

**Bakterielle 2,4-Dioxygenasen:  
Untersuchungen zur Aufklärung des  
Katalysemechanismus der cofaktorfreen  
1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase**

---

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften  
der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg  
zur Erlangung des Grades und Titels eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

DR. RER. NAT.

angenommene Dissertation

von Frau Ursula Frerichs-Deeken  
geboren am 15.04.1966 in Oldenburg

Gutachterin: Prof. Dr. S. Fetzner  
Zweitgutachterin: apl. Prof. Dr. I. Witte  
Tag der Disputation: 25.02.2008

## Danksagung

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde vom April 2000 bis April 2004 unter Leitung von Frau Prof. Dr. S. Fetzner in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie des Fachbereichs 7 der Carl von Ossietzky Universität in Oldenburg angefertigt.

Frau Prof. Dr. Susanne Fetzner danke ich für die Überlassung des außergewöhnlichen Themas, ihre ständige Diskussionsbereitschaft, ihre großzügige Unterstützung und die gewährte Freiheit bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau apl. Prof. Dr. Irene Witte, Arbeitsgruppe Umwelttoxikologie der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, danke ich für die Übernahme meiner Betreuung in Oldenburg ab November 2002, wodurch sie mir die Fortsetzung meiner Arbeit ermöglichte.

Frau H.-Doz. Dr. Luise Berthe-Corti, Arbeitskreis Mikrobiologie/Biotechnologie der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, und ihren Mitarbeitern danke ich für die freundliche Aufnahme in ihren Kreis. Danke an Lilli, Rainer, Uwe, Marcus, Simone und Barbara, ihr habt mich quasi adoptiert. Ich danke euch nicht nur für eure fachliche Unterstützung, sondern auch für eure Menschlichkeit und die vielen kleinen Dinge die ein angenehmes und produktives Arbeitsklima ausmachen.

Bei Dr. Reinhard Kappl, Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes, bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Anfertigung und Interpretation der ESR-Spektren.

Dr. Roberto Steiner, Randall Division of Cell & Molecular Biophysics at King's College London, danke ich für seine Ausdauer bei den unzähligen Kristallisationsexperimenten.

Ein ganz spezieller Dank geht an Katja, Sonja und Birgit für die schöne Zeit in Oldenburg. Eure fachliche Kompetenz und auch euren Humor habe ich sehr genossen. Ihr habt mir einige sehr schöne Erinnerungen geschenkt.

Renate Gahl-Janßen danke ich für die vielen Proteinreinigungen, ihren unermüdlichen Einsatz und ihre Hilfestellung in jeglicher Lebenslage. Die vielen Gespräche über Gott und die Welt haben mir Spaß gemacht und viel Hoffnung gegeben. Danke das du für mich da warst.

Mehr als ein Dank geht an meine Familie. Lieber Hartmut, danke für deine Großzügigkeit und Unterstützung. Lieber Arne wenn Du dies irgendwann einmal lesen solltest. Denk daran, du kannst viel mehr als du und andere glauben. Mein größter Wunsch ist es mit euch noch viele glückliche Jahre zu erleben.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Schemaverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Sauerstoff in biologischen Systemen.....	1
1.2 Bakterielle cofaktorfreie 2,4-Dioxygenasen .....	6
1.3 Aufgabenstellung .....	9
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>11</b>
2.1 Abkürzungen.....	11
2.2 Definitionen .....	13
2.3 Geräte .....	13
2.4 Chemikalien, Enzyme und sonstige Materialien .....	14
2.5 Puffer und Lösungen.....	15
2.6 Expressionssysteme .....	16
2.7 Bakterienkulturen und Zellzüchtungen .....	17
2.8 Allgemeine DNA-Techniken.....	18
2.9 Molekularbiologische Manipulation der Expressionsvektoren .....	19
2.9.1 Konstruktion von pQE-50:: <i>hod</i> -Varianten.....	19
2.9.2 Konstruktion von pQE-30:: <i>hod</i> -Varianten.....	21
2.9.3 Sequenzanalysen und gerichtete ortsspezifische Mutagenese .....	22
2.10 Präparation zellfreier Rohextrakte .....	23
2.11 Proteinbestimmung.....	26
2.12 Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	26
2.13 Proteinreinigung.....	26
2.14 Untersuchungen zur Enzymaktivität der Hod .....	28
2.14.1 Enzymtest.....	28
2.14.2 Bestimmung molarer Extinktionskoeffizienten.....	29
2.14.3 Qualitativer Nachweis der Enzymaktivität .....	29
2.14.4 Umsetzbarkeit alternativer Substrate .....	29
2.14.5 Untersuchungen zur Langzeit-, pH- und pD-Stabilität.....	29
2.15 Untersuchungen zur Kinetik der enzymkatalysierten 2,4-Dioxygenolyse.....	30
2.15.1 Ermittlung kinetischer Konstanten.....	30
2.15.2 Analyse kinetischer Meßdaten .....	31
2.15.3 pH- und pD-Wert-Abhängigkeit der kinetischen Konstanten.....	32
2.15.4 Einfluß der Viskosität auf kinetische Konstanten .....	33
2.16 Einfluß von Detergenzien und Reduktionsmittel auf Hod .....	33
2.17 UV/Vis-Absorptionsspektroskopie.....	34
2.18 ESR-Spektroskopie der Modellreaktion und der Enzymreaktion.....	34

2.19	Homologie-Struktur-Modellierung der 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	Expression und Charakterisierung unterschiedlicher Hod-Varianten	37
3.1.1	HodA	37
3.1.2	HodB	39
3.1.3	HodC	40
3.1.4	His <sub>6</sub> HodC	40
3.1.5	His <sub>6</sub> <sup>xa</sup> HodC	41
3.2	Kinetik der Hod-katalysierten 2,4-Dioxygenolyse	42
3.2.1	Umsetzung des physiologischen Substrates 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin	42
3.2.2	Umsetzbarkeit alternativer Substrate	44
3.2.3	Umsetzung des alternativen Substrates 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinolin	45
3.2.4	Produktthemmstudien	46
3.2.5	pH-, pD- und Viskositätseffekte	48
3.3	Physikalische Charakterisierung der 2,4-Dioxygenolyse	50
3.3.1	Säurekonstanten der Substrate	50
3.3.2	UV/Vis-Spektren äquimolarer Mischungen von Enzym und Substrat	51
3.3.3	UV/Vis-Spektren der basenkatalysierten Modellreaktionen	52
3.3.4	ESR-Spektren der Modellreaktion	54
3.3.5	ESR-Spektren der Enzymreaktion	57
3.4	Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Hod	57
3.4.1	Konservierte Sequenzbereiche der bakteriellen 2,4-Dioxygenasen	58
3.4.2	Theoretische Strukturmodelle der 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase	66
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1	Reaktive Intermediate der chemischen 2,4-Dioxygenolyse	71
4.2	Mechanismus der enzymatischen 2,4-Dioxygenolyse	73
4.2.1	Substratbindung und Produktfreisetzung	73
4.2.2	Basenkatalysierte Substrataktivierung und Radikalpaarbildung	77
4.2.3	Bakterielle 2,4-Dioxygenasen besitzen keine klassische Triade	82
4.2.4	Die Funktion eines konservierten Tyrosin-Restes der <i>cap-domain</i>	84
4.3	Hypothesen zur Struktur-Funktions-Beziehung in Hod	85
4.4	Ausblick	89
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>94</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Räumliche Darstellung der $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung.....	7
Abbildung 2: Sekundärstruktur-Diagramm der $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung.....	8
Abbildung 3: Restriktionskarten der Plasmide pQE-30, pQE-50 und pREP4 (nach QIAGEN 2001).	16
Abbildung 4: Restriktionskarten der Expressionsvektoren pQE-30m2:: <i>hod</i> und pQE-50m2:: <i>hod</i> ..	19
Abbildung 5: Flankierende Sequenzbereiche der <i>hod</i> -Inserts in den Expressionsvektoren und Aminosäuresequenzen der exprimierten Hod-Varianten.....	21
Abbildung 6: Native PAGE rekombinanter Hod-Proteine.....	37
Abbildung 7: Lineweaver-Burk-Plot der Reaktion von HodC mit 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin .....	42
Abbildung 8: Lineweaver-Burk-Plot der Reaktion von HodC mit 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinolin .....	45
Abbildung 9: Hanes Plot der Reaktion von HodC mit 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinolin .....	46
Abbildung 10: pH/pD-Abhängigkeit der katalytischen Konstanten $k_{catO_2}^{app} / K_{mO_2}^{app}$ von His <sub>6</sub> HodC.....	48
Abbildung 11: pH/pD-Abhängigkeit der katalytischen Konstanten $k_{catA}^{app} / K_{mA}^{app}$ von His <sub>6</sub> HodC.....	49
Abbildung 12: pH-Abhängigkeit der UV/Vis Spektren von 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin .....	50
Abbildung 13: UV/Vis Spektren von HodC und HodC-H251A mit 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin ...	52
Abbildung 14: UV/Vis Spektren der basenkatalysierten Modellreaktionen in DMF .....	53
Abbildung 15: UV/Vis Spektren der basenkatalysierten Modellreaktion in H <sub>2</sub> O .....	53
Abbildung 16: ESR Spektren der Anionradikale von 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin und 1 <i>H</i> -3- Hydroxy-4-oxo-2-phenylchinolin .....	54
Abbildung 17: ESR-Spektren von BMPO-Spin-Addukten in Tris-HCl Puffer .....	56
Abbildung 18: ESR-Spektren der <sup>t</sup> BuOK katalysierten Modellreaktion von 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4- oxochinaldin in Tris-HCl Puffer .....	56
Abbildung 19: Phylogramm cofaktorfreier bakterieller 2,4-Dioxygenasen und strukturbekannter $\alpha/\beta$ - Hydrolasen.....	58
Abbildung 20: Phylogramm cofaktorfreier bakterieller 2,4-Dioxygenasen und putativer cofaktorfreier Oxygenasen mit postulierter $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung.....	59
Abbildung 21: Aminosäuresequenz-Alignment bakterieller 2,4-Dioxygenasen und Epoxid- Hydrolasen mit bekannter Tertiärstruktur .....	61
Abbildung 22: Aminosäuresequenz-Alignment bakterieller 2,4-Dioxygenasen und putativer cofaktorfreier Oxygenasen mit postulierter $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung.....	62
Abbildung 23: Anordnung und Vergleich der Sekundärstruktur-Elemente verschiedener theoretischer Struktur-Modelle der 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase ..	67
Abbildung 24: Theoretische 3D-Strukturmodelle der 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase und mit vergrößerten Darstellungen der potentiellen aktiven Zentren .....	68

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Plasmide zur Expression unterschiedlicher Hod-Varianten .....	17
Tabelle 2: Hod-Varianten generiert mittels ortsspezifischer Mutagenese .....	24
Tabelle 3: Primer zur ortsspezifischen Mutagenese ausgesuchter Codons im Gen <i>hod</i> .....	25
Tabelle 4: Apparente kinetische Konstanten von HodC .....	43
Tabelle 5: Absolute kinetische Konstanten der Reaktion von HodC mit dem physiologischen Substrat 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin .....	44
Tabelle 6: Absolute kinetische Konstanten von HodC mit einem alternativen Substrat 1 <i>H</i> -3- Hydroxy-4-oxochinolin .....	46
Tabelle 7: Produkthemmung der Reaktion von HodC mit 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinolin .....	47
Tabelle 8: Simulationsparameter und postulierte Radikalstruktur von 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin und 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxo-2-phenylchinolin .....	55
Tabelle 9: Kinetische Parameter verschiedener Hod-Varianten .....	70

## Schemaverzeichnis

Schema 1: Reduktionsstufen des Sauerstoffs .....	1
Schema 2: Formen der Aromatenspaltung durch Dioxygenasen .....	2
Schema 3: Reaktionen cofaktorfreier Oxygenasen und Oxidasen .....	5
Schema 4: Abbau von Chinaldin und 4-Chinolon über den Anthranilsäureweg .....	6
Schema 5: Reaktionen der Oxygenasen vom Faltungstyp der $\alpha/\beta$ -Hydrolasen .....	7
Schema 6: Strukturformeln potentieller Substrate und des Spin-traps BMPO .....	14
Schema 7: Abfolge der Substrat-Bindung und Produkt-Freisetzung der 1 <i>H</i> -3-Hydrox-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase .....	47
Schema 8: Postulierte Abfolge der Reaktion der 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase .	79

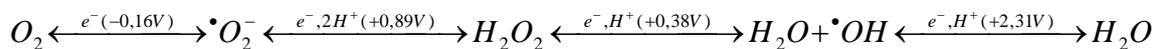
# 1 Einleitung

## 1.1 Sauerstoff in biologischen Systemen

Molekularer Sauerstoff, das zweithäufigste Gas der Erdatmosphäre, nimmt im Metabolismus aerober Organismen eine zentrale Rolle ein. Die 4-Elektronen-Reduktion von  $O_2$  zu  $2 H_2O$ , mit einem Standard-Reduktionspotential  $E_0'$  (bei pH 7, 25°C) von +0,815 Volt (SAWYER 1991), ist ein stark exothermer, thermodynamisch begünstigter Vorgang, der es aeroben Organismen ermöglicht mittels oxidativer Phosphorylierung mit  $O_2$  als Elektronenakzeptor weitaus höhere Mengen biochemisch verfügbarer Energie in Form von ATP aus der Nahrung zu generieren als es über anaerobe Atmung oder Gärung möglich wäre.

Reaktivität und Nutzbarkeit von  $O_2$  in biologischen Systemen wird von dessen chemisch-physikalischen Eigenschaften bestimmt. Die monovalente Reduktion von  $O_2$  zum Superoxid ( $\bullet O_2^-$ ) ist ein endothermer Prozess (KAHN & TIPTON 1997; PETLICKI & VAN DE VEN 1998; SAWYER & VALENTINE 1981) und verhindert als thermodynamische Barriere die spontane Reaktion mit reduzierten Verbindungen (HO et al. 1995; KAHN & TIPTON 1998). Des Weiteren kann  $O_2$ , der in seinem Grundzustand als Triplett-Biradikal mit parallelem Elektronenspin vorliegt, nicht direkt mit überwiegend in Singulett-Konfiguration vorliegenden organischen Molekülen reagieren, ohne die Spin-Erhaltungsregel zu verletzen (HAMILTON 1974). Die Überwindung der thermodynamischen Barriere und der Spin-Erhaltungsregel kann über die reaktiven Sauerstoff-Formen Superoxidanion-Radikal ( $\bullet O_2^-$ ), Peroxidion ( $O_2^{2-}$ ) und dem Hydroxylradikal ( $\bullet OH$ ) erfolgen (SAWYER 1991, Schema 1). Eine untergeordnete Rolle in biologischen Systemen spielt Singulett-Sauerstoff, der sowohl chemisch, physikalisch oder enzymatisch gebildet werden kann (ALLEN 1994; DJORDJEVIC 2004; KANOFKY 1989; KHAN et al. 1983; KLEBANOFF 2005; NAQUI et al. 1986; ULLRICH 1984), aber aufgrund seiner Elektronenstruktur gegenüber organischen Molekülen sehr reaktiv ist und sich daher nicht in der Erdatmosphäre anreichern konnte (WASSERMANN & MURRAY 1978).

Schema 1: Reduktionsstufen des Sauerstoffs



Standard-Reduktionspotentiale in Klammern:  $E_0'$  vs. NHE, pH 7,25°C; SAWYER (1991)

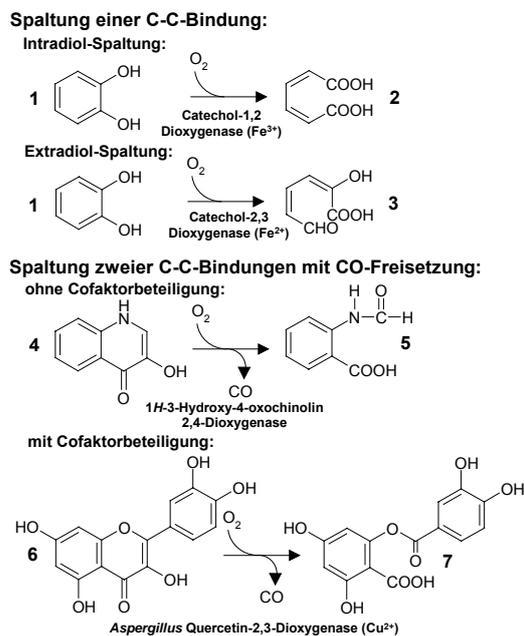
Die zelluläre Biochemie des Sauerstoffs ist in ihrer Auswirkung auf den Organismus sehr ambivalent. Einerseits ermöglicht die aerobe Lebensweise im Vergleich zur anaeroben Lebensweise eine effizientere Verwertung der Nahrung und die Durchführung unterschiedlicher oxidativer Biotransformationen. Andererseits entstehen bei der  $O_2$ -Reduktion Derivate (vgl. Schema 1), die oxidative Schäden an Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden und anderen Zellkomponenten verursachen können (FRIDOVICH 1998; VALENTINE et al. 1998). Eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung des aeroben Lebens auf der Erde war daher die Entwicklung von Systemen, die sowohl Reaktionen des  $O_2$ , aber auch die Bildung, die Freisetzung oder die Akkumulation reaktiver Sauerstoff-Formen kontrollieren. Wichtige Enzyme In diesem

Zusammenhang sind Katalase (EC 1.11.1.6;  $2H_2O_2 = O_2 + 2H_2O$ ), Peroxidase (EC 1.11.1.7;  $Donor^{red.} + H_2O_2 = Donor^{ox.} + 2H_2O$ ) oder Superoxid-Dismutase (EC 1.15.1.1;  $2\bullet O_2^- + 2H^+ = O_2 + 2H_2O$ ). Oxidasen nutzen molekularen Sauerstoff als Oxidationsmittel und setzen bei ihren Reaktionen  $H_2O_2$  oder  $H_2O$  frei. Enzyme dieser Gruppe finden sich z. B. in der aeroben Atmungskette und im Stoffwechsel von Neurotransmittern oder Purinen. Oxygenasen wiederum katalysieren den Einbau eines (Monoxygenasen) oder beider (Dioxygenasen) O-Atome aus  $O_2$  in ihre Substrate. Lipide, Aminosäuren, Nukleinsäuren, Vitamine und Hormone werden auf diese Weise für weitergehende biochemische Modifikationen vorbereitet (STRYER 1996).

Die Spaltung natürlicher aromatischer Verbindungen mit Hilfe von Sauerstoff ist eine im globalen Kohlenstoffkreislauf häufig durchgeführte Reaktion. Den größten Anteil nimmt dabei der Abbau von Lignin durch Pilze und Bakterien ein. Mit unterschiedlicher Effizienz können aber auch synthetische Aromaten abgebaut werden. Ein vollständiger oder partieller Einbau von molekularem Sauerstoff in Aromaten und *N*-Heteroaromaten wie Benzol, Chinolin, Chinaldin, Isochinolin oder Xanthin repräsentiert häufig einen essentiellen Schritt zum mikrobiellen Abbau dieser Verbindungen

(FETZNER 2000). In der organischen Chemie finden sich entsprechende Reaktionen mit molekularem Sauerstoff kaum. Aromaten sind aufgrund ihrer delokalisierten  $\pi$ -Elektronen sehr stabil und lassen sich biologisch nur über mehrere Schritte spalten. Der mikrobielle aerobe Abbau aromatischer Verbindungen erfolgt in der Regel über zwei Basisschritte. Nach einer einleitenden Oxidation des Ringes zum Catechol- oder Hydrochinonderivat durch Mono- oder Dioxygenasen erfolgt im zweiten Schritt die, nach heutigem Erkenntnisstand nur von Dioxygenasen katalysierte Spaltung des aromatischen Ringes (BUGG 2003; VAILLANCOURT et al. 2006). Für die aerobe Aromatenspaltung sind verschiedene Spaltungsmodi bekannt (Schema 2). Catechol-Dioxygenasen repräsentieren eine weitverbreitete und intensiv untersuchte Gruppe der ringspaltenden Dioxygenasen (BRODERICK

Schema 2: Formen der Aromatenspaltung durch Dioxygenasen



1 Catechol, 2 *cis-cis*-Muconat, 3 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd, 4 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin 5 *N*-Formylantranilsäure, 6 Quercetin, 7 Phenol-carboxylsäureester.

1999; BUGG & LIN 2001). Die intradiol spaltenden Catechol-Dioxygenasen, mit ihren typischen Vertretern Catechol-1,2-Dioxygenase (EC 1.13.11.1) und Protocatechuat-3,4-Dioxygenase (EC 1.13.11.3), besitzen in der Regel  $Fe^{3+}$  als Cofaktor und spalten eine C-C-Bindung zwischen zwei benachbarten Hydroxyl-Gruppen. Im Gegensatz dazu nutzen die extradiol spaltenden Catechol-

Dioxygenasen, repräsentiert durch Catechol-2,3-Dioxygenase (EC 1.13.11.2) oder Protocatechuat-4,5-Dioxygenase (EC 1.13.11.8),  $\text{Fe}^{2+}$  als Cofaktor. Sie katalysieren die Spaltung einer C-C-Bindung in direkter Nachbarschaft zu einem Hydroxyl-Paar. Seltener anzutreffen ist die konzertierte Spaltung zweier C-C-Bindungen unter Freisetzung von Kohlenmonoxid, wie sie für die Metall-haltigen Flavonol-2,4-Dioxygenasen (Quercetinasen; EC 1.13.11.24) aus *Aspergillus niger* ( $\text{Cu}^{2+}$ ; HUND et al. 1990) und aus *Bacillus subtilis* ( $\text{Mn}^{2+}$ , Aktivität auch mit  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$ ; SCHAAAB et al. 2006) sowie für die cofaktorfreen bakteriellen 2,4 Dioxygenasen 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin 2,4-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* 33/1 (Qdo; EC 1.13.11.47) und 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase aus *Arthrobacter nitroguajocolicus* R61a (ehemals *A. ilicis* R61a) (Hod; EC 1.13.11.48) nachgewiesen wurde (BAUER et al. 1994; BAUER et al. 1996).

In der Regel besitzen Oxidasen und Oxygenasen metallische Cofaktoren wie Fe-, Cu-, seltener Mn-Zentren (BUGG 2003), organische Cofaktoren wie Flavin, Pterin oder Chinone (FITZPATRICK 1999; KLINMAN & MU 1994; MASSEY 1994) oder Kombinationen aus einem Metallion komplexiert mit einem organischen Teil (Häm). In jüngerer Zeit entdeckte, sogenannte endogene Cofaktoren, sind durch posttranslationale Modifikationen von Aminosäuren gebildete Chinon-Cofaktoren (OKELEY & VAN DER DONK 2000) und Radikale der AS-Reste Tyr, Gly, Trp oder Cys (STUBBE & VAN DER DONK 1998).

Häm und Flavin werden von einigen Enzymen nicht als kovalent gebundene oder dauerhaft chelatierte Cofaktoren, sondern als Cosubstrate verwendet. Prinzipiell katalysieren die Cosubstrate mit Hilfe des Enzym-Proteingerüsts ihre eigene Oxidation oder sogar Spaltung unter  $\text{O}_2$ -Reduktion. Die Häm-Oxygenase (EC 1.14.99.3, RIVERA & ZENG 2005; WILKS 2002; Schema 3 G) ist beteiligt am Abbau des Häms mit dem Ziel der Fe-Freisetzung. Im Syntheseweg von Vitamin  $\text{B}_{12}$  spaltet BluB das Cosubstrat  $\text{FMNH}_2$  in Anwesenheit von  $\text{O}_2$  unter anderem zu 5,6-Dimethylbenzimidazol, einem Liganden des Vitamin  $\text{B}_{12}$  (TAGA et al. 2007; Schema 3 C). Die Mehr-Komponenten-Flavoprotein-Monooxygenasen bestehen in der Regel aus zwei separaten Enzymen. Eine Reduktase-Komponente katalysiert die Reduktion von Flavin. Die cofaktorfrie Oxygenase-Komponente nutzt reduziertes Flavin als Substrat zur Aktivierung molekularen Sauerstoffs (VAN BERKEL et al. 2006). Als erste Mehr-Komponenten-Flavoprotein-Monooxygenase wurde die bakterielle Luciferase beschrieben (EC 1.14.14.3, Alkan-Monooxygenase, FISHER et al. 1995; FISHER et al. 1996; Schema 3 D).

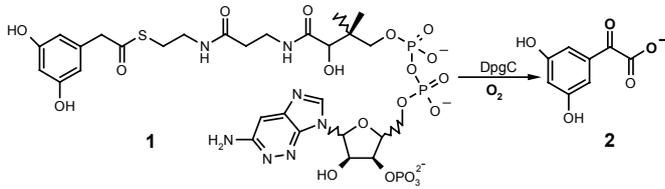
Die wesentlichen Funktionen der Cofaktoren bzw. Cosubstrate sind Sauerstoffaktivierung, Unterstützung eines Spin-Flips im molekularen Sauerstoff, aber auch die Stabilisierung bzw. Bindung reaktiver Intermediate zur Vermeidung unkontrollierter Reaktionen mit Zellkomponenten.

Lange Zeit wurde die Möglichkeit cofaktor-unabhängiger  $\text{O}_2$ -Aktivierung in biologischen Systemen als nicht realisiert betrachtet. Beispiele für cofaktorfrie Oxygenasen und Oxidasen, deren Aktivitäten nicht auf bekannte Cofaktoren zurückzuführen sind, gibt es bisher nur relativ wenige. Neben den bakteriellen 2,4-Dioxygenasen (Schema 5) sind weitere cofaktorfrie Oxygenasen und Oxidasen beteiligt an der Biosynthese verschiedener Antibiotika (Schema 3 A und B), organischer Cofaktoren oder Vitamine (Schema 3 E und F), der posttranslationalen Modifikationen von Sulfatasen (Schema 3 I), am Abbau von Chinolin-Derivaten (Schema 5 A) aber auch an

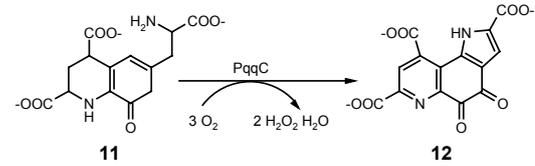
biolumineszenten Reaktionen (Schema 5 B). Cofaktorfreie  $O_2$ -nutzende Enzyme entstammen sehr unterschiedlichen Enzymfamilien, so dass eine voneinander unabhängige Entwicklung der Enzyme vorliegt. Für cofaktorfreie Oxidasen und Oxygenasen, die als Substrate nicht die bekannten Cofaktoren Häm und reduziertes Flavin nutzen, stellt sich insbesondere die Frage, auf welche Art und Weise die elementaren Schritte  $O_2$  Aktivierung, Spinflip und Stabilisierung reaktiver Intermediate erfüllt werden können.

Schema 3: Reaktionen cofaktorfreier Oxygenasen und Oxidasen

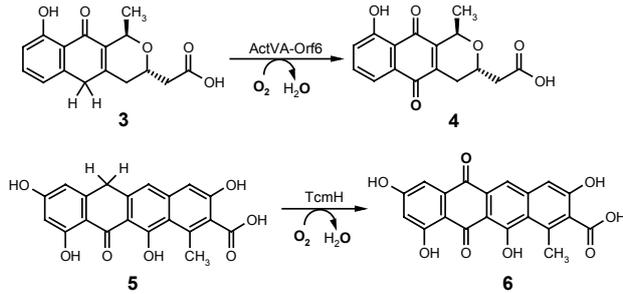
A) Reaktion der DpgC-1,2-Dioxygenase (DpgC) in der Vancomycin-Biosynthese



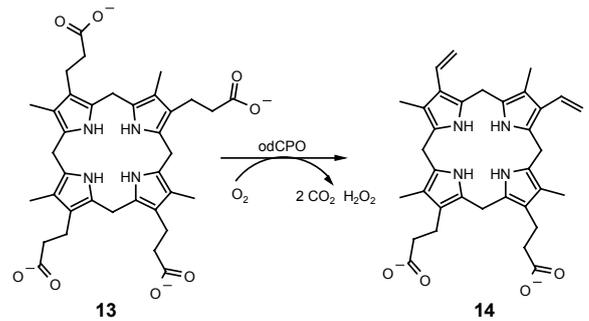
E) Reaktion der Pyrolochinolinchinon Synthase C (PqqC) in der Synthese des Cofaktors und bakteriellen Vitamins PQQ



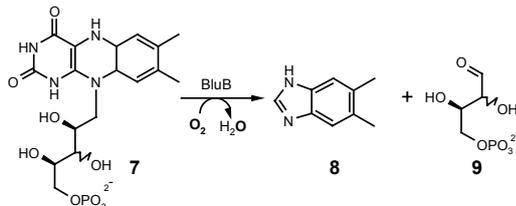
B) Reaktionen von ActVA-Orf6-Monooxygenase (ActVa-Orf6) und Tetracenomycin-F1-Monooxygenase (TcmH) in der Polyketid-Synthese



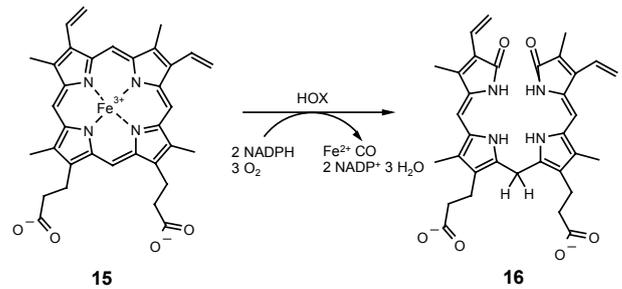
F) Reaktion der O<sub>2</sub>-abhängigen Coproporphyrinogen-Oxidase (odCPO) in der Häm Biosynthese



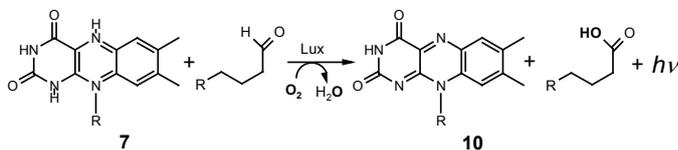
C) Reaktion der "Flavin Destructase" (BluB) zur Synthese des Vitamin B<sub>12</sub> Liganden



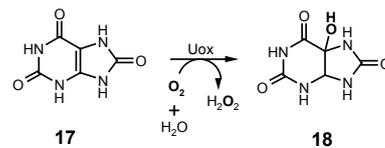
G) Reaktion der Häm Oxygenase (HOX) im Häm-Abbau



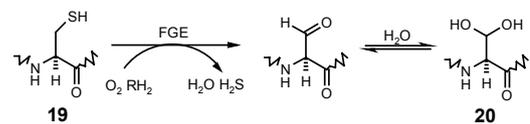
D) Reaktion der Bakteriellen Luciferase (Lux)



H) Reaktion der Urat-Oxidase (Uox)



I) Reaktion des Formylglycin-bildenden Enzyms (FGE) - posttranslationale Modifikation eukaryontischer Sulfatasen -

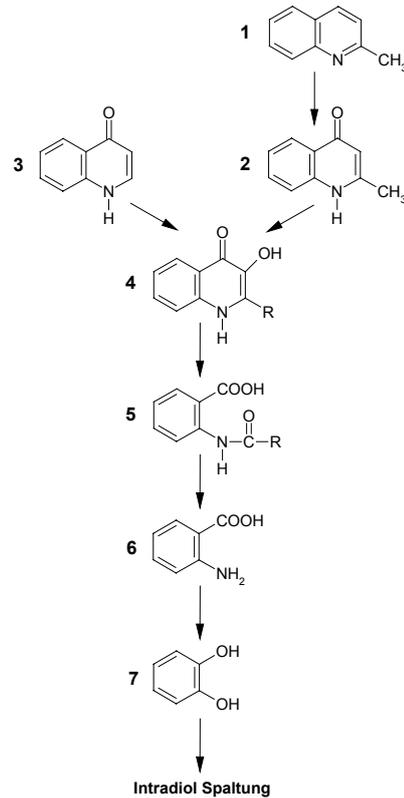


**A)** **1** 3,5-Dihydroxyphenylacetat-CoA, **2** 3,5-Dihydroxyphenylglyoxylat (DpgC: TSENG et al. 2004, Crotonase Superfamilie), **B)** **3** 6-Desoxydihydrokalafungin, **4** Dihydrokalafungin, **5** Tetracenomycin F1, **6** Tetracenomycin D3 (ActVA-Orf6 und Tcm: SCIARA et al. 2003; SHEN & HUTCHINSON 1993, Antibiotika-Biosynthese-Monooxygenase-Familie), **C)** **7** reduziertes Flavinmononukleotid, **8** 5,6-Dimethylbenzimidazol, **9** D-Erythrose-4-Phosphat (BluB: TAGA et al. 2007, Nitroreduktase / Flavin-Oxidoreduktase Familie), **D)** **10** oxidiertes Flavinmononukleotid (Bakterielle Luciferase: FISHER et al. 1995; FISHER et al. 1996, EC 1.14.14.3, Bakterielle Luciferasen Familie), **E)** **11** 3a-(2-Amino-2-carboxyethyl)-4,5-dioxo-4,5,6,7,8,9-hexahydrochinolin-7,9-di-Carbonsäure, **12** Pyrolochinolinchinon (PqqC: MAGNUSSON et al. 2007, Häm-Oxygenase ähnliche Enzyme), **F)** **13** Koproporphyrinogen-III, **14** Protoporphyrinogen-IX (odCPO: LEE et al. 2005; PHILLIPS et al. 2004, EC 1.3.3.3), **G)** **15** Häm, **16** α-Bilirubin (HOX: RIVERA & ZENG 2005; WILKS 2002, EC 1.14.99.3) **H)** **17** Urat, **18** 5-Hydroxyurat (Urat Oxidase: COLLOCHH et al. 1997; KAHN & TIPTON 1997, EC 1.7.3.3, Tetrahydrobiopterin-Biosynthese Superfamilie), **I)** **19** Cystein-Rest, **20** Formylglycin-Rest (ROESER et al. 2006)

## 1.2 Bakterielle cofaktorfreie 2,4-Dioxygenasen

Die cofaktorfreien bakteriellen 2,4-Dioxygenasen 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin 2,4-Dioxygenase (Qdo, Monomer 30 kDa, EC 1.13.11.47) und 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase (Hod, Monomer 32 kDa, EC 1.13.11.48) sind beteiligt am Abbau von 4-Chinolon durch *Pseudomonas putida* 33/1 bzw. Chinaldin durch *Arthrobacter nitroguajolicus* R61a (ehemals *A. ilicis* R61a) über den Anthranilsäureweg (Schema 4, FETZNER 2000; 2002; OVERHAGE et al. 2005). Sie katalysieren, unter CO-Freisetzung, den Einbau beider Atome aus O<sub>2</sub> an die Ring-Positionen C-2 und C-4 ihrer aromatischen Substrate, einhergehend mit der Spaltung zweier C-C-Bindungen (Schema 5 A, BAUER et al. 1996), im Gegensatz zur einfachen C-C-Spaltung anderer bekannter ringspaltender Dioxygenasen. Aminosäuresequenz-Analysen und Strukturvorhersagen unterstreichen die Besonderheit der cofaktorfreien 2,4-Dioxygenasen da keine Homologie zu bekannten ringspaltenden Dioxygenasen festgestellt wurde (FISCHER et al. 1999). Stattdessen konnten Qdo und Hod der Enzym-Superfamilie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung zugeordnet werden, deren Mitglieder nur geringe Sequenz-, Funktions- und Substratübereinstimmungen untereinander zeigen (NARDINI & DIJKSTRA 1999; OLLIS et al. 1992). Die Entwicklung der Superfamilie erfolgte vermutlich durch divergente Evolution eines gemeinsamen Ursprungs-Proteins wobei die Selektion der Proteine eher auf eine Konservierung der strukturgebundenen katalytischen Maschinerie („katalytische Triade“, s. u.) zielte und nicht auf eine Konservierung der Sequenz (O'BRIEN & HERSCHLAG 1999; TODD et al. 2001). Unterfamilien innerhalb der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungs-Familie bilden z. B. die Epoxid-Hydrolasen, Aminopeptidasen, C-C-Hydrolasen, Lyasen, bakterielle Lipasen, Peptidasen und  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen (HOTELIER et al. 2004, <http://bioweb.enscm.inra.fr/esther>). Neben den bakteriellen 2,4-Dioxygenasen Hod und Qdo ist bisher nur die Luciferin-2-Monooxygenase (Renilla-Luciferase, EC 1.13.12.5) aus *Renilla reniformis* als weiteres O<sub>2</sub>-abhängiges Enzym der Superfamilie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen-Faltung zugeordnet worden (LORENZ et al. 1991; MATTHEWS et al. 1977). In der Subfamilie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen befinden sich zur Zeit (Stand Oktober 2007) ca. 3200 Protein-Sequenzen mit 19 bekannten Strukturen. Nach Abschluß des praktischen Teils dieser Arbeit wurden die vorhergesagten  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungen der Renilla-Luciferase (PDB-ID: 2PSD) von der Arbeitsgruppe um Sanjiv Sam Gambhir (Stanford University, Palo Alto, USA) und der

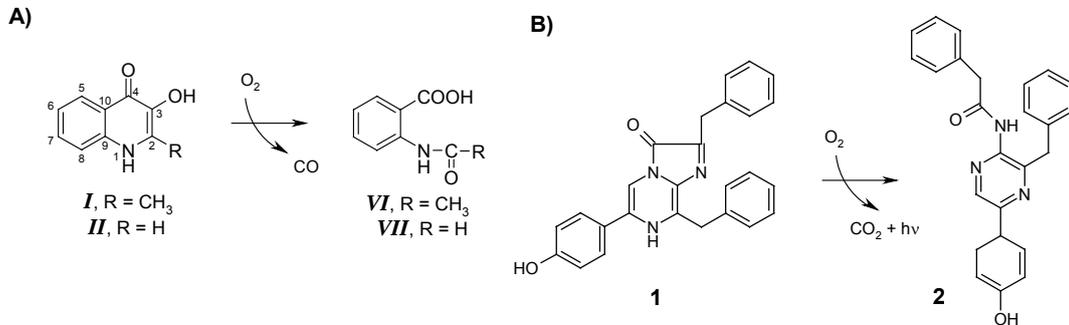
Schema 4: Abbau von Chinaldin und 4-Chinolon über den Anthranilsäureweg



1 Chinaldin, 2 1*H*-4-Oxochinaldin, 3 4-Chinolon, 4 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin (R=H) / -chinaldin (R=CH<sub>3</sub>), 5 *N*-Formylanthranilsäure (R=H) / *N*-Acetylanthranilsäure (R=CH<sub>3</sub>), 6 Anthranilsäure, 7 Catechol (FETZNER 2002)

cofaktorfreien 2,4-Dioxygenasen (Qi et al. 2007; STEINER et al. 2007) mittels Röntgenstrukturanalysen bestätigt. Die Strukturdaten der bakteriellen 2,4-Dioxygenasen sind noch nicht veröffentlicht.

Schema 5: Reaktionen der Oxygenasen vom Faltungstyp der  $\alpha\beta$ -Hydrolasen



**A)** Reaktionen katalysiert von den bakteriellen cofaktorfreien 2,4-Dioxygenasen 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase (Hod, Substrat **I**) und 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin 2,4-Dioxygenase (Qdo, Substrat **II**); (**I**) 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin; (**II**) 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin; (**VI**) *N*-Acetyl-anthranilsäure; (**VII**) *N*-Formyl-anthranilsäure.  
**B)** Reaktion katalysiert von der Luciferin-2-Monooxygenase (**1** Renilla-Luciferin reduziert, **2** Renilla Luciferin oxidiert)

Die Superfamilie der  $\alpha\beta$ -Hydrolase-Faltung ist die bislang umfangreichste aber auch funktionell variantenreichste Enzymgruppe (BUGG 2004; HOLMQUIST 2000), deren Mitglieder im Kern eine identische Tertiärstruktur (*core-domain*) aufweisen. Eine zentral gelegene in sich verdrehte Faltblattstruktur bestehend aus acht vorwiegend parallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta 2$  antiparallel;  $\beta 1, \beta 3$ - $\beta 8$  parallel) wird an beiden Seiten von  $\alpha$ -Helices ( $\alpha A$ - $\alpha F$ ) und Loops eingerahmt (Abbildung 1).

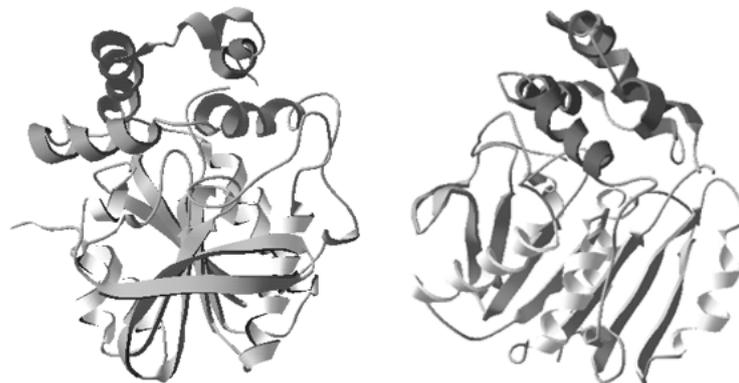


Abbildung 1: Räumliche Darstellung der  $\alpha\beta$ -Hydrolase-Faltung  
 Beispiel: Epoxid-Hydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1 (PDB-ID: 1EHY; NARDINI et al. 1999). Ansicht aus zwei verschiedenen Blickwinkeln. Abbildung erstellt mit Swiss-PDB-Viewer (GUEx & PEITSCH 1997).  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter der *core-domain* sind in Hell- und Mittelgrau, die Helices der *cap-domain* in Dunkelgrau dargestellt

Variable Elemente der  $\alpha\beta$ -Hydrolase-Faltung sind Insertionen vorwiegend zwischen Faltblatt  $\beta 6$  und Helix  $\alpha D$ , seltener auch zwischen  $\beta 4/\alpha B$  und  $\beta 7/\alpha E$  (Abbildung 2), die sich zu *caps*, *lids* oder *flaps* oberhalb der *core-domain* formieren können. Die *cap-domain* trägt wesentlich zur

Substratspezifität bei und/oder kontrolliert den Zugang zum aktiven Zentrum (HEIKINHEIMO et al. 1999; NARDINI & DIJKSTRA 1999).

Die katalytisch relevanten AS-Reste der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen bilden eine konservierte katalytische Triade bestehend aus einem nukleophilen AS-Rest (Ser, Cys oder Asp), der innerhalb einer Konsensussequenz (Sm-X-Nu-Sm-Sm; Sm = kleine AS, Nu = nukleophile AS, X = beliebige AS) an der Spitze eines nukleophilen Ellenbogens (*nucleophile elbow*) liegt, einem strikt konservierten His-Rest und einer sauren Aminosäure. Ein weiteres Element, die Oxyanion-Tasche (*oxyanion hole*) welches ein negativ geladenes Intermediat stabilisiert, wird gebildet aus zwei Amidgruppen des Protein-Rückgrates. Beteiligt sind hieran der direkt dem Nukleophil folgende AS-Rest ( $\text{Nu}^{+1}$ ) und ein zwischen dem Faltblatt  $\beta 3$  und der Helix  $\alpha A$  lokalisierter AS-Rest (Abbildung 2). Die Oxyanion-Tasche muß nicht zwangsläufig im substratfreien Enzym existent sein, sondern kann als Element

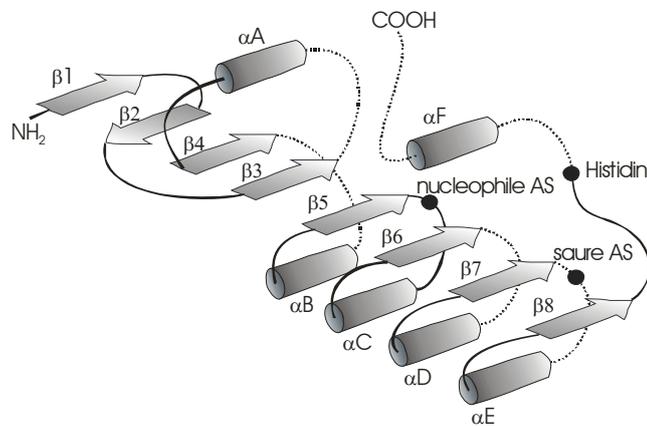


Abbildung 2: Sekundärstruktur-Diagramm der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung  
Zylinder =  $\alpha$ -Helices, Pfeile =  $\beta$ -Faltblätter, Punkte = Position der Katalytischen Triade, gepunktete Linien = Positionen möglicher Insertionen (OLLIS et al. 1992).

eines beweglichen Loops erst im Zuge der Substratbindung die notwendige Konformation und/oder Position einnehmen (HOLMQUIST 2000; NARDINI & DIJKSTRA 1999).

Sowohl Hod als auch Qdo besitzen einen His-Rest entsprechend dem konserviertem His-Rest der katalytischen Triade der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen, sowie ein Serin als potentielles Nukleophil innerhalb einer Sequenz korrespondierend zum nukleophilen Ellenbogen. Mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese wurde für Qdo die katalytische Relevanz des konservierten His-Restes ( $\text{H}^{244}$ ) nachgewiesen (FISCHER et al. 1999). Eine der katalytischen Triade entsprechende saure Aminosäure konnte bisher nicht nachgewiesen werden. FISCHER & FETZNER (2000) postulierten für die 2,4-dioxygenolytische Ringspaltung durch Qdo einen Mechanismus in Analogie zur Reaktion der bakteriellen Luciferasen mit  $\text{FMNH}_2$ .

Ein wesentliches Problem in der Reaktion organischer Verbindungen mit  $\text{O}_2$  ist die Überwindung der Spinbarriere (vgl. 1.1). Triplett-Sauerstoff muß über eine Änderung der Spin-Konfiguration aktiviert werden, bevor eine Reaktion mit organischen Molekülen (Singulettzustand) erfolgen kann.

Viele Dioxygenasen nutzen paramagnetische Metall-Cofaktoren um den Wechsel von einer Triplett- zur Singulett-Konfiguration mittels metall-gebundenem aktivierten Sauerstoffs durchzuführen. Die Aktivierung von O<sub>2</sub> durch paramagnetische Metallionen ist dabei grundsätzlich über drei Strategien möglich (BUGG 2003). Orbitalüberlappung der ungepaarten Elektronen eines Metall-Cofaktors mit den ungepaarten Elektronen des Triplett-O<sub>2</sub> in einem Komplex ermöglicht die Reaktion mit einem organischen Molekül in Singulett-Konfiguration. Außerdem können mit Hilfe von Metallen enzymatisch gebildete Substratradikale mit O<sub>2</sub> reagieren, da sie nicht mehr der Spin-Erhaltungsregel unterliegen. Eine dritte Möglichkeit stellt der Transfer einzelner Elektronen (SET Mechanismus = *single electron transfer*) vom Metall zum O<sub>2</sub> mit der Bildung reaktiver Sauerstoff-Formen dar. Die Reaktion reduzierten Flavins mit O<sub>2</sub>, einem typischen organischen Cofaktor in verschiedenen Oxidasen und Monoxygenasen, erfolgt ebenfalls über einen SET-Mechanismus mit Ausbildung eines Flavin-Semichinon-Radikal/Superoxid-Radikal Paares, das nach Radikal-Rekombination in ein (Hydro)-Peroxid-Intermediat übergeht (MASSEY 1994; PALFEY et al. 1995).

### 1.3 Aufgabenstellung

Die cofaktorfreen bakteriellen 2,4-Dioxygenasen 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin 2,4-Dioxygenase (Qdo) und 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase (Hod) bilden eine neuartige Struktur-Funktions-Beziehung. Sie übernehmen mit der Spaltung eines *N*-heterozyklischen aromatischen Ringes eine entscheidende Rolle beim Abbau zweier Hydroxychinolin-Derivate. Anders als die bislang bekannten ringspaltenden Dioxygenasen verfügen sie weder über organische noch metallische Cofaktoren und sie kombinieren eine oxygenolytische Ringspaltung mit einer Decarbonylierung. Interessanterweise zeigen Hod und Qdo keine Verwandtschaft zu bekannten Dioxygenasen, sondern Homologien zu Enzymen des Faltungstyps der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen. Die cofaktorfreen 2,4-Dioxygenasen katalysieren eine innerhalb der umfangreichen Gruppe der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen bislang nicht bekannte Reaktion. Im Rahmen dieses Projektes sollte ein Mechanismus für die Reaktion der Hod erarbeitet werden.

Einen wichtigen Beitrag zu Aufklärung des Katalysemechanismus von Enzymen leistet die 3D-Struktur des Enzyms. Für Versuche zur Kristallisation von Enzymen werden homogene Proteinpräparationen benötigt. Mit den zur Verfügung stehenden Expressionsvektoren pQE50::*hod* (FISCHER 2000) und pQE30::*hod* (BETZ et al. 2000) konnten aus *E. coli* bis dato nur inhomogene Hod-Präparationen aufgereinigt werden, die eine Kristallisation unmöglich machten. Zunächst sollte im Rahmen dieser Arbeit die Ursache für die Heterogenität der Hod-Proteinpräparationen geklärt werden. Nach der Optimierung der Expressionssysteme sollten homogene Hod-Präparate in größerem Umfang für Kristallisationsexperimente in Zusammenarbeit mit Roberto Steiner (King's College, London) bereitgestellt werden. Ausgehend von einer Kristallstruktur, von Sequenzanalysen und Datenbankrecherchen sollten Aminosäure-Reste mit potentieller katalytischer Relevanz identifiziert werden und die Art ihrer Beteiligung im Reaktionsmechanismus, mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese in Kombination mit kinetischen Untersuchungen geklärt werden.

Die Abfolge der Substratbindung und der Produktfreisetzung bildet den äußeren Rahmen eines enzymatischen Mechanismus und sollte mit Hilfe der Zwei-Substrat-Kinetik und Produkthemmstudien (RUDOLPH 1979) bestimmt werden.

Ein enzymatischer Mechanismus muß chemisch-physikalischen Gesetzen genügen. Die in einem Enzym durchgeführte Reaktion ist daher nicht alleine von AS-Resten oder etwaigen Cofaktoren im aktiven Zentrum abhängig, sondern auch von den chemisch-physikalischen Eigenschaften der beteiligten Substrate. Untersuchungen zur Reaktivität der Substrate der Hod mit O<sub>2</sub> sollten Hinweise auf mögliche Teilschritte der enzymatischen Reaktion liefern. In Zusammenarbeit mit Dr. R. Kappl (Universität des Saarlandes, Homburg) sollte durch ESR-Spektroskopische Analysen die Fähigkeit zur Radikalbildung des Substrates und die Entstehung von Radikalen während der Enzymreaktion untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Abkürzungen

#### Allgemeine Abkürzungen

(k)bp	(Kilo)Basenpaare
(k)Da	(Kilo)Dalton (1 Da = $1,66018 \times 10^{-24}$ g)
A	Absorption
AS	Aminosäure(n)
BMPO	5- <i>tert</i> -Butoxycarbonyl 5-methyl-1-pyrrolin <i>N</i> -oxid
C (%)	Prozentualer Anteil an Bisacrylamid in PAGE
CHAPS	3-[ <i>N</i> -(3-Cholanamidopropyl)-dimethyl-amino]-1-propansulfonat
d	Schichtdicke der Küvette
deion	deionisiert
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
G	Gauss
g	Erdbeschleunigung
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
h; min; s	Stunde ; Minute ; Sekunde
His <sub>6</sub>	Hexahistidin-(tag)
His <sub>6</sub> Hod	Protein kodiert von pQE-30:: <i>hod</i>
His <sub>6</sub> HodC	Protein kodiert von pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> <sub>Xa</sub> HodC	Protein kodiert von pQE-30Xam2:: <i>hod</i> -C69S
Hod	1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase
<i>hod</i>	Gen der 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase
HodA	Protein kodiert von pQE-50:: <i>hod</i>
HodB	Protein kodiert von pQE-50m2:: <i>hod</i>
HodC	Protein kodiert von pQE-50m2:: <i>hod</i> -C96S
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
l; ml; µl	Liter; Milliliter, Mikroliter
LB	Luria-Bertani-Medium
M	mol/Liter
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions / Ionisations-Massenspektrometrie
mmol; µmol; nmol	Millimol, Mikromol; Nanomol

Mr	relative Molekularmasse
mT	Millitesla
mW	Milliwatt
Octylglucosid	<i>N</i> -Octyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
T (%)	Prozentualer Anteil an Acrylamid plus Bisacrylamid in PAGE
TB	Terrific-broth-Medium
<sup>t</sup> BuOK	Kalium- <i>tert.</i> -butylat
TNM	Tetranitromethan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-HCl-Puffer
Triton X100	Octophenolpoly(ethylen-glycolether) <sub>n</sub>
U	Unit
ÜN	Über-Nacht (16 h)
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Zwittergent	<i>N</i> -Dodecyl- <i>N,N</i> -dimethyl-3-ammono-1-propansulfonat
$\epsilon$	Molarer Extinktionskoeffizient
$\lambda$	Wellenlänge des Lichtes
$\Delta c$	Konzentrationsänderung

Abkürzungen für Aminosäuren im Ein- und Dreibuchstabencode

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

## 2.2 Definitionen

### Enzymaktivität

Enzymtest:

Eine Enzymeinheit (1 U) ist die Menge Enzym, welche pro Minute die Umsetzung von 1  $\mu\text{mol}$  Substrat bei einer Temperatur von 30 °C katalysiert.

Restriktionsendonukleasen:

Eine Unit (1U) ist die Menge Enzym, die 1  $\mu\text{g}$   $\lambda$ -DNA in einer Stunde, bei für das jeweilige Enzym optimalen Bedingungen, vollständig spaltet.

Ligasen:

Eine Unit (1 U) ist definiert als die Enzymmenge, die notwendig ist, um 1 nmol  $^{32}\text{P}$  aus Pyrophosphat zu  $[\gamma,\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  in 20 min bei 37°C umzusetzen.

### Spezifische Aktivität

U/mg Protein

## 2.3 Geräte

Anaerobenzelt: Coy Laboratory Products Inc., Michigan, USA

Bilddokumentation: Transilluminator TFP-M/WL: Lft Labortechnik, Wasserburg; Digitalkamera DC 120 Zoom mit Software: Kodak, New York, USA

Elektrophorese:

a) Agarosegel-Elektrophorese: Horizontalgelkammern: Bio-Rad, München

b) Polyacrylamidgel-Elektrophorese: Vertikalsystem (1 mm Dicke, Breite 10 cm x Höhe 7 cm): Lft-Labortechnik, Wasserburg; Vertikalsystem (2 mm Dicke, Breite 20 cm x Höhe 14 cm): Universitätswerkstätten, Oldenburg; Präparative Polyacrylamidgel-Elektrophorese Model 491 Prep Cell: Bio-Rad, München

c) Spannungsgeräte: Powerpack PP 3000: Biometra, Göttingen; PowerPAC 300: Bio-Rad, München

Elektroporation: Electroporator 2510: Eppendorf, Hamburg; Elektroporationsküvetten 2 mm: PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

ESR-Spektroskopie: Bruker ESP 300E mit Frequenz-Zähler und NMR-Gaussmeter, Bruker Bio Spin GmbH, Rheinstetten; ESR-Flachzelle 100  $\mu\text{l}$ , Wilmad Labglass, NJ, USA

FPLC-Anlage und Säulen: Biologic HR System mit Workstation, Fraction Collector Model 2128: Bio-Rad München; UnoQ-6, Bio-Prep SE 1000/17, Leersäule Bio-Scale MT6 und Econo-Columnn 1,0 x 10 cm, Flow Adaptor 1,0 x 14 cm: Bio-Rad, München

Inkubation: Inkubationsschüttelmaschine, Pilot Shake System Kühner: B. Braun, Melsungen

Mischer: Heidolph Tischmischer REAX 2000: Jürgens Laborbedarf, Bremen

PCR: Personal Cyclers™: Biometra, Göttingen

pH-Messung: pH 535 MultiCal®: WTW, Weinheim

Photometer: Pharmacia LKB Autofill UV/Visible Spectrophotometer: Pharmacia GmbH, Freiburg

Sterilbank: Holten Safe 2000: Heto-Holten AS, Allerød, Dänemark

Sterilisation: Tuttnauer 2540 ELV: Tuttnauer, Ronkonkoma, USA

Ultrafiltration: VIVASPIN 4 und VIVASPIN 15: Vivascience Ltd., Sonehouse, England

Ultraschallzellaufschluß: Branson Ultraschall Desintegrator Sonifier 250: G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd

Vakuumpumpe: Vacuubrand MZ2C/2,4: Jürgens Laborbedarf, Bremen

Wärmeschrank: Heraeus ET 504: Heraeus Instruments, Hanau

Wasseraufbereitungsanlage: ELGA STAT UHQ PS: KSN Wassertechnik, Nistertal

Waagen: Analysenwaage Sartorius 2462: Sartorius AG, Göttingen; Tischwaage: Pag Oerlikon AG, Zürich, Schweiz

Wasserbad: Typ W 350: Jürgens Laborbedarf, Bremen

Zentrifugation: Tischzentrifuge Biofuge fresco: Heraeus Instruments, Hanau; Hochgeschwindigkeitszentrifuge Beckman J2-21 M/E mit Rotoren JA-10 und JA-20: Beckman Instruments GmbH, München; Kontron-Kühlzentrifuge Hermle ZK 400 mit Rotor A6-14: Hermle KG, Eiching

## 2.4 Chemikalien, Enzyme und sonstige Materialien

1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (Schema 5, *I*) wurde nach CORNFORTH & JAMES (1956) aus 3-Formyl-2-methyl-4(1*H*)-chinolon (EIDEN et al. 1978) synthetisiert, und 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin (Schema 5, *II*) wurde nach EVANS & EASTWOOD (1974) präpariert. Die Methode von HRADIL et al. (1999) diente als Basis für die Synthese von 1*H*-2-Phenyl-3-hydroxy-4-oxochinolin (Schema 6, *III*). 3-Benzyloxy-2-methyl-4-pyron (HARRIS 1976), wurde als Reaktant zur Synthese von 3-Hydroxy-2-methyl-1*H*-pyridin-4-on (Schema 6, *V*) nach NELSON et al. (1988) verwendet. *N*-Formylantranilsäure (Schema 5, *VII*) wurde nach SZCZEPANKIEWICZ & SUWINSKI (2000) synthetisiert.

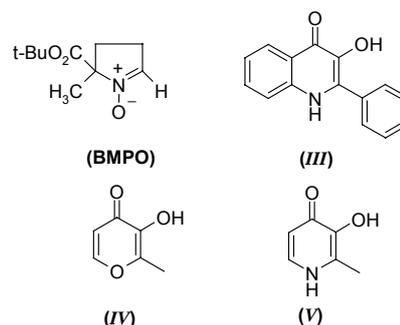
*N*-Acetylantranilsäure (Schema 5, *VI*) und 3-Hydroxy-2-methylpyran-4-on (Schema 6 *IV*) wurden von Sigma-Aldrich (Deisenhof) bezogen. 5-Methyl-1-pyrrolin *N*-oxid (BMPO, Schema 6, ZHAO et al. 2001) wurde von B. Kalyanaraman, The Medical College of Wisconsin, Milwaukee, zur Verfügung gestellt.

In dieser Arbeit eingesetzte Chemikalien (Reinheitsgrad p.a.) wurden von Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhof), Fluka (Neu Ulm), Serva (Heidelberg), Bio-Rad (München) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Messer Griesheim (Krefeld) lieferte die Gase Sauerstoff (99,995%), Stickstoff (99,99%), Kohlenmonoxid (99%) und Argon (99,998%).

Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme stammten von MBI-Fermentas (St. Leon-Roth), peqLab (Erlangen), Roche (Mannheim) und Promega (Mannheim).

Chromatographie-Materialien lieferten Bio-Rad (München), Qiagen (Hildern) und Amersham Biosciences (Freiburg).

Schema 6: Strukturformeln potentieller Substrate und des Spin-traps BMPO



5-*tert*-Butoxycarbonyl 5-methyl-1-pyrrolin *N*-oxid (BMPO), 1*H*-2-Phenyl-3-hydroxy-4-oxochinolin (*III*), 3-Hydroxy-2-methyl-pyran-4-on (*IV*) und 3-Hydroxy-2-methyl-1*H*-pyridin-4-on (*V*)

## 2.5 Puffer und Lösungen

### Molekulargenetische Methoden und Agarosegel-Elektrophoresen

Puffer und Lösungen wurden nach SAMBROOK et al. (1989) hergestellt

#### Stammlösungen

Stammlösungen der Antibiotika und des Induktors wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Antibiotika:

Ampicillin: 100 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ .

Kanamycin: 50 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ .

Induktor:

IPTG: 1 M in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ .

Detergenzien:

Octylglycosid, CHAPS, Zwittergent (3/16) und Triton X 100 jeweils 1 M in Puffer A

Reduktionsmittel:

DTT 20 mM in Puffer A

Substrate und Produkte:

**I, II, III, IV, V, VI** und **VII** (siehe 2.4) wurden 10 mM in Ethanol angesetzt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### pH-Puffer

Puffer zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit kinetischer Konstanten wurden nach KLEBER et al. (1997) hergestellt.

#### Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

Puffer und Lösungen wurden nach HAMES 1990 für native PAGE entsprechend dem *High pH discontinuous* und für SDS-Page nach dem *SDS-discontinuous* Puffersystem hergestellt.

#### Puffer für die Proteinreinigung und Kinetik

Puffer A: 50 mM Tris-HCl; pH 8,0; 2 mM EDTA

Puffer B: 10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,0

Puffer C: 150 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,0

Puffer D: 20 mM Tris-HCl; pH 8,0; 100 mM NaCl

#### Proteinbestimmung

Bradford-Reagenz (Serva Blau G-250) und eine Proteinstandard-Lösung aus Rinderserumalbumin wurden nach BRADFORD (1976) hergestellt.

## 2.6 Expressionssysteme

### Expressionsvektoren

Die Expressionsvektoren pQE-30 und pQE-50 (QIAGEN 2001; Abbildung 3) gehören zur pDS-Familie (BUJARD et al. 1987) und liegen mit einer Kopiezahl von ca. 10 pro Zelle vor. Neben einer synthetischen Ribosomenbindestelle (RBS) und einer *multiple cloning site* (MCS) besitzen die pQE-Vektoren einen, mit zwei Lactose-Operatorsequenzen (*lacI*) kombinierten, T5-Promoter (PT5). Der Vektor pQE-30 ermöglicht, im Gegensatz zu pQE-50, die Expression von Fusionsproteinen mit einem N-terminalen Hexahistidin-tag (*His<sub>6</sub>-tag*). Bei beiden Expressionssystemen begrenzen Translations-Stoppocodons in drei möglichen Leserastern die MCS. Die Transkriptions-Terminatoren *t<sub>0</sub>* des Phagen Lambda und T1 des *rrnB* Operon aus *E. coli* verhindern eine Fortsetzung der Transkription in den Vektor hinein. Ampicillin-Resistenz wird durch das  $\beta$ -Lactamase Gen (*bla*) vermittelt, die Replikation erfolgt über ein ColE1 *origin*. Die Regulation der Transkription erfolgt am T5 Promotor über das vom Repressorplasmid pREP4 konstitutiv exprimierte *lac*-Repressor-Protein (Abbildung 3, FARABAUGH 1978). Die Expression rekombinanter Proteine erfolgt durch die Zugabe des Induktors IPTG, welcher das *lac*-Repressor-Protein inaktiviert und die Transkription inserierter Gene ermöglicht. Der Vektor pQE-30Xa unterscheidet sich von pQE-30 nur durch eine 48 Nukleotide lange DNA-Sequenz zwischen dem *His<sub>6</sub>-tag* kodierenden Bereich und der *Bam*HI Schnittstelle (vgl. Abbildung 5). Dieser Bereich kodiert die Erkennungssequenz für die Faktor Xa Protease, die es ermöglicht, nach Reinigung der exprimierten Proteine mittels Affinitätschromatographie den *His<sub>6</sub>-tag* abzuspalten.

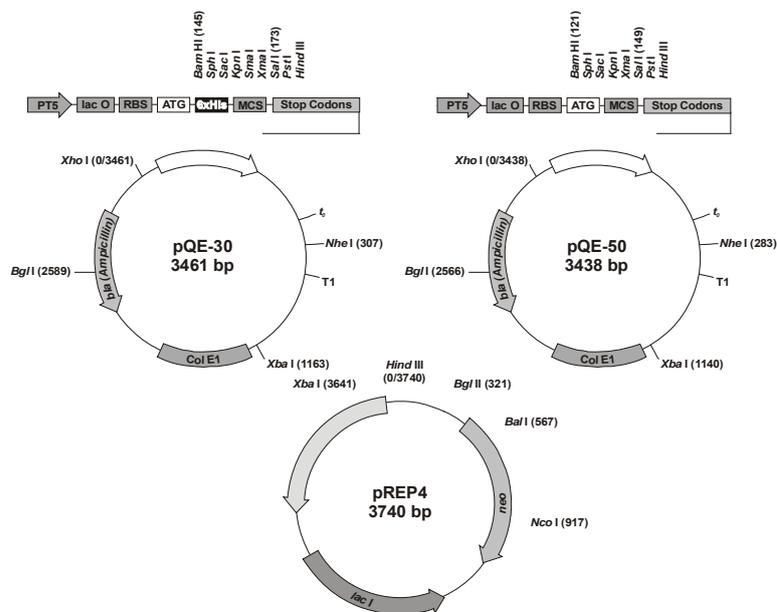


Abbildung 3: Restriktionskarten der Plasmide pQE-30, pQE-50 und pREP4 (nach QIAGEN 2001)

### **Bakterienstämme**

*E. coli* XL1-Blue MRF' (JERPSETH et al. 1992)

Genotyp:  $\Delta(mcrA)183$ ,  $\Delta(mcrCB'hsdSMRmrr')$ 173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac[F' proAB, lac<sup>f</sup>Z $\Delta$ M15, Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*

Dieser Stamm diente als Empfängerstamm für pQE-50::*hod*, pQE-30::*hod* und deren Varianten.

*E. coli* M15 [pREP4] (ZAMENHOF & VILLAREJO 1972):

Genotyp: *nat<sup>S</sup>*, *str<sup>S</sup>*, *rif<sup>S</sup>*, *thi<sup>-</sup>*, *lac<sup>-</sup>*, *ara<sup>+</sup>*, *gal<sup>+</sup>*, *mtf<sup>-</sup>*, *f<sup>-</sup>*, *recA<sup>+</sup>*, *uvr<sup>+</sup>*, *lon<sup>+</sup>*

Dieser Stamm wurde zur Expression sämtlicher Hod Protein-Varianten verwendet.

### **Plasmide**

Tabelle 1 listet einen Teil der in dieser Arbeit verwendeten und generierten Plasmide zur Expression unterschiedlicher Hod-Varianten auf. Nicht weiter genannte Plasmide basieren, analog zu pQE-30m2::*hod*-C69S-D39N, auf pQE-30m2::*hod*-C69S und tragen als Zusatzbezeichnung statt D39N die Bezeichnung des durch die jeweils eingefügte Mutation entstandenen Aminosäuren-Austauschs (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 1: Plasmide zur Expression unterschiedlicher Hod-Varianten

Bezeichnung	Quelle	Verwendungszweck
pQE-50:: <i>hod</i>	FISCHER (2000)	Überexpression von HodA
pQE-50m1:: <i>hod</i>	diese Arbeit	Zwischenprodukt zur Konstruktion von pQE-50m2:: <i>hod</i>
pQE-50m2:: <i>hod</i>	diese Arbeit	Überexpression von HodB
pQE-50m2:: <i>hod</i> -C69S	diese Arbeit	Überexpression von HodC
pQE-50m2:: <i>hod</i> -C69S-H251A	diese Arbeit	Überexpression von HodC-H251A
pQE-30:: <i>hod</i>	BETZ et al. (2000)	Überexpression von His <sub>6</sub> Hod
pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S	diese Arbeit	Überexpression von His <sub>6</sub> HodC
PQE-30Xam2:: <i>hod</i> -C69S	diese Arbeit	Überexpression von His <sub>6</sub> XaHodC
pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S-D39N	diese Arbeit	Überexpression von His <sub>6</sub> HodC-D39N

## **2.7 Bakterienkulturen und Zellzüchtungen**

### **Medien**

Verwendet wurden Luria Bertani (LB) Medium und Terrific Broth (TB) (SAMBROOK et al. 1989). Selektionsmedien wurden durch Zugabe entsprechender Antibiotika bereitet: Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) zur Züchtung von *E. coli* mit pQE-30 und pQE-50 sowie Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml) für *E. coli* mit pREP4. Feste Nährmedien enthielten 2% (w/v) Agar-Agar. Die Sterilisation erfolgte bei 121°C für 20 min.

### **Stammhaltung**

*E. coli*-Stämme wurden bei 37°C auf LB-Platten, je nach Bedarf unter Selektionsbedingungen, 24 h inkubiert und für maximal 4 Wochen bei 4°C gelagert.

Von allen verwendeten Stämmen wurden ÜN-LB-Flüssigkulturen mit 30% (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C eingelagert.

### **Zellzüchtungen**

#### ***Züchtung zur Reinigung von Hod-Varianten***

Die Züchtung sämtlicher *E. coli* M15 [pREP4, pQE50/30]-Varianten zur Proteinexpression erfolgte in LB-Selektionsmedium mit Ampicillin und Kanamycin. Eine 100 ml Vorkultur wurde mit 1 ml einer ÜN-Kultur beimpft und bei 37°C mit 130 Upm inkubiert. Bei einer optischen Dichte ( $OD_{600nm}$ ) zwischen 0,5 und 0,6 wurde die gesamte Vorkultur in eine 700 ml LB-Hauptkultur überführt und die Expression des Proteins wurde mit IPTG (0,5 mM) induziert. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte für weitere 16 h bei 25°C mit 130 Upm. Nach der Ernte (4°C, 5500 x g, 20 min) wurden die Zellen sofort zur Präparation von Rohextrakten nach 2.10 weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung eingefroren (-80°C).

#### ***Züchtung zum Schnelltest auf Expression und Aktivität***

Züchtungen im kleinen Maßstab dienten der Überprüfung der Expression und der Aktivität verschiedener Hod-Varianten. 10 ml LB-Selektionsmedium (1 mM IPTG) wurden mit einer Kolonie beimpft und inkubiert (37°C, ÜN). Die Zellen wurden geerntet (4°C, 5500 x g, 10 min) und das Pellet in 50 µl Puffer A resuspendiert und sofort nach 2.10 weiterverarbeitet.

#### ***Präparation elektrokompetenter E. coli Zellen***

1 l TB (Kanamycin: 50 µg/ml) wurden mit 10 ml einer ÜN-Kultur von *E. coli* M14 [pREP4] in TB (Kanamycin: 50 µg/ml) oder *E. coli* XL1-Blue MRF' angeimpft und bei 37°C, 110 Upm bis zu einer  $OD_{600nm}$  zwischen 0,6 und 0,9, inkubiert. Die weitere Präparation elektrokompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach IWASAKI et al. (1994).

## **2.8 Allgemeine DNA-Techniken**

Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) oder dem PeqLab Plasmid Miniprep Kit (PeqLab Biotechnologie, Erlangen) präpariert.

DNA-Präzipitationen, Agarosegel-Elektrophoresen, Größen-, Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren erfolgten nach SAMBROOK et al. (1989). Als Größen- und Konzentrationsstandard wurde der Mid Range MW-Marker (Promega, Deutschland GmbH, Mannheim) verwendet.

Restriktionen und Ligationen wurden entsprechend der Herstellerangaben zu den einzelnen Restriktions- bzw. Ligationsenzymen durchgeführt.

Die Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche mittels PCR wurde mit *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega, Deutschland GmbH, Mannheim) durchgeführt.

Die Reinigung von PCR-, Restriktions- und Ligationsansätzen erfolgte mit Hilfe des High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim).

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem QIA Quick Gelextraktionskit, (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Primer-Synthesen und Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeiten (MWG-Biotech, Ebersberg) vergeben.

Die Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation erfolgte, entsprechend dem von DOWER et al. (1988) beschriebenen Verfahren, in 2 mm Elektroporationsküvetten bei 25  $\mu$ FD, 200  $\Omega$ , 2,5 kV. Transformierte Zellen wurden auf LB-Selektionsplatten vereinzelt. Die gereinigten Plasmide positiver Transformanten wurden mittels Restriktion und Sequenzierung kontrolliert. Ein Schnelltest auf Proteinexpression und Enzymaktivität erfolgte wie unter 2.10 beschrieben.

## 2.9 Molekularbiologische Manipulation der Expressionsvektoren

### 2.9.1 Konstruktion von pQE-50::*hod*-Varianten

#### Deletion von DNA-Abschnitten im Expressionsplasmid pQE-50::*hod* zur Konstruktion von pQE-50m1::*hod* und pQE-50m2::*hod*

Mit Hilfe zweier PCR-Schritte erfolgten die Deletionen eines 12 bp-Fragmentes stromaufwärts und eines 33 bp-Fragmentes stromabwärts des *hod*-Inserts aus dem Vektor pQE-50::*hod*. Das 12 bp-Fragment enthielt das plasmideigene Startcodon, eine potentielle Ribosomenbindestelle (Sequenz AGAGGA) sowie die *Bam*HI Schnittstelle der MCS. Die Deletion des 33 bp-Fragmentes führte zur direkten Aneinanderlagerung des *hod*-eigenen Stoppcodons mit dem plasmideigenen Stoppcodon und dem Verlust der *Sal*I-, *Pst*I- und *Hind*III-Schnittstelle der MCS (Abbildung 4).

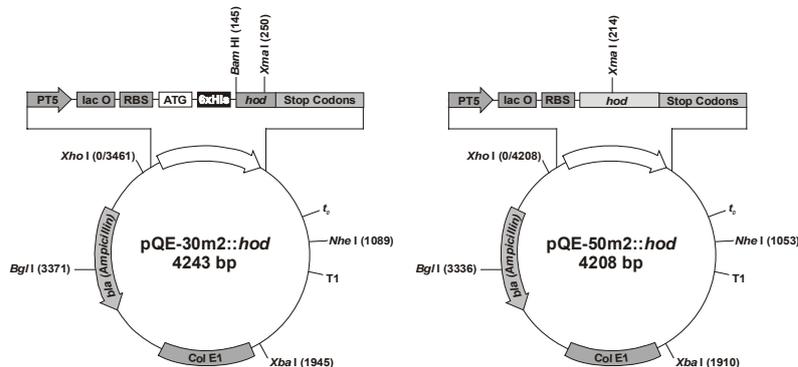


Abbildung 4: Restriktionskarten der Expressionsvektoren pQE-30m2::*hod* und pQE-50m2::*hod*

#### Primer

Die 5'-phosphorylierten Primer ermöglichten eine Amplifikation des Plasmids pQE-50::*hod* unter Auslassung des zu deletierenden Sequenzabschnitts:

Primer	Sequenz <sup>a</sup>	T <sub>m</sub> (°C)
<i>hod</i> -start-for	5' P- <b>ATGACCGACACATATCTGCATG</b> -OH 3'	58,4
<i>hod</i> -start-rev	5' P-AGTTAATTTCTCCTCTTTAATGAATTCTG-OH 3'	58,2
<i>hod</i> -stopp-for	5' P- <b><u>TTACTGGCCTTGGCGGATTG</u></b> -OH 3'	59,4
<i>hod</i> -stopp-rev	5' P- <b><u>TGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGA</u></b> -OH 3'	63,2

<sup>a</sup> Fettdruck: zum *hod*-Insert komplementäre Sequenzen; Fettdruck kursiv: Startcodon des *hod*-Inserts; Fettdruck unterstrichen: Stoppcodon des *hod*-Inserts; Normaldruck: zum Plasmid pQE-50 komplementäre Sequenzen; Normaldruck unterstrichen: Stoppcodon bereitgestellt vom Plasmid

PCR-Ansätze

Das Plasmid pQE-50::*hod* diente als Template zur Deletion des DNA-Bereiches stromaufwärts von *hod*. Die Deletion des stromabwärts gelegenen Bereiches wurde von pQE-50m1::*hod* (stromaufwärts deletiertes pQE-50::*hod*) ausgehend vorgenommen.

PCR-Ansätze:

a) Deletion stromaufwärts des *hod*-Inserts

Mastermix 1:	H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> :	12,4 µl	
	dNTP-Mix:	1,0 µl	(200 µM im Ansatz)
	Primer <i>hod</i> -start-for:	2,5 µl	(500 nM im Ansatz)
	Primer <i>hod</i> -start-rev:	2,5 µl	(500 nM im Ansatz)
	Template-DNA pQE-50:: <i>hod</i>	6,6 µl	(5 ng im Ansatz)
Mastermix 2:	H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> :	19,4 µl	
	10 x Polymerase-Puffer	5,0 µl	
	Pfu-DNA-Polymerase (3 U/µl)	0,6 µl	

b) Deletion stromabwärts des *hod*-Inserts

Mastermix 1:	H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> :	12,4 µl	
	dNTP-Mix:	1,0 µl	(200 µM im Ansatz)
	Primer <i>hod</i> -stopp-for:	2,5 µl	(500 nM im Ansatz)
	Primer <i>hod</i> -stopp-rev:	2,5 µl	(500 nM im Ansatz)
	Template-DNA pQE-50m1:: <i>hod</i>	6,6 µl	(5 ng im Ansatz)

Mastermix 2 entsprechend der Deletion stromaufwärts des *hod*-Inserts.

PCR-Zyklen

Anzahl der Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit	Reaktion
1	94	2 min	Denaturierung
10	94	15 s	Denaturierung
	57	30 s	Annealing
	72	9 min	Elongation
15	94	15 s	Denaturierung
	57	30 s	Annealing
	72	9 min + 20 s je Zyklus	Elongation
1	72	7 min	Elongation
1	4	∞	

Aufbereitung des Amplifikates

Je Deletion wurden 6 parallele PCR-Ansätze vereinigt, gereinigt und aufkonzentriert. Die Zirkularisation der deletierten Plasmide erfolgte über eine *blunt-end* Ligation. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes betrug 50 µl und enthielt 30 µl konzentrierte Plasmidlösung, Ligationspuffer, 5% Polyethylenglycol 8000 und 4 U T4-DNA-Ligase (Inkubation: 16 h 22°C). Vor der eigentlichen

Transformation wurden die Template-Plasmide des gesamten, gereinigten Ligationsansatzes (42 µl) mit *DpnI* restringiert (Restriktionsansatz: Gesamtvolumen 50 µl inklusive Ligationsansatz, Restriktionspuffer und 6 U *DpnI*; Inkubation: 1 h 37°C). Nach der Transformation in den Empfängerstamm *E. coli* M15 [pREP4] wurden positive Klone mittels Schnelltest (vgl. 2.7) auf Proteinexpression und Enzymaktivität kontrolliert. Eine vorläufige Verifizierung der durchgeführten Deletion in den generierten Expressionsplasmiden pQE-50m1::*hod* und pQE-50m2::*hod* erfolgte über Restriktionskontrollen der isolierten Plasmide mit *Bam*HI, *Hind*III oder *Sal*I (deletierte Schnittstellen) sowie *Sma*I (singuläre Zielsequenz im *hod*-Insert) bzw. *Xba*I (singuläre Zielsequenz im Plasmid). Das Gesamtvolumen der Restriktionsansätze betrug 20 µl inklusive 0,4 µg Plasmid-DNA, dem jeweiligen Restriktionspuffer und 2 U Restriktionsenzym. Eine abschließende Verifizierung erfolgte über eine Sequenzierung der relevanten Abschnitte (Abbildung 5).

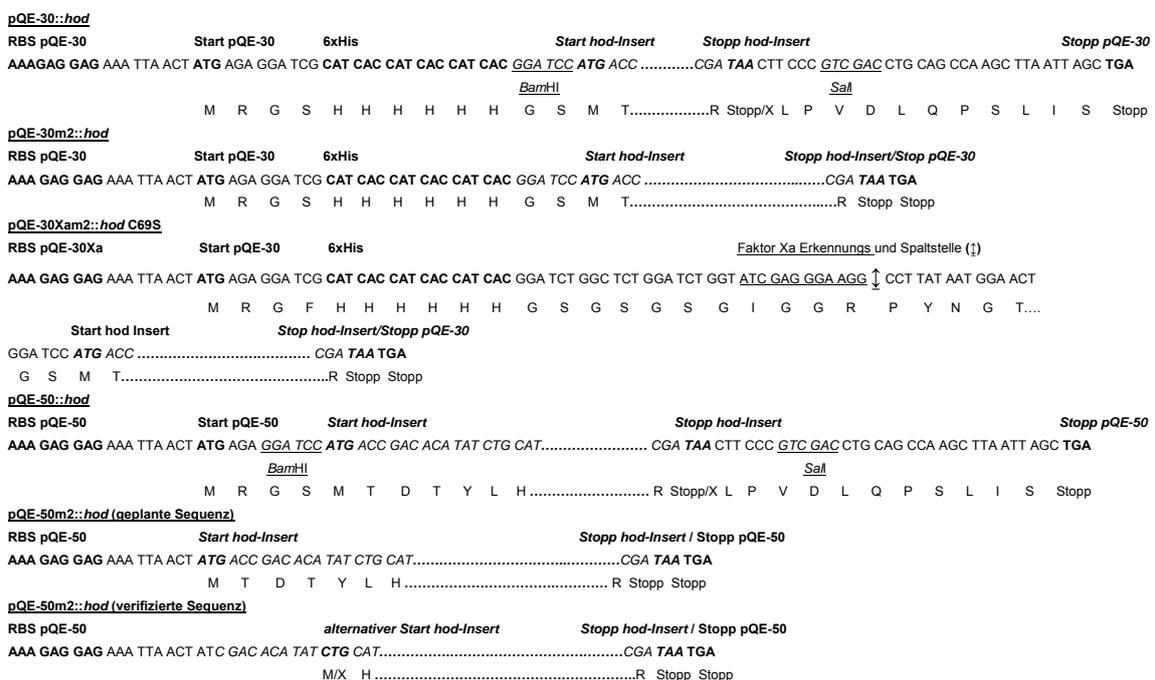


Abbildung 5: Flankierende Sequenzbereiche der *hod*-Inserts in den Expressionsvektoren und Aminosäuresequenzen der exprimierten *Hod*-Varianten

### Ortsspezifische Mutagenese in pQE-50m2::*hod* zur Konstruktion von pQE-50m2::*hod*-C69S

Die Veränderung des Codons C69 innerhalb des Gens *hod* in pQE-50m2::*hod* erfolgte mittels gerichteter ortsspezifischer Mutagenese (siehe 2.9.3).

### 2.9.2 Konstruktion von pQE-30::*hod*-Varianten

Die Konstruktion von pQE-30m2::*hod*-C69S erfolgte mittels Austausch eines *Xba*I/*Xma*I-Fragmentes aus pQE-30::*hod* gegen ein entsprechendes Fragment aus pQE-50m2::*hod*-C69S. Dadurch konnten ein korrigierter Stopp-Bereich sowie ein DNA-Bereich der die AS-Substitution C69S kodiert aus pQE-50m2::*hod*-C69S in einem Schritt in pQE-30::*hod* eingefügt werden. In einem Doppelverdau wurden pQE-30::*hod* und pQE-50m2::*hod*-C69S mit *Xba*I und *Xma*I restringiert (2.8). Die Ansätze (100 µl Gesamtvolumen) enthielten jeweils 75 µl Plasmidpräparation

(ca. 3000 ng DNA), Restriktionspuffer sowie je 10 U *Xba*I und *Xma*I. Nach Inkubation der Ansätze bei 37°C (ÜN) wurden die Restriktionsansätze inaktiviert, elektrophoretisch aufgetrennt und die benötigten Fragmente eluiert (2.8). Die entsprechenden Fragmente wurden ligiert (2.8) und in *E. coli* M15 [pREP4] transformiert. Plasmide aktiver Transformanten wurden mittels Restriktion und Sequenzierung kontrolliert.

Die Konstruktion von pQE-30Xam2::*hod*-C69S erfolgte durch den Austausch eines *Bam*HI/*Xho*I-Fragmentes aus pQE-30Xa gegen ein entsprechendes Fragment aus pQE-30m2::*hod*-C69S. Die weitere Vorgehensweise entsprach der Konstruktion von pQE-30m2::*hod*-C69S.

### 2.9.3 Sequenzanalysen und gerichtete ortsspezifische Mutagenese

Mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese ausgesuchter Codons erfolgte die gezielte Veränderung der Aminosäuresequenz der Hod, um möglichst die Lösungseigenschaften des Proteins zu verbessern, und um Aminosäuren mit potenzieller katalytischer und/oder struktureller Relevanz auszutauschen. Die Auswahl entsprechender Aminosäuren erfolgte anhand von binären und multiplen Aminosäure-Alignments (CHENNA et al. 2003, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) von Hod (EMBL Protein-ID: CAD61043.1; UniProtKB/Swiss-Prot entry: Q7WSQ7) mit Qdo (EMBL Protein-ID: CAA75082.2; UniProtKB/Swiss-Prot entry: O33472) und Hod mit ausgewählten  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen (HOTELIER et al. 2004; RENAULT et al. 2005, <http://bioweb.enscm.inra.fr/esther>), der Identifizierung von konservierten Strukturmotiven (*fingerprints*) in den Datenbanken BLOCKS ([http://blocks.fhcrc.org/blocks/blocks\\_search.html](http://blocks.fhcrc.org/blocks/blocks_search.html), HENIKOFF et al. 2000; HENIKOFF & HENIKOFF 1994) und PRINTS (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/dbbrowser/sprint/>, ATTWOOD et al. 2003), sowie über Sekundärstruktur-Vorhersagen (FISCHER et al. 1999) mit der PROFsec Methode (ROST et al. 2004, <http://www.predictprotein.org/>). Tabelle 2 (S. 24) listet die in dieser Arbeit generierten Proteinvarianten auf. Die Sequenzen der verwendeten Mutationsprimer sind der Tabelle 3 (S. 25) zu entnehmen. Das Design der Primer und die Durchführung der Mutagenesen basieren auf dem Quick Change Site-Directed Mutagenesis Protocol (Stratagene, Amsterdam) in Zusammenhang mit der Hod-Gensequenz (*hod*, EMBL Nukleotid Sequenz Nr.: AJ537472).

#### PCR-Ansätze

H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> :	ad 50 µl	
dNTP-Mix:	1,0 µl	(200 µM im Ansatz)
Primer X-f:	2,5 µl	(500 nM im Ansatz)
Primer X-r:	2,5 µl	(500 nM im Ansatz)
10 x Polymerase-Puffer	5,0 µl	
Template-DNA:	x µl	(5-50 ng im Ansatz)
pQE-50m2:: <i>hod</i> oder pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S		
Pfu-DNA-Polymerase (3 U/µl)	1,0 µl	

PCR-Bedingungen

Anzahl der Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit	Reaktion
1	95	2 min	Denaturierung
15	95	1 min	Denaturierung
	55	30 s	Annealing
	73	9 min	Elongation
1	73	5 min	Elongation
1	4	∞	

Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese (2.8) kontrolliert und die Template-Plasmide restringiert. Dazu wurde 1 µl *DpnI* (10 U/µl) direkt unter die Ölschicht in den PCR-Ansatz pipettiert. Nach Inkubation (16 h, 37°C) erfolgte die Transformation von *E. coli* XL1-Blue MRF'. Aus den Transformanten isolierte Plasmide wurden mittels Sequenzierung (2.8) verifiziert und anschließend zur Proteinexpression in *E. coli* M15 [pREP4] etabliert.

**2.10 Präparation zellfreier Rohextrakte**Zellaufschluß mit Ultraschall (zur Proteinreinigung)

Zur Präparation zellfreier Rohextrakte wurden X g Zellen (2.7) mit dem 5-fachen Volumen an Puffer A (Hod-Varianten) oder Puffer D mit 10 mM Imidazol (His<sub>6</sub>Hod-Varianten) resuspendiert und mittels Ultraschall bei 0°C (diskontinuierlich 4 x 5 min, 60% Puls, Stufe 6-7) aufgeschlossen. Nach Sedimentation unlöslicher Bestandteile (45 min, 48000 x g, 4 °C) wurde der Überstand (Rohextrakt) abgenommen, auf Enzymaktivität (2.14.1) überprüft und zur Proteinreinigung mittels FPLC (2.13) eingesetzt.

Zellaufschluß mit Lysozym (Schnellaufschluß zur Expressions- und Aktivitätskontrolle)

Die nach 2.7 in kleinem Maßstab gezüchteten und resuspendierten Zellen wurden mit Lysozym aufgeschlossen. Dazu wurde der Ansatz 4 mal bei -80°C eingefroren und auf Eis aufgetaut. Die so vorbehandelten Zellen wurden anschließend mit Lysozym in einer Endkonzentration von 6,5 mg/ml versetzt und 60 min auf Eis inkubiert. Der Zellabfall wurde sedimentiert (4°C, 20000 x g, 20 min), der Rohextrakt entnommen und mittels Enzymtest (2.14.1) und SDS-PAGE (2.12) untersucht.

Tabelle 2: Hod-Varianten generiert mittels ortsspezifischer Mutagenese

Proteinvariante	Original AS	Original Codon	mutiertes Codon <sup>[a]</sup>	eingeführte AS	Template-Plasmid
HodB-C37S	Cystein 37	TGC	<b>TCC</b>	Serin	pQE-50m2:: <i>hod</i>
HodC (HodB-C69S)	Cystein 69	TGC	<b>TCC</b>	Serin	pQE-50m2:: <i>hod</i>
HodB-C184S	Cystein 184	TGC	<b>TCC</b>	Serin	pQE-50m2:: <i>hod</i>
HodC-H251A	Histidin 251	CAC	<b>GCC</b>	Alanin	pQE-50m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-D39N	Aspartat 39	GAC	<b>AAC</b>	Asparagin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-H40Q	Histidin 40	CAC	<b>CAG</b>	Glutamin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-R41Q	Arginin 41	CGC	<b>CAG</b>	Glutamin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-V42L	Valin 42	GTC	<b>CTC</b>	Leucin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-Y43F	Tyrosin 43	TAC	<b>TTC</b>	Phenylalanin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-K44Q	Lysin 44	AAG	<b>CAG</b>	Glutamin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-R62Q	Arginin 62	CGG	<b>CAG</b>	Glutamin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-H64Q	Histidin 64	CAC	<b>CAG</b>	Glutamin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-S99N	Serin 99	TCT	<b>AAT</b>	Asparagin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-H100Q	Histidin 100	CAT	<b>CAG</b>	Glutamin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-S101A	Serin 101	TCT	<b>GCT</b>	Alanin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-S101N	Serin 101	TCT	<b>AAT</b>	Asparagin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-H102Q	Histidin 102	CAC	<b>CAG</b>	Glutamin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-Y196A	Tyrosin 196	TAC	<b>GCC</b>	Alanin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-Y196K	Tyrosin 196	TAC	<b>AAA</b>	Lysin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-Y196R	Tyrosin 196	TAC	<b>CGC</b>	Arginin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-H217Q	Histidin 217	CAC	<b>CAG</b>	Glutamin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-F219Y	Phenylalanin 219	TTC	<b>TAC</b>	Tyrosin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-S220N	Serin 220	TCG	<b>AAC</b>	Asparagin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-Q221A	Glutamin 221	CAG	<b>GCG</b>	Alanin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-E224A	Glutamat 224	GAG	<b>GCG</b>	Alanin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-T250N	Threonin 250	ACC	<b>AAC</b>	Asparagin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-R266Q	Arginin 266	CGT	<b>CAG</b>	Glutamin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S
His <sub>6</sub> HodC-E267Q	Glutamat 267	GAA	<b>CAA</b>	Glutamin	pQE-30m2:: <i>hod</i> -C69S

[a] Fettdruck: mittels Primer (vgl. Tabelle 3) eingeführte Punktmutationen

Tabelle 3: Primer zur ortsspezifischen Mutagenese ausgesuchter Codons im Gen *hod*

Primer	Sequenz <sup>[a]</sup>
Hod-C37S	5' HO-CTCCTCCTACCCGGGTGGT <u>CCC</u> CACGACCACCGCGTCTAC-OH 3'
Hod-D39N	5' HO-CCCGGGTGGTGCCAC <u>AAC</u> CACCGCGTCTACAAG-OH 3'
Hod-H40Q	5' HO-GGGTGGTGCCACGACC <u>AGC</u> GCGTCTACAAGTAC-OH 3'
Hod-R41Q	5' HO-TGGTGCCACGACCAC <u>AGG</u> TCTACAAGTACCTG-OH 3'
Hod-V42L	5' HO-TGCCACGACCACCGC <u>CTC</u> TACAAGTACCTGATC-OH 3'
Hod-Y43F	5' HO-CACGACCACCGCGTCTT <u>CA</u> AGTACCTGATC CAG-OH 3'
Hod-K44Q	5' HO-GACCACCGCGTCTAC <u>CAG</u> TACCTGATCCAGGAG-OH 3'
Hod-R62Q	5' HO-ATTGTCCCTAACTGG <u>CAG</u> GGTCACGGACTCTCG-OH 3'
Hod-H64Q	5' HO-CCTAACTGGCGGGGT <u>CAG</u> GGACTCTCGCCCTCC-OH 3'
Hod-C69S	5' HO-GGTCACGGACTCTCGCC <u>TCC</u> GAGGTCCAGACTTTGGC-OH 3'
Hod-S99N	5' HO-ACTTTCTTCGGTAA <u>AT</u> CATTCTCACGGCGGC-OH 3'
Hod-H100Q	5' HO-TTTCTTCGGTATCT <u>CAG</u> TCTCACGGCGGCTGG-OH 3'
Hod-S101A	5' HO-CTTCGGTATCTCAT <u>GCT</u> CACGGCGGCTGGGTT-OH 3'
Hod-S101N	5' HO-CTTCGGTATCTCAT <u>AAT</u> CACGGCGGCTGGGTT-OH 3'
Hod-H102Q	5' HO-CCGGTATCTCATTCT <u>CAG</u> GGCGGCTGGGTTCTT-OH 3'
Hod-C184S	5' HO-GCAGACTACGGCTACGACT <u>CC</u> TGGGGACGATCCGGAAGG-OH 3'
Hod-Y196K	5' HO-CGAGGACGCT <u>AAA</u> GGCAGGAACGG-OH 3'
Hod-Y196R	5' HO-CGAGGACGCT <u>CGC</u> GGCAGGAACGG-OH 3'
Hod-Y196A	5' HO-CGAGGACGCT <u>GCC</u> GGCAGGAACGG-OH 3'
Hod-H217Q	5' HO-ACGCGACCGATCCGG <u>CAG</u> ATCTTCTCGCAGCCA-OH 3'
Hod-F219Y	5' HO-CCGATCCGGCACATCT <u>ACT</u> CGCAGCCAACAGAG-OH 3'
Hod-S220N	5' HO-ATCCGGCACATCTT <u>CAC</u> CAGCCAACAGAGCCT-OH 3'
Hod-Q221A	5' HO-CGGCACATCTTCTCG <u>GCC</u> GCCAACAGAGCCTGAA-OH 3'
Hod-E224A	5' HO-CTTCTCGCAGCCAAC <u>AGC</u> CCTGAATACGAGAAAATC-OH 3'
Hod-T250N	5' HO-AAGTTGGGCGGGCCGA <u>ACC</u> ACTTCCCCGCCATC-OH 3'
Hod-H251A	5' HO-GGCGGGCCGACC <u>GCC</u> TCCCCGCCATC-OH 3'
Hod-R266Q	5' HO-GCGGCAGTCCATATC <u>CAG</u> GAATTTGCCACGGCA-OH 3'
Hod-E267Q	5' HO-GCAGTCCATATCCGT <u>CAA</u> TTTGCCACGGCAATC-OH 3'

[a] Angegeben ist jeweils nur der forward-Primer eines komplementären Paares. Unterstrichen: kodierendes Triplet; Fettdruck: verändertes Nukleotid

## 2.11 Proteinbestimmung

Zur Quantifizierung von Proteinmengen wurde die Methode von BRADFORD (1976) modifiziert nach ZOR & SELIGER (1996) eingesetzt. Als Standard diente Rinderserumalbumin.

## 2.12 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Probenvorbereitung, die Durchführung der vertikalen nativen PAGE und der SDS-PAGE, sowie die Färbung der Gele erfolgte nach HAMES (1990).

### Native PAGE

Eingesetzt wurden Trenngele (12,8% T, 0,33% C) mit Sammelgelen (4,3% T, 0,11% C) im *High pH discontinuous* Puffersystem.

Vertikale native PAGE wurde verwendet, um die Homogenität der Proteinpräparationen zu untersuchen.

Präparative native PAGE (Prep Cell 491, Bio-Rad Laboratories) diente als ein Trennschritt bei der Reinigung von HodC und wurde zur Trennung einzelner mono- und oligomerer Hod-Varianten benutzt. Die Elektrophorese wurde bei 4°C mit maximal 500 V, 40 mA, 20 W durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Beginnend mit dem Austritt der Bromphenolbande, wurden Fraktionen von 2,25 ml bei einer Flußrate von 0,9 ml/min aufgefangen (Puffer A) und auf Aktivität (2.14.1) geprüft.

### SDS-PAGE

Zum Einsatz kamen SDS-Polyacrylamidgele (Trenngel: 12,8% T, 0,33% C; Sammelgel: 4,3% T, 0,11% C) im *SDS-discontinuous* Puffersystem. Zur Bestimmung der Molekularmassen wurde ein Größenstandard (Broad Range MW Proteinstandard, Bio-Rad, München) bei jedem Lauf mit aufgetragen.

## 2.13 Proteinreinigung

### Reinigungsprotokoll 1 (nach BAUER et al. 1996; HodA und HodB)

Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel gefolgt von einer Adsorptionschromatographie an Hydroxyapatit und einer weiteren Anionenaustauschchromatographie an UnoQ) mit abschließender Gelfiltration.

### Reinigungsprotokoll 2 (HodC)

Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel, präparative Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen und abschließend eine Anionenaustauschchromatographie an UnoQ.

### Reinigungsprotokoll 3 (His<sub>6</sub>Hod-Varianten)

Metallchelate-Affinitätschromatographie an Ni-NTA Superflow gefolgt von einer Anionenaustauschchromatographie an UnoQ.

Bis auf die präparative Gelelektrophorese erfolgten alle Reinigungsschritte bei Raumtemperatur. Die Aktivität einzelner Reinigungsfraktionen wurde mit dem Enzymstandardtest (2.14.1) ermittelt. Gereinigte Proteinpräparationen wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

**Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel**

Rohextrakt aus 2.10 wurde auf eine mit Puffer A äquilibrierte Bio-Scale MT5 Säule mit DEAE-Sephacel aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit Puffer A (Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min) gespült, bis der Absorptionswert ( $A_{280\text{nm}}$ ) des Eluats kleiner 0,1 war. Der Spülvorgang wurde mit 0,1 M KCl in Puffer A (1 ml/min) solange weitergeführt, bis keine weitere Verringerung der Absorption mehr meßbar war. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0,1 bis 0,4 M KCl in Puffer A (Gesamtvolumen 50 ml; 1 ml/min) in 2 ml Fraktionen. Aktive Fraktionen wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration (Ausschlußgröße 10 kDa) aufkonzentriert und mit Puffer A oder B entsprechend des anschließenden Reinigungsschrittes gewaschen.

**Adsorptionschromatographie an Hydroxyapatit**

Eine vorgereinigte Proteinprobe (DEAE-Sephacel) wurde auf eine mit Puffer B äquilibrierte Hydroxyapatit Bio-Gel (Econo-Säule, 1 x 10 cm, 5 ml Bettvolumen) aufgetragen und die Säule anschließend mit Puffer B (0,75 ml/min) bis zu einem konstanten Absorptionswert ( $A_{280\text{nm}}$ ) des Eluats gespült. Mit einem linear ansteigenden Kaliumphosphat-Gradient von Puffer B auf Puffer C (30 ml, 0,75 ml/min) erfolgte die Elution gebundener Proteine. Mit Beginn des Spülvorganges wurden 1 ml Fraktionen aufgefangen. Aktive Fraktionen wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und mit Puffer A gewaschen.

**Anionenaustauschchromatographie an UnoQ**

Eine vorgereinigte Proteinprobe (präparative Gelelektrophorese oder Hydroxyapatit) wurde auf eine mit Puffer A äquilibrierte Bio-Rad UnoQ 6 Säule aufgetragen und mit Puffer A bis zu einem konstanten Absorptionswert ( $A_{280\text{nm}}$ ) des Eluats gespült. Mit einem linearen Gradienten von 0,1 bis 0,4 M KCl in Puffer A (30 ml, 1 ml/min, Fraktionsgröße 1 ml) wurde gebundenes Protein desorbiert. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, über Ultrafiltration mit Puffer A gewaschen und aufkonzentriert.

**Gelfiltration an Bio-Prep SE-1000/17**

Die mit Puffer A äquilibrierte Gelfiltrations-Säule wurde mit der nach Chromatographie an UnoQ erhaltenen und mittels Ultrafiltration konzentrierten Proteinprobe beladen. Bei einer Flußrate von 0,1 ml/min wurden die Proteine ihrer Größe entsprechend getrennt und in Fraktionen von 0,5 ml gesammelt. Aktive Fraktionen wurden mittels Ultrafiltration eingeeengt.

**Präparative Gelelektrophorese**Separation unterschiedlicher Hod-Varianten

Eine über DEAE-Sephacel vorgereinigte und mittels Ultrafiltration aufkonzentrierte Proteinprobe wurde entsprechend 2.12 in die Prep Cell eingefüllt und eluiert. Unterschiedliche Aktivitätsmaxima wurden separat aufkonzentriert und über native PAGE sowie SDS-PAGE kontrolliert.

Reinigung HodC

Die konzentrierte Proteinprobe aus der Vorreinigung (DEAE-Sephacel) wurde entsprechend der Anleitung für die Prep-Cell vorbereitet, eingefüllt und eluiert (2.12). Aktive Fraktionen wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und über native PAGE sowie SDS-PAGE kontrolliert.

***Metallchelate-Affinitätschromatographie an Ni-NTA Superflow***

Rohextrakt zur Reinigung von His<sub>6</sub>Hod-Varianten wurde auf Ni-NTA Superflow (Econo-Säule 1 x 10 cm, 7 ml Bettvolumen, äquilibriert mit Puffer D mit 10 mM Imidazol) aufgetragen (1 ml/min). Die Säule wurde solange mit Puffer D mit 10 mM Imidazol gespült, bis keine Änderungen des Absorptionswertes ( $A_{280\text{nm}}$ ) des Eluates mehr erkennbar waren. Ein weiterer Spülschritt mit 4 Bettvolumina Puffer D (mit 20 mM Imidazol) eluierte schwach gebundene Proteine. Das Fusionsprotein wurde mit einem linear aufsteigendem Gradienten (40 ml; 1ml/min) von 20 auf 250 mM Imidazol in Puffer D eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Aktive Fraktionen wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration eingeeengt und mit Puffer A gewaschen.

**2.14 Untersuchungen zur Enzymaktivität der Hod****2.14.1 Enzymtest**

In den unterschiedlichen Enzymtests wurde die Aktivität der Hod-Varianten am Photometer durch Messung der Absorptionsabnahme am Absorptionsmaximum des jeweils eingesetzten Substrates bestimmt. Die Messung der Extinktionsänderungsrate ( $\Delta E/\text{min}$ ) erfolgte bei 30°C nach Start der Reaktion mit Substrat.

Standard-Testansatz

980  $\mu\text{l}$  Puffer A  
 10  $\mu\text{l}$  Enzymlösung  
 10  $\mu\text{l}$  1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin (*I*, 10 mM in Ethanol)

Die Volumenaktivität einer Enzymlösung (U/ml) wurde nach Gleichung (1) ermittelt. Für 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (*I*, Absorptionsmaximum 334 nm) erfolgte die Berechnung mit  $\epsilon_{334\text{nm}} = 9570 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  und für das alternative Substrat 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin (*II*, Absorptionsmaximum 334 nm) mit  $\epsilon_{337\text{nm}} = 10500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (BAUER 1995).

$$\frac{U}{\text{ml}} = \frac{\Delta E}{\text{min}} \times \frac{1}{\epsilon \times d} \times \frac{\text{Vol.}_{\text{Küvette}}}{\text{Vol.}_{\text{Enzymlg.}}} \quad (1)$$

Die Berechnung der spezifischen Aktivität (U/mg) erfolgte über die Volumenaktivität und der nach 2.11 bestimmten Proteinkonzentration.

### Testansätze zur Bestimmung kinetischer Konstanten

Für die Bestimmung kinetischer Konstanten erfolgte die Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit ( $v_i$ ) der enzymatischen Substratumsetzung nach Gleichung (2) aus der photometrisch gemessenen Extinktionsabnahme innerhalb einer Minute ( $\Delta E/\text{min}$ ) und den für das jeweils verwendete Substrat unter den gegebenen Bedingungen gültigen molaren Extinktionskoeffizienten.

$$v_i = \frac{\Delta c}{\text{min}} = \frac{\Delta E}{\varepsilon \times d \times \text{min}} \quad (2)$$

Im Gegensatz zum Standardenzymtest wurden für kinetische Untersuchungen 20  $\mu\text{l}$  Substratlösung und 970  $\mu\text{l}$  Puffer eingesetzt. Das Volumen der Enzymlösung betrug 10  $\mu\text{l}$ .

#### **2.14.2 Bestimmung molarer Extinktionskoeffizienten**

Die molaren Extinktionskoeffizienten (334 nm) von **II** bei verschiedenen pH- und pD-Werten wurden mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes  $E = \varepsilon \times c \times d$  berechnet. Dazu wurden Lösungen mit bekannten Konzentrationen von **II** in Puffer verschiedener pH- bzw. pD-Werte hergestellt (vgl. 2.15.3) und deren Extinktionswert bei 334 nm bestimmt.

#### **2.14.3 Qualitativer Nachweis der Enzymaktivität**

Jeweils 16  $\mu\text{g}$  nach 2.13 (Protokoll 1) gereinigtes Protein wurden pro Gelspur aufgetragen und mit Hilfe der nativen PAGE aufgetrennt. Eine mit einem Messer abgetrennte Gelspur wurde gefärbt (2.12) und zur Lokalisation der korrespondierenden Proteinbanden im ungefärbten Teil des Gels verwendet. Die entsprechenden Bereiche wurden aus den ungefärbten Gelen ausgeschnitten. Nach Extraktion der Proteine aus den Gelstücken, durch Inkubation in 1 ml Puffer A über Nacht bei 4°C, wurde die Aktivität der Extrakte nach 2.14.1 bestimmt. Als Kontrollen dienten jeweils Gelstreifen ohne Protein.

#### **2.14.4 Umsetzbarkeit alternativer Substrate**

Als alternative Substrate wurden 1*H*-2-Phenyl-3-hydroxy-4-oxochinolin (**III**), 3-Hydroxy-2-methylpyran-4-on (**IV**) und 3-Hydroxy-2-methyl-1*H*-pyridin-4-on (**V**) mit HodC getestet. Die Testansätze in Puffer A enthielten jeweils 100  $\mu\text{M}$  **III**, **IV** oder **V** sowie 0,02  $\mu\text{M}$  HodC. In regelmäßigen Abständen wurden über einen Zeitraum von 4 Stunden die Absorptionsspektren aufgezeichnet und miteinander verglichen. Zur Kontrolle wurde die Restaktivität von HodC zum Ende des Versuchs mit dem physiologischen Substrat (**I**) bestimmt.

#### **2.14.5 Untersuchungen zur Langzeit-, pH- und pD-Stabilität**

Die Überprüfung der Langzeitstabilität von His<sub>6</sub>HodC wurde in Puffer A (sterilfiltriert) bei RT und bei 4°C über einen Zeitraum von 4 Wochen durchgeführt. Eine Proteinlösung (10 mg/l) wurde aliquotiert und unter den entsprechenden Bedingungen gelagert. In unterschiedlichen Abständen wurden die abgefüllten Aliquots mittels Enzymtest (2.14.1) und SDS-PAGE (2.12) untersucht.

Die Überprüfung der Stabilität von His<sub>6</sub>HodC innerhalb des pH-Bereiches der kinetischen Untersuchungen (2.15.3) erfolgte, indem das Enzym für 5 min bei 30°C in dem entsprechenden Puffer inkubiert wurde. Anschließend wurden 10 µl Aliquots in 980 µl 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 auf eine Konzentration an His<sub>6</sub>HodC von 0,4 µM verdünnt. Die Restaktivität wurde photometrisch mit 100 µM **II** wie unter 2.14.1 beschrieben ermittelt.

## 2.15 Untersuchungen zur Kinetik der enzymkatalysierten 2,4-Dioxygenolyse

### 2.15.1 Ermittlung kinetischer Konstanten

#### Apparente kinetische Konstanten

Apparente kinetische Konstanten ( $K_{mA}^{app}$ ,  $V^{app}$  und  $k_{cat}^{app}$ ) wurden mittels Messung der Substratabnahme von **I** oder **II** bei variablen Ausgangskonzentrationen an organischem Substrat in Anwesenheit konstanter O<sub>2</sub>-Konzentrationen ermittelt.

$K_{mO_2}^{app}$  und die entsprechenden Werte für  $V^{app}$  und  $k_{cat}^{app}$  wurden durch Variation der O<sub>2</sub> Konzentration bei konstanten Konzentrationen von **I** oder **II** ermittelt.

#### Zwei-Substrat-Kinetik: Absolute kinetische Konstanten

Absolute kinetische Konstanten ( $K_{mO_2}$ ,  $K_{mA}$ ,  $k_{cat}$ , und  $V$ ) wurden mit Hilfe der Zwei-Substrat-Kinetik ermittelt, die gleichzeitig eine Bestimmung des Reaktionsmusters einer enzymatischen Zwei-Substratreaktion ermöglicht (vgl. CORNISH-BOWDEN 1999; DIXON & WEBB 1979). Die Untersuchung erfolgte über eine Reihe verschiedener Teil-Experimente bei denen die Konzentrationen der organischen Substrate (**I** oder **II**) sowie die O<sub>2</sub>-Konzentrationen variiert wurden.

#### Produktthemmstudien

Produktthemmstudien (RUDOLPH 1979) einer enzymatischen Reaktion ermöglichen die Identifizierung der Reihenfolge der Substratbindung und der Produktfreisetzung. Dazu wurden in mehreren Experimenten zusätzlich zu verschiedenen Substratkonzentrationen unterschiedliche Produktkonzentrationen (CO oder *N*-Formylantranilsäure) in den Testansätzen verwendet.

Die Einstellung der O<sub>2</sub>-Konzentration in den Experimenten erfolgte durch Begasung der Reaktionspuffer bei 30°C für 30 min mit entsprechenden Mischungen von O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> und CO. Die Gase bzw. Gasmischungen wurden zwecks Anfeuchtung vor der Einleitung in den Reaktionspuffer durch H<sub>2</sub>O geleitet. Die Glasgefäße mit den eingestellten Puffer wurden mittels Septen verschlossen. Die O<sub>2</sub>-Konzentration in den Testansätzen wurde ausgehend von der O<sub>2</sub>-Löslichkeit in Wasser bei 30°C (230 µM; HITCHMAN 1978) und dem O<sub>2</sub>-Volumenanteil des verwendeten Gasgemisches berechnet und in regelmäßigen Abständen mit einer O<sub>2</sub> Elektrode kontrolliert. Die Konzentration an CO in Puffer, begast mit 100% CO, wurde mit 882 µM bei 30°C angenommen (BUDAVARI 1989).

Enzym-, Substrat- und *N*-Formylantranilsäure-Lösungen wurden vor Gebrauch mehrfach evakuiert, mit N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (90%/10%) äquilibriert und auf Eis unter Argon gelagert. Komponenten des

photometrischen Testansatzes (Puffer A äquilibriert mit entsprechenden Gasmischungen, 10 µl Enzymlösung und falls notwendig *N*-Formylanthranilsäure) wurden mit gasdichten Spritzen in Argon-gespülte Küvetten pipettiert. Nach 20 s wurde die Reaktion durch Substratzugabe gestartet und die Abnahme der Substratkonzentration ( $\Delta E / \text{min}$ ) photometrisch ermittelt (2.14.1).

### 2.15.2 Analyse kinetischer Meßdaten

Die Ermittlung kinetischer Konstanten aus den gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten ( $v_i$ ) der einzelnen Messreihen erfolgte graphisch über die linearisierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung (3) nach HANES (1932)

$$\frac{[A]}{v_i} = \frac{K_m}{V} + \frac{1}{V} \times [A] \quad (3)$$

oder der Gleichung (4) nach LINEWEAVER & BURK (1934)

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \times \frac{1}{[A]} \quad (4)$$

und/oder über eine Anpassung der Meßdaten an unterschiedliche Geschwindigkeitsgleichungen (s. u.) mit Hilfe des Programms LEONORA (CORNISH-BOWDEN 1995). Im Falle der Ermittlung apparenter kinetischer Konstanten (Variation einer Substratkonzentration) wurden die gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten ( $v_i$ ) an die Michaelis-Menten-Gleichung (5) oder an eine entsprechende Gleichung mit Berücksichtigung der Substrathemmung (6) angepaßt.

$$v_i = \frac{V^{app} [S]}{K_{mS}^{app} + [S]} \quad (5)$$

$$v_i = \frac{V^{app} [S]}{K_{mS}^{app} + [S] + [S]^2 / K_{siS}^{app}} \quad (6)$$

Die Ermittlung absoluter Konstanten aus Bi-Substrat-Untersuchungen (Variation beider Substratkonzentrationen) erfolgte über die Anpassung der Anfangsgeschwindigkeiten an die Gleichungen eines substituierten (ping-pong) Mechanismus (7), eines über einen ternären Komplex verlaufenden Mechanismus (8) oder eines über einen ternären Komplex verlaufenden, mit Substrathemmung verbundenen Mechanismus (9).

$$v_i = \frac{v[A][O_2]}{K_{mO_2}[A] + K_{mA}[O_2] + [A][O_2]} \quad (7)$$

$$v_i = \frac{V[A][O_2]}{K_{sA} + K_{mO_2}[A] + K_{mA}[O_2] + [A][O_2]} \quad (8)$$

$$v_i = \frac{V[A][O_2]}{K_{sA} + K_{mO_2}[A] + K_{mA}[O_2](1 + [A]/K_{siA} + [A][O_2])} \quad (9)$$

Daten aus Produkthemmstudien wurden an Michaelis-Menten-Gleichungen angepasst, die kompetitive (10), unkompetitive (11) und nonkompetitive Hemmung(12) beschreiben.

$$v_i = \frac{V^{app}[S]}{K_{mS}^{app}(1 + [I]/K_{ic}^{app}) + [S]} \quad (10)$$

$$v_i = \frac{V^{app}[S]}{K_{mS}^{app} + [S](1 + [I]/K_{iu}^{app})} \quad (11)$$

$$v_i = \frac{V^{app}[S]}{K_{mS}^{app}(1 + [I]/K_{ic}^{app}) + [S](1 + [I]/K_{iu}^{app})} \quad (12)$$

Die Konzentrationen der Substrate und der Produkte werden durch Symbole in eckigen Klammern repräsentiert.  $S$ ,  $A$ ,  $O_2$ ,  $CO$  und  $N$  werden verwendet für ein einzelnes variiertes Substrat, aromatische Substrate ( $I$  oder  $II$ ), molekularen Sauerstoff sowie die Produkte Kohlenmonoxid und  $N$ -Formylantranilsäure.  $K_m$  entspricht der Michaelis-Konstante,  $K_{sA}$  symbolisiert die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes (EA),  $K_{si}$  und  $K_{siA}$  stehen für die Konstanten der Substrathemmung.  $K_i$  ist die Konstante der Hemmung. Die Zusätze  $c$  bzw.  $u$  stehen für kompetitive bzw. unkompetitive Hemmung. Die Beziehung der Maximalgeschwindigkeit  $V$  zur katalytischen Konstante  $k_{cat}$  ist durch die Gleichung (13) beschrieben mit  $[e_0]$  gleich der Enzymkonzentration im Testansatz.

$$k_{cat} = \frac{V}{60s[e_0]} \quad (13)$$

### 2.15.3 pH- und pD-Wert-Abhängigkeit der kinetischen Konstanten

Zur Bestimmung der pH- und pD-Abhängigkeit der apparenten Konstanten  $k_{cat}^{app}$  und  $K_m^{app}$  wurde His<sub>6</sub>HodC in einer Konzentration von 0,06 μM im Enzymtest (2.14.1) eingesetzt. Die Stabilität von His<sub>6</sub>HodC über die verwendeten pH- und pD-Bereiche wurde nach 2.14.5 überprüft.

### pH-Abhängigkeit der kinetischen Parameter

Zur Bestimmung von  $k_{cat}^{app}$  in Abhängigkeit von  $O_2$  sowie  $K_{mO_2}^{app}$  wurde die Konzentration von  $O_2$  wie unter 2.15.1 zwischen 60 bis 1084  $\mu M$  variiert. Die Konzentration des aromatischen Substrates (**II**) betrug konstant 100  $\mu M$ . Die Ermittlung von  $k_{cat}^{app}$  in Abhängigkeit vom aromatischen Substrat und  $K_{mA}^{app}$  erfolgte bei konstant 230  $\mu M O_2$ . Die Konzentrationsspanne von **II** erstreckte sich von 10 bis 190  $\mu M$ . Für die unterschiedlichen pH-Bereiche wurden Citrat-Phosphatpuffer (67 mM, pH 4-6), Tris-HCl (50 mM, pH 7-9), Glycin-NaOH-Puffer (40 mM, pH 10) und  $Na_2HPO_4$ -NaOH-Puffer (33 mM, pH 11) verwendet. Die Konzentrationen der einzelnen Puffer wurden so gewählt, dass keine Aktivitätssprünge durch Pufferwechsel auftraten. Die Berechnung der Anfangsgeschwindigkeiten ( $v_i$ ) in den einzelnen Teil-Experimenten und ihre Auswertung erfolgte wie unter 2.14.1 und 2.15.2 beschrieben. Die nach 2.14.2 ermittelten und verwendeten molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{337nm}$ ; Einheit  $M^{-1}cm^{-1}$ ) für **II** bei verschiedenen pH-Werten in den verwendeten Puffern waren: 10135 (pH 4,0); 10135 (pH 5,0); 9537 (pH 5,5); 10045 (pH 6,0); 10255 (pH 7,0); 9776 (pH 8,0); 9306 (pH 9,0); 5978 (pH 10,0); 3147 (pH 11,0).

### pD-Abhängigkeit der kinetischen Parameter

Lösungsmittel-Isotopeneffekte wurden untersucht durch die Bestimmung der kinetischen Konstanten  $k_{cat}^{app}$  für  $O_2$  und  $K_{mO_2}^{app}$  in Pufferlösungen verschiedener pD-Werte. Vor der Messung wurden die Enzymlösungen dreimal per Ultrafiltration (Ausschlussgrenze 3000 kDa) mit  $D_2O$ -Puffer pD 8,0 gewaschen. Zur Herstellung der Puffer wurden die getrockneten Puffersubstanzen in  $D_2O$  gelöst und mit NaOD oder DCl auf die entsprechende pD-Werte eingestellt. Die Art der Puffer und die Konzentrationen entsprachen denen der Untersuchung der pH-Abhängigkeit (s. o.). Die pD-Werte wurden mit einer regulären pH-Elektrode gemessen und durch Addition von 0,4 zum abgelesenen Wert korrigiert (COVINGTON et al. 1968; GLASOE & LONG 1960; SHOWEN & SHOWEN 1982). Die molaren Extinktionskoeffizienten für **II** bei 337 nm bei unterschiedlichen pD-Werten waren: 9114 (pD 4,4); 10107 (pD 5,0); 10057 (pD 5,5); 10340 (pD 6,0); 9524 (pD 7,0); 9403 (pD 8,0); 8758 (pD 9,0); 5929 (pD 10,0); 4173 (pD 11,0) (Einheit  $M^{-1}cm^{-1}$ ).

### **2.15.4 Einfluß der Viskosität auf kinetische Konstanten**

Einflüsse der Viskosität des Lösungsmittels auf die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit einer Konzentration von 0,06  $\mu M$  His<sub>6</sub>HodC und 100  $\mu M$  **II** im Enzymtest (2.14.1) durchgeführt. Die Puffer und die Substratlösungen enthielten Glukose als Viskosogen. Mit den eingesetzten Glukosekonzentrationen von 0 bis 30% (w/v) wurden relative Viskositäten von 1-3 (bei 20 °C) erreicht (WEAST et al. 1983-1984).

### **2.16 Einfluß von Detergenzien und Reduktionsmittel auf Hod**

Nach Protokoll 1 (2.13) gereinigte HodA (Endkonzentration 1,2  $\mu M$ ) wurde mit verschiedenen Detergenzien für 3 h bei RT in Puffer A inkubiert (Octylglycosid 45 mM, CHAPS 13 mM, Zwittergent 30 mM, Triton X 100 5 mM). Der Einfluß des Reduktionsmittels DTT wurde untersucht,

indem 10 µg/ml nach Protokoll 1 (2.13) gereinigte HodA mit unterschiedlichen Endkonzentrationen DTT (0-10 mM) versetzt und 1 h bei RT in Puffer A inkubiert wurden.

Die Testansätze wurden auf Aktivität (2.14.1) und Integrität der Enzyme mittels nativer PAGE (2.12) untersucht. Zum Vergleich wurden jeweils Ansätze ohne Detergenzien oder DTT entsprechend behandelt und analysiert.

## 2.17 UV/Vis-Absorptionsspektroskopie

### Säurekonstanten der Substrate

Die Ermittlung der  $pK_a$ -Werte erfolgte mittels UV/Vis-Absorptionsspektren von *I* oder *II* (jeweils 50 µM) bei 25°C in oxischen und anoxischen Lösungen unterschiedlicher pH-Werte (eingestellt mit NaOH oder HCl). Anoxische Bedingungen wurden durch Begasen der Lösungen mit Argon für mind. 20 min eingestellt. Die Aufzeichnung der Spektren erfolgte in gasdichten Küvetten. Der untersuchte pH-Bereich erstreckte sich von 1,0 bis 13,0 pH mit 1,0 Inkrementen. Die Ermittlung der  $pK_a$  Werte erfolgte nach der Methode von JOHNSON & METZLER 1970.

### Untersuchung der basenkatalysierten 2,4-Dioxygenolyse

UV/Vis-Absorptionsspektren der Reaktion von *I*, *II* und *III* in DMF und in H<sub>2</sub>O mit <sup>t</sup>BuOK oder NaOH wurden unter oxischen und anoxischen Bedingungen bei 25°C aufgezeichnet. Anoxische Bedingungen wurden eingestellt durch Begasung der einzelnen Lösungen mit Argon für 30 min, bevor die Mischung der Reaktionskomponenten in gasdichten, argongefüllten Küvetten erfolgte. Die Testansätze enthielten 100 nmol *I*, *II* oder *III* und 177 µmol <sup>t</sup>BuOK oder 200 µmol NaOH in 1 ml DMF oder H<sub>2</sub>O.

### Untersuchung der enzymatischen 2,4-Dioxygenolyse

UV/Vis-Absorptionsspektren von HodC, *I*, *N*-Acetylanthranihsäure (organisches Produkt), äquimolaren Mischungen von HodC mit *I* und HodC mit *N*-Acetylanthranihsäure sowie HodC-H251A und *I* in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 wurden bei 25°C aufgenommen. Alle Lösungen wurden separat 20 min mit Argon begast und für 20 h in einem Anaerobenzelt (N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> 90%/10%) inkubiert. Die Endkonzentrationen von HodC, HodC-H251A und *I* waren 50 µM. Die Aufzeichnung der Spektren erfolgte über einen Zeitverlauf von 1,5 h unter anoxischen Bedingungen. Anschließend wurden die Ansätze 1 min mit Luft begast und erneut Spektren aufgezeichnet.

## 2.18 ESR-Spektroskopie der Modellreaktion und der Enzymreaktion

### Modellreaktion: Basenkatalysierte 2,4-Dioxygenolyse

Zur Untersuchung der chemischen Modellreaktion wurden 500 µl Aliquots Substrat (0,13 M) und Base (0,13 M) in einem Anaerobenzelt mit entgasten Lösungsmittel (DMF oder 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) präpariert. Von den Stammlösungen wurden je 100 µl Substrat und 100 µl Base unter anoxischen Bedingungen im Anaerobenzelt in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und direkt in eine 100 µl ESR-Flachzelle überführt und zur ESR-Messung eingesetzt. Geringe Mengen von Luft wurden durch kurzzeitiges Öffnen des oberen Stopfens in die Messzellen geleitet. Um eine komplette Oxidation mit O<sub>2</sub> zu ermöglichen wurden die Reaktionsmischungen in ein offenes

Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, für 5-10 min an der Luft stehen gelassen und erneut zur Messung in die Flachzelle eingefüllt. In Fällen, in denen keine komplette Lösung der Komponenten erreicht werden konnte, wurden die Lösungen für einige Minuten innerhalb des Anaerobenzettes gerührt und der Überstand in die Flachzellen eingefüllt. Der Radikalfänger BMPO wurde unter anoxischen Bedingungen in einer Endkonzentration von 3,09 M zu den Substratstammlösungen gegeben.

In allen Fällen wurden Kontrollexperimente der Basen und der Substrate unter oxidischen und anoxischen Bedingungen durchgeführt. Die Spektren wurden bei Mikrowellenstärken von 20, 2 oder 0,2 mW mit einer Modulationsamplitude von 0,1 oder 0,5 G (1 G = 0,1 mT) aufgezeichnet.

#### Enzymreaktion

Die Messung der Enzymreaktion erfolgte analog der Messung der Modellreaktion. Die Testansätze enthielten 3,7 mM Enzym, 1,19 M Substrat und 3,09 M BMPO. Kontrollexperimente wurden unter oxidischen und anoxischen Bedingungen durchgeführt.

#### Simulation der ESR-Spektren

Die ermittelten Spektren wurden mit der Software Simfonia und Xsophe (Bruker, Rheinstetten) simuliert.

### **2.19 Homologie-Struktur-Modellierung der 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase**

Gestützt durch die Beobachtung, dass unverwandte Proteine durchaus ähnliche Faltungen haben können, wird postuliert, dass es zwischen 1000 bis 10000 unterschiedliche Proteinfaltungen gibt (COULSON & MOULT 2002; ORENGO et al. 1994; TODD et al. 2001). Ein funktionsfähiges Protein wird gebildet aus der Einheit von Aminosäuresequenz, Faltung und Funktion. Ein Vergleich von zwei Proteinen bezüglich der genannten Merkmale kann den Grad der Homologie zwischen den verglichenen Proteinen definieren. Homologie Protein-Modellierung ist eine Methode zur Erzeugung theoretischer dreidimensionaler Strukturmodelle einer AS-Sequenz auf der Basis von experimentell ermittelten Strukturen homologer Proteine (GUEX et al. 1999).

Mit Hilfe des Servers SWISS-MODEL (ARNOLD et al. 2006; GUEX & PEITSCH 1997; SCHWEDE et al. 2003; <http://swissmodel.expasy.org/>) wurden für Hod theoretische Strukturmodelle ausgehend von den bekannten Strukturen dreier  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen erstellt. Als Basis für die Struktur-Modellierung dienten Aminosäure-Alignments erstellt mit CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>, CHENNA et al. 2003) von Hod (UniProtKB/Swiss-Prot entry: Q7WSQ) mit der Epoxid-Hydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1 (EchA, UniProtKB/Swiss-Prot entry: O31243; PDB-ID: 1EHY\_A), mit der 2-Hydroxy-6-oxo-phenylhexa-2,4-dienoat-Hydrolase (C-C-Hydrolase: BphD) aus *Rhodococcus* sp. RHA1 (BphD, UniProtKB/Swiss-Prot entry: Q75WN8; PDB-ID: 1C4X\_A) und mit der Haloalkan-Dehalogenase aus *Rhodococcus* sp. (Hdlh, UniProtKB/Swiss-Prot entry: P59336; PDB-ID: 1BN6\_A). Die als Template zur Modellierung gewählten Proteine wurden mit Hilfe von BLAST-Datenbankrecherchen (ALTSCHUL et al. 1997; SCHAFFER et al. 2001,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) in der RCSB-Protein-Datenbank (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, <http://www.pdb.org/>) ausgewählt.

Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse der Modellierung nicht auf experimentell ermittelten Daten beruhen, sondern auf theoretischen Berechnungen. Die Ergebnisse müssen daher unter Vorbehalt bewertet werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expression und Charakterisierung unterschiedlicher Hod-Varianten

##### 3.1.1 HodA

###### Enzymreinigung und Charakterisierung von HodA

Die Reinigung aus 3,1 g Zellen (*E. coli* M15 [pREP4, pQE-50::*hod*]) nach Protokoll 1 (2.13) ergab mit einer 38-fachen Anreicherung und einer Ausbeute von 0,4% 1,6 mg HodA. Die spezifische Aktivität der gereinigten HodA entsprach mit 70 U/mg der gereinigter Wildtyp-Hod aus *Arthrobacter nitroguajocolicus* (früher: *ilicis*) R61a (BAUER 1995).

SDS-PA-Gele von HodA zeigten lediglich eine 32 kDa Bande, entsprechend der für Wildtyp-Hod bekannten Molekularmasse (nicht gezeigt). Allerdings wurde im nativen PA-Gel erkennbar, dass es sich bei HodA wie bereits von FISCHER (2000) beschrieben, um eine heterogene Probe handelte (Abbildung 6; Spur 1). Bei gereinigter Wildtyp-Hod

aus *A. ilicis* trat dieses Phänomen nicht auf (nicht gezeigt). Die Heterogenität der HodA-Präparation wurde als eine mögliche Ursache der bis dahin erfolglosen Kristallisationsversuche angesehen. Ein Teil-Ziel dieser Arbeit war die Beseitigung der Heterogenität der Hod-Präparationen, daher wurden zur Charakterisierung der HodA-Präparation die Proteinbanden einer nativen PAGE einzeln eluiert und auf Aktivität nach 2.14.3 untersucht. Alle drei Banden wiesen Hod-Aktivität auf. Eine Verunreinigung von HodA mit Fremd- oder inaktiven Proteinen war somit ausgeschlossen. Die Untersuchung der HodA-Präparation mit Hilfe der MALDI-MS ergab für das gereinigte Protein ein Mischungsverhältnis von 3:1 bestehend aus HodA-

Monomeren (ca. 32 kDa) und HodA-Dimeren (ca. 64 kDa) (persönliche Mitteilung Herr Griep-Raming, Arbeitskreis Prof. Metzger, Fachbereich Chemie, Universität Oldenburg). Mögliche Ursachen der unerwünschten Dimerbildung konnten die Anlagerung hydrophober Bereich durch van-der-Waals-Kontakte zwischen einzelnen Monomeren oder die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken sein.

###### Einfluß von Detergenzien auf HodA-Dimere

Hydrophobe Anlagerungen zwischen Proteinmonomeren in polaren Lösungsmitteln können mittels Detergenzien aufgehoben werden. Der Einfluß verschiedener Detergenzien auf die Dimerisierung und die Aktivität von HodA - gereinigt nach Protokoll 1 (2.13) - wurde wie unter 2.16 beschrieben untersucht. Bei einer Endkonzentration von 1,2 µM HodA führte Zwittergent (30 mM) zur vollständigen Inaktivierung und Denaturierung des Proteins. Octylglucosid (45 mM), CHAPS (13

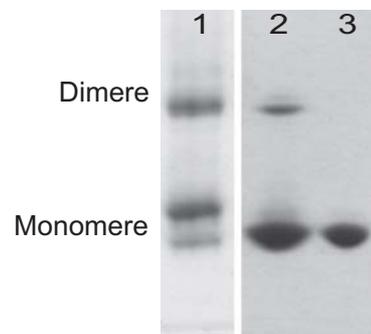


Abbildung 6: Native PAGE rekombinanter Hod-Proteine.  
 Spur 1: HodA aus *E. coli* M15 [pREP4, pQE-50::*hod*]; gereinigt nach Protokoll 1  
 Spur 2: HodB aus *E. coli* M15 [pREP4, pQE-50::*hod*]; gereinigt nach Protokoll 1  
 Spur 3: HodC aus *E. coli* M15 [pREP4, pQE-50::*hod*-C69S]; gereinigt nach Protokoll 2 (FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)

mM) und Triton X100 (5 mM) zeigten im Vergleich zur Kontrolle weder einen Einfluß auf die Aktivität noch auf das Bandenmuster von HodA in nativen PA-Gelen. Die Bildung von Dimeren aufgrund hydrophober Wechselwirkungen kam als Ursache nicht in Frage.

#### Einfluß von Reduktionsmitteln auf HodA-Dimere

Disulfidbrücken, als mögliche Ursache der Dimerisierung, sollten durch den Einfluß des reduzierenden Agens DTT aufgespalten werden. Der Einfluß von DTT in Konzentrationen von 0-10 mM auf HodA (0,25 mM) wurde wie unter 2.16 beschrieben untersucht. Unter dem Einfluß von DTT bis zu einer Konzentration von 6 mM konnte ein Anstieg der Enzymaktivität um 70% im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die Dimerform die Aktivität des Enzyms beeinträchtigt. Oberhalb von 6 mM DTT konnte ein Aktivitätsverlust von ca. 10% beobachtet werden. Eine mögliche Ursache könnte die Aufspaltung innermolekularer Disulfidbrücken sein (vgl. 3.4.2).

Das Bandenmuster in nativen PA-Gelen wurde bereits ab 4 mM DTT von 3 Banden auf 2 Banden reduziert. Der Einsatz von DTT verhindert bzw. beeinträchtigt die Bildung von HodA-Dimeren und scheint bis zu einem gewissen Grad die Aktivität des Enzyms zu steigern. Allerdings lieferten diese Untersuchungen keine Erklärung für die weiterhin fortbestehende Anwesenheit zweier monomerer Proteinformen.

Versuche, den Reinigungserfolg mit Hilfe der Zugabe von DTT (2 mM) zu den Reinigungs- und Aufschlußpuffern zu verbessern, schlugen fehl, da ein wesentlich höherer Anteil an Fremdproteinen in der HodA-Präparation verblieb. Außerdem konnte eine erneute Dimerbildung trotz DTT-Zugabe während der endgültigen Aufkonzentration im Anschluß an die Gelfiltration nicht unterbunden werden.

#### Trennung unterschiedlicher HodA-Varianten mittels präparativer Gelelektrophorese

Eine genauere Charakterisierung der unterschiedlichen Proteinvarianten in den HodA-Präparationen war erst möglich, nachdem die einzelnen Proteinbanden mittels präparativer Gelelektrophorese (2.12) quantitativ getrennt wurden. Es zeigte sich, dass die zwei ursprünglich identifizierten monomeren HodA-Varianten letztendlich aus vier unterschiedlichen Monomeren bestanden. Jeweils zwei Banden mit nahezu identischem Laufverhalten bildeten ein Paar, welches mit der herkömmlichen nativen PAGE nicht getrennt werden konnte. Die spezifischen Aktivitäten der vier Monomere betragen zwischen 60 und 70 U/mg. Weiterhin konnten mehrere kurz aufeinander eluierende Dimerbanden identifiziert werden, deren spezifischen Aktivitäten zwischen 40 und 55 U/mg bestimmt wurden. Eine Kontrolle der eluierten Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel mit einer längeren (14 cm) als der bisher verwendeten Laufstrecke (7 cm), zeigte geringe Unterschiede im Laufverhalten. Der Differenz der Laufstrecke von 0,25 cm zwischen der größten und der kleinsten Hod-Variante deutete auf Größenunterschiede von ca. 2 kDa hin. Die Analyse der Sequenz von pQE-50::*hod* im Bereich des Inserts (siehe Abbildung 5) ergab, dass auf der mRNA neben der vom Vektor pQE-50 kodierten Shine-Dalgarno-Sequenz mit 9 Nukleotiden zwischen der Ribosomenbindestelle (AGAGGAG) und dem Startcodon (AUG) eine weitere potentielle Startsequenz mit lediglich 3 zwischenliegenden Nukleotiden vorhanden sein muß. Des Weiteren

gibt es zwei Möglichkeiten zur Terminierung der Translation. Eine Kombination der unterschiedlichen Start- und Terminations-Möglichkeiten kann theoretisch zur gleichzeitigen Expression von Hod-Varianten mit 31,8 kDa, 32,3 kDa, 33,1 kDa und 33,6 kDa führen, was theoretisch eine Massendifferenz zwischen der kleinsten und der größten Variante von 1,8 kDa ergibt und dem bereits aus dem SDS-Polyacrylamidgel abgeleiteten Unterschied entspricht.

Die Ergebnisse führten zu der Erkenntnis, dass mit dem Expressionsplasmid pQE-50::*hod* keine homogenen Hod-Präparationen für Kristallisationsversuche und umfangreiche kinetische Messungen gewonnen werden konnten. Zur Gewährleistung einer Expression homogener Hod-Präparate wurden die vorhandenen Expressionsplasmide pQE-50::*hod* und pQE-30::*hod* modifiziert.

### 3.1.2 HodB

#### Konstruktion von pQE-50m1::*hod* und pQE-50m2::*hod*

Die Plasmide pQE-50m1::*hod* und pQE-50m2::*hod* wurden wie unter 2.9.1 beschrieben generiert, um die für pQE-50::*hod* nachgewiesene Expression unterschiedlicher Hod-Monomere (vgl. 3.1.1) zu unterbinden.

Eine *Bam*HI Restriktionskontrolle von pQE-50m1::*hod* bestätigte die Deletion eines DNA-Fragments stromaufwärts des *hod*-Inserts gegenüber pQE-50::*hod*. Für pQE-50m2::*hod* bestätigte der Verlust der Schnittstellen *Sal*I und *Hind*III die Deletion eines DNA-Fragments stromabwärts des *hod*-Inserts (vgl. Abbildung 5).

Die spezifische Aktivität von Rohextrakten aus *E. coli* M15 [pREP4, pQE-50m2::*hod*] war mit ca. 30 U/mg 7-fach höher als die durchschnittliche spezifische Aktivität in Rohextrakten aus *E. coli* M15 [pREP4, pQE-50::*hod*]. Eine abschließende Sequenzkontrolle stromauf- und stromabwärts des *hod*-Inserts zeigte einen Verlust des ursprünglichen Startcodons des *hod*-Inserts an (vgl. Abbildung 5). Da dennoch eine effektive Expression vom Plasmid aus erfolgte, mußte ein alternatives Startcodon vorhanden sein. Neben ATG können auch GTG, CTG oder TTG als Startcodons, fungieren (RAJBHANDARY 2000). Im Falle des *hod*-Inserts ist das ursprünglich sechste Triplet ein CTG und kann als alternatives Startcodon dienen. HodB ist demnach am N-Terminus fünf Aminosäuren kürzer als Wildtyp-Hod.

#### Reinigung und Charakterisierung der HodB-Präparationen

Aus 3,3 g Zellen (Naßgewicht) *E. coli* M15 [pREP4, pQE-50m2::*hod*], gezüchtet nach 2.7, konnten 3,3 mg HodB (Ausbeute 2%) mit einer spezifischen Aktivität von 69 U/mg nach Protokoll 1 gereinigt werden. Im Vergleich dazu konnte die Proteinausbeute mittels Protokoll 2 auf 5,4% gesteigert werden.

Die HodB-Präparation bestand im Gegensatz zu HodA aus jeweils einer Monomer- und einer Dimerbande (Abbildung 6, Spur 2).

Die Spaltung der Dimere durch DTT in eine einzige Monomerform wurde mittels präparativer Gelelektrophorese bestätigt. Das Plasmid pQE-50m2::*hod* ermöglichte die Expression lediglich einer monomeren Hod-Variante, die allerdings weiterhin über die Fähigkeit zur Dimerbildung bei hohen Proteinkonzentrationen verfügte.

### 3.1.3 HodC

#### Konstruktion von pQE-50m2::hod-C69S

Aggregatbildung in Proteinpräparationen beeinträchtigen die Reinigung und die Kristallisation. HOLDEN et al. (2002); STOVER et al. (2000) und SIMONOVIC et al. (2000) beschrieben verbesserte Löslichkeiten und Kristallisations-Eigenschaften von Enzymen nach Austausch exponierter Cys-Reste durch Ser-Reste. Analog erfolgte die Änderung aller drei Hod-Cys-Codons (C<sup>37</sup>, C<sup>69</sup> und C<sup>184</sup>) gegen Ser-Codons mittels ortsspezifischer Mutagenese (2.9.3). Die konstruierten Plasmide pQE-50m2::hod-C37S und pQE-50m2::hod-C184S resultierten in der Expression sehr geringer Mengen instabiler Proteine. Die spezifischen Aktivitäten in Rohextrakten aus *E. coli* M15 [pREP4, pQE-50m2::hod-C37S] und *E. coli* M15 [pREP4, pQE-50m2::hod-C184S] betragen lediglich 0,4 und 3,5 U/mg im Vergleich zur spezifischen Aktivität von 34 U/mg in Rohextrakten aus *E. coli* M15 [pREP4, pQE50m2::hod]. Die Proteinvariante Hod-C69S, nachfolgend HodC genannt, wurde erfolgreich gereinigt. Die spezifische Aktivität im Rohextrakt aus *E. coli* M15 [pREP4, pQE-50m2::hod-C69S] betrug rund 39 U/mg.

#### Reinigung und Charakterisierung der HodC-Präparationen

Aus 2,1 g Zellen (Naßgewicht) *E. coli* M15[pREP4] pQE-50m2::hod-C69S gezüchtet nach 2.7 konnten 3,3 mg HodC (Protokoll 1 (2.13), Ausbeute 2%) mit einer spezifischen Aktivität von 51 U/mg gereinigt werden. Nach Protokoll 2 konnte der Reinigungserfolg aus 2,3 g Zellen *E. coli* M15[pREP4] pQE-50m2::hod-C69S auf 7,4 mg reine HodC mit einer Ausbeute von 4% verbessert werden. Die spezifische Aktivität von 70 U/mg entspricht den Angaben von BAUER et al. 1996 für Wildtyp-Hod und den ermittelten Werten für HodB. Der Austausch von C<sup>69</sup> gegen Ser hat keinen Einfluß auf die Aktivität von Hod. Präparative Gelelektrophorese und native PAGE bestätigten die Existenz lediglich einer monomeren Form (Abbildung 6, Spur 3). HodC-Präparationen konnten mittels Ultrafiltration auf 120 mg/ml konzentriert werden. Anzeichen einer Dimerbildung oder Ausfällung der Proteine gab es nicht. Inkubationen von HodC (10 mg/ml) im Dunkeln bei RT und 4°C unter sterilen Bedingungen in Puffer A über einen Zeitraum von 4 Wochen belegen eine außergewöhnliche Stabilität der HodC-Präparationen. Bei 4°C konnte erst zum Beginn der vierten Woche ein Aktivitätsverlust von ca. 10% ermittelt werden. Bis dato war keine Fragmentierung der Proteine in einer SDS-Page erkennbar. Erste Aktivitätsverluste (15%) und Hinweise auf eine Fragmentierung des Proteins zeigten sich bei RT zum Ende der zweiten Woche. Die Eigenschaften des Proteins HodC im Vergleich zu HodA erschienen für Kristallisationsexperimente und kinetische Untersuchungen vielversprechend.

### 3.1.4 His<sub>6</sub>HodC

#### Konstruktion von pQE-30m2::hod-C69S

Wie bereits von Bratke (2001) beschrieben, zeigte gereinigte His<sub>6</sub>Hod, exprimiert von pQE-30::hod (BETZ et al. 2000), in einer nativen PAGE (nicht gezeigt) ein heterogenes Bandenmuster analog dem Muster der HodA-Präparation (vgl. 3.1.1). Ausgehend von den Erkenntnissen der Untersuchungen zur Heterogenität der HodA-Präparationen ergab eine Sequenzkontrolle von pQE-30::hod ebenfalls alternative Möglichkeiten zur Termination der Translation (siehe Abbildung 5) und

die C69-vermittelte Fähigkeit zur Dimerisierung. Um die Vorteile einer Metallchelate-Affinitätschromatographie nutzen zu können, wurden die unerwünschten Eigenschaften des Plasmids pQE-30::*hod* durch Deletionsklonierung - wie unter 2.9.2 beschrieben - beseitigt und das Plasmid pQE-30m2::*hod*-C69S generiert.

#### Reinigung und Charakterisierung von His<sub>6</sub>HodC

In einer typischen Reinigung (2.13) von His<sub>6</sub>HodC aus Rohextrakten von *E. coli* M15 [pREP4, pQE-30m2::*hod*-C69S], gezüchtet nach 2.7, konnte mit einer Ausbeute von 25% und einer 36-fachen Anreicherung reine His<sub>6</sub>HodC mit einer spezifischen Aktivität von 51,3 U/mg gewonnen werden. Zum Vergleich konnten BETZ et al. (2000) über eine Ni-NTA-Reinigung mit einer 5,6-fachen Anreicherung und einer Ausbeute von 34% reine His<sub>6</sub>Hod mit einer spezifischen Aktivität von 28,1 U/mg gewinnen. Die Kontrolle gereinigter und aufkonzentrierter His<sub>6</sub>HodC mittels nativer PAGE (nicht gezeigt) bestätigte, dass His<sub>6</sub>HodC als monodisperse Präparation vorlag.

His<sub>6</sub>HodC zeigt eine gute Langzeitstabilität. Nach 2-wöchiger Lagerung konnten für Proteinproben gelagert bei 4°C und bei RT lediglich 2 bzw. 10% Aktivitätsverlust und keine Proteinfragmentierungen nachgewiesen werden. Erst ab der dritten Woche (RT) bzw. vierten Woche (4°C) zeigte die SDS-PAGE der Aliquots schwache Banden, die Fragmenten der Hod entsprachen. Zu diesen Zeiten lagen die Restaktivitäten noch bei 80% (4°C) und 60% (RT).

Für His<sub>6</sub>HodC wurde die pH- und pD-Stabilität nach 2.14.5 untersucht. Eine 5-minütige Inkubation des Enzyms bei pH 5,5 bis 11,0 oder pD 6,0 bis 11,0 hatte keinen Einfluß auf die Restaktivität (~ 100 ± 5%). Bei Inkubationen in pH 5 (55% Restaktivität) und pH 4 (Restaktivität 19%) kommt es zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Aktivität. Dies ist ebenso der Fall bei pD 5 und pD 4 (76% und 2,3% Restaktivität).

#### **3.1.5 His<sub>6Xa</sub>HodC**

Das Expressionsplasmid pQE-30Xam2::*hod*-C69S sollte die Expression einer Hod-Variante ermöglichen, die über Affinitätschromatographie gereinigt wird, bei der es aber möglich ist, den His<sub>6</sub>-tag mit Hilfe einer Faktor-Xa-Protease abzuspalten. Dieses Vorgehen erschien sinnvoll, da ein His<sub>6</sub>-tag ungünstige Auswirkungen auf die Kristallisation haben könnte. Die Expression von His<sub>6Xa</sub>HodC vom Plasmid pQE-30Xam2::*hod*-C69S war erfolgreich insofern, dass in einem Rohextrakt große Mengen an löslichem Protein nachgewiesen werden konnten, allerdings nur mit unzureichenden spezifischen Aktivitäten. Zusätzlich ließ sich das Protein nicht mittels Affinitätschromatographie reinigen, obwohl gewährleistet war, dass die korrekte Aminosäuresequenz exprimiert wurde. Die Faktor Xa Protease Schnittstelle verlängert das His<sub>6Xa</sub>HodC um 16 Aminosäuren gegenüber His<sub>6</sub>HodC (vgl. Abbildung 5), was die Faltung des Proteins so beeinflussen könnte, dass die Zugänglichkeit des His-tags beeinträchtigt wird. Zusätzlich scheint die Aktivität des Enzyms durch eine Verlängerung des N-Terminus negativ beeinflusst zu werden. Eine Deletion des Vektors um ein 18 Nukleotide großes DNA-Fragment zwischen der Faktor Xa Erkennungssequenz und dem eigentlichen *hod*-Insert konnte die Bindeeigenschaften an die Ni-NTA-Agarose und die Aktivitäten des Enzyms nicht verbessern. Die Versuche wurden nicht fortgeführt.

## 3.2 Kinetik der Hod-katalysierten 2,4-Dioxygenolyse

### 3.2.1 Umsetzung des physiologischen Substrates 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin

#### Apparente kinetische Konstanten von HodC mit 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin

Die Bestimmung apparenter kinetischer Konstanten von HodC mit dem physiologischen Substrat 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (*I*) erfolgte wie unter 2.15.1 beschrieben, wobei Konzentrationen von *I* im Bereich von 2-200  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurden. In luftgesättigtem Puffer A (230  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$ ) führten Konzentrationen von *I* ab 40  $\mu\text{M}$  zur Hemmung der Reaktion (Abbildung 7). Eine Anpassung der ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten an die Gleichungen (4) und (5) ergab nahezu identische Parameter. Die Qualität der Anpassung an Gleichung (5) war geringfügig besser (Tabelle 4) und bestätigte die bereits in Abbildung 7 beobachtete Substrathemmung (Tabelle 4,  $K_{siA}^{app} = 907 \pm 109$   $\mu\text{M}$ ). Die Hemmung der enzymatischen Umsetzung durch *I* ist abhängig von der  $\text{O}_2$  Konzentration. Bei  $\text{O}_2$ -Konzentrationen über 241  $\mu\text{M}$  konnte kein Hemmeffekt mehr beobachtet werden. Die Anpassung an Gleichung (6) resultierte in negativen Werten für  $K_{siA}^{app}$ .

Bei einer  $\text{O}_2$  Konzentration von 120  $\mu\text{M}$  wurde ein  $K_{siA}^{app}$  von  $684 \pm 483$   $\mu\text{M}$  ermittelt, was auf eine Verstärkung des Hemmeffektes durch *I* bei niedrigen  $\text{O}_2$ -Konzentrationen hindeutet. Ein deutlicher

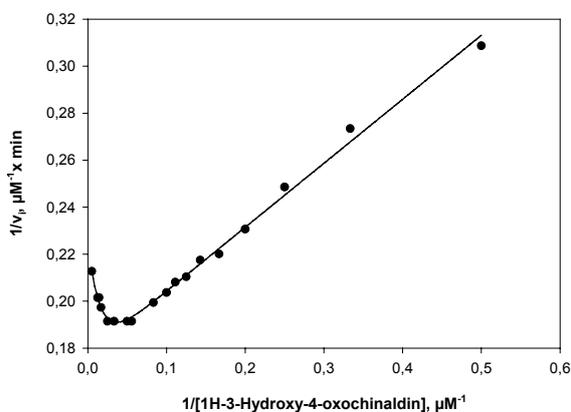


Abbildung 7: Lineweaver-Burk-Plot der Reaktion von HodC mit 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin. Experimente wurden durchgeführt in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 mM EDTA (luftgesättigt) bei 30°C, verwendete Konzentrationsspanne 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin: 2-200  $\mu\text{M}$ . Die Linie entspricht einer Anpassung der Daten an die Michaelis-Menten Gleichung mit Substrathemmung (6).

Anstieg von  $k_{cat}^{app}$  für *I* von  $35 \pm 1$   $\text{s}^{-1}$  auf  $145 \pm 3$   $\text{s}^{-1}$  trat auf, wenn die  $\text{O}_2$ -Konzentration von 120  $\mu\text{M}$  auf 964  $\mu\text{M}$  angehoben wurde. Dies belegt den limitierenden Effekt unzureichender  $\text{O}_2$ -Konzentrationen. Bei 1205  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$  wurde  $k_{cat}^{app}$  für *I* mit  $136 \pm 7$   $\text{s}^{-1}$  bestimmt und deutet auf eine mögliche Hemmung der Reaktion durch hohe  $\text{O}_2$ -Konzentrationen hin. Eine genauere Analyse des Hemmeffektes durch  $\text{O}_2$  war aufgrund der limitierten  $\text{O}_2$ -Löslichkeit in Puffer unter atmosphärischen Bedingungen nicht möglich. Aktivitätsmessungen bei konstanten Konzentrationen von *I* zwischen 10 bis 100  $\mu\text{M}$  ergaben  $k_{cat}^{app}$  für  $\text{O}_2$  von  $228 \pm 25$   $\text{s}^{-1}$ , der Wert sank aber auf  $146 \pm 29$   $\text{s}^{-1}$

bei 2,5  $\mu\text{M}$  *I*, da unter 10  $\mu\text{M}$  *I* keine sättigenden Bedingungen mehr vorliegen. Im Gegensatz zu  $k_{cat}^{app}$  wurden die apparenten Michaelis-Konstanten  $K_{mA}^{app}$  für *I* und  $K_{mO_2}^{app}$  nicht von der Konzentration des jeweiligen anderen Substrates beeinflusst.  $K_{mA}^{app}$  für *I* wurde mit  $1,7 \pm 0,6$   $\mu\text{M}$  bestimmt und liegt damit nahe an der Nachweisgrenze des Enzymtestes.  $K_{mO_2}^{app}$  für *I* wurde mit

805 ± 146 µM bestimmt und liegt nahe der maximalen Löslichkeit von O<sub>2</sub> in Wasser (1,3 mM bei 20°C und 1 bar).

Tabelle 4: Apparente kinetische Konstanten von HodC  
(FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)

Substrat	Gleichung	$K_{mA}^{app}$ (µM)	$k_{cat}^{app}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{siA}^{app}$ (µM)	$k_{cat}^{app} / K_{mA}^{app}$ (× 10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
<i>I</i>	4	1,3 (0,1) <sup>a)</sup>	51 (1)		40 (4)
<i>I</i>	5	1,5 (0,1) <sup>a)</sup>	54 (1)	907 (109)	36 (3)
<i>II</i>	4	93 (7)	7 (0)		0,08 (0,006)
<i>II</i>	5	185 (46)	13 (3)	179 (79)	0,08 (0,03)

Experimente wurden in luftgesättigtem (230 µM O<sub>2</sub>) 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA bei 30°C durchgeführt. Verwendete Konzentrationsspannen: 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (*I*) 2-200 µM und 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin (*II*) 10-200 µM. Die Werte der Parameter und ihre Standardabweichungen (in Klammern) wurden mit dem Programm LEONORA (CORNISH-BOWDEN 1995) ermittelt. Je 54 Einzelwerte pro Datensatz wurden zur Kalkulation der Parameter eingesetzt.

<sup>a)</sup>Die für  $K_m$  ermittelten Werte können nur als grob angenäherte Werte betrachtet werden, da aufgrund des geringen  $K_m$  Wertes die niedrigste einsetzbare Substratkonzentration nicht in limitierenden Konzentrationen eingesetzt werden konnte.

#### Zwei-Substrat-Kinetik der HodC mit 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (*I*)

Eine Auftragung der Meßdaten bei einer Zwei-Substrat Reaktion in Form eines Hanes-Plots ( $[A]/v_i$  zu  $[A]$ ) resultiert bei einem einfachen ternären Komplex-Mechanismus in einer Geradenschar, die sich in einem Punkt ( $-K_{iA}; (K_{mA} - K_{iA})/V$ ) trifft. Im Falle eines substituierten Enzymmechanismus befindet sich der gemeinsame Schnittpunkt auf der  $[A]/v_i$ -Achse in dem Punkt ( $K_{mA}/V$ ) (CORNISH-BOWDEN 1999). Im Falle einer computergestützten Auswertung mit Hilfe des Programms LEONORA ermöglicht die Güte der Anpassung an die entsprechenden Geschwindigkeitsgleichungen eine Diskriminierung zwischen beiden Möglichkeiten (CORNISH-BOWDEN 1995).

Im Falle der Zwei-Substrat-Kinetik (2.15.1) von HodC mit *I* (2,5-100 µM) und O<sub>2</sub> (120-1205 µM) erfolgte zunächst die Auswertung mit Hilfe eines Hanes-Plots ( $[I]/v_i$  zu  $[I]$ ); dies resultierte in einer Geradenschar ohne gemeinsamen Schnittpunkt. Dieser Effekt ist vermutlich auf die beobachtete Hemmung der Reaktion durch hohe Konzentrationen von *I* zurückzuführen. Die computergestützte Anpassung der Meßdaten an die Gleichungen eines ternären Komplex-Mechanismus mit und ohne Substrathemmung (Gleichungen 7 und 8) bzw. eines substituierten Enzymmechanismus (Gleichung 6) ließen keine eindeutige Zuordnung zu einem speziellen Mechanismus zu (Tabelle 5). Die Berechnung der katalytischen Konstanten für *I* und O<sub>2</sub> ist nicht gesichert, da die ermittelten Werte für  $K_{mA}$  und  $K_{mO_2}$  nahe der experimentellen Limits für die verwendbaren Konzentrationen der Substrate liegen und Werte nur über eine ungenügende Konzentrationsspanne erhoben werden konnten. Apparente kinetische Konstanten für O<sub>2</sub> konnten zwar für ungesättigte (<10 µM *I*)

und gesättigte (>20  $\mu\text{M}$  *I*) Konzentrationen von *I* bestimmt werden, aber für *I* konnten nur nicht sättigende Konzentrationen an  $\text{O}_2$  eingesetzt werden.

Tabelle 5: Absolute kinetische Konstanten der Reaktion von HodC mit dem physiologischen Substrat 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)

Mechanismus	$K_{siA}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{sA}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{mA}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{mO_2}$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat} / K_{mA}$ ( $\times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$k_{cat} / K_{mO_2}$ ( $\times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
Ternärer Komplex (Gl. 7)	-	2,0 (0,6)	2,0 (1,2)	907 (138)	274 (30)	1,4	0,003
Ternärer Komplex mit Hemmung durch A (Gl. 8)	-423 (-151)	1,7 (0,6)	1,1 (0,9)	973 (102)	261 (22)	2,4	0,003
substituiert (Gl. 6)	-		6,9 (1,6)	1320 (212)	350 (46)	0,5	0,003

Experimente wurden durchgeführt in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA, bei 30°C. Verwendete Konzentrationsspannen: 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (*I*) (2,5-100  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{O}_2$  (120-1205  $\mu\text{M}$ ). Die Werte der Parameter und ihre Standardabweichungen (in Klammern) wurden mit dem Programm LEONORA (CORNISH-BOWDEN 1995) ermittelt. Je 420 Einzelwerte pro Datensatz wurden zur Kalkulation der Parameter eingesetzt.

### 3.2.2 Umsetzbarkeit alternativer Substrate

Da mit dem physiologischen Substrat (*I*) unter den experimentellen Bedingungen keine Bestimmung des Mechanismus der bakteriellen 2,4-Dioxygenolyse möglich war, wurde die Umsetzbarkeit alternativer Substrate untersucht. Die Umsetzung von 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin (*II*), dem physiologischen Substrat der 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin 2,4-Dioxygenase (Qdo) durch Hod wurde bereits von BAUER et al. (1996) nachgewiesen. Als potentielle alternative Substrate wurden 3-Hydroxy-2-methylpyran-4-on (*IV* Schema 6), 3-Hydroxy-2-methyl-1*H*-pyridin-4-on (*V*, Schema 6) und 1*H*-3-Hydroxy-4-oxo-2-phenylchinolin (*III*, Schema 6), wie unter 2.14.4 beschrieben, getestet. Während der gesamten Versuchsdauer konnte keine Extinktionsänderung der Absorptionsmaxima festgestellt werden. Die Aktivität des Enzyms bezüglich des physiologischen Substrates änderte sich während der Versuchsdauer nicht. Keine dieser Substanzen wurde als Substrat akzeptiert. Ein Hemmeffekt der alternativen Substrate (in Konzentrationen bis zu 1 mM) auf die durch HodC katalysierte Umsetzung des physiologischen Substrats war nicht festzustellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Benzol-Ring sowie die Größe des Substituenten an C2 relevant für die Substratbindung ist.

### 3.2.3 Umsetzung des alternativen Substrates 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin

#### Apparente kinetische Konstanten der HodC mit dem Substrat 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin

Die apparenten kinetischen Konstanten der Reaktion von HodC mit dem alternativen Substrat 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin (**II**) wurden wie unter 2.15.1 beschrieben ermittelt. Eine Substrathemmung durch **II** konnte im Bereich von 10-200  $\mu\text{M}$  in einem Lineweaver-Burk-Plot (Abbildung 8) nicht nachgewiesen werden. Die Anpassung der Initialgeschwindigkeiten an eine Geschwindigkeitsgleichung ohne Substrathemmung zeigte die beste Qualität (Tabelle 4). Allerdings kann die Möglichkeit einer Hemmung durch sehr hohe Substratkonzentrationen nicht völlig ausgeschlossen werden, wie eine Anpassung der Daten an die Gleichung (6) zeigt (Tabelle 4). Die ermittelten Konstanten  $K_{mA}^{app}$  für **II** in luftgesättigtem Puffer (230  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$ ) wurde mit  $93 \pm 7$

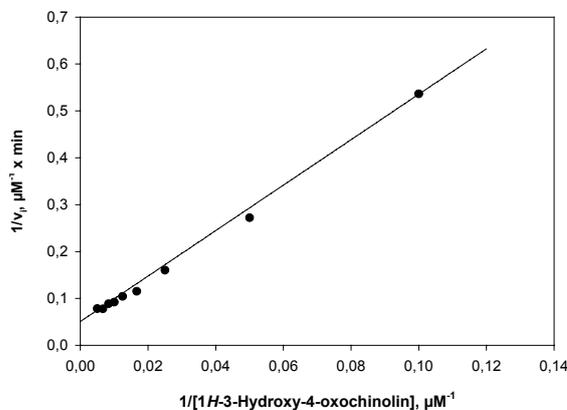


Abbildung 8: Lineweaver-Burk-Plot der Reaktion von HodC mit 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin. Experimente wurden durchgeführt in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 mM EDTA (luftgesättigt) bei 30°C, Konzentrationspanne von 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin (**II**): 10-200  $\mu\text{M}$ . Die Linie entspricht einer Anpassung der Daten an die Michaelis-Menten Gleichung ohne Substrathemmung (5).

$\mu\text{M}$  und  $K_{mO_2}^{app}$  bei 60  $\mu\text{M}$  **II** wurde mit  $233 \pm 63 \mu\text{M}$  bestimmt. Diese Werte ermöglichten die Variation beider Substratkonzentrationen über anwendbare Bereiche um die ermittelten Michaelis-Konstanten von **II** und  $\text{O}_2$ . Zwischen 55 bis 602  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$  konnte kein Einfluß auf  $K_{mA}^{app}$  ( $60 \pm 6 \mu\text{M}$ ) festgestellt werden. Ein Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von **II** (10-150  $\mu\text{M}$ ) auf  $K_{mO_2}^{app}$  ( $178 \pm 50 \mu\text{M}$ ) war ebenfalls nicht zu beobachten. Bis zu Konzentrationen von 150  $\mu\text{M}$  **II** konnte keine Substrathemmung nachgewiesen werden. Allerdings

konnten, begrenzt durch die Messbarkeit im Photometer, keine sättigenden Bedingungen für **II** getestet werden. Ein Anstieg von  $k_{cat}^{app}$  für **II** von  $2,2 \pm 0,2$  auf  $22,0 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$  bei einer Erhöhung der  $\text{O}_2$ -Konzentration von 55 auf 1204  $\mu\text{M}$ , zeigt deutlich den limitierenden Effekt unzureichender  $\text{O}_2$ -Konzentrationen auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Wenn die Konzentration des Substrates **II** von 10 auf 150  $\mu\text{M}$  erhöht wurde, stieg  $k_{cat}^{app}$  für  $\text{O}_2$  von  $1,3 \pm 0,3$  auf  $5,3 \pm 0,8 \text{ s}^{-1}$ . Eine Sättigung konnte dabei nicht erreicht werden.

Zwei-Substrat-Kinetik der HodC mit 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin (II)

Ein Hanes-Plot ( $[II]/v_i$  zu  $[II]$ ) der Zwei-Substrat-Kinetik von HodC mit **II** (10-150  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{O}_2$  (55-274  $\mu\text{M}$ ) zeigt eine Serie von Geraden, die sich in einem Punkt links der vertikalen Achse schneiden (Abbildung 9) und identifiziert somit einen ternären Komplex-Mechanismus, bei dem ein Komplex bestehend aus Enzym, organischem Substrat und  $\text{O}_2$  gebildet wird. Die Auswertung der einzelnen Teil-Experimente mit LEONORA identifiziert, wie bereits die grafische Auswertung, einen ternären Komplex-Mechanismus (Gleichung 8). Ein substituierter (ping-pong) Mechanismus (Gleichung 7) kann ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

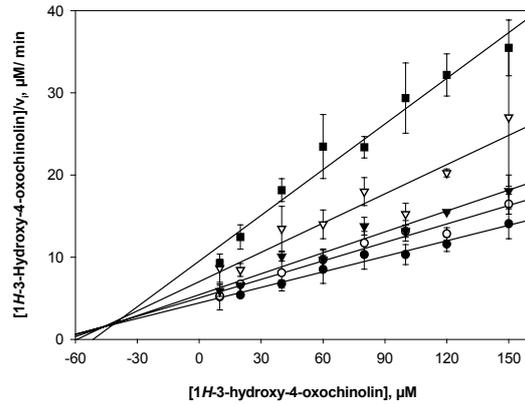


Abbildung 9: Hanes Plot der Reaktion von HodC mit 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin  
Experimente wurden durchgeführt in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA bei 30°C. 274  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$  (●), 219  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$  (○), 164  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$  (▼), 110  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$  (▽) and 55  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$  (■). (FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)

Tabelle 6: Absolute kinetische Konstanten von HodC mit einem alternativen Substrat 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin (FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)

Mechanismus	$K_{siA}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{sA}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{mA}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{mO_2}$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat} / K_{mA}$ ( $\times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat} / K_{mO_2}$ ( $\times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
Ternärer Komplex (Gl. 7)		45 (15)	95 (34)	270 (91)	11 (2)	1,2	0,41
Ternärer Komplex mit Hemmung durch A (Gl. 8)	-379 (-100)	11 (3)	125 (24)	566 (116)	13 (2)	1,0	0,30
substituiert (Gl. 6)			1136 (1370)	2811 (3428)	75 (88)		

Experimente wurden durchgeführt in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA, bei 30°C;  $\text{O}_2$  Konzentration (55-274  $\mu\text{M}$ ); Konzentrationsspanne von 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin (10-150  $\mu\text{M}$ ). Die Werte der Parameter und ihre Standardabweichungen (in Klammern) wurden mit dem Programm LEONORA (CORNISH-BOWDEN 1995) ermittelt. Je 160 Einzelwerte pro Datensatz wurden zur Kalkulation der Parameter eingesetzt.

**3.2.4 Produkthemmstudien**

Die Ergebnisse der Produkthemmstudien (2.15.1) sind in Tabelle 7 zusammengefasst. *N*-Formylantranilsäure wirkt als kompetitiver Inhibitor gegenüber **II** bei nicht-sättigenden Konzentrationen von  $\text{O}_2$  (160  $\mu\text{M}$ ). Dieses Verhalten deutet auf eine Bindung von *N*-Formylantranilsäure und **II** an die gleiche Enzymform hin. Die Hemmung von *N*-Formylantranilsäure gegen  $\text{O}_2$  ist nonkompetitiv bei nicht sättigenden Konzentrationen von **II** (40  $\mu\text{M}$ ) und resultiert aus der Bindung beider Substanzen an unterschiedliche Enzymformen. Kohlenmonoxid zeigt nonkompetitive Hemmung gegen  $\text{O}_2$  und gegen **II** und bindet daher an eine weitere Enzymform. Das vorliegende Muster der Hemmung schließt einen „rapid equilibrium

ordered bi bi“, einen „rapid equilibrium random bi bi“, einen „Theorell-Chance“ und einen substituierten Mechanismus aus (RUDOLPH 1979). Für HodC mit **II** als organischem Substrat ergibt sich aus dem Muster der Hemmung ein geordneter (sequentieller) ternärer Komplex-Mechanismus, in dem die Bindung des aromatischen Substrates (A) vor der Bindung von O<sub>2</sub> an das Enzym (E) erfolgt. Kohlenmonoxid (CO) verlässt den Enzym-Produkt-Komplex vor *N*-Formylanthranilsäure (P, Schema 7).

Schema 7: Abfolge der Substrat-Bindung und Produkt-Freisetzung der 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase (FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)

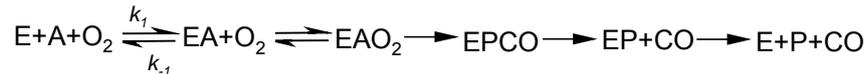


Tabelle 7: Produkthemmung der Reaktion von HodC mit 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin (FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)

variables Substrat	konstantes Substrat <sup>a)</sup>	variables Produkt	Hemmtypus	$K_{ic}^{app}$ (μM)	$K_{iu}^{app}$ (μM)
(Aromat) (20-180 μM)	O <sub>2</sub> (164 μM; nicht gesättigt)	<i>N</i> -Formylanthranilsäure (0-1000 μM)	kompetitiv <sup>b)</sup>	363 (35)	
(Aromat) (20-180 μM)	O <sub>2</sub> (438 μM)	<i>N</i> -Formylanthranilsäure (0-1000 μM)	kompetitiv <sup>b)</sup>	324 (20)	
O <sub>2</sub> (54-438 μM)	( <b>II</b> ) (40 μM; nicht gesättigt)	<i>N</i> -Formylanthranilsäure (0-1000 μM)	nonkompetitiv <sup>b)</sup>	445 (78)	521 (87)
(Aromat) (20-180 μM)	O <sub>2</sub> (164 μM; nicht gesättigt)	CO (0-588 μM)	nonkompetitiv <sup>b)</sup>	1770 (395)	1860 (325)
(Aromat) (20-180 μM)	O <sub>2</sub> (438 μM)	CO (0-588 μM)	unkompetitiv <sup>c)</sup>		503 (41)
O <sub>2</sub> (54-438 μM)	( <b>II</b> ) (40 μM; nicht gesättigt)	CO (0-588 μM)	nonkompetitiv <sup>c)</sup>	1238 (914)	1068 (304)

Hemmstudien wurden durchgeführt in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA, 30 °C. Die Werte der Parameter und ihre Standardabweichungen (in Klammern) wurden mit dem Programm LEONORA (CORNISH-BOWDEN 1995) ermittelt.

<sup>a)</sup> Aufgrund der begrenzten Löslichkeit von Sauerstoff und 1*H*-3-Hydroxy-4-oxoquinoline konnten keine sättigenden Bedingungen eingestellt werden.

<sup>b)</sup> Diagramme der Steigungen und der Schnittpunkte gegen die Inhibitorkonzentration zeigten lineare Verläufe.

<sup>c)</sup> Diagramme der Steigungen und der Schnittpunkte gegen die Inhibitorkonzentration zeigten nicht-lineare Verläufe.

Die Spezifitätskonstante  $k_{cat}/K_{mA}$  entspricht einer Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung (Schema 7,  $k_1$ ) für die Assoziation von **II** an HodC und wurde mit  $1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bestimmt (Tabelle 6, Gleichung 7). Dieser Wert ist 1170-fach geringer als die Spezifitätskonstante für das physiologische Substrat, die mit  $1,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  nahezu diffusionslimitiert ist (Tabelle 5). Die Assoziation von **I** an HodC kann somit als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der 2,4-Dioxygenolyse ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis zeigt aber, dass der Methyl-Substituent an C2 eine wesentliche Bedeutung bei der effizienten Bindung des Substrates an HodC hat.

Da  $K_{sA} = k_{-1} / k_1$  die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes (EA) repräsentiert, konnten die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{-1}$  für **I** mit  $280 \text{ s}^{-1}$  und für **II** mit  $5 \text{ s}^{-1}$  ermittelt werden. Die Spezifitätskonstante  $k_{cat} / K_{mO_2}$  für **I** war mit  $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  7,5-fach höher als die Konstante für **II** ( $0,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) und deutet daher leicht unterschiedliche Reaktivitäten der gebundenen Substrate oder EA-Komplexe gegenüber  $O_2$  an.

### 3.2.5 pH-, pD- und Viskositätseffekte

His<sub>6</sub>HodC zeigte über einen pH-Bereich von 5,5 bis 11,0 bzw. einen pD-Bereich von 6,0 bis 11,0 keine signifikanten Aktivitätsverluste (vgl. 3.1.4). Unterschiede in den katalytischen Konstanten sollten daher lediglich auf einem pH- bzw. pD-Effekt beruhen und nicht auf eine Beeinträchtigung der Enzymintegrität.

#### pH- und pD-Abhängigkeit der apparenten Konstanten $K_{mO_2}^{app}$ und $k_{catO_2}^{app}$

Die Messungen im pH-Bereich von 5,5 bis 10,5 zeigten einen deutlichen Einfluß des pH-Wertes auf die kinetischen Konstanten.  $k_{catO_2}^{app}$  erhöhte sich von  $0,44 \text{ s}^{-1}$  (pH 5,1) auf  $8,8 \text{ s}^{-1}$  (pH 9,1).  $K_{mO_2}^{app}$  stieg von  $45 \text{ }\mu\text{M}$  (pH 5,1) auf  $480 \text{ }\mu\text{M}$  (pH 9,1). Die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung

( $k_{catO_2}^{app} / K_{mO_2}^{app}$ ) erreicht bei pH 8 ihr

Maximum mit  $2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Das pH-Profil von  $\log k_{catO_2}^{app} / K_{mO_2}^{app}$  (Abbildung 10) ermöglicht keine korrekte Bestimmung des

$pK_a$ -Wertes einer ionisierbaren Gruppe im Bereich von pH 5 bis 7. Zum einen ist die Bestimmung der kinetischen Konstanten

( $k_{catO_2}^{app} = 0,44 \pm 0,16$ ;  $K_{mO_2}^{app} = 45,1 \pm 93,8$ )

bei pH 5 kritisch, da das Enzym lediglich über 55% Restaktivität verfügt (vgl. 3.1.4). Zum anderen erlauben die gewählten pH-Abstände keine exakte Eingrenzung des Bereichs der größten Aktivitätssteigerung.

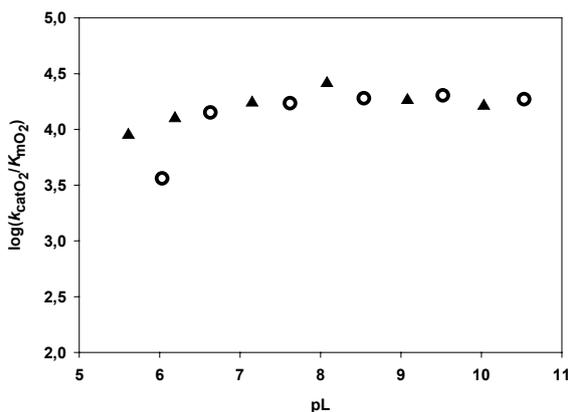


Abbildung 10: pH/pD-Abhängigkeit der katalytischen Konstanten  $k_{catO_2}^{app} / K_{mO_2}^{app}$  von His<sub>6</sub>HodC

pL = pH in H<sub>2</sub>O (▲) oder pD in D<sub>2</sub>O (○).

Bei pH 11 ist ebenfalls, trotz einer Enzymrestaktivität von 99%, keine eindeutige Bestimmung der kinetischen Konstanten möglich. Zum einen waren geringe Aktivitäten erst ab  $O_2$  Konzentrationen von  $602 \text{ }\mu\text{M}$  meßbar, was möglicherweise durch einen Anstieg von  $K_{mO_2}^{app}$  bei pH 11 verursacht wird. In diesem Fall kann die Messung nicht bei der notwendigen Substratsättigung durchgeführt werden. Zum anderen verfügt das Substrat in diesem pH-Bereich über eine ionisierbare Gruppe (vgl. 3.3.1). Daher sind die ermittelten katalytischen Konstanten bei pH 11 nicht nur durch den pH-Wert, sondern auch durch den Dissoziierungsgrad des Substrates bedingt. Eine Abgrenzung der beiden Effekte voneinander war ohne ein alternatives Substrat mit anderen  $pK_a$ -Werten nicht möglich.

Zur Untersuchung geschwindigkeitslimitierender Schritte der Katalyse, insbesondere Protonentransferprozesse, wurden die Lösungsmittel-Isotopeneffekte auf  $k_{catO_2}^{app} / K_{mO_2}^{app}$  in D<sub>2</sub>O untersucht. Die ermittelten Werte in D<sub>2</sub>O-Puffern waren denen in H<sub>2</sub>O-Puffern sehr ähnlich (Abbildung 10, Maximum  $k_{catO_2}^{app} / K_{mO_2}^{app} 1,96 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ , pD 9,1) und zeigten keine deutlichen Lösungsmittel-Isotopeneffekte auf die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung. Andererseits zeigten sich inverse Lösungsmittel-Isotopeneffekte auf  $K_{mO_2}^{app}$  mit  $K_H / K_D = 0,17$  und  $k_{catO_2}^{app}$  mit  $k_H / k_D = 0,23$  bei pH/pD 8,0.

pH- und pD-Abhängigkeit der apparenten Konstanten  $K_{mA}^{app}$  und  $k_{catA}^{app}$

Die Messungen wurden bei einer Konzentration von 1203 µM O<sub>2</sub> und variablen Konzentrationen von **II** durchgeführt.  $k_{catA}^{app}$  stieg von 5,2 s<sup>-1</sup> (pH 5,7) über 24 s<sup>-1</sup> (pH 8,2) auf 29 s<sup>-1</sup> (pH 9,3). Die Werte für  $K_{mA}^{app}$  stiegen von 135 µM (pH 5,7) auf 266 µM (pH 9,3) an. Ein Lösungsmittel-Isotopeneffekt auf  $K_{mA}^{app}$  konnte in D<sub>2</sub>O-Puffern nicht beobachtet werden, so dass ein vom Lösungsmittel beeinflusster Schritt, insbesondere der Protonentransfer vom organischen Substrat zur katalytischen Base (H<sup>251</sup>; vgl. 3.3.2) für die Reaktion nicht geschwindigkeitsbestimmend ist.

Das pH-Profil von  $\log k_{catA}^{app} / K_{mA}^{app}$  (Abbildung 11) deutet auf die katalytische Relevanz eines deprotonierten Aminosäure-Restes mit einem pK<sub>a</sub> Wert von 6,5 hin, da bei pH 4 und pH 5 keine Enzymaktivitäten meßbar waren. Damit wird die Bedeutung eines deprotonierten His-Restes für die enzymatische Reaktion unterstrichen. In

Qdo konnte das konservierte His (H<sup>244</sup>) als katalytisch relevant identifiziert werden (FISCHER et al. 1999). Für Hod wurde die Bedeutung des konservierten Restes H<sup>251</sup> in dieser Arbeit belegt (vgl. 3.4 und 3.3.2). Das pD-Profil von  $\log k_{catA}^{app} / K_{mA}^{app}$  zeigt eine leichte Verschiebung zu einem basischeren pK<sub>a</sub> in D<sub>2</sub>O, aber keinen signifikanten Effekt auf den Maximalwert für die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung bei pL 8-9 (Abbildung 11). Die Ergebnisse liefern somit keinen Hinweis auf geschwindigkeitslimitierende Protonentransferprozesse

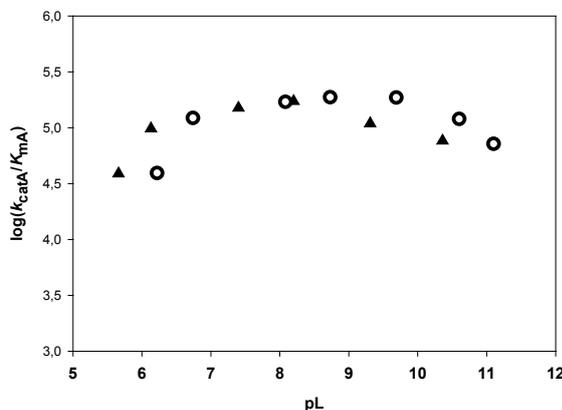


Abbildung 11: pH/pD-Abhängigkeit der katalytischen Konstanten  $k_{catA}^{app} / K_{mA}^{app}$  von His<sub>6</sub>HodC

pL = pH in H<sub>2</sub>O (▲) oder pD in D<sub>2</sub>O (○).

in Bezug auf die Substratumsetzung. Allerdings ist auch hier, wie bereits für die katalytischen Konstanten bezüglich O<sub>2</sub>, ein leichter inverser Lösungsmittel-Isotopeneffekt auf  $K_{mA}^{app}$  ( $K_H / K_D = 0,7$ ) und  $k_{catA}^{app}$  ( $k_H / k_D = 0,7$ ) zu erkennen.

Viskositätseffekte auf die apparenten Konstanten  $K_{mO_2}^{app}$  und  $k_{catO_2}^{app}$

Falls die Bindung molekularen Sauerstoffs an den Komplex [HodC-Substrat(di)anion] einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt, sollte  $k_{catO_2}^{app} / K_{mO_2}^{app}$  durch die Viskosität des Lösungsmittels beeinflussbar sein. Änderungen der relativen Viskosität des Testpuffers (pH 8,0) im Bereich von 1 bis 3 hatten keinen Effekt auf  $K_{mO_2}^{app}$ ,  $k_{catO_2}^{app}$  und  $k_{catO_2}^{app} / K_{mO_2}^{app}$  von His<sub>6</sub>HodC. Die Bindung von O<sub>2</sub> und die Freisetzung der Produkte sind somit keine geschwindigkeitsbestimmenden Schritte in der Reaktion von HodC.

### 3.3 Physikalische Charakterisierung der 2,4-Dioxygenolyse

#### 3.3.1 Säurekonstanten der Substrate

Bedingt durch die Dissoziationsgleichgewichte zwischen den geladenen und neutralen Formen des Substrates zeigten die UV/Vis-Spektren, durchgeführt nach 2.17, von 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (**I**) und 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin (**II**)

eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert. Bei einer Titration von **I** im pH-Bereich von 1 bis 3 erfolgte eine Verschiebung der Maxima von 233 zu 242 nm und von 321 zu 334 nm mit einem isosbestischen Punkt bei 321 nm (Abbildung 12). Im Bereich zwischen pH 3 und pH 9 blieb das Spektrum konstant mit Maxima bei 242 und 334 nm. Eine weitere Erhöhung des pH-Wertes von 9 auf 13 führte zu einer weiteren Verschiebung der Maxima auf 261 nm und 378 nm mit einem isosbestischen Punkt bei 356 nm. Substrat **II** zeigte ein identisches Verhalten mit geringfügig abweichenden Maxima. Da die UV/Vis-Spektren nach 1 h Inkubation bei RT durch Anpassung der pH-Werte ineinander umgewandelt werden konnten, ist ein Zerfall von **I** oder **II** während der Messung ausgeschlossen. Spektren unter oxidischen oder anoxischen Bedingungen zeigten keine Unterschiede.

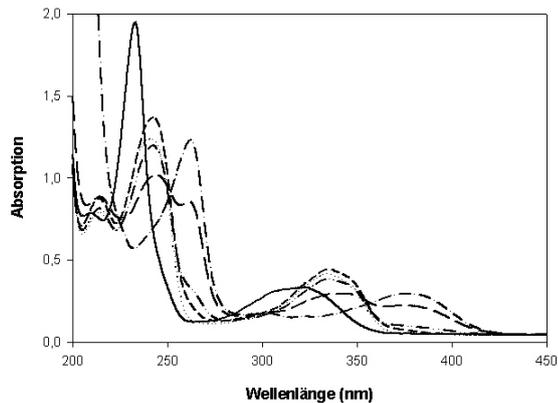


Abbildung 12: pH-Abhängigkeit der UV/Vis Spektren von 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin pH 1 (—), pH 3 (---), pH 8 (.....), pH 10 (— · — · —), pH 11 (— — —), und pH 13 (— · — · —); (**I** 50 µM); (FRERICHS-DEEKEN et al. 2004).

Substrat **II** zeigte ein identisches Verhalten mit geringfügig abweichenden Maxima. Da die UV/Vis-Spektren nach 1 h Inkubation bei RT durch Anpassung der pH-Werte ineinander umgewandelt werden konnten, ist ein Zerfall von **I** oder **II** während der Messung ausgeschlossen. Spektren unter oxidischen oder anoxischen Bedingungen zeigten keine Unterschiede.

Die UV/Vis-Spektren wurden zur Bestimmung der  $pK_a$ -Werte nach JOHNSON & METZLER (1970) ausgewertet. Für die Substrate **I** und **II** wurde für die Dissoziation des ersten Protons vom neutralen Substrat ein  $pK_a$  von 1,5 und für die Dissoziation eines weiteren Protons vom Substratmonoanion ein  $pK_a$  von 11,0 aus den Spektren interpretiert. Die aus den Spektren interpretierten Werte entsprachen damit den angegebenen Werten von  $1,39 \pm 0,2$  und  $11,01 \pm 0,2$  für **I** und  $1,33 \pm 0,2$  und  $10,70 \pm 0,2$  für **II** in der REGISTRY-Databse (COPYRIGHT 2001; American Chemical Society,  $pK_a$ -Werte kalkuliert mit Advanced Chemistry Development (ACD) Software Solaris V4.67 (C) 1994-2001 ACD). Die ermittelten  $pK_a$ -Werte deuteten ursprünglich auf

ein Monoanion als vorherrschende Substratform bei pH 8,0 hin. Neuere Kalkulationen der  $pK_a$ -Werte für das Substrat *I* mit dem SPARC-Online-Calculator (HILAL et al. 1994; HILAL et al. 1995; <http://www.ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/>) deuten allerdings auf das ungeladene Substrat als dominante Form bei pH 8,0 hin. Der kalkulierte  $pK_a$ -Wert für das Dissoziationsgleichgewicht zwischen dem neutralen Substrat und dem Substratmonoanion ist 9,20 und für den Übergang vom Substratmonoanion zur Dianionform 13,69. Ein weiterer  $pK_a$ -Wert von 1,96 wurde für das Dissoziationsgleichgewicht zwischen dem Substratkation (1*H*-3,4-Dihydroxychinaldin) und dem neutralen Substrat ermittelt. Ein Vergleich der für *I* experimentell ermittelten Werte mit den vom SPARC-Online-Calculator ermittelten Werten deutet darauf hin, dass über die UV/Vis-Spektren (vgl. Abbildung 12) nicht die  $pK_a$ -Werte der Dissoziationsgleichgewichte zwischen neutralem Substrat, der Monoanion- und der Dianionform bestimmt wurden, sondern die  $pK_a$ -Werte der Gleichgewichte zwischen Substratkation, neutralem Substrat und dem Substratmonoanion. Da der  $pK_a$ -Wert für den Übergang vom Substratmonoanion zur Dianionform mit 13,96 sehr hoch liegt, konnte das Spektrum eines Substratdianions in wässrigem Puffer nicht aufgezeichnet werden. Für diese Arbeit ergibt sich aus den neuen Erkenntnissen eine Änderung bezüglich der vom Enzym bei pH 8,0 wahrscheinlich bevorzugten Substratzpezies. Die Bindung des Substrates in ungeladener Form ist wahrscheinlicher als die in FRERICHS-DEEKEN et al. (2004) postulierte Bindung eines Monoanions. Die Arbeitshypothese einer basenkatalysierten Substrataktivierung durch Hod (4.1 S. 72 und 4.2.2 S. 78) bleibt von den neuen Erkenntnissen unberührt.

### 3.3.2 UV/Vis-Spektren äquimolarer Mischungen von Enzym und Substrat

Aus den Ergebnissen der Produkthemmstudien (3.2.4) war bekannt, dass das organische Substrat vor O<sub>2</sub> an das Enzym bindet. Eine Mischung des organischen Substrates und HodC unter anoxischen Bedingungen sollte daher neben dem freien Substrat (A), dem freien Enzym (E) auch zum Teil aus dem Enzym-Substrat-Komplex (EA) bestehen. Der Einfluß des Enzyms auf das gebundene Substrat wurde mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie untersucht (2.17). Eine Mischung äquimolarer Mengen HodC mit *I* unter anoxischen Bedingungen zeigt eine Verschiebung der Maxima in den längerwelligen Bereich (A, Abbildung 13). Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichtes des Substrates zu Gunsten der Anionform im EA-Komplex. Das Spektrum der Mischung ist unter anoxischen Bedingungen über eine Stunde stabil und ändert sich augenblicklich bei Zugabe von O<sub>2</sub>. Ausgehend vom pH-Aktivitätsoptimum (pH 8,0) der 2,4-Dioxygenasen ist die bevorzugte Bindung des neutralen Substrates wahrscheinlich (3.3.1). HodC-H251A zeigt einen deutlich geringeren Wert für  $k_{cat}^{app}$  im Vergleich zu HodC, wohingegen  $K_{mA}^{app}$  durch den AS-Austausch kaum beeinträchtigt wurde (vgl. S. 77), was dafür spricht, dass die Substratbindung kaum, die Umsetzung des Substrates aber deutlich beeinträchtigt ist. Eine äquimolare Mischung von HodC-H251A und *I* unter oxischen sowie anoxischen Bedingungen zeigt nicht die für HodC typische, auf Anionbildung basierende, Verschiebung der Absorptionsmaxima (B, Abbildung 13). Vielmehr erscheint das Bild eines Additionsspektrums von Enzym und Substrat bei pH 8,0. Eine Anionbildung ist nicht zu erkennen. H<sup>251</sup> scheint als Base im aktiven Zentrum der

Hod die Bildung des Anions zu katalysieren und somit das Substrat für eine weitere Reaktion mit O<sub>2</sub> zu aktivieren.

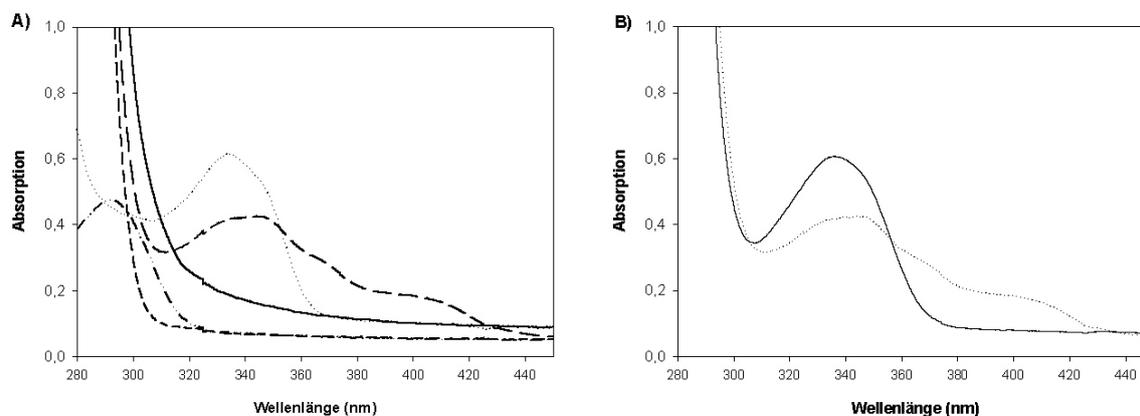


Abbildung 13: UV/Vis Spektren von HodC und HodC-H251A mit 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin  
 A) HodC und 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (**I**), oxische Bedingungen (—); HodC und (**I**), anoxische Bedingungen (---); (**I**) (·····); HodC (- - -); N-Acetylanthranilsäure (- · - ·). B) HodC-H251A und (**I**) (—), anoxische Bedingungen; HodC und (**I**), anoxische Bedingungen (·····); Konzentration der Komponenten jeweils 50 µM. (FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)

### 3.3.3 UV/Vis-Spektren der basenkatalysierten Modellreaktionen

Die chemische Dioxygenolyse von 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (**I**) oder 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin (**II**) in DMF mit <sup>t</sup>BuOK oder in wässriger Natronlauge führt zu den gleichen Produkten wie die Reaktionen der 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod (BAUER et al. 1996; FISCHER 2000). Die basenkatalysierte Umsetzung von 1H-3-Hydroxy-4-oxo-2-phenylchinolin (**III**) unter CO-Freisetzung wurde von CZAUN & SPEIER (2002) beschrieben. Mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie wurde der Einfluß der Basen <sup>t</sup>BuOK und NaOH auf die Substrate der 2,4-Dioxygenasen und ihres C2-Phenylderivates unter oxischen und anoxischen Bedingungen untersucht (2.17).

Unter oxischen sowie anoxischen Bedingungen in DMF ohne Basenzugabe zeigten **I**, **II** und **III** Absorptionsmaxima bei 345 nm, 346 nm und 366 nm (Abbildung 14A-C). In Anwesenheit der Basen <sup>t</sup>BuOK oder NaOH erfolgte eine Verschiebung der jeweiligen Maxima auf 354 nm (**I**), 355 nm (**II**) und 373 nm (**III**) und zeigte somit die Anionbildung der Substanzen an. Die beschriebenen UV/Vis-Spektren blieben unter anoxischen Bedingungen über 2 h konstant. In Anwesenheit von O<sub>2</sub> kommt es in den basischen Ansätzen bei allen Substanzen zur Ausbildung einer intensiven roten Farbe. Die Maxima der UV/Vis-Spektren zeigten in diesem Stadium eine weitere Verschiebung in den längerwelligen Bereich (361 nm **I**, 360 nm **II** und 383 nm **III**). Die visuell erkennbare Färbung der Testansätze spiegelte sich in der Ausbildung zusätzlicher Absorptionsmaxima bei 483 nm (**I**), 486 nm (**II**) und 532 nm (**III**) wieder (Abbildung 14A-C). CZAUN & SPEIER (2002) beschrieben die Anwesenheit eines Maximums bei 532 nm für **III** unter oxischen Bedingungen bereits für eine Mischung aus 1 mmol **III** und 1 mmol <sup>t</sup>BuOK in 15 ml DMF. Sie ordneten das neue Signal einem 1H-3-Hydroxy-4-oxo-2-phenylchinolin-Radikal zu.

In wässrigen Lösungen zeigten die Spektren von **I**, **II** und **III** unter dem Einfluß von <sup>t</sup>BuOK oder NaOH als Folge einer Deprotonierung ebenfalls eine Verschiebung der Maxima in den

längerwelligen Bereich. Für **I** erfolgte die Verschiebung von 331 zu 373 nm, für **II** von 335 zu 355 nm und für **III** von 350 zu 391 nm (Abbildung 15A-C). Im Gegensatz zu den Beobachtungen in DMF waren die Spektren in H<sub>2</sub>O mit Base unter oxidischen und anoxischen Bedingungen gleich. Die Ausbildung der Substratanionen und ihre Reaktivität gegenüber O<sub>2</sub> scheint unter aprotischen Bedingungen deutlich begünstigt zu sein. Die katalytische Konstante ( $k_{cat}$ ) der Reaktion von **I** mit <sup>t</sup>BuOK in DMF ist 0,3 h<sup>-1</sup> aber in H<sub>2</sub>O kleiner als 0,01 h<sup>-1</sup>.

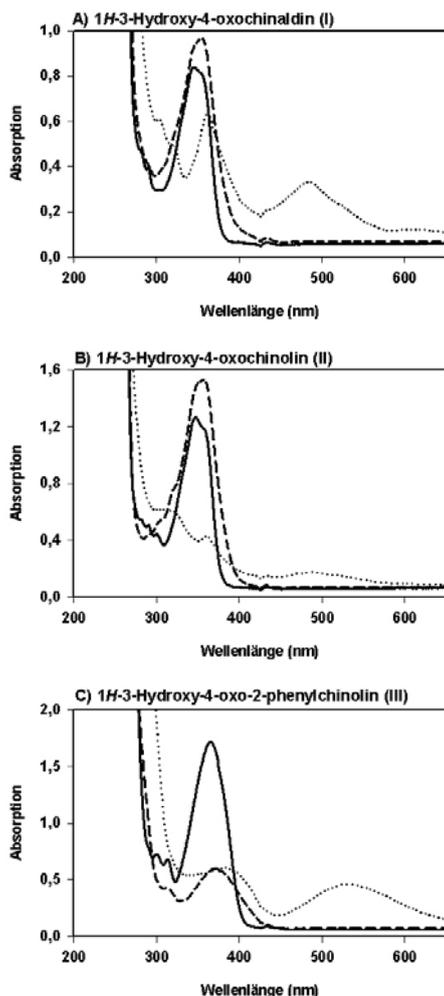


Abbildung 14: UV/Vis Spektren der basenkatalysierten Modellreaktionen in DMF (A) 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (**I**), (B) 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin (**II**) und (C) 1H-2-Phenyl-3-hydroxy-4-oxochinolin (**III**). (—) Organische Komponente ohne Base; (·····) organische Komponente und <sup>t</sup>BuOK, oxisch; (- - -) organische Komponente und <sup>t</sup>BuOK, anoxisch; Konzentration der Komponenten: 100 µM. (FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)

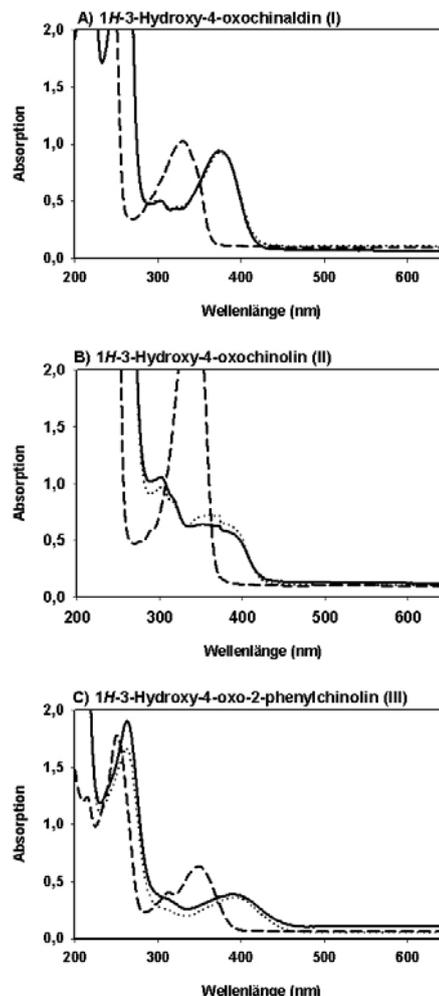


Abbildung 15: UV/Vis Spektren der basenkatalysierten Modellreaktion in H<sub>2</sub>O (A) 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (**I**), (B) 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin (**II**) und (C) 1H-2-Phenyl-3-hydroxy-4-oxochinolin (**III**). (—) Organische Komponente und NaOH; (·····) organische Komponente und <sup>t</sup>BuOK, (- - -) organische Komponente ohne Base; Konzentration der Komponenten: 100 µM, Versuche durchgeführt unter oxidischen Bedingungen. (FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)

### 3.3.4 ESR-Spektren der Modellreaktion

#### Spektren ohne Radikalfänger

Die Bildung freier Radikale in der Modellreaktion der 2,4-Dioxygenolyse wurde mit Hilfe der ESR-Spektroskopie für **I**, **II** und **III** untersucht (2.18). Bei allen drei Substanzen erfolgte die Bildung der Radikale nur unter basischen Bedingungen in Gegenwart von O<sub>2</sub>. Allerdings ist die Reaktion von **II** im Vergleich zu den Reaktionen von **I** und **III** komplizierter, da mindestens drei verschiedene Radikalspezies in unterschiedlichem Verhältnis innerhalb der ersten 60 min der Reaktion auftraten. Zusätzlich haben die Lösungsmittel einen Einfluß auf die Verhältnisse der Radikale zueinander. Im Rahmen dieser Arbeit ist eine weitere Analyse der Modellreaktionen mit **II** nicht möglich gewesen. Für **I** und **III** ließ sich innerhalb der ersten 3 min nach Beginn der Reaktion in DMF oder Puffer mit <sup>t</sup>BuOK oder NaOH die Bildung nur einer Radikalspezies nachweisen. Die Radikale konnten über mehrere Stunden in dem Reaktionsansatz nachgewiesen werden.

In anoxischen äquimolaren Mischungen von **I** oder **III** mit <sup>t</sup>BuOK oder NaOH unter aprotischen (DMF) oder protischen (Puffer) Bedingungen konnten keine deutlichen Radikalsignale gemessen werden. Hingegen zeigte die Reaktion von **I** oder **III** mit <sup>t</sup>BuOK in DMF unter oxischen Bedingungen deutliche Radikalsignale. Das ESR-Spektrum von **I** in DMF (anoxisch) zeigte sehr geringe Spuren eines Radikalsignals, hervorgerufen durch den Eintritt von geringen Mengen Luft in die Messzelle (Abbildung 16A). Wenn die Flachzelle für kurze Zeit geöffnet wurde, erschien ein deutlicheres 8-Linien-Muster mit einer weiter aufgelösten Hyperfein-Struktur (Abbildung 16B). Der vollständige Eintritt von Sauerstoff in die Reaktionslösung resultierte in einem klaren Oktett-Signal mit einer reduzierten Auflösung (Abbildung 16D). Die Verbreiterung des Signals basiert möglicherweise auf einer Interaktion mit paramagnetischem Sauerstoff oder auf möglichen Spin-Spin Interaktionen zwischen Radikalen. Zur Simulation der Hyperfein-Strukturen waren Interaktionen des Elektronenspins mit einem Stickstoffkern (<sup>14</sup>N), drei gleichwertigen Protonen, zwei zusätzlichen Protonen mit ähnlicher Kopplungsgröße und eine schwache

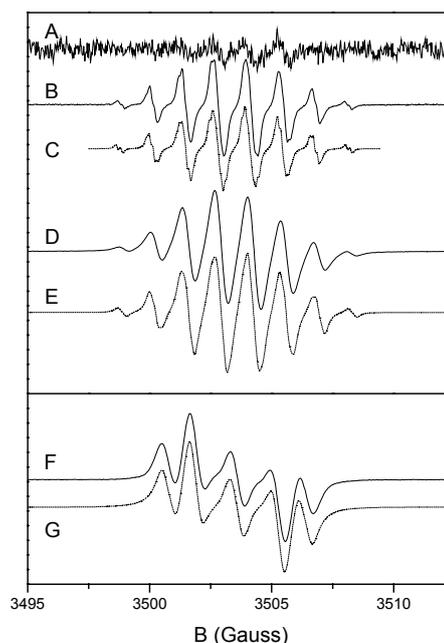
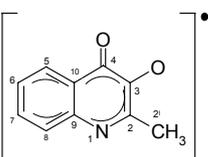
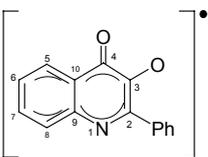


Abbildung 16: ESR Spektren der Anionradikale von 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin und 1H-3-Hydroxy-4-oxo-2-phenylchinolin  
 ESR Spektrum des Anionradikals von 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldins: (A) in DMF nach anoxischer Preparation, (B) nach partieller Zugabe von Luft, (C) Simulation des Spektrums von B, (D) nach Belüftung (5 min) und (E) Simulation des Spektrums D  
 ESR Spektrum des Radikals von 1H-2-Phenyl-3-hydroxy-4-oxochinolin: (F) in DMF nach Eintritt von Luft und (G) die entsprechende Simulation.  
 Experimentelle ESR Parameter für die Spektren von **I**: 2 mW Mikrowellenleistung, 0,1 G Modulationsamplitude; für die Spektren von **III**, 0,2 mW Mikrowellenleistung, 0,1 G Modulationsamplitude. (FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)

Protonenkopplung nötig (Abbildung 16C, Tabelle 8). Zur Simulation des Spektrums D in Abbildung 16 wurde die Linienweite auf 0,4 G erhöht, um die beobachtete Verbreiterung der Linien zu reproduzieren. Ein ähnlicher g-Faktor, typisch für ein Kohlenstoff-zentriertes Radikal, wurde bereits von CZAUN & SPEIER (2002) für das Radikal von **III** in DMF beobachtet. Dabei ist der g-Faktor eines freien Elektrons ( $g = 2,0023$ ) durch den Einfluß der Spin-Orbit Kopplung der Oxo-Gruppen des Heterozyklen verschoben. Isotope Hyperfein-Interaktionen werden normalerweise induziert durch Spin-Polarisationen oder Hyperkonjugations-Mechanismen mit paramagnetischen Kernen ( $^1\text{H}$ ,  $^{14}\text{N}$ ) im Heterozyklus **I**. Die Stickstoff-Hyperfein-Interaktion basiert auf einer N1-Kopplung und die  $H_a$ -Kopplung ist der C2-Methylgruppe zugeordnet. Die Protonen an C5 und C8 könnten die  $H_b$  und  $H_c$  Interaktionen verursachen, wohingegen die schwache Kopplung  $H_d$  vom N-H-Proton oder von einem weiteren Proton am benachbartem 6er Ring verursacht sein kann. Ohne weitere Untersuchungen mit isotopenmarkierten Substanzen ist diese Übertragung vereinbar mit der vorgeschlagenen Struktur des 3,4-Dioxychinaldin Anion Radikals (Tabelle 8). Für das Radikal-Anion von **III**, in dem gegenüber **I** die C2-Methylgruppe durch eine Phenylgruppe ersetzt ist, wurde ein einfacheres 5-Linien-Spektrum nach Lufteintritt beobachtet. Das beobachtete Spektrum kann mit den Parametern aus Tabelle 8 übereinstimmend mit den von CZAUN & SPEIER (2002) angegebenen Werten simuliert werden. Für diese Komponente sind keine Interaktionen mit der Phenylgruppe erkennbar, allerdings verstärkt sich die Stickstoff-Kopplung in **III** verglichen mit **I** (Abbildung 16F, G).

Tabelle 8: Simulationsparameter und postulierte Radikalstruktur von 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin und 1H-3-Hydroxy-4-oxo-2-phenylchinaldin

Radikalstruktur	Atomposition	Simulationsparameter <sup>a), b)</sup>	Ermittelte Spindichten (in %)
 <p>3,4-Dioxychinaldin Radikalanion (aus <b>I</b>)</p>	<p>1 2 5 8 6 oder 7</p>	<p><math>A(^{14}\text{N}) = 1,226\text{G}</math>  <math>A(3H_a) = 1,345\text{G}</math>  <math>A(H_b) = 1,440\text{G}</math>  <math>A(H_c) = 1,475\text{G}</math>  <math>A(H_d) = 0,170\text{G}</math>  <math>g = 2,0050</math>  <math>LW = 0,10\text{G}</math></p>	<p>&lt;1 6 6 7 &lt;1</p>
 <p>3,4-Dioxy-2-phenylchinaldin Radikalanion (aus <b>III</b>)</p>	<p>1 2 5 8 6 or 7</p>	<p><math>A(^{14}\text{N}) = 1,680\text{G}</math>  <math>np^c)</math>  <math>A(H_a) = 1,134\text{G}</math>  <math>A(H_b) = 1,071\text{G}</math>  <math>A(H_d) = 0,266\text{G}</math>  <math>g = 2,0051</math>  <math>LW = 0,40\text{G}</math></p>	<p>&lt;1 - 5 5 &lt;1</p>

<sup>a)</sup> In DMF; <sup>b)</sup> 1 G = 0,1 mT; LW = Linienweite; <sup>c)</sup> Keine Protoneninteraktion.  
(FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)

In einer protischen Umgebung (Puffer und  $^t\text{BuOK}$  oder NaOH als Basenkatalysator) konnten unter anoxischen Bedingung keine Radikalsignale von **I** beobachtet werden (Abbildung 18A). In Anwesenheit von Sauerstoff erscheint das bereits in DMF für **I** mit  $^t\text{BuOK}$  (Abbildung 18B) und **I** mit NaOH (identisch mit Abbildung 18B) beobachtete typische 8-Linienspektrum. Allerdings ist die Signalintensität ca. 400-500-fach kleiner, was eine Folge der wesentlich geringeren Löslichkeit von

*I* in wässrigen Lösungsmitteln sein kann. Die Radikalsignale von *I* in Puffer zerfallen nach vollständigem Lufteintritt in einem Prozess erster Ordnung mit einer charakteristischen Halbwertszeit von 15 min. Die ESR-Spektren lassen sich mit Parametern, ähnlich denen für *I* in DMF, simulieren (Tabelle 8). Die geringfügigen Abweichungen der Hyperfein-Kopplungen ( $\pm 0,05$ ) rühren von den unterschiedlichen Lösungsmittelpolaritäten her. Die Durchführung des Experimentes in D<sub>2</sub>O ergibt das gleiche 8-Linienspektrum ohne erkennbare Veränderungen in der Weite oder der Aufspaltung der Linien (Abbildung 18C). Dies zeigt, dass keine austauschbaren Protonen am N1 vorliegen. Dieses Ergebnis wird gestützt dadurch, dass *III* und <sup>t</sup>BuOK unter oxidischen Bedingungen identische ESR-Signale in Puffer und in D<sub>2</sub>O zeigen. Vermutlich stammt die kleinste Hyperfein-Kopplung von einem Proton an C6 oder C7. Zumindest für das wässrige System kann gefolgert werden, dass die N1-Position im Radikal deprotoniert vorliegt.

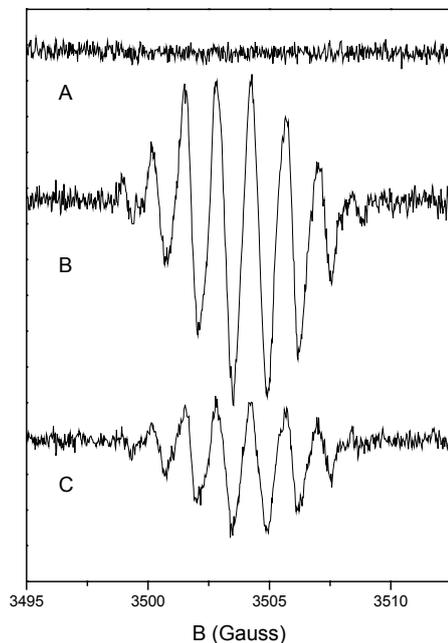


Abbildung 18: ESR-Spektren der <sup>t</sup>BuOK katalysierten Modellreaktion von 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin in Tris-HCl Puffer (A) anoxische Bedingungen; (B) Lufteintritt für 5 min; (C) in D<sub>2</sub>O, oxidische Bedingungen. Experimentelle ESR-Bedingungen: 20 mW Mikrowellenleistung, 0,5 G Modulationsamplitude. (FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)

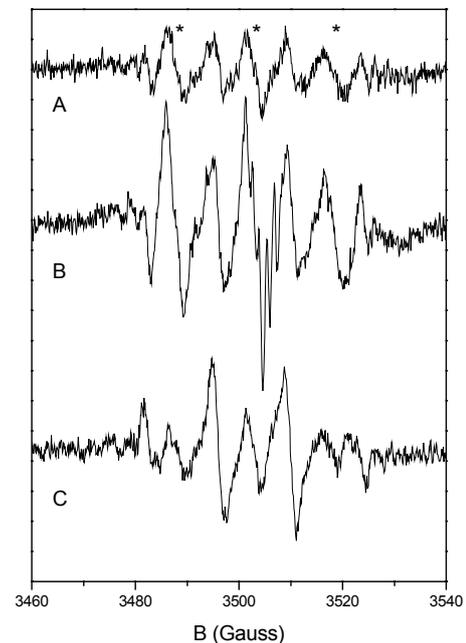


Abbildung 17: ESR-Spektren von BMPO-Spin-Addukten in Tris-HCl Puffer (A) BMPO unter oxidischen Bedingungen (\* = Tripletts-Muster); (B) oxidische Mischung von <sup>t</sup>BuOK und *I* mit BMPO (Scharfe Linien oberhalb der zentralen Signale rühren vom Oktettmuster aus (Abbildung 18B)); (C) Enzym und *I* mit BMPO nach 22 h Inkubation unter oxidischen Bedingungen. Experimentelle ESR-Bedingungen: 20 mW Mikrowellenleistung, 0,5 G Modulationsamplitude. (FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)

### Spektren der Reaktion in Anwesenheit des Radikalfängers BMPO

Ergebnisse der ESR-Untersuchungen stützen die Hypothese eines Substratanions als reaktives Intermediat, das im Verlauf der Katalyse einer Radikalbildung unterliegt. Das Anion von *I* (analog auch die Anionen von *II* und *III*) könnten molekularen Sauerstoff mittels Übertragung einzelner Elektronen in ein reaktives Superoxidradikal überführen. Mit Hilfe des Radikalfängers BMPO (ZHAO et al. 2001) sollten mögliche Superoxid-Anion-Radikale in der Modellreaktion nachgewiesen

werden. Unter anoxischen Bedingungen zeigten die Testansätze und die Kontrollexperimente (Puffer + BMPO, *I* + BMPO, <sup>t</sup>BuOK + BMPO) selbst nach langer Reaktionsdauer nur sehr schwache Signale. Unter oxischen Bedingungen hingegen konnten Signale aufgezeichnet werden (Beispiel Abbildung 17A; Puffer + BMPO). Die Analyse der Kontrollexperimente ermöglichte die Zuordnung der Signale auf zwei Gruppen. Zum einen ein Triplett-Signal, gekennzeichnet durch \* in Abbildung 17A, und einem Quartett-Signal. Letzteres konnte einem OH- oder OOH-Spin-Addukt von BMPO zugeordnet werden (ZHAO et al. 2001). Die Quelle des Triplett-Signals ist bislang unklar. Die Ergebnisse zeigten, dass in den Kontrollreaktionen spontane Radikalbildung und Spin-Addukt-Bildung auftritt. In den Testansätzen von *I* mit <sup>t</sup>BuOK und BMPO wurden ähnliche Signale, allerdings mit 2–3-fach stärkerer Intensität beobachtet. Zusätzlich ist das typische 8-Linienspektrum des Substratradikals von *I* sichtbar. Somit sind in dem Testansatz freie Substratradikale (Abbildung 17B, vgl. Abbildung 16) und BMPO-Radikal-Addukte existent. Leider verhinderte die komplexe Zusammensetzung der Spin-Addukt Experimente, die spontane Radikalbildung sowie die unzureichende Kenntnis der Reaktionskinetik und -wege der einzelnen Radikaltypen eine eindeutige Detektion von Superoxiden oder deren Produkten.

### 3.3.5 ESR-Spektren der Enzymreaktion

Wie die Modellreaktion wurde auch die Enzymreaktion von HodC mit *I* unter oxischen und anoxischen Bedingungen auf eventuelle Radikale hin untersucht (2.18). Als Kontrollexperimente wurden *I* und HodC jeweils separat mit oder ohne BMPO untersucht. In Anwesenheit von BMPO konnte in der Enzymreaktion neben dem Hintergrundsignal der Kontrollexperimente kein zusätzliches Signal detektiert werden. In einem Fall konnte nach einer Reaktionszeit von 22 h in der Enzymreaktion ein Spektrum mit dem bereits bekannten Triplett-Signal sowie ein verstärktes Quartett-Muster detektiert werden (Abbildung 17C). Allerdings kann das letzte Signal nicht sicher dem Spin-Addukt einer enzymatisch aktivierten Sauerstoffspezies zugeordnet werden, obwohl das freie Enzym und das Substrat keine Hinweise auf stabile paramagnetische Radikale unter oxischen Bedingungen lieferten. Möglicherweise ist das aktive Zentrum von HodC nicht für BMPO zugänglich, oder mögliche Radikalreaktionen laufen wesentlich schneller ab als die Reaktion zwischen BMPO und dem Substratradikal. Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen kann daher nicht ausgeschlossen, aber auch nicht bestätigt werden, dass in einem anoxischen EA-Komplex oder während der Katalyse Spin-gekoppelte, nicht ESR-detektierbare Radikalpaare oder sehr kurzlebige freie Radikale gebildet werden. Für Untersuchungen dieser Art ist vermutlich die *stopped-flow* ESR-Technik die Methode der Wahl.

## 3.4 Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Hod

Ausgehend von Sequenzanalysen und Sekundärstrukturvorhersagen (FISCHER et al. 1999), wurden Hod und Qdo der Superfamilie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung (NARDINI & DIJKSTRA 1999; OLLIS et al. 1992) zugeordnet. Auch neuere BLAST-Datenbankrecherchen (ALTSCHUL et al. 1997; SCHAFFER et al. 2001, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) für Hod und vorläufige Röntgenstrukturdaten für Qdo und Hod (QI et al. 2007; STEINER et al. 2007) bestätigten diese Zugehörigkeit.

### 3.4.1 Konservierte Sequenzbereiche der bakteriellen 2,4-Dioxygenasen

Unter den bekannten Strukturen in der Proteindatenbank der Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB, <http://www.pdb.org/>) wurden für Hod die besten Übereinstimmungen mit Vertretern der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen gefunden (Phylogramm: Abbildung 19, Alignment: Abbildung 21). Hierzu gehören die Epoxid-Hydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* Ad1 (EchA, Score 43,9; 29% Identität, 45% Ähnlichkeit, Gap 11%, NARDINI et al. 1999; UniProtKB/Swiss-Prot entry: O31243), Teile der löslichen Epoxid-Hydrolasen aus *Mus musculus* (Ephx2, Score 41,2, 28% Identität, 48% Ähnlichkeit, Gap 3%, ARGIRIADI et al. 1999, UniProtKB/Swiss-Prot entry: P34914) und *Homo sapiens* (Epx1, Score 40,0%, Identität 30%, Ähnlichkeit 52%, Gap 4%, GOMEZ et al. 2004, UniProtKB/Swiss-Prot entry: P34913) sowie die Haloalkan-Dehalogenase aus *Rhodococcus* sp. (Hdlh, Score 32,2, Identität 23,0%, Ähnlichkeit 42,0%, Gap 4%, NEWMAN et al. 1999, UniProtKB/Swiss-Prot entry: P59336). Die Luciferase (Rluc, UniProtKB/Swiss-Prot entry: P27652) aus *Renilla reniformis*, neben Qdo und Hod die bislang einzige bekannte Oxygenase unter den  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen (<http://bioweb.ensam.inra.fr/esther>), hat einen ebenfalls recht geringen Verwandtschaftsgrad (Score 22,3, Identität 26%, Ähnlichkeit 42%, Gap 2%) zu Hod (vgl. Abbildung 19). Ihre Strukturdaten sind seit kurzem in der PDB-Datenbank hinterlegt (PDB-ID: 2PSD).

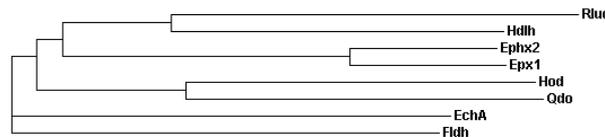


Abbildung 19: Phylogramm cofaktorfreier bakterieller 2,4-Dioxygenasen und strukturbekanntere  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen

Luciferase (Rluc, *Renilla reniformis*; UniProtKB/Swiss-Prot entry: P27652), Haloalkan-Dehalogenase (Hdlh, *Rhodococcus* sp., P59336), lösliche Epoxid-Hydrolase (Ephx2, *Mus musculus*, P34914; Epx1, *Homo sapiens*, P34913), Epoxid-Hydrolase (EchA, *Agrobacterium radiobacter* AD1, O31243), bakterielle 2,4-Dioxygenasen (Hod, *Arthrobacter ilicis*, Q7WSQ7, Qdo, *Pseudomonas putida*, O33472), Fluoroacetat-Dehalogenase (Fldh, *Burkholderia* sp. FA1, Q1JU72), Phylogramm erstellt mit CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>)

In neuerer Zeit (nach Abschluß des praktischen Anteils dieser Arbeit) sind im Rahmen von Genomprojekten, aufgrund ausgeprägter Homologie zur Hod, weitere potentielle Oxygenasen mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung in *Nocardia farcinica* (Noc-Do, Score 231, Identität 43%, Ähnlichkeit 60%, Gap 0%, UniProtKB/Swiss-Prot entry: Q5YP20), *Ochrobactrum anthropi* (Och-Do, Score 221, Identität 44%, Ähnlichkeit 59%, Gap 0%, UniProtKB/Swiss-Prot entry: A6X788), *Coccidioides immitis* (Coc-HPr, Score 200, Identität 36%, Ähnlichkeit 58%, Gap 0%, UniProtKB/Swiss-Prot entry: Q1DRK1), *Myxococcus xanthus* (Myx-Do, Score 155, Identität 33%, Ähnlichkeit 51%, Gap 0%, UniProtKB/Swiss-Prot entry: Q1D1H0) und *Serratia proteamaculans* (Ser-Do, Score 133, Identität 32%, Ähnlichkeit 52%, Gap 0%, UniProtKB/Swiss-Prot entry: A0IW62) postuliert worden (Phylogramm: Abbildung 20, Alignment: Abbildung 22). Ihre Funktion als Oxygenase muß

allerdings noch experimentell bestätigt werden. Der Grad der Identitäten dieser Proteine zur Hod ist zum Teil höher als zwischen Hod und Qdo. Möglicherweise könnten diese Proteine mit Hod und Qdo eine neue Gruppe innerhalb der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Superfamilie bilden.

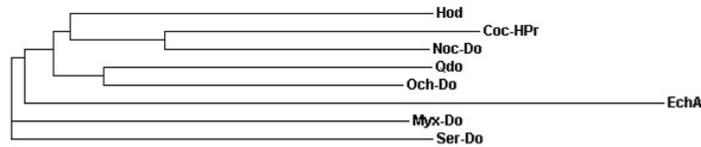


Abbildung 20: Phylogramm cofaktorfreier bakterieller 2,4-Dioxygenasen und putativer cofaktorfreier Oxygenasen mit postulierter  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung Noc-Do (Quelle: *Nocardia farcinica*, UniProtKB/Swiss-Prot entry: Q5YP20), Och-Do (*Ochrobactrum anthropi*, A6X788), Coc-Hpr (*Coccidioides immitis*, Q1DRK1), Myx-Do (*Myxococcus xanthus*, Q1D1H0), Ser-Do, (*Serratia proteamaculans*, A0IW62), bakterielle 2,4-Dioxygenasen (Hod, *Arthrobacter ilicis*, Q7WSQ7, Qdo, *Pseudomonas putida*, O33472) und als Vergleich: Strukturbekannte Epoxid-Hydrolase EchA (*Agrobacterium radiobacter* AD1, O31243), Phylogramm erstellt mit CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>)

In der Regel besitzen Enzyme vom Typ der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung eine katalytische Triade bestehend aus einem nukleophilen AS-Rest, einem sauren AS-Rest und einem strikt konserviertem Histidin-Rest (HOLMQUIST 2000; NARDINI & DIJKSTRA 1999; OLLIS et al. 1992). Die Suche nach konservierten Strukturbereichen (*fingerprints*) der Hod-AS-Sequenz mit Hilfe der Datenbanken BLOCK und PRINTS identifizierte zwei von sechs bekannten Epoxid-Hydrolase-Signaturen (IPB000639; EH-Faltung Motiv II und VI) und zwei von vier Motiven der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung (IPB003089,  $\alpha/\beta$ -Faltung Motiv I und II, Abbildung 21).

Das Motiv VI der EH-Signatur beinhaltet den in  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen strikt konservierten His-Rest der katalytischen Triade. Die entsprechenden AS-Reste der bakteriellen 2,4-Dioxygenasen sind H<sup>251</sup> (Hod) und H<sup>244</sup> (Qdo). Ebenso finden sich entsprechende His-Reste in den Sequenzen der putativen Oxygenasen in einem stark konserviertem Bereich aus T/S-His-F/L-P/G (Motiv VI EH-Faltung, Abbildung 22). Die katalytische Relevanz des konservierten H<sup>244</sup> in Qdo wurde von FISCHER et al. (1999) nachgewiesen. Die katalytische Bedeutung des konservierten H<sup>251</sup> in Hod wurde in dieser Arbeit kinetisch (3.2.1) und photometrisch (3.3.2) untersucht.

Motiv II der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Signatur beinhaltet das Sequenzmotiv Sm-X-Nu-X-Sm des nukleophilen Ellenbogens der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen (OLLIS et al. 1992). Der katalytische AS-Rest des nukleophilen Ellenbogens (Ser, Cys oder Asp) befindet sich auf einem scharfen Knick zwischen dem Faltblatt  $\beta 5$  und der folgenden Helix  $\alpha C$  (HOLMQUIST 2000). Der entsprechende Bereich in Hod ist <sup>99</sup>SHSHG<sup>103</sup>, mit S<sup>101</sup> als potentiell Nukleophil (Motiv II  $\alpha/\beta$ -Faltung, Abbildung 21). Im entsprechenden Abschnitt der putativen Oxygenasen (Motiv II  $\alpha/\beta$ -Faltung, Abbildung 22) stellt sich ebenfalls ein konservierter Bereich dar, bei dem die Position des potentiellen Nukleophils vorwiegend durch ein Ser aber auch durch ein Ala ausgefüllt ist. Auffällig ist ein vollständig konserviertes His an der Position Nu<sup>+1</sup> in den bakteriellen 2,4-Dioxygenasen (H<sup>102</sup> in Hod) und den potentiellen Oxygenasen

innerhalb der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungsfamilie. In vielen  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen ist die Aminosäure dieser Position ein Bestandteil der Oxyanion-Tasche. Ein zweites Element, welches das an der Ausbildung der Oxyanion-Tasche beteiligt ist, befindet sich in einem HGX-Motiv direkt nach dem Faltblatt  $\beta 3$  (Abbildung 21). Die an der Bildung der Oxyanion-Tasche beteiligten AS-Reste ( $\text{Nu}^{+1}$  und X des HGX-Motivs) stabilisieren über die Amidgruppen ihrer Peptidbindungen die negative Ladung eines tetraedrischen Übergangszustandes (BARTH et al. 2004; VERSCHUEREN et al. 1993b). Ein dem HGX-Motiv entsprechender Bereich ist in den Sequenzen von Hod, Qdo und den putativen Oxygenasen als P/S-G-W-C/G ausgebildet, wobei ein konservierter Trp-Rest die Position des X einnimmt (Abbildung 22).

Dem Motiv I der  $\alpha/\beta$ -Faltung bzw. Motiv II der EH-Faltung wird keine besondere katalytische Funktion zugeschrieben. Dieser Bereich, der sich in der *core-domain* aus dem Faltblatt  $\beta 4$  und dem ersten Teil des anschließenden Loops vor der Helix  $\alpha B$  bildet, scheint vorwiegend strukturelle Bedeutung zu haben, indem das aktive Zentrum zum Lösungsmittel hin im Bereich der Oxyanion-Tasche abgeschlossen wird.

Die identifizierten *fingerprints* befinden sich allesamt in der innerhalb der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen strukturell stark konservierten *core-domain*. Die *cap-domain* der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen hingegen ist sowohl strukturell als auch bezüglich der AS-Sequenz äußerst variabel. Eine Identifizierung relevanter AS-Reste der vermuteten *cap-domain* in Hod war alleine über AS-Sequenz-Alignments mit strukturbekanntem  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen wie in Abbildung 21 nur bedingt zufriedenstellend.





### Substitution ausgewählter AS-Reste

Um den Einfluß ausgesuchter AS-Reste (vgl. 3.4.1) auf die Enzymaktivität zu untersuchen, wurden die entsprechenden Codons im Gen der Hod mittels ortsspezifischer Mutagenese verändert (2.9.3). Die entsprechenden Proteinvarianten wurden in *E. coli* produziert (2.7), gereinigt (2.13), mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Größe (SDS-PAGE) sowie Laufverhalten (native PAGE) kontrolliert und ihre apparenten kinetischen Konstanten bestimmt (2.15, Tabelle 9).

### Aminosäureaustausch im Motiv VI der EH-Faltung: Konserviertes Histidin der $\alpha/\beta$ -Hydrolasen

H<sup>251</sup> der Hod entspricht dem konservierten His der katalytischen Triade der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen (3.4.1). Die Proteinvariante HodC-H251A konnte mit einer spezifischen Aktivität von 0,031 U/mg gereinigt werden. Dieser Wert ist ca. 2300-fach geringer als der Wert gereinigter HodC. Das Verhalten von HodC-H251A während der Reinigung und in den PAGE's zeigte keinen Unterschied zur HodC, was auf eine intakte Struktur dieser Variante hindeutete. Die kinetischen Parameter wurden für 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (*I*; 2-200  $\mu$ M) in luftgesättigtem Puffer (pH 8,0) bestimmt. Der Aktivitätsverlust ist vorwiegend auf eine Beeinträchtigung des  $k_{catA}^{app}$  (0,01 s<sup>-1</sup> für *I*) zurückzuführen. Im Vergleich hat HodC unter identischen Bedingungen einen  $k_{catA}^{app}$  von 54 s<sup>-1</sup>. Der  $K_{mA}^{app}$  von HodC-H251 für *I* beträgt  $5,5 \pm 1,2 \mu$ M und ist damit ähnlich dem  $K_{mA}^{app}$  für *I* von HodC ( $1,5 \pm 0,4 \mu$ M). HodC-H251A bindet das aromatische Substrat, setzt es aber nur schlecht um. Die UV/Vis-spektroskopischen Untersuchungen zeigten, dass HodC-H251A anders als HodC nicht mehr in der Lage ist, das Substratanion zu bilden (3.3.2). Die Bildung eines Substratanions scheint ein Schlüsselschritt in der Reaktion der Hod zu sein. Eine Bestimmung des  $k_{catA}^{app}$  bei pH 11, bei der ein wesentlich höherer Anteil an Substratanion vorliegen sollte, führt im Falle der HodC-H251A zu einem 53-fachen Anstieg, bei His<sub>6</sub>HodC jedoch zu einer geringfügigen Verschlechterung der Umsatzrate. Für beide Hod-Varianten steigt der  $K_{mA}^{app}$  an (HodC 2-fach, HodC-H251A 54-fach). Möglicherweise kann HodC-H251A das Substratanion zwar mit geringerer Affinität binden, aber vergleichsweise gut umsetzen. Dieses Ergebnis zeigt aber auch, dass ein protoniertes His nicht essentiell für die Katalyse ist, aber deutlich die Umsatzrate beeinflusst. Weitere Substitutionen in diesem Bereich (T<sup>250</sup>, R<sup>266</sup> und E<sup>267</sup> s. u.) führten zur Expression instabiler Proteine und könnten daher für die korrekte Faltung der Hod von Bedeutung sein.

### Aminosäureaustausch im Motiv II $\alpha/\beta$ -Faltung: Nukleophiler Ellenbogen und Oxyanion-Tasche

Im Bereich des Motiv II der  $\alpha/\beta$ -Faltung, dem nukleophilen Ellenbogen, wurde das potentielle Nukleophil S<sup>101</sup> gegen Asn und Ala ausgetauscht. Die Proteinvariante His<sub>6</sub>HodC-S101N zeigte keine Aktivität, was aber eher auf eine veränderte Faltung der Variante zurückzuführen ist, da in der Reinigung ein abweichendes Laufverhalten beobachtet wurde. Die Variante S101A konnte ohne Schwierigkeiten gereinigt werden. Die Substitution führt zu einer ca. 20-fachen Erhöhung des  $K_{mA}^{app}$ , wohingegen  $k_{catA}^{app}$  nicht beeinflusst wird. Für die apparenten kinetischen Konstanten in Bezug auf O<sub>2</sub> ist das Verhalten entgegengesetzt.  $K_{mO_2}^{app}$  wird nicht beeinflusst und  $k_{catO_2}^{app}$  lediglich

um den Faktor 3 verringert. Wenn S<sup>101</sup> entsprechend dem Nukleophil anderer  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen direkt an der Katalyse beteiligt gewesen wäre, sollte entweder ein vollständiger Verlust der Aktivität oder ein wesentlich stärkerer Effekt auf die Reaktionsgeschwindigkeit von His<sub>6</sub>HodC-S101A deutlich werden. Der beobachtete Effekt auf  $K_{mA}^{app}$  zeigt eher an, dass S<sup>101</sup> an der Substratbindung und/oder der Stabilisierung von Intermediaten oder des Übergangszustandes beteiligt sein könnte. Der Einfluß auf  $k_{catO_2}^{app}$  ist in diesem Fall nicht zu überbewerten, da aufgrund des erhöhten  $K_{mA}^{app}$  keine sättigenden Bedingungen mehr eingestellt werden konnten und der Effekt wahrscheinlich auf Substratsubsättigung beruht.

An der Position Nu<sup>-2</sup> befindet sich in Hod, Qdo und den meisten putativen Oxygenasen ein weiteres Ser (S<sup>99</sup> in Hod und S<sup>93</sup> in Qdo) von dem vermutet wurde, dass es eventuell die Funktion des Nukleophils übernehmen könnte. Allerdings zeigte der Austausch der entsprechenden Aminosäure in Hod und Qdo zu Ala keinen Einfluß auf die apparenten kinetischen Konstanten für das aromatische Substrat (Kai Bratke und Frank Fischer, persönliche Mitteilung). Apparente kinetische Konstanten für O<sub>2</sub> standen nicht zur Verfügung, ein drastischer Einfluß ist allerdings nicht zu erwarten. Die Proteinvariante His<sub>6</sub>HodC-S99N konnte in *E. coli* nicht exprimiert werden.

Die Position in direkter Folge zum Nukleophil (Nu<sup>+1</sup>) ist in vielen  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen an der Ausbildung der Oxyanion-Tasche beteiligt. In den cofaktorfreen 2,4-Dioxygenasen (H<sup>102</sup> in Hod) und auch den potentiellen Oxygenasen mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung ist die Nu<sup>+1</sup>-Position durch ein His besetzt. Ein Austausch des H<sup>102</sup> gegen Glutamin führte zu einer leichten Erhöhung des  $K_{mA}^{app}$  um den Faktor 2,8 bei gleichzeitiger Verschlechterung des  $k_{catA}^{app}$  um den Faktor 2,3. In Bezug auf O<sub>2</sub> konnte eine Verringerung des  $K_{mO_2}^{app}$  um den Faktor 3,8 beobachtet werden. Diese Verbesserung wurde aber durch eine 7,7-fache Verringerung der Umsatzrate ( $k_{catO_2}^{app}$ ) aufgehoben. Eine Beeinträchtigung der Proteinfaltung konnte aufgrund des Reinigungsverhaltens und des Laufverhaltens in der PAGE ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung des H<sup>102</sup> an der O<sub>2</sub>-Bindung und der O<sub>2</sub>-Reaktivität hin. Ebenso scheint ein leichter Effekt auf die Interaktion mit dem organischen Substrat vorzuliegen.

Ein weiteres Element der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen, welches an der Ausbildung der Oxyanion-Tasche beteiligt ist, findet sich in einem konservierten Bereich direkt im Anschluß an das Faltblatt  $\beta_3$  (Abbildung 21, AS-Rest 37 bis AS-Rest 44 in Hod). Substitutionen verschiedener AS-Reste in diesem Bereich führten entweder zu erheblichen Beeinträchtigungen der Faltung oder zeigten keine Einflüsse auf die kinetischen Konstanten (vgl. Tabelle 9).

#### Aminosäureaustausch im Bereich der potentiellen sauren Aminosäure einer katalytischen Triade

Die saure Aminosäure der katalytischen Triade in der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen-Faltung kann sowohl nach dem Faltblatt  $\beta_7$  oder  $\beta_6$  folgen. In den bisher bekannten Fällen befindet sich der saure AS-Rest vorwiegend hinter dem Faltblatt  $\beta_7$ . Sowohl im Bereich hinter  $\beta_6$  als auch hinter  $\beta_7$  sind Homologien zwischen den cofaktorfreen 2,4-Dioxygenasen und verschiedenen  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen sehr gering ausgeprägt (Abbildung 21). In Qdo wurde als potentieller saurer AS-Rest ein Asp (D<sup>120</sup>

in Qdo) identifiziert (FISCHER et al. 1999). Der Austausch von D<sup>120</sup> zu Ala in Qdo zeigte lediglich unbedeutende Auswirkungen auf die Aktivität der Qdo. Das entsprechende Gegenstück in Hod (D<sup>126</sup>) wurde aufgrund dieser Erkenntnis bislang nicht genauer untersucht. Die Segmente <sup>217</sup>HIFSQPTE<sup>224</sup> in Hod und <sup>210</sup>HIYSQPLS<sup>217</sup> in Qdo schienen konserviert zu sein. Die Möglichkeit der Bildung eines Loops wurde für die Reste <sup>220</sup>(S)QPTE<sup>224</sup> im Anschluß an das postulierte Falblatt der Reste <sup>215</sup>IRHF<sup>219</sup> in Hod vermutet. In diesem Bereich ließ sich kein saurer AS-Rest identifizieren, der dem sauren Triaden-Rest der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen entsprochen hätte. Der AS-Rest E<sup>224</sup> in Hod ist die erste saure Aminosäure nach dem postulierten Falblatt  $\beta$ 7 und wurde daher gegen Ala ausgetauscht. Die Proteinvariante His<sub>6</sub>HodC-E224A zeigte eine leichte Verringerung des  $K_{mO_2}^{app}$  im Vergleich zu HodC. Da die Parameter bezüglich des aromatischen Substrates nur geringfügige Abweichungen zeigten (Tabelle 9), ist E<sup>224</sup> nicht von katalytischer Relevanz.

Die Substitution F219Y zeigte keinerlei Effekt auf die kinetischen Parameter. Des Weiteren wurden aufgrund ihrer Konservierung in Hod und Qdo und der Fähigkeit zum Protonentransfer bzw. der Fähigkeit zur Ausbildung von H-Brücken die Reste H<sup>217</sup>, S<sup>220</sup> und Q<sup>221</sup> in Hod ausgetauscht. Die His<sub>6</sub>HodC-Proteinvarianten mit den AS-Substitutionen H217Q und Q221A konnten nicht synthetisiert werden. Für die Proteinvariante His<sub>6</sub>HodC-S220N konnten für das aromatische Substrat ähnliche kinetische Konstanten wie für His<sub>6</sub>HodC ermittelt werden. Eine Beteiligung von S<sup>220</sup> an der Bindung oder Aktivierung des aromatischen Substrates ist eher unwahrscheinlich. Beobachtet werden konnten allerdings eine Verringerung des  $K_{mO_2}^{app}$  um den Faktor 3,5 und eine Verringerung des  $k_{catO_2}^{app}$  um den Faktor 6,2. Möglicherweise besteht für S<sup>220</sup> eine Beteiligung bei der O<sub>2</sub>-Bindung oder O<sub>2</sub>-Aktivierung.

#### Aminosäureaustausch im Motiv I $\alpha/\beta$ -Faltung / Motiv II EH-Faltung

In diesem Bereich wurden die Substitutionen R62Q und H64Q generiert. Während die Proteinvariante His<sub>6</sub>HodC-H64Q im Rohextrakt nicht nachgewiesen werden konnte, war es für His<sub>6</sub>HodC-R62Q möglich, die kinetischen Parameter zu bestimmen. Der Einfluß des AS-Austausches R62Q auf die kinetischen Parameter ist allerdings sehr gering und spricht gegen eine katalytische Relevanz dieser Aminosäure.

#### Aminosäureaustausch in der potentiellen cap-domain

Zu den  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen mit Homologie zu Qdo und Hod gehören u. a. auch die Epoxid-Hydrolasen; diese enthalten mindestens einen konservierten Tyr-Rest. Trotz der geringen Sequenz-Homologien findet sich auch bei den bakteriellen 2,4-Dioxygenasen ein entsprechender Tyrosin-Rest (Y<sup>196</sup> in Hod, Y<sup>189</sup> in Qdo; Abbildung 21). Um Hinweise auf die Beteiligung des in Hod konservierten Tyr-Restes Y<sup>196</sup> an der Katalyse zu erhalten, wurden die Proteinvarianten His<sub>6</sub>HodC-Y196K, His<sub>6</sub>HodC-Y196A und His<sub>6</sub>HodC-Y196R erzeugt, gereinigt und ihre apparenten kinetischen Konstanten bestimmt. Die Proteinvariante His<sub>6</sub>HodC-Y196F konnte nicht als stabiles Protein isoliert werden (Kai Bratke, persönliche Mitteilung). Dies weist darauf hin, dass die Hydroxylgruppe des Y<sup>196</sup> einen wesentlichen Einfluss auf die strukturelle Integrität des Proteins hat. Die Proteinvarianten

His<sub>6</sub>HodC-Y196A/K/A sind stabil und aktiv. Ein Einfluss dieser einzelnen AS-Substitutionen auf die globale Faltung des Proteins konnte mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht eindeutig nachgewiesen werden. Das Verhalten während der Reinigung entsprach dem der His<sub>6</sub>HodC. In der nativen PAGE wanderte His<sub>6</sub>HodC-Y196A wie His<sub>6</sub>HodC, die Varianten His<sub>6</sub>HodC-Y196R/K zeigten ein geringfügig langsames Wanderungsverhalten. Alle drei Veränderungen zeigen jedoch deutliche Effekte auf die apparenten kinetischen Konstanten in Bezug auf das aromatische Substrat. Auf  $K_{mO_2}^{app}$  ist kein signifikanter Einfluss festzustellen (Tabelle 9; S. 70).

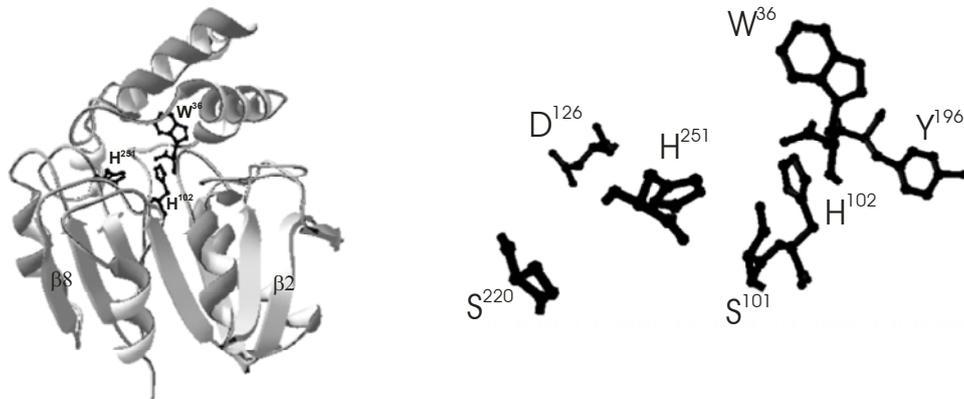
### 3.4.2 Theoretische Strukturmodelle der 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase

Aminosäure-Reste werden während der Evolution von Enzymen vorwiegend aus zwei Gründen konserviert. Einerseits als Teil einer katalytischen Maschinerie, andererseits aber auch als strukturelles Element. Deutlich wird diese Tatsache auch bei einer Betrachtung konservierter Sequenzabschnitte in Hod, Qdo und putativen Oxygenasen mit postulierter  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung. In den bakteriellen 2,4-Dioxygenasen und den potentiellen Oxygenasen sind stark konservierte Bereiche erkennbar, die vermutlich von Bedeutung für die Struktur sind und teilweise katalytisch relevante Reste positionieren (Abbildung 22). Informationen über die räumliche Anordnung bestimmter AS-Reste in Hod könnten wesentlich dazu beitragen, deren katalytisches und/oder strukturelles Potential abzuschätzen. Die postulierte Faltung der bakteriellen 2,4-Dioxygenasen wurde mittlerweile experimentell bestätigt (STEINER et al. 2007), aber bislang steht kein Strukturmodell der Hod basierend auf den Kristalldaten zur Verfügung. Um eine erste Vorstellung von der räumlichen Anordnung der in dieser Arbeit als möglicherweise relevant identifizierten AS-Reste der Hod zu bekommen, wurden für Hod drei verschiedene Strukturmodelle mittels Homologie Modellierung erstellt (2.19). Deren Sekundärstruktur-Elemente sind in Relation zur Sequenz der Hod in Abbildung 23 dargestellt. Die räumlichen Modelle sowie vergrößerte Darstellungen der potentiellen aktiven Zentren sind in Abbildung 24 gezeigt.

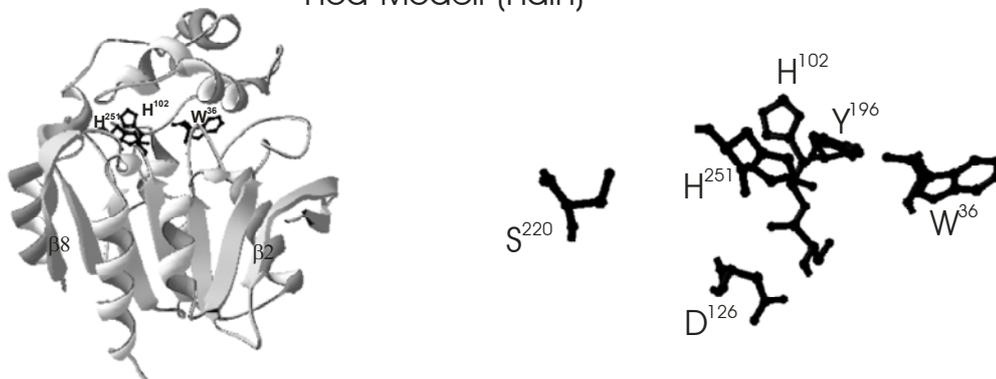
Gute Übereinstimmungen der mittels PROFsec-Methode vorhergesagten Sekundärstruktur-Elemente innerhalb der Hod-AS-Sequenz mit den Sekundärstruktur-Elementen innerhalb der AS-Sequenz der theoretischen Hod-Modelle finden sich im Bereich des Faltblattes  $\beta 3$  mit dem sich direkt anschließenden Bereich korrespondierend zur Oxyanion-Tasche der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen ( $G^{35}$  und  $W^{36}$  in Hod). Weitere Bereiche mit relativ identischer Anordnung der Sekundärstruktur-Elemente finden sich um Faltblatt  $\beta 4$  (Motiv I  $\alpha/\beta$ -Faltung; Motiv II EH-Faltung; vgl. Abbildung 22),  $\alpha$ -Helix  $\alpha B$  und Faltblatt  $\beta 5$  (Motiv II  $\alpha/\beta$ -Faltung; korrespondierend zum Sequenzbereich des nukleophilen Ellenbogens der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen mit  $Nu^{+1}$  als Element einer Oxyanion-Tasche  $H^{102}$  in Hod), im Bereich zwischen Faltblatt  $\beta 8$  und der  $\alpha$ -Helix  $\alpha F$  (Topologische Region des strikt konservierten His-Restes der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen,  $H^{251}$  in Hod) sowie im Bereich der Faltblätter  $\beta 6$  und  $\beta 7$  (mögliche Positionen eines sauren AS-Restes der katalytischen Triaden der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen). Die gute Übereinstimmung der Anordnung der o. a. Sekundärstruktur-Elemente in den theoretischen Modellen, die auf recht unterschiedlichen Vertretern der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen basieren,



Hod-Modell-(EchA)



Hod-Modell-(Hdlh)



Hod-Modell-(BphD)

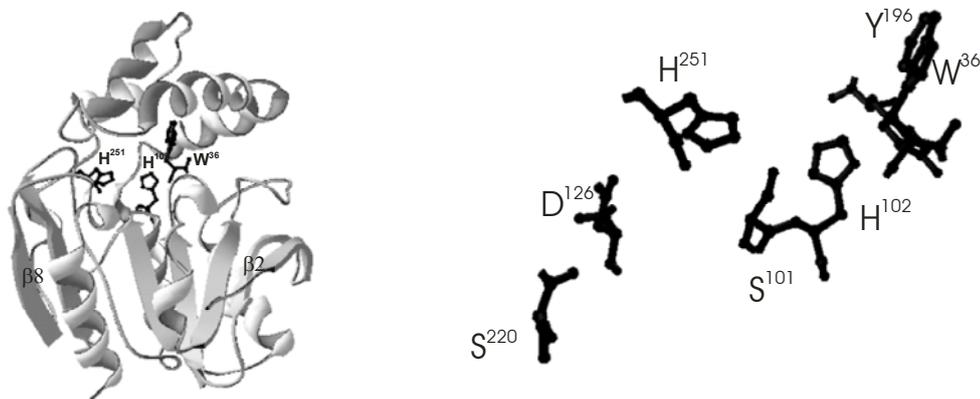


Abbildung 24: Theoretische 3D-Strukturmodelle der 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase mit vergrößerten Darstellungen der potentiellen aktiven Zentren

Strukturmodelle wurden erstellt mit SWISS-MODEL, <http://www.swissmodel.expasy.org/>: Hod-Modell-(EchA): Template-Protein: Epoxid-Hydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1 (EchA, UniProtKB/Swiss-Prot entry: O31243; PDB-ID: 1EHY\_A); Hod-Modell-(BphD): Template-Protein: 2-Hydroxy-6-oxo-phenylhexa-2,4-dienoat-Hydrolase (BphD) aus *Rhodococcus* sp. RHA1 (BphD, UniProtKB/Swiss-Prot entry: Q75WN8; PDB-ID: 1C4X\_A), Hod-Modell-(Hdlh): Template-Protein: Haloalkan-Dehalogenase aus *Rhodococcus* sp. (Hdlh, UniProtKB/Swiss-Prot entry: P59336; PDB-ID: 1BN6\_A). Abbildung erstellt mit Swiss-PDB-Viewer (GUEx & PEITSCH 1997).

Die mittels Homologie-Modellierung erstellten theoretischen 3D-Strukturmodelle der Hod zeigen deutlich die typische Zweiteilung von *core-domain* und *cap-domain*, sowie die räumliche

Anordnung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter entsprechend der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung (Abbildung 24). Das katalytisch relevante H<sup>251</sup> sowie weitere AS-Reste eines potentiellen aktiven Zentrums befinden sich in allen Modellen innerhalb einer Kavität zwischen *core-domain* und *cap-domain*. Es kann angenommen werden, dass diese Anordnung auch innerhalb der tatsächlichen Struktur der Hod Geltung haben wird.

Tabelle 9: Kinetische Parameter verschiedener Hod-Varianten

	$K_{mA}^{app}$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{catA}^{app}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{catA}^{app} / K_{mA}^{app}$ ( $\times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ )	$K_{mO_2}^{app}$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{catO_2}^{app}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{catO_2}^{app} / K_{mO_2}^{app}$ ( $\times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ )
<b>Hod-Referenzvarianten:</b>						
HodC	1,5 ± 0,1	54 ± 1,0	36 ± 3,0			
His <sub>6</sub> HodC	9,2 ± 2,1	22,9 ± 1,3	2,5	1233 ± 273	113,7 ± 17,4	0,09
His <sub>6</sub> Hod <sup>a)</sup>	5,0	18	3,6	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
<b>Hod-Varianten mit Aminosäure-Substitutionen im Motiv IV EH-Faltung (konserviertes His)</b>						
His <sub>6</sub> HodC-T250N	geringe Menge inaktives instabiles Protein, verändertes Laufverhalten					
HodC-H251A	5,5 ± 1,2	0,01	0,0018	<i>n.b.</i> <sup>b)</sup>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
His <sub>6</sub> HodC-R266Q	geringe Mengen schwach aktives Protein geringfügig verändertes Laufverhalten					
His <sub>6</sub> HodC-E267Q	"					
<b>Hod-Varianten mit Aminosäure-Substitutionen im Motiv II <math>\alpha/\beta</math>-Faltung (nucleophiler Ellenbogen)</b>						
His <sub>6</sub> HodC-S99N	Protein im Rohextrakt nicht nachweisbar					
His <sub>6</sub> HodC-S99A <sup>a)</sup>	2,1	6	2,9	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
His <sub>6</sub> HodC-H100Q	keine Aktivität, verändertes Laufverhalten in der Reinigung					
His <sub>6</sub> HodC-S101A	190,7 ± 12,4	23	0,01	1382 ± 242	38,8	0,02
His <sub>6</sub> HodC-S101A <sup>a)</sup>	56,0	13	0,3	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
His <sub>6</sub> HodC-S101N	geringe Menge inaktives instabiles Protein, verändertes Laufverhalten					
His <sub>6</sub> HodC-H102Q	25,7 ± 6,7	10,0	0,4	325 ± 32	14,8	0,04
<b>Hod-Varianten mit Aminosäure-Substitutionen im Bereich eines potentiellen Teils der Oxyanion-Tasche</b>						
His <sub>6</sub> HodC-C37S	nur geringe Mengen Protein im Rohextrakt nachweisbar					
His <sub>6</sub> HodC-D39N	Protein im Rohextrakt nicht nachweisbar					
His <sub>6</sub> HodC-H40Q	"					
His <sub>6</sub> HodC-R41Q	16,3 ± 1,3	16,5	1,0	940 ± 416	41,3	0,04
His <sub>6</sub> HodC-V42L	37,5 ± 1,8	15,6	0,4	1253 ± 274	55,2	0,04
His <sub>6</sub> HodC-Y43F	11,9 ± 1,6	14,9	1,3	1495 ± 270	88,8	0,06
His <sub>6</sub> HodC-K44Q	35,2 ± 8,9	23,9	0,7	2675 ± 669	159,1	0,06
<b>Hod-Varianten mit Aminosäure-Substitutionen im Motiv I <math>\alpha/\beta</math>-Faltung / Motiv II EH-Faltung</b>						
His <sub>6</sub> HodC-R62Q	16,3 ± 3,3	15,0	0,9	1051 ± 115	50,3	0,05
His <sub>6</sub> HodC-H64Q	Protein im Rohextrakt nicht nachweisbar					
<b>Hod-Varianten mit Aminosäure-Substitutionen an möglichen Positionen eines sauren Triaden-AS-Restes</b>						
His <sub>6</sub> HodC-H217Q	Protein im Rohextrakt nicht nachweisbar					
His <sub>6</sub> HodC-F219Y	9,5 ± 1,4	22,8	2,4	1270 ± 232	110,9	0,09
His <sub>6</sub> HodC-S220N	15,4 ± 2,4	12,2	0,8	357 ± 40	18,3	0,05
His <sub>6</sub> HodC-Q221A	Protein im Rohextrakt nicht nachweisbar					
His <sub>6</sub> HodC-E224A	15,5 ± 4,2	28,2	1,8	710 ± 127	79,1	0,11
<b>Hod-Varianten mit Aminosäure-Substitutionen im Bereich der potentiellen cap-domain</b>						
His <sub>6</sub> HodC-C184S	nur geringe Mengen Protein im Rohextrakt nachweisbar					
His <sub>6</sub> HodC-Y196A	99,5 ± 6,6	1,3 ± 0,05	0,013	1646 ± 409	6,4 ± 1,2	0,004
His <sub>6</sub> HodC-Y196K	39,9 ± 4,1	0,7 ± 0,03	0,018	1600 ± 152	3,4 ± 0,2	0,002
His <sub>6</sub> HodC-Y196R	83,6 ± 4,5	1,0 ± 0,03	0,012	1370 ± 244	3,4 ± 0,4	0,002
His <sub>6</sub> HodC-Y196F <sup>a)</sup>	Im Rohextrakt nicht nachweisbar					

<sup>a)</sup> Werte Kai Bratke (persönliche Mitteilung), <sup>b)</sup> n.b. = nicht bestimmt

## 4 Diskussion

Aufgrund der isolierten Stellung der 2,4-Dioxygenasen bezüglich der Kombination von Struktur und Funktion wurde eine Annäherung an den katalytischen Mechanismus von mehreren Seiten her unternommen. In dieser Arbeit wurden Erkenntnisse aus einer chemischen Modellreaktion und Untersuchungen zur Enzymkinetik verschiedener Hod-Varianten verwendet, um eine Hypothese des Reaktionsmechanismus der cofaktorfreen bakteriellen 2,4-Dioxygenasen zu erstellen. Weitere Anhaltspunkte lieferten Vergleiche mit homologen Enzymen der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungs-Familie, theoretische Strukturmodelle der Hod und Informationen über die Reaktivität der organischen Cofaktoren FAD und Pterin gegenüber  $O_2$ . AS-Sequenzvergleiche mit postulierten Oxygenasen vom  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungstyp und neuere Erkenntnisse aus nicht strukturverwandten cofaktorfreen  $O_2$ -nutzenden Oxidasen und Oxygenasen unterstützen den in dieser Arbeit aufgestellten Reaktionsmechanismus und zeigen, dass die cofaktorfreen Aktivierung von  $O_2$  in biologischen Systemen weiter verbreitet ist als ursprünglich angenommen. Dieses Phänomen ist nicht an eine bestimmte Enzymstruktur gebunden, sondern ist anscheinend stark abhängig von den jeweiligen Eigenschaften der Substrate.

Die Bestätigung der postulierten  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung der bakteriellen 2,4-Dioxygenasen erfolgte erst nach Abschluß des praktischen Teils dieser Arbeit (Qi et al. 2007; STEINER et al. 2007). Die Strukturdaten sind zur Zeit noch nicht veröffentlicht und konnten daher nicht zur Überprüfung der theoretischen Strukturmodelle der Hod herangezogen werden.

### 4.1 Reaktive Intermediate der chemischen 2,4-Dioxygenolyse

Reaktionen von  $O_2$  mit organischen Molekülen im Grundzustand, ohne Beteiligung von Cofaktoren, können aufgrund der Spin-Erhaltungsregel i.d.R. in Kombination mit radikalischen Zwischenstufen erfolgen (vgl. Kapitel 1) Im Fall der cofaktorfreen 2,4-Dioxygenasen können die notwendigen Schritte nur über die enzymatische Aktivierung des aromatischen Substrates, des Sauerstoffs oder eines speziellen AS-Restes ausgelöst werden. Eine Substrataktivierung könnte z. B. durch Verstärkung des negativen Redoxpotentials oder mittels Bildung eines Substratradikals erfolgen. Die  $O_2$ -Aktivierung wäre in Form der Bildung eines Superoxid-Radikals oder theoretisch auch durch die Überführung in die Singulett-Konfiguration möglich. Die lichtinduzierte Produktion von Singulett-Sauerstoff ist u. a. bekannt als Phänomen des photooxidativen Stresses im Zusammenhang mit der Photosynthese (KRIEGER-LISZKAY 2005) aber sie ist für die nachweislich lichtunabhängige Reaktionen der 2,4-Dioxygenasen nicht relevant. Die enzymatische Bildung von hochreaktivem Singulett- $O_2$  in biologischen Systemen ist ein ausgesprochen exotischer Vorgang. Diese Reaktion ist zwar für das Myeloperoxidase-System in Neutrophilen beschrieben worden, erfolgt aber aus  $H_2O_2$  unter Beteiligung von Chloridionen (KLEBANOFF 2005). Die enzymatische Bildung von Singulett- $O_2$  direkt aus Triplett- $O_2$  ist bisher nicht beobachtet worden und stellt einen energetisch sehr aufwendigen Prozess dar, der ohne Cofaktoren nicht von den 2,4-Dioxygenasen durchgeführt werden kann. Die Bildung eines Superoxidradikals oder eines Substratradikals durch ein cofaktorfrees Enzym erfordert entweder die vorhergehende Radikalisierung eines aktiven AS-Restes (proteinogenes Radikal) oder einen AS-Rest, der nach Aufnahme oder Abgabe eines

Elektrons ein ungepaartes Elektron stabilisieren kann. Radikale, basierend auf posttranslational modifizierte Aminosäuren (Chinon-Cofaktoren = Tyr- bzw. Trp-basierte Cofaktoren) oder unveränderten Aminosäuren (Gly, Cys, Tyr, Trp), sind für eine Reihe von Enzyme beschrieben worden (BUCKEL & GOLDING 2006; FREY et al. 2006; STUBBE & VAN DER DONK 1998). Alle bisher bekannten Enzyme, die proteinogene Radikale in ihrem Mechanismus einsetzen benötigen Metallcofaktoren, so dass diese grundsätzliche Möglichkeit der O<sub>2</sub>- oder Substrat-Aktivierung in den 2,4-Dioxygenasen eher nicht verwirklicht sein wird. Es bleibt daher als Arbeitshypothese für die Reaktion der 2,4-Dioxygenasen in erster Linie die Aktivierung des Substrates.

In neutralen protischen oder aprotischen Lösungen sind die Substrate **I** und **II** der 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod, sowie ihr C2-Phenylderivat **III** relativ stabil, werden aber in einer basenkatalysierten chemischen Modellreaktion in die Produkte der 2,4-dioxygenolytischen Spaltung, CO und dem jeweiligen Anthranilsäure-Derivat, überführt (vgl. 3.3.3). Die Umsetzung erfolgt unter aprotischen Bedingungen wesentlich schneller. Unter stark basischen Bedingungen liegen die Anionen von **I**, **II** und **III** vor (3.3.1). Diese sind unter anoxischen Bedingungen stabil, bilden aber in Anwesenheit von O<sub>2</sub> Radikale aus (3.3.4). Die Bildung resonanzstabilisierter Radikale stellt eine Möglichkeit zur Umgehung der Spin-Restriktion dar. Für die 2,4-dioxygenolytische Ringspaltung der Qdo stellten FISCHER & FETZNER (2000) einen hypothetischen Reaktionsmechanismus auf, der an die Reaktion reduzierter Flavine und Pterine mit O<sub>2</sub> (MASSEY 1994; PALFEY et al. 1995) und die Reaktivität von Carbanionen gegenüber O<sub>2</sub> angelehnt ist (ABELL & SCHLOSS 1991). Die 2,4-dioxygenolytische Ringspaltung sollte mit der basenkatalysierten Bildung eines Substrat-Carbanions beginnen, welches ein Elektron auf O<sub>2</sub> übertragen kann. Die Bildung der Produkte erfolgt analog der Reaktion reduzierter Flavine und Pterine mit O<sub>2</sub> über weitere Schritte, die ein Radikalpaar und ein Hydroperoxid-Anion beinhalten. Als wesentliche Voraussetzungen für die direkte Reaktion reduzierter Flavine und Pterine mit O<sub>2</sub> wird ihr negatives Redoxpotential (beeinflussbar durch den Protonierungsgrad), ihre Fähigkeit, Ein-Elektronen-Transfer-Reaktionen durchzuführen, sowie die Bildung resonanzstabilisierter Radikale angesehen (MASSEY 2000). Die Reaktion von reduziertem Flavin mit O<sub>2</sub> in protischen Lösungen ist, wie im Falle der Substrate (**I** und **II**) der cofaktorfreen 2,4-Dioxygenasen, ein autokatalytischer Prozeß, der durch basische pH-Werte begünstigt wird. Reduziertes Flavin überträgt ein Elektron auf O<sub>2</sub>, wobei ein *caged-radical-pair* entsteht, das nach Spin-Inversion in ein Flavin-Peroxid-Derivat kollabiert (KEMAL et al. 1977). Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass die Existenz eines *caged-radical-pair* bislang nicht experimentell bestätigt werden konnte.

Die Simulationen der Hyperfein-Strukturen der ESR-Spektren der Radikale von **I** und **III** in der Modellreaktion zeigen eine Spin-Delokalisation über des gesamte asymmetrische Ringsystem, mit einem deutlichen Effekt des C2-Substituenten (Methyl- oder Phenyl-Rest) auf die Spin-Verteilung und die Reaktivität des Radikals. Die Spinkopplung der Protonen an die Positionen C5 und C8 verringert sich bei gleichzeitiger Verstärkung der Kopplung an die N1-Position in Abhängigkeit von der Größe des C2-Substituenten (Tabelle 8). Das Auftreten einer deutlichen Hyperfein-Interaktion der Methylgruppen-Protonen stimmt überein mit einer beachtlichen Spin-Dichte an der Position C2. Für eine frei rotierbare Methylgruppe am C2 kann eine Spin-Dichte von 6% an der C2 Position angenommen werden. Für C5 und C8 ergeben sich Spin-Dichten von 6-7%, wohingegen die Spin-

Dichte an N1 lediglich <1% beträgt (McCONNELL 1956; McCONNELL & CHESNUT 1958). Die kalkulierten Werte für die Spin-Verteilung stellen ohne weiterführende Untersuchungen nur grobe Annäherungen dar. Dennoch ist die Aussage möglich, dass 20% der Spin-Intensität asymmetrisch auf die angegebenen Positionen der Heterocyclen verteilt ist (Tabelle 8). Die restlichen 80% der Spin-Intensität sollten demnach auf die Positionen C4, C3 oder auf beide verteilt sein. Eine weitere Differenzierung dieser Positionen konnte bisher nicht durchgeführt werden und ist nur möglich über spezielle Isotopenmarkierung der entsprechenden Positionen (z. B.  $^{13}\text{C}$  und  $^{17}\text{O}$ ). Da die größte Spin-Dichte der freien Radikale sich wahrscheinlich vorwiegend an den Positionen C4 oder C3 befindet, kennzeichnet dieser Bereich einen geeigneten Ort für einen elektrophilen Angriff durch ein Superoxidradikal. Allerdings zeigen die unterschiedlichen Spin-Verteilungen in den jeweiligen Derivaten, dass Substituenten einen deutlichen Einfluß auf die Spin-Verteilung haben können. Denkbar ist daher auch, dass Einflüsse von AS-Seitenketten im aktiven Zentrum der Enzyme mittels elektronenziehender oder schiebender Eigenschaften die Spinverteilung beeinflussen und so günstige Bedingungen für einen räumlich gerichteten Elektronentransfer schaffen könnten.

Die Ergebnisse der Modellreaktion belegen, dass die Substrate der 2,4-Dioxygenasen mittels Basenkatalyse aktiviert werden können, in Gegenwart von  $\text{O}_2$  nach Abgabe eines Elektrons in ein stabiles Radikal übergehen, und dass aprotische Bedingungen (vergleichbar mit niedrigen dielektrischen Bedingungen in aktiven Zentren; MERTZ & KRISHTALIK 2000) die Umsetzung der Substrate positiv beeinflussen. Die intrinsische Fähigkeit der Substrate zur Resonanzstabilisierung ungepaarter Elektronen könnte ein Schlüsselement zur Reaktion mit  $\text{O}_2$  sein, denn neben den Substraten der bakteriellen 2,4-Dioxygenasen zeigen auch die aromatischen Substrate weiterer cofaktorfreier  $\text{O}_2$ -nutzender Enzyme in Modellsystemen gesteigerte Oxidierbarkeit (negativeres Redoxpotential der Anionen im Vergleich zum ungeladenen Molekül) unter basischen Bedingungen sowie die Fähigkeit zur Stabilisierung ungepaarter Elektronen. Hierzu gehören u.a. Urat (GOYAL et al. 1994; MAPLES & MASON 1988), das Substrat der cofaktorfreien Urat-Oxidase (Schema 3 H), Renilla Luciferin (GOTO 1968), das Substrat der Renilla-Luciferase (Schema 5 B), Anthrone (MÜLLER 1996), Substratanaloga einiger Monooxygenasen in der Polyketid-Synthese (Schema 3 B) und reduziertes Flavin (KEMAL et al. 1977), das von BluB und einigen Mehrkomponenten-Monooxygenasen (z. B. bakterielle Luciferase) als Cosubstrat genutzt wird (Schema 3 C und D).

## 4.2 Mechanismus der enzymatischen 2,4-Dioxygenolyse

### 4.2.1 Substratbindung und Produktfreisetzung

Die HodC katalysierte Dioxygenolyse erfolgt über einen sequenziellen bi-bi-ternären Komplex-Mechanismus (vgl. Schema 7, 3.2.4). Das organische Substrat bindet vor  $\text{O}_2$  an das Enzym, während CO aus dem Enzym-Produkt-Komplex zuerst freigesetzt wird. Hier ist die Frage berechtigt, ob es strukturelle oder funktionelle Gründe für einen derartigen Ablauf der Enzymreaktion gibt.

Bei geordneter Substratbindung an ein Enzym kann angenommen werden, dass nach Aktivierung des ersten Substrates im aktiven Zentrum eine direkte Reaktion mit dem zweiten Substrat erfolgt oder aber die Bindung des ersten Substrates eine Konformationsänderung induziert, welche die Bindung oder den Eintritt des zweiten Substrates erst ermöglicht.

Eine direkte Verbindung zwischen Konformationsänderung eines Enzyms und einem geordneten bi-bi-Mechanismus wurde für die Riboflavin-Kinase (RFK) nachgewiesen. RFK katalysiert die Phosphorylierung von Riboflavin mit ATP zum FMN. Die Bindung von Riboflavin verursacht eine Konformationsänderungen, die zur Ausbildung der ATP-Bindestelle führt. Die anschließende geordnete Produktfreisetzung geht mit weiteren Änderungen der Konformation einher (KARTHIKEYAN et al. 2003). Analog wäre die Ausbildung einer O<sub>2</sub>-Bindestelle in den cofaktorfreien 2,4-Dioxygenasen nach der Bindung des aromatischen Substrates denkbar.

Spezifische Kanäle zum aktiven Zentrum und Substrat-induzierte Konformationsänderungen sind im Zusammenhang mit voluminösen Substraten allgemein anerkannt und für verschiedene Enzyme beschrieben worden. Für kleine Substrate wie O<sub>2</sub> wurde vorwiegend eine zufällige Diffusion durch hydrophobe Bereiche der Proteinmatrix angenommen. Zufällige O<sub>2</sub>-Diffusion innerhalb einer Proteinmatrix und eine ungerichtete Annäherung beider Reaktionspartner reicht aber in vielen Fällen nicht aus, um die Regio- und Stereospezifität enzymatischer Reaktionen mit O<sub>2</sub> zu erklären. Spezifische proteinogene Bindestellen und Kanäle für O<sub>2</sub> oder O<sub>2</sub>-bedingte Konformationsänderungen, insbesondere in metallfreien Enzymen, wurden überwiegend indirekt aus kinetischen Daten, hypothetischen Überlegungen oder Kristallstrukturen mit O<sub>2</sub>-Markern oder O<sub>2</sub>-Antagonisten (Xenon, NO, CO, Halogene) abgeleitet (s. u.).

Eine Reaktionssequenz ohne die Notwendigkeit einer spezifischen O<sub>2</sub>-Bindung wird für die Fe-haltige Soja-Lipoxygenase (Lox; EC 1.13.11.12) diskutiert. Die Reaktion von O<sub>2</sub> mit einem enzymgebundenen Substratradikal erfolgt in diesem Enzym direkt. Eine Interaktion von O<sub>2</sub> mit dem Fe-Cofaktor konnte nicht nachgewiesen werden, stattdessen ist der Cofaktor verantwortlich für die Bildung des Substratradikals durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms (KNAPP & KLINMAN 2003). Die Proteinmatrix der Lox gewährleistet die Stereospezifität der Reaktion, indem O<sub>2</sub> durch einen definierten hydrophoben Kanal an das aktive Zentrum mit dem gebundenen Substratradikal geleitet wird. Eine flexible Aminosäure (I<sup>553</sup>) kontrolliert den Zutritt an den reaktiven Kohlenstoff des gebundenen Substratradikals. Umfangreiche Konformationsänderungen sind bislang bei der Lipoxygenase nicht nachgewiesen worden. Die Aminosäuren L<sup>546</sup> und L<sup>754</sup> bilden im Reaktionsbereich eine O<sub>2</sub>-Bindetasche und begrenzen rein sterisch den Reaktionsbereich des O<sub>2</sub> auf die erforderliche Position. Der Austausch von L<sup>546</sup> und L<sup>754</sup> gegen kleinere Aminosäuren vergrößert den Reaktionsbereich des O<sub>2</sub> und erlaubt daher die Ausbildung alternativer Produkte (KLINMAN 2007).

In der flavinhaltigen Cholesterin-Oxidase (EC 1.1.3.6) wurde ein hydrophober Kanal zum aktiven Zentrum identifiziert, dessen Öffnung ebenfalls durch die Konformation von AS -Resten (Arg, Glu) kontrolliert wird (COULOMBE et al. 2001; LARIO et al. 2003). Die Bindung von Cholesterin bewirkt eine Konformationsänderung, die zum Ausschluß des Lösungsmittels aus dem aktiven Zentrum führt. Die AS-Reste an der Öffnung des Kanals kontrollieren nicht nur den O<sub>2</sub>-Eintritt zum aktiven Zentrum, sondern dienen auch der Substrat-Positionierung, induzieren eine bestimmte Isoform und regulieren den Redoxstatus des Flavins. Proteinogene hydrophobe O<sub>2</sub>-Bindestellen auf Basis der Bindung von O<sub>2</sub>-Markern (Xenon oder NO) in Proteinkristallen wurden u. a. für die extradiol spaltende Catechol-Dioxygenase (Fe; SATO et al. 2002) und für die Cu-haltige Amin-Oxidase (Cu und Chinon-Cofaktor; JOHNSON et al. 2007) beschrieben. Hinweise auf einen definierten O<sub>2</sub>-Kanal

gibt es in beiden Enzymen bisher nicht. Für die Amin-Oxidase wird vielmehr postuliert, dass die Dynamik der Proteinstruktur (*protein-breathing*) die schrittweise Diffusion zum Reaktionsort gewährleistet. Die Beispiele zeigen, dass durchaus unterschiedliche Transportwege und Bindemöglichkeiten für O<sub>2</sub> in Enzymen verwirklicht sein können.

Die strukturelle und chemisch-physikalische Vergleichbarkeit der Substrate der bakteriellen 2,4-Dioxygenasen mit reduzierten Flavinen erinnert an die enzymatische flavinabhängige Reduktion molekularen Sauerstoffs. Funktionell vergleichbar sind insbesondere die Mehrkomponenten-Flavoprotein-Monooxygenasen, die reduziertes Flavin nicht als Cofaktor, sondern als Cosubstrat nutzen. Die Bindung reduzierten Flavins führt in der bakteriellen Luciferase (Alkanal-Monooxygenase; Schema 3 D) durch Konformationsänderung eines Loops zur Ausbildung eines lösungsmittelfreien Reaktionsraumes. Der Ausschluß des Lösungsmittels aus dem Reaktionszentrum verhindert die Destabilisierung des reaktiven Hydroperoxyflavins (FISHER et al. 1996; Low & Tu 2002). Die Mehrkomponenten-Flavoprotein-Monooxygenase *p*-Hydroxyphenylacetat-Hydroxylase aus *Pseudomonas aeruginosa* zeigt Konformationsänderungen im Zusammenhang mit der geschwindigkeitsbestimmenden Freisetzung des oxidierten Flavins, nicht aber bei Bindung des reduzierten Flavins (BALLOU et al. 2005). Die Reaktionsmöglichkeit molekularen Sauerstoffs mit dem gebundenen Flavin ist räumlich lediglich auf eine kleine Kavität vor dem C4a des Flavins beschränkt.

Aus den oben genannten Beispielen lassen sich Minimal-Eigenschaften der Enzymstrukturen ableiten, welche die Reaktionen von organischen Substraten mit O<sub>2</sub> begünstigen könnten und die möglicherweise auch für die Struktur und die Funktion der bakteriellen 2,4-Dioxygenasen oder anderer cofaktorfreier Oxidasen und Oxygenasen zutreffen.

1. Die Ausbildung lösungsmittelfreier (aprotischer) Reaktionsräume mit niedrigen dielektrischen Eigenschaften verbessert die Katalyse, da elektrostatische Wechselwirkungen unter diesen Bedingungen verstärkt werden und reaktive Intermediate ohne störende Einflüsse von lösungsmittel-basierten Reprotonierungen stabilisiert werden können. Die Bedeutung von Möglichkeiten zur Protonierung, gerade im Zusammenhang mit cofaktorfreien Oxidasen oder Oxygenasen, wird am Beispiel der Dihydroneopterin-Aldolase (DHNA) deutlich, welche die Umwandlung eines Dihydroneopterin zum Hydroxymethyl-Dihydropterin katalysiert. Die Substitution eines konservierten Tyrosin-Restes zu einem Phenylalanin wandelt die Aldolase in eine cofaktorfreie Oxygenase um. Die ursprüngliche Protonierung eines Enolintermediates wird verhindert und begünstigt dadurch eine Reaktion mit O<sub>2</sub> (WANG et al. 2006). Konformationsänderungen nach Substratbindung können zur effektiven Abschirmung des aktiven Zentrums führen. Dies bedeutet allerdings auch, dass die Produktfreisetzung ebenfalls an Änderungen der Konformation gebunden sein muß. Lösungsmittelfreie Reaktionsräume müssen nicht zwangsläufig durch Konformationsänderungen geschaffen werden, sondern können alleine durch die Bindung eines Substrates an ein vorgeformtes aktives Zentrum gebildet werden. Allerdings muß in einem solchen Fall das aktive Zentrum für das zweite Substrat über eine Art Kanal weiterhin zugänglich sein.

2. Diskrete O<sub>2</sub>-Kanäle und/oder selektive O<sub>2</sub>-Taschen könnten die Ausrichtung der Reaktionspartner O<sub>2</sub> und aktiviertes Substrat zueinander optimieren und so die Katalyse begünstigen.

Dynamische Vorgänge als Folge der Substratbindung, einhergehend mit der Bildung lösungsmittelfreier Reaktionsräume und/oder O<sub>2</sub>-Bindestellen bzw. Tunnel sind nachweislich von Bedeutung für die Funktion verschiedener cofaktorfreier O<sub>2</sub>-reduzierender Enzyme und daher auch für die cofaktorfreen 2,4-Dioxygenasen denkbar.

Die cofaktorfreie O<sub>2</sub>-abhängige Koproporphyrinogen-Oxidase (odCPO; EC 1.3.3.3), hauptsächlich isoliert aus Eukaryonten, z. B. *Homo sapiens* oder *Saccharomyces cerevisiae*, katalysiert die O<sub>2</sub> abhängige Decarboxylierung des Koproporphyrinogen-III zum Protoporphyrinogen-IX innerhalb des Häm-Biosyntheseweges (Schema 3 F). Die Substratbindung bewirkt durch Änderungen der Konformation die Ausbildung eines isolierten lösungsmittelfreien Reaktionsraumes, möglicherweise einhergehend mit der Bildung eines O<sub>2</sub>-Tunnels und einer O<sub>2</sub>-Bindestelle (PHILLIPS et al. 2004).

Das Formylglycin-bildende-Enzym (FGE, ROESER et al. 2006) katalysiert die O<sub>2</sub>-abhängige Oxidation eines konservierten Cys-Restes in den noch ungefalteten Peptidketten eukaryontischer Sulfatasen zum katalytisch aktiven Formylglycin (Schema 3 I). Da FGE über eine stark vorgeformte Bindestelle verfügt, bewirkt die Substratbindung nur Konformationsänderungen einzelner Aminosäure-Reste im aktiven Zentrum. Zwischen Enzym und Substrat kommt es zur Ausbildung einer Disulfidbrücke (FGE-C<sup>341</sup>/FGly-Precursor-Cys). Dadurch wird eine Tasche zwischen der Disulfidbrücke und dem katalytisch relevanten C<sup>336</sup> geformt, die hinsichtlich ihrer Größe und Lage die Anforderungen zur Bindung von O<sub>2</sub> erfüllen könnte und gleichzeitig vom Lösungsmittel abgeschirmt ist (ROESER et al. 2007).

PQQ ist ein aromatisches, tricyclisches o-Chinon-Derivat, das zur Familie der Chinon-Cofaktoren gehört und z. B. in Methanol- oder Glukose-Dehydrogenase zu finden ist. Der letzte Schritt der PQQ-Biosynthese wird durch die Pyrrolochinolinchinon-Synthase (PqqC, Schema 3 E) katalysiert und beinhaltet einen Ringschluß sowie eine 8-Elektronen-Oxidation des Substrates. Die Bindung des Substrates bewirkt umfangreiche Konformationsänderungen und führt zum vollständigen Einschluß des Substrates im aktiven Zentrum. Die Kristallstruktur des PqqC/PQQ-Komplexes lieferte Hinweise auf eine mögliche O<sub>2</sub> oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Bindestelle nahe dem reaktiven C5 des gebundenen Substrates (MAGNUSSON et al. 2004).

Der direkte Nachweis von O<sub>2</sub> in einer hydrophoben Tasche nahe der Oxidationsstelle eines gebundenen Substrates wurde von WIDBOOM et al. (2007) für die cofaktorfreie 3,5-Dihydroxyphenylacetyl-CoA-1,2-Dioxygenase (DpgC) und von TAGA et al. (2007) für das cofaktorfreie Putative-Oxidoreduktase-NAD-Protein (Synonym: BluB) durch Untersuchungen der Kristallstrukturen erbracht. DpgC katalysiert einen wichtigen Schritt in der Biosynthese der nicht-proteinogenen Aminosäure 3,5-Dihydroxyphenylglycin (Schema 3 A), welche ein Bestandteil der Antibiotika aus der Vancomycin und Teicoplan-Gruppe ist (HUBBARD & WALSH 2003). O<sub>2</sub> befindet sich in einer strikt hydrophoben, klar definierten Tasche (L<sup>237</sup>, I<sup>324</sup>, V<sup>425</sup> und V<sup>429</sup>). Die Ausrichtung von O<sub>2</sub> erfolgt lediglich über eine Wasserstoffbrückenbindung zur Amidgruppe der Peptidbindung des I<sup>324</sup>. BluB katalysiert die Spaltung von FMNH<sub>2</sub> zum 5,6-Dimethylbenzimidazol, dem

niedermolekularem Liganden des Vitamin B<sub>12</sub> (Schema 3 C) und besitzt einen flexiblen Loop, der FMNH<sub>2</sub> vollständig im aktiven Zentrum einschließt und lediglich eine Interaktion mit O<sub>2</sub> erlaubt. O<sub>2</sub> ist nahe dem C4a des Substrates gelegen und wird mittels zweier Wasserstoffbrücken, ausgehend von einer Hydroxylgruppe und der Amidgruppe der Peptidbindung von G<sup>61</sup>, positioniert. Der katalytische Zyklus beinhaltet mehrere Konformationsänderungen (TAGA et al. 2007).

Die bereits von FISCHER et al. (1999) aufgrund von AS-Sequenzvergleichen postulierte und von STEINER et al. (2007) bzw. QI et al. (2007) experimentell belegte  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung der cofaktorfreien bakteriellen 2,4-Dioxygenasen (4.3) erlauben einen Vergleich mit anderen Proteinen innerhalb der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungs-Familie (1.2). Auffällig ist die Struktur-Dynamik einiger Mitglieder dieser Enzymfamilie im Zusammenhang mit der Substratbindung und/oder Produktfreisetzung. Im Allgemeinen ist die *core-domain* der Haloalkan-Dehalogenasen relativ starr und dient als Grundgerüst für die Positionierung der katalytischen AS-Reste, wohingegen die wesentlich flexiblere *cap-domain* hauptsächlich Aufgaben bezüglich der Substratspezifität übernimmt. Isomerisierungen der *cap-domain* der Haloalkan-Dehalogenase (LinB) aus *Sphingomonas paucimobilis* optimieren die Position des gebundenen Substrates in Richtung der katalytischen Reste (STRELTSOV et al. 2003). Für LinB und weitere Haloalkan-Dehalogenasen ist die Freisetzung des abgespaltenen Halogenid-Ions direkt an geschwindigkeitsbestimmende, umfangreiche Isomerisierungen gekoppelt (KROOSHOF et al. 1999; SCHANSTRA & JANSSEN 1996). Aufgrund der Ähnlichkeit der Strukturen verschiedener  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen postulierten OTYEPKA & DAMBORSKY (2002) dynamische Eigenschaften auch für weitere Mitglieder dieser Enzym-Superfamilie. So wird der Zugang zum hydrophoben aktiven Zentrum in einigen Lipasen, lokalisiert zwischen *core-* und *cap-domain*, in Gegenwart von Lipiden durch Konformationsänderungen im Lid (*surface loop*) freigegeben. Im Zuge dieser Konformationsänderungen wird die für die Katalyse der Lipasen notwendige Oxyanion-Tasche ausgebildet (BELLE et al. 2007; SCHRAG et al. 1997).

Die beschriebene Flexibilität der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung könnte für die Funktion der bakteriellen 2,4-Dioxygenasen die bereits postulierten Grundvoraussetzungen erfüllen (vgl. S. 75). Substratinduzierte Konformationsänderungen, wie in den oben vorgestellten cofaktorfreien Oxygenasen bzw. Oxidasen, könnten zur Ausbildung eines lösungsmittelfreien (aprotischen) Reaktionsraumes führen und somit die Reaktion begünstigen. Desweiteren ist eine Kontrolle des O<sub>2</sub>-Zutritts, des O<sub>2</sub>-Reaktionsortes oder die Positionierung katalytisch relevanter AS-Reste denkbar.

Untersuchungen zur Abhängigkeit des Katalysemechanismus von Konformationsänderungen konnten für die Hod bislang nicht durchgeführt werden. Untersuchungen von BEERMANN et al. (2007) belegen jedoch für Hod ein außergewöhnlich hohes Maß an Flexibilität mit kompletter Reversibilität von thermischer De- und Renaturierung. Die Konformationsänderung vom nativen zu einem intermediären Faltungszustand erfordert nur wenig Energieaufwand.

#### 4.2.2 Basenkatalysierte Substrataktivierung und Radikalpaarbildung

##### Die Funktion des konservierten H<sup>251</sup> in Hod

Die Funktion des konservierten His ist in den Enzymen von  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungstyp variabel. Im klassischen Beispiel einer Ser-His-Asp-Triade, wie sie in den Serin-Proteasen (z. B. Trypsin)

gefunden wird, deprotoniert das konservierte His, unterstützt von der sauren Aminosäure, das Ser der Triade, welches dadurch seine nukleophile Eigenschaft erhält und einen nukleophilen Angriff auf das Substrat durchführt. Die Interaktion von His mit einer sauren Aminosäure verändert den  $pK_a$  des Histidin und beeinflusst so die Funktion des His als Säure oder Base (GUTTERIDGE & THORNTON 2005). Die Funktion des konservierten His in den Epoxid-Hydrolasen aus *Agrobacterium radiobacter* (EchA) und der Maus (Ephx2) sowie den Haloalkan-Dehalogenasen aus *Rhodococcus* (Hdlh), *Sphingomonas* (LinB) und *Xanthobacter* (DhlA) ist vorwiegend die Aktivierung eines Wassermoleküls zur Hydrolyse des kovalenten Enzym-Intermediates im zweiten Teilschritt der Reaktion (CHOVANCOVA et al. 2007; HOPMANN & HIMO 2006b; JANSSEN 2004). In den C-C-Hydrolasen aus *Burkholderia xenovorans* oder *Escherichia coli* wird die Funktion des konservierten His kontrovers diskutiert. Während LI & BUGG (2007) für das konservierte His ebenfalls die Aktivierung eines Wassermoleküls postulieren, welches das Substrat direkt angreift, schlagen HORSMAN et al. (2007) die Katalyse der einleitenden Tautomerisierung des Substrates durch das konservierte His vor. Die Frage, ob ein kovalentes Enzym-Substrat-Intermediat ausgebildet wird, ist nicht abschließend geklärt. In der Hydroxynitril-Lyase deprotoniert das konservierte His kein Wassermolekül, sondern direkt das zweite Substrat (HCN) (ZUEGG et al. 1999).

Ein elementarer Schritt der Katalyse von Hod ist, wie bereits aus den Säurekonstanten des physiologischen Substrates **I** (3.3.1), den UV/Vis-Spektren äquimolarer Mischungen von Enzym und Substrat (3.3.2) sowie der Modellreaktion (3.3.3) abgeleitet, die  $O_2$ -unabhängige Aktivierung des Substrates mittels basenkatalysierter Protonenabstraktion mit der Bildung eines Substrat-Anions. Die pH-Abhängigkeit der Hod-Reaktion von einem deprotonierten Aminosäure-Rest mit einem  $pK_a$  Wert von 6,5 deutete bereits auf die Beteiligung eines His-Restes in der Katalyse hin (vgl. 3.2.5). Da der Austausch des konservierten  $H^{251}$  zu Ala einen deutlichen Einfluß auf die Aktivität und die Fähigkeit zur Anionbildung hat (vgl. 3.3.2), übernimmt das konservierte  $H^{251}$  die Funktion einer Base und scheint für die Aktivierung des Substrates von Bedeutung zu sein (Schema 8, Schritt 1). Bei pH 8,0 liegt vorwiegend die ungeladene Substratform, so das sehr wahrscheinlich auch diese Form in die Katalyse eingeht. Bislang kann allerdings keine gesicherte Aussage darüber getroffen werden, ob das 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (Ketoform des Substrates) oder das 3,4-Dihydroxychinaldin (Enolform des Substrates) bevorzugt gebunden wird. Das Gleichgewicht der beiden Tautomere ist laut SPARC-Online-Calculator (<http://www.ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/> in wässriger Lösung deutlich auf Seite der Ketoform und könnte daher - wie in Schema 8 gezeigt - als Ausgangsform für die Katalyse dienen. Dies impliziert die Annahme, dass  $H^{251}$  das Proton vom 1N des Substrates abstrahiert. Allerdings könnte das Gleichgewicht durch die Einwirkung des Enzyms umgekehrt werden, so dass im aktiven Zentrum die Enolform des Substrates vorliegen könnte (nicht gezeigt). Die Kalkulation der  $pK_a$ -Werte (SPARC-Online-Calculator) für die beiden Tautomere des Substrates deutet für die Ketoform des Substrates eine Deprotonierung ( $pK_a$  9,2) zum Anion am N1 (Schema 8, Schritt 1) und für die Enolform eine Deprotonierung ( $pK_a$  6,25) der C3-Hydroxygruppe (nicht gezeigt) an. Bislang kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche der beiden Möglichkeiten höchst wahrscheinlich verwirklicht ist.

Mit der Funktion als Base entspricht das konservierte  $H^{251}$  in Hod nicht dem His einer klassischen Triade, sondern ist eher vergleichbar mit den konservierten His-Resten in den Haloalkan-Dehalogenasen, Epoxid-Hydrolasen oder C-C Hydrolasen. Ohne Kenntnis der Distanz zwischen  $H^{251}$  und Substrat sowie deren Ausrichtung im Enzym-Substrat-Komplex können eine direkte Deprotonierung des Substrates (wie oben diskutiert) durch  $H^{251}$  oder eine indirekte Deprotonierung über ein aktiviertes Wassermolekül in Betracht gezogen werden. Da die Reaktion der Hod allerdings leichte inverse Lösungsmittel-Isotopeneffekte auf  $K_{mA}^{app}$  und  $k_{catA}^{app}$  zeigte (3.2.5), scheint eine direkte Substrataktivierung durch Deprotonierung wahrscheinlicher.

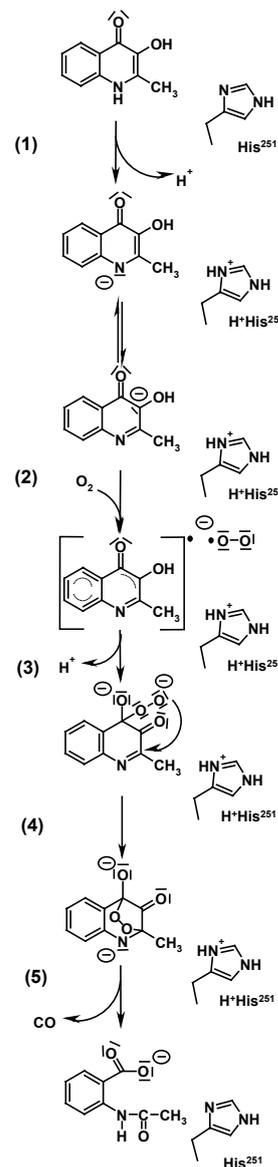
#### Substrataktivierung als Voraussetzung für eine $O_2$ -Aktivierung

Die  $O_2$ -unabhängige Bildung des Substratanions in Hod lässt sich durchaus als Substrataktivierung betrachten, da nachweislich deprotonierte elektronenreiche Moleküle eine gesteigerte Tendenz zur Oxidation zeigen. Für das Substrat der Hod lässt sich vermuten, dass die Bildung des Anions die notwendige Voraussetzung für eine  $O_2$ -Aktivierung ist.

Substrataktivierung vor  $O_2$ -Bindung bzw.  $O_2$ -Aktivierung ist in verschiedenen  $O_2$  nutzenden Enzymen verwirklicht. Neben der schon erwähnten Fe-haltigen Lipoxygenase erfolgt eine Substrataktivierung auch in den Fe-haltigen intradiol spaltenden Dioxygenasen. Im Gegensatz zur Lipoxygenase erfolgt die Substrataktivierung in den intradiol spaltenden Dioxygenasen nicht über Wasserstoff-Abstraktion und Bildung eines enzymgebundenen Substratradikals (NELSON et al. 1994), sondern über Deprotonierung des Substrates und Bildung eines Fe-gebundenen Catecholdianions mit Semichinon-Charakter (BUGG 2003; PAU et al. 2007; VAILLANCOURT et al. 2006). In beiden Beispielen ist ein Fe-generiertes Substratradikal oder ein Substrat-Fe-Intermediat mit Radikalcharakter für die  $O_2$ -Aktivierung verantwortlich und ermöglicht so die Überwindung der Spin-Restriktion.

Interessantere Beispiele, weil eher vergleichbar mit der Situation der cofaktorfreen 2,4-Dioxygenasen, finden sich aber unter den cofaktorfreen  $O_2$ -abhängigen Enzymen (Schema 3). Substrataktivierung über Basenkatalyse als Voraussetzung für die Reaktion mit  $O_2$  wird ebenfalls

Schema 8: Postulierte Abfolge der Reaktion der 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase (nach FRERICHS-DEEKEN et al. 2004)



für die O<sub>2</sub>-abhängige-Koproporphyrinogen-Oxidase (Asp; STEPHENSON et al. 2007), die Urat-Oxidase (Thr-Lys-Diade; DOLL et al. 2005; IMHOFF et al. 2003), die ActVa-Orf6-Monooxygenase (Tyr; SCIARA et al. 2003), die Pyrrolochinolinchinon-Synthase (His; MAGNUSSON et al. 2007) und BluB (Asp; TAGA et al. 2007) diskutiert. Der gemeinsame einleitende Schritt für diese cofaktorfreen Oxygenasen bzw. Oxidasen und den cofaktorfreen 2,4-Dioxygenasen scheint eine basenkatalysierte Deprotonierung des organischen Substrates durch eine Aminosäure, oder - wie für die DpgC-1,2-Dioxygenase von WIDBOOM et al. (2007) vorgeschlagen - ein aktiviertes Wassermolekül zu sein.

Für den weiteren Verlauf der 2,4-Dioxygenolyse durch Hod könnte die Deprotonierung des Substrates und die Bildung des protonierten H<sup>251</sup> (H<sup>+</sup>His<sup>251</sup>, Schema 8) sogar die Voraussetzungen für die Bindung und/oder Aktivierung von O<sub>2</sub> sein (vgl. 4.2.1). Für das konservierte His der Hod sind in seiner protonierten Form noch weiterführende Aufgaben bezüglich der Reaktion mit O<sub>2</sub> denkbar. In der Reaktion der flavin-haltigen Glukose-Oxidase bildet ein konserviertes protoniertes His eine polarisierte Umgebung und kann so die Reaktion von reduziertem Flavin mit O<sub>2</sub> fördern, aber auch zur Stabilisierung des Superoxidanions beitragen (KLINMAN 2007; ROTH & KLINMAN 2003). Ähnliche Funktionen werden auch für konservierte His-Reste der Oxygenase-Komponente aus *p*-Hydroxyphenylacetat-Hydroxylase (ALFIERI et al. 2007) und für die Pyrrolochinolinchinon-Synthase (MAGNUSSON et al. 2007) vermutet. Theoretische Berechnungen deuten darauf hin, dass die Elektronenaffinität von O<sub>2</sub> in der Anwesenheit von einem protonierten His deutlich gesteigert ist (PRABHAKAR et al. 2003; PRABHAKAR et al. 2002). Unter der Voraussetzung das der protonierte H<sup>251</sup>-Rest im ternären Komplex [Hod-Substratanion-O<sub>2</sub>] in unmittelbarer Nähe zum O<sub>2</sub> liegt, könnte ein protoniertes H<sup>251</sup> für einen Elektronentransfer vom aktivierten Substrat auf O<sub>2</sub> von Bedeutung sein. Allerdings könnten in Hod, Qdo und den potentiellen Oxygenasen mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung weitere konservierte His-Reste an anderen Positionen ebenfalls eine solche Funktion übernehmen oder unterstützend beteiligt sein. Mit Hilfe des AS-Sequenz-Alignments der cofaktorfreen 2,4-Dioxygenasen und den putativen Oxygenasen vom  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungstyp (vgl. Abbildung 22) konnten neben dem konserviertem His noch drei weitere strikt konservierte His-Reste (His<sup>64</sup>, His<sup>102</sup> und His<sup>217</sup>) identifiziert werden, von denen sich His<sup>64</sup> und His<sup>102</sup> an konservierten Positionen innerhalb der Familie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen befinden (vgl. 4.2.3 Oxyanion-Tasche).

#### Radikalpaarbildung und Hypothesen zum weiteren Ablauf der enzymatischen 2,4-Dioxygenolyse

In den oben angeführten Beispielen cofaktorfreier Oxygenasen und Oxidasen wird postuliert, dass die jeweils durch Protonenabstraktion aktivierten enzymgebundenen organischen Substratanionen mit Carbanionen-Charakter, analog der Reaktion reduzierter Flavine und Pterine, ein Elektron auf O<sub>2</sub> übertragen und dabei resonanzstabilisierte Radikal-Intermediate ausbilden. Ein Elektronentransfer vom enzymgebundenen Substratanion der Hod auf O<sub>2</sub> (Schema 8, Schritt 2) mit Bildung eines Substratradikals scheint wahrscheinlich, zumal in der Modellreaktion die Bildung eines Substratradikals bewiesen wurde (4.1). Im Gegensatz zur Modellreaktion konnten in der Enzymreaktion mit Hilfe der ESR-Spektroskopie und unter Einsatz von Radikalfängern keine Radikalspezies nachgewiesen werden. Trotz des fehlenden Nachweises von Radikalen in der Enzymreaktion hat die Hypothese eines Elektronentransfers vom aktivierten Substratanion zum O<sub>2</sub>

mit der Ausbildung eines gekoppelten Radikalpaares bestehend aus Substratradikal und Superoxidradikal (Schema 8, Schritt 2) weiterhin Bestand, da die Spin-Kopplung der Radikale einen Nachweis mittels konventioneller ESR-Spektroskopie verhindert und andererseits die Verfügbarkeit der Radikale für die eingesetzten Radikalfänger aus unterschiedlichen Gründen (z. B. hermetischer Ausschluß von Lösungsmittel, Reaktionsgeschwindigkeit der Radikale mit dem Spin-trap wesentlich langsamer als die Reaktion der Radikalpaare) vermutlich nicht gegeben ist. Außerdem bleibt noch anzumerken, dass selbst nach jahrzehntelangen intensiven Untersuchungen zur Reaktion reduzierter Flavine mit O<sub>2</sub> kaum Informationen zur Verfügung stehen, die den direkten Nachweis für die Existenz der postulierten Radikalpaare bei den Flavoproteinen erbringen. Lediglich eine neuere Veröffentlichung von TAGA et al. (2007) beschreibt die Struktur von BluB (Schema 3) mit reduziertem Flavin und einem O<sub>2</sub> in direkter Nachbarschaft zum C(4)<sub>a</sub> Atom des Flavins.

Für den weiteren Verlauf der Reaktion der Hod wird eine Radikalkombination postuliert, wobei ein elektrophiler Angriff des Superoxid-Radikals an die C4-Position, der Stelle mit der experimentell ermittelten größten Spin-Dichte (vgl. 4.1), vermutlich in der Bildung eines C4-(Hydro)peroxy(di)anions resultiert (Schema 8, Schritt 3). Wie bereits erwähnt, geht mit großer Wahrscheinlichkeit ein ungeladenes Substratmolekül in die Reaktion der Hod ein. Das Produkt der Reaktion, *N*-Acetylanthransäure, liegt bei pH 8,0 vorwiegend als Monoanion vor (Carboxylgruppe: p*K*<sub>a</sub> 3,44; Amidgruppe p*K*<sub>a</sub> 13,61; kalkuliert mit SPARC-Online-Calculator). Aus der Ladungsdifferenz zwischen Substrat und Produkt kann abgeleitet werden, dass im Verlauf der Katalyse ein Proton freigesetzt werden muß (Im Rahmen dieser Arbeit experimentell nicht untersucht). Wann und wie dieses Proton freigesetzt wird ist bisher nicht bekannt. Zwischen der experimentell belegten Monoanionbildung des Substrates durch Hod bis zum Abschluß des katalytischen Zyklus sind mehrere Optionen denkbar von denen zwei Beispiele im Folgenden kurz erwähnt werden sollen. Eine Möglichkeit wäre die passive Abspaltung des Protons von der C3-Hydroxylgruppe im Verlauf der Radikalkombination wie im Schritt 3 in Schema 8 gezeigt. Eine weitere Möglichkeit wäre die Freisetzung des Protons zum Ende des Reaktionszyklus während der Regeneration der katalytischen Base H<sup>251</sup>.

Ein intramolekularer Angriff des während der Radikalkombination gebildeten C4-(Hydro)peroxy(di)anions an die Position C2 sollte in einem 2,4-Endoperoxy(di)anion resultieren (Schema 8, Schritt 4). Die nicht zu vernachlässigende Spin-Dichte des Substratradikals in der Modellreaktion erlaubt ein alternatives Szenario mit der einleitenden Bildung eines C2-(Hydro)peroxy(di)anions und anschließendem Angriff an die Position C4, wobei ebenfalls ein 2,4-Endoperoxy(di)anion gebildet wird. Es bleibt zu bedenken, dass die Wahrscheinlichkeit der Spinverteilung im Substratradikal durch die Bedingungen im aktiven Zentrum vom Spin-Verteilungsmuster des freien Substratradikals der Modellreaktion abweichen kann. Unabhängig von den unterschiedlichen Möglichkeiten zur Bildung eines Endoperoxy-Intermediates zerfällt dieses unter Spaltung der O-O-Bindung und zweier C-C-Bindungen zu den Produkten CO und *N*-Acetylanthransäure (aus **I**) oder *N*-Formylanthransäure (aus **II**) (Schema 8, Schritt 5). Die Existenz der postulierten Intermediate, (Hydro)peroxy(di)anion und 2,4-Endoperoxy(di)anion, konnte bisher experimentell nicht belegt werden. Die von BAUER et al. (1996) mit Hod und Qdo

durchgeführten ( $^{18}\text{O}$ ) $\text{O}_2$ / $(^{16}\text{O})\text{O}_2$  Inkorporationsversuche belegen den Einbau beider O-Atome des molekularen Sauerstoffs in die Carboxyl- und die Formyl- bzw. Acetylgruppe der jeweiligen organischen Produkte. Dieses Ergebnis und fehlende Hinweise auf andere Produkte außer CO und den jeweiligen Anthranilsäure-Derivaten schließen die Möglichkeit eines Dioxetan-Intermediates statt eines 2,4-Endoperoxy(di)anions aus.

### 4.2.3 Bakterielle 2,4-Dioxygenasen besitzen keine klassische Triade

#### Die Funktion eines potentiellen Nukleophils in der cofaktorfreen 2,4-Dioxygenolyse

Der nukleophile Aminosäure-Rest (Ser, Cys oder Asp) der katalytischen Triaden in den Haloalkan-Dehalogenasen oder Epoxid-Hydrolasen ist verantwortlich für den einleitenden Schritt des nukleophilen Katalysemechanismus. Die Reaktion beginnt mit einem Angriff des Triaden-Nukleophils und Ausbildung eines kovalenten Enzym-Substrat-Intermediat (CHOVANCOVA et al. 2007; HOPMANN & HIMO 2006a). Substitutionen des Nukleophils, Asp<sup>107</sup> in der Epoxid-Hydrolase (EchA) aus *Agrobacterium radiobacter* (RINK et al. 1997) oder Asp<sup>124</sup> in der Haloalkan-Dehalogenase aus *Xanthobacter autotrophicus* (PRIES et al. 1994) führten zu drastischen Aktivitätsverlusten. Der Austausch des potentiellen Nukleophils S<sup>101</sup> in Hod hingegen beeinträchtigt lediglich den  $K_m$  Wert des aromatischen Substrates. Dieses Ergebnis, auch im Zusammenhang mit Untersuchungen von FISCHER & FETZNER (2000) zur Funktion des konservierten Ser in Qdo, sprechen gegen eine Funktion als Nukleophil und deuten eher auf alternative Funktionen in der cofaktorfreen 2,4-Dioxygenolyse hin. LI & BUGG (2007) schlagen für die C-C-Hydrolasen aus *Burkholderia xenovorans* und aus *Escherichia coli*, im Gegensatz zum sonst vorwiegend für  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen postulierten nukleophilem Mechanismus, eine basenkatalysierte Ester-Hydrolyse ohne Ausbildung eines kovalenten Enzym-Substrat-Intermediates vor. Das Ser der katalytischen Triade stabilisiert in dem vorgeschlagenen Reaktionsweg ein Oxyanion-Intermediat via Wasserstoffbrücken-Bindung. Dies stellt eine neuartige Funktion für ein Nukleophil innerhalb der katalytischen Triaden der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen dar. Alternative Funktionen des klassisch als Nukleophil wirkenden Serins könnten in den cofaktorfreen 2,4-Dioxygenasen analog den C-C-Hydrolasen ebenfalls in der Substratbindung, der Stabilisierung von Intermediaten oder auch in Protonentransfer-Prozessen liegen.

#### Die Oxyanion-Tasche als potentielle O<sub>2</sub>-Bindestelle

Ein weiteres wesentliches Element der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen ist, neben den AS-Resten der Triade, die Oxyanion-Tasche, dessen Funktion vorwiegend in der Stabilisierung eines negativ geladenen Intermediates besteht. Interessanterweise wird diese Funktion vorwiegend von den Amidgruppen der Peptidbindungen der beteiligten Aminosäuren vorgenommen (BARTH et al. 2004; VERSCHUEREN et al. 1993b). In den Haloalkan-Dehalogenasen ist allerdings auch die Seitenkette der Aminosäure Nu<sup>+1</sup> an der Substratbindung und der Stabilisierung des Übergangszustandes beteiligt. Die Seitenkette des konservierten Trp-Restes in Position Nu<sup>+1</sup> wurde als eine von zwei Halogenid-stabilisierenden AS-Resten identifiziert, die eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der NH-Gruppe ihres Indolringes und der entstehenden negativen Ladung am freiwerdenden Halogenid ausbilden (BOHAC et al. 2002; KENNES et al. 1995; MAREK et al. 2000; VERSCHUEREN et al. 1993a;

VERSCHUEREN et al. 1993b). Die Lage des zweiten Halogenid-stabilisierenden AS-Restes (Asn oder Trp) variiert in den Haloalkan-Dehalogenasen. In DhIA (*Xanthobacter autotrophicus*, W<sup>175</sup>) befindet sich der entsprechende Rest in der *cap-domain*, wohingegen in LinB (*Sphingomonas paucimobilis*, N<sup>38</sup>) der zweite Halogenid-stabilisierende Rest im *loop* hinter dem Falblatt  $\beta$ 3 liegt und somit der Position des HGX Motivs der Oxyanion-Tasche entspricht (CHOVANCOVA et al. 2007; JANSSEN 2004).

Im Gegensatz zu den Epoxid-Hydrolasen und den Haloalkan-Dehalogenasen haben Hod, Qdo und potentielle Oxygenasen vom  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungstyp kein Trp sondern einen konservierten His Rest in Nu<sup>+1</sup> Position (H<sup>102</sup> in Hod, Abbildung 22). Analog der Funktion des Nu<sup>+1</sup>-Restes in den Epoxid-Hydrolasen und Haloalkan-Dehalogenasen könnte in den cofaktorfreen 2,4-Dioxygenasen der entsprechende His-Rest an der Stabilisierung eines negativ geladenen Intermediates beteiligt sein. Der positive Einfluß von His-Resten auf die Reaktivität bzw. Stabilität von Sauerstoff wurde für die Glukose-Oxidase (KLINMAN 2007; ROTH & KLINMAN 2003), die *p*-Hydroxyphenylacetat-Hydroxylase (ALFIERI et al. 2007) und für die Pyrrolochinolinchinon-Synthase (MAGNUSSON et al. 2007) beschrieben. Die Substitution H102Q in Hod (vgl. Tabelle 9, S. 70) führt zwar nicht zu drastischen Beeinträchtigungen der Aktivität, deutet aber auf eine Beteiligung von H<sup>102</sup> an der O<sub>2</sub>-Bindung und -Reaktivität hin. Es besteht daher die Möglichkeit, dass ein strukturelles Äquivalent zur Halogenid-Bindestelle der Haloalkan-Dehalogenasen in Hod mit H<sup>102</sup> an der O<sub>2</sub>-Bindung oder Stabilisierung eines Superoxidanions beteiligt ist. Neben dem konservierten His in Nu<sup>+1</sup> Position (H<sup>102</sup> in Hod) könnte das konservierte Trp der Oxygenasen vom  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungstyp (W<sup>36</sup> in Hod, Abbildung 22), welches dem X eines HGX-Motivs der Oxyanion-Tasche der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen entspricht, an der O<sub>2</sub>-Bindung oder Stabilisierung beteiligt sein. Bisher konnte ein Austausch dieser Position nicht durchgeführt werden.

Neben den Komponenten einer potentiellen Oxyanion-Tasche in Hod ist durchaus die Beteiligung von AS-Resten der *cap-domain* an der O<sub>2</sub>-Bindung bzw. Stabilisierung denkbar. Da es sich bei der *cap-domain* aber um einen sehr variablen Bereich innerhalb der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen handelt, ist eine Identifizierung weiterer AS-Reste auf Basis von Sequenzvergleichen mit den bislang strukturbekanntem  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen wenig erfolgversprechend gewesen. Mit Hilfe der theoretischen Strukturmodelle (vgl. 3.4.2) in Kombination mit den Sequenzdaten potentieller Oxygenasen mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung sollte eine gezieltere Identifizierung katalytisch relevanter AS-Reste möglich sein (vgl. 4.3).

Mit Hinblick auf die außerordentlichen Eigenschaften des Substrates O<sub>2</sub> scheint es sehr wahrscheinlich, dass an der O<sub>2</sub>-Bindung und Stabilisierung in den cofaktorfreen 2,4-Dioxygenasen nicht nur ein AS-Rest als essentiell identifiziert werden wird, sondern eher ein Konsortium mehrerer AS-Reste für diese Aufgabe notwendig ist. Hierin könnte der Grund gesehen werden, dass in dieser Arbeit mit Ausnahme der H251A Substitution fast alle AS-Austausche geringe Effekte auf die Aktivität hatten.

### Die Funktion einer potentiellen sauren Aminosäure

Die saure Aminosäure der katalytischen Triade in den  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen ist in der *core-domain* vorwiegend hinter dem Faltblatt  $\beta 7$  lokalisiert, kann aber auch hinter dem Faltblatt  $\beta 6$  positioniert sein. Beide Bereiche zeigen im Alignment der cofaktorfreen 2,4-Dioxygenasen mit strukturbekanntem  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen kaum Übereinstimmungen; die Position einer sauren Aminosäure in Hod und Qdo ließ sich nicht eindeutig identifizieren (Abbildung 21, FISCHER et al. 1999). Im Anschluß an das postulierte Faltblattes  $\beta 7$  von Hod wurde lediglich der AS-Rest E224 als mögliche saure AS identifiziert und gegen Ala ausgetauscht. Da Hod und Qdo im Bereich des Faltblattes  $\beta 7$  über ein konserviertes Sequenzmotiv verfügen (Abbildung 21, HIF/YSQP), wurden ebenfalls die Aminosäuren His<sup>217</sup>, Ser<sup>220</sup> und Gln<sup>221</sup> als AS-Reste mit potentieller Beteiligung an Protonen-Transfer-Prozessen oder mit Beteiligung an der Bildung von Wasserstoffbrücken ausgetauscht (Tabelle 9, S. 70). Die Substitutionen H217Q und Q221A führten zu instabilen Proteinen. Die Effekte des Austausches E224A auf die kinetischen Parameter waren sehr gering. Die Substitution S220N in Hod zeigte Effekte auf die kinetischen Parameter ähnlich den Effekten des Austausches H102Q. Wie H<sup>102</sup>, welches der Position der konservierten Halogenid-Bindestelle in den Haloalkan-Dehalogenasen entspricht, könnte S<sup>220</sup> ein Element einer O<sub>2</sub>-Bindestelle und/oder von Bedeutung für die O<sub>2</sub>-Aktivierung sein. Die Auswirkung der Substitution E224A auf  $K_{mO_2}^{app}$  stützt die Hypothese, dass der Bereich hinter dem Faltblatt  $\beta 7$  eine Bedeutung für die O<sub>2</sub>-Bindung hat. Allerdings wurde den Resten des Loops hinter dem Faltblatt  $\beta 7$  in den Haloalkan-Dehalogenasen bislang keine Funktion bezüglich der Stabilisierung eines Halogenid-Ions zugeschrieben (BOHAC et al. 2002; DAMBORSKY & KOCA 1999; OAKLEY et al. 2004). Die Möglichkeit einer Interaktion von S<sup>220</sup> mit O<sub>2</sub> läßt vermuten, dass eine O<sub>2</sub>-Bindestelle in Hod nicht homolog zur Halogen-Bindestelle der Haloalkan-Dehalogenasen ist. Allerdings sind einige der AS-Reste im Anschluß an des Faltblatt  $\beta 7$  Bestandteile des aktiven Zentrums in einigen Haloalkan-Dehalogenasen (z. B. A247 und L248 in LinB) und Haloacetat-Dehalogenasen (DehH1, *Moraxella* sp. Stamm B, M<sup>246</sup>; DAMBORSKY & KOCA 1999). In LinB bilden die AS-Reste A247 bis R252 einen Schlitz in der Nähe des aktiven Zentrums aus, über den möglicherweise Wassermoleküle ans aktive Zentrum gelangen könnten. Analog ist es denkbar, dass die Region hinter dem postulierten Faltblatt  $\beta 7$  in Hod an der Formgebung des aktiven Zentrums beteiligt ist.

#### **4.2.4 Die Funktion eines konservierten Tyrosin-Restes der *cap-domain***

Zu den  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen mit Ähnlichkeit zu den bakteriellen 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod gehören wie bereits erwähnt auch die Epoxid-Hydrolasen (Abbildung 21, FISCHER et al. 1999). Innerhalb der Enzymfamilie mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung sind u.a. Strukturen der Epoxid-Hydrolasen (EchA) aus *Agrobacterium radiobacter* (NARDINI et al. 1999), der Maus (ARGIRIADI et al. 2000; ARGIRIADI et al. 1999) und dem Menschen (GOMEZ et al. 2004) bekannt. In den bekannten Strukturen befinden sich in der *cap-domain* zwei Tyr-Reste, eines davon strikt konserviert, die jeweils ins aktive Zentrum reichen. Unterstützt durch AS-Substitutionen dieser Position wird den Tyrosin-Resten eine Funktionen bei der Substrat-Bindung, Stabilisierung von Intermediaten und der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zugeschrieben (BARTH et al. 2004; RINK et al. 2000; RINK

et al. 1999; YAMADA et al. 2000). Ein entsprechend konservierter Tyr-Rest innerhalb der *cap-domain* konnte auch in den bakteriellen 2,4-Dioxygenasen gefunden werden ( $Y^{189}$  in Qdo,  $Y^{196}$  in Hod, vgl. Abbildung 21). In den Epoxid-Hydrolasen wirkt der konservierte Tyr-Rest im ersten Schritt der Katalyse als Protonen-Donator und überträgt ein Proton auf das während der Spaltung des Epoxidringes gebildete Oxyanion. Eine ähnliche Rolle z. B. als Wasserstoffbrücken-bildender AS-Rest zum  $O_2$  oder als Protonen-Donator zur Stabilisierung negativ geladener Intermediate schien möglich. Um die Rolle des Restes  $Y^{196}$  in der Katalyse der Hod zu untersuchen, wurde der entsprechende Rest gegen Ala, Lys und Arg ausgetauscht. Die katalytische Konstante  $K_{mA}^{app}$  stieg aufgrund des AS-Austausches um den Faktor 4,3 bis 10,8 (Tabelle 9 S. 70). Im Gegensatz dazu führten die Substitutionen des entsprechenden Restes Y215F und Y215A in EchA zu einem deutlich stärkeren Anstieg des  $K_m$ -Wertes für das Epoxid-Substrat (RINK et al. 2000; RINK et al. 1999), was darauf hindeutet, dass die Funktion des  $Y^{196}$  in Hod bezüglich der Substratbindung nicht mit der des konservierten Tyrosins in den Epoxid-Hydrolasen vergleichbar ist. Der Austausch von  $Y^{196}$  zu Ala, Lys und Arg führte jeweils zu relativ ähnlichen Effekten auf den  $k_{cat}^{app}$  für das organische Substrat und  $O_2$  (Tabelle 9) was auf eine mögliche Beteiligung von  $Y^{196}$  an der Umsetzung des ternären Komplexes hindeuten kann.

### 4.3 Hypothesen zur Struktur-Funktions-Beziehung in Hod

Im Folgenden wird ausgehend von den theoretischen Strukturmodellen der Hod (2.19; 3.4.2) eine Abschätzungen über mögliche Interaktionen verschiedener AS-Reste untereinander oder die Möglichkeit der Beteiligung spezieller AS-Reste an der Ausbildung eines aktiven Zentrums vorgenommen. Allgemein sind trotz relativ geringer Sequenzhomologien die Anordnungen der  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter in den Kernstrukturen (*core-domain*) der Enzyme vom  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungstyp relativ identisch (NARDINI & DIJKSTRA 1999; OLLIS et al. 1992). Dadurch wird die Vergleichbarkeit der Strukturen und gleichzeitig auch die Qualität der mittels Homologie-Modellierung erstellten theoretischen Strukturen für Hod verbessert. Anders verhält es sich für die *cap-domain* der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen. Deren Sekundärelemente sind ausgesprochen variabel und zeigen kaum konservierte Bereiche oder Übereinstimmungen. Dieses Phänomen spiegelt sich auch in den verschiedenen mittels Homologie-Modellierung erstellten theoretischen Hod-Strukturmodellen wieder (Abbildung 24) und beeinträchtigt besonders für die *cap-domain* eine Abschätzung der Funktion einzelner AS-Reste.

#### Eine Disulfidbrücke könnte ein wichtiges Element der Strukturintegrität der Hod sein

Hod verfügt über drei Cys-Reste ( $C^{37}$ ,  $C^{69}$  und  $C^{184}$ ) deren Austausch gegen Serin mittels gerichteter ortsspezifischer Mutagenese im Falle von  $C^{37}$  und  $C^{184}$  zur Expression sehr geringer äußerst instabiler Proteinmengen führte (vgl. 3.1.3). Anhand der theoretischen Strukturmodelle der Hod wird deutlich, dass  $C^{69}$  sich wahrscheinlich an der Proteinoberfläche befindet. Eine entsprechende Lage in Hod könnte erklären warum die Substitution C69S in Hod die für HodA und HodB beobachtete Dimerbildung verhinderte und keinen Einfluß auf die Aktivität und die Faltung

der Hod zeigte (vgl. 3.1.3). Die AS-Reste des Cysteinopaars C<sup>37</sup>/C<sup>184</sup> sind in den drei generierten theoretischen Struktur-Modellen zueinander ausgerichtet und befinden sich in einem zentralen Kontaktbereich zwischen *core*- und *cap-domain*. Die aus den theoretischen Strukturmodellen abgeleiteten Distanzen zwischen dem Cys-Paar variieren von 6 bis 14 Å (Hod-Modell-(EchA) 6,4 Å; Hod-Modell-(Hdlh) 6,4 Å; Hod-Modell-(BphD) 14,1 Å ). Falls die Lage des Paares C<sup>37</sup>/C<sup>184</sup> in der tatsächlichen Struktur der Hod ähnlich und enger ist, könnte an dieser Stelle durchaus eine Disulfidbrücke mit Einfluß auf die Struktur vorhanden sein.

Die potentielle Oxyanion-Tasche der Hod könnte neben dem AS-Rest Nu<sup>+1</sup> und einem AS-Rest aus dem HGX-Motiv weitere Elemente enthalten.

Hochkonservierte Abschnitte in cofaktorfreen Oxygenasen vom  $\alpha/\beta$ -Faltungstyp (Abbildung 22) und allgemein in Enzymen mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung finden sich im Bereich des zentralen Faltblattes  $\beta 3$  mit dem direkt anschließendem potentiellen P/SGX-Motiv einer Oxyanion-Tasche (X = W<sup>36</sup> in Hod) und zwischen dem Faltblatt  $\beta 5$  und der Helix  $\alpha C$  mit dem nukleophilen Ellenbogen (Motiv II der  $\alpha/\beta$ -Faltung; potentiellen Nukleophil S<sup>101</sup>; Nu<sup>+1</sup> Element einer Oxyanion-Tasche = H<sup>102</sup> in Hod). Beide Bereiche befinden sich in den theoretischen Strukturmodellen der Hod im Bereich eines potentiellen aktiven Zentrums zwischen *core-domain* und *cap-domain* (Abbildung 24). Für H<sup>102</sup> wurde aus den kinetischen Daten der Proteinvariante H102Q eine mögliche Beteiligung bei der O<sub>2</sub>-Bindung und O<sub>2</sub>-Reaktivität abgeleitet (Tabelle 9; vgl. auch S. 82). Aus den theoretischen Strukturmodellen der Hod läßt sich eine räumliche Distanz zwischen den beiden potentiellen Elementen einer Oxyanion-Tasche (W<sup>36</sup> und H<sup>102</sup>) von ca. 6 bis 9 Å ermitteln (Hod-Modell-(EchA) 6,1 Å; Hod-Modell-(Hdlh) 8,9 Å; Hod-Modell-(BphD) 7,4 Å). Aufgrund der geringen Distanz ist für Hod durchaus eine parallele Interaktion von W<sup>36</sup> und H<sup>102</sup> mit einem gemeinsamen Liganden, möglicherweise O<sub>2</sub> oder einem Superoxidanion denkbar. Interessanterweise liegen W<sup>36</sup>, H<sup>102</sup> und H<sup>251</sup> in allen theoretischen Strukturmodellen wie an den Eckpunkten eines Dreiecks zueinander, bei dem die Achse W<sup>36</sup> zu H<sup>102</sup> die Basis (Oxyanion-Tasche?) bildet und H<sup>251</sup> an der Spitze des Dreiecks mit Schenkellängen von ca. 5 bis 10 Å liegt. Diese Anordnung wäre, wenn sie in ähnlichem Umfang in der Hod ausgeformt ist, groß genug um den Pyridin-Ring eines Substratmoleküls und ein O<sub>2</sub> zu fassen und könnte daher einen Bereich des aktiven Zentrums in Hod ausformen. Ausgehend von den Überlegungen zum Mechanismus (4.2.2) der Hod wird postuliert, das H<sup>251</sup> zum N1 oder zum Liganden an C3 (mögliche Orte einer Substrat-Deprotonierung) eines gebundenen Substrates ausgerichtet sein könnte und S<sup>101</sup> bevorzugt bei der Substratbindung (vgl. 4.2.3) mittels Wasserstoffbrücken über die Liganden an C3 oder C4 des Substrates beteiligt ist. Ohne tatsächliche Strukturdaten, im besten Fall mit gebundenem Substrat, bleibt diese Aussage vorerst unbestätigt.

Konservierte Reste der *cap-domain* tragen wahrscheinlich nicht nur zur Substratbindung bei

In der *cap-domain* der potentiellen Oxygenasen mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung finden sich keine konservierten Bereiche, lediglich einzelne AS-Reste scheinen strikt (F<sup>136</sup>, W<sup>160</sup>, W<sup>185</sup> und Y<sup>196</sup> in Hod) bzw. teilweise konserviert zu sein (Abbildung 22). Der *cap-domain* der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen wird im allgemeinen eine wichtige Rolle bei der Substratbindung zugeschrieben (HEIKINHEIMO et al.

1999; NARDINI & DIJKSTRA 1999). Die Ausformung der *cap-domain* in den theoretischen Strukturmodellen ist stark abhängig von dem jeweils verwendeten Template zur Homologie-Modellierung. Daher kann keine Aussage über eine etwaige Beteiligung der konservierten Reste F<sup>136</sup>, W<sup>160</sup> und W<sup>185</sup> getroffen werden. Aufgrund des vermutlich gemeinsamen Substrates O<sub>2</sub> für die Oxygenasen mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung (Abbildung 22) erscheint es interessant, dass vorwiegend aromatische AS-Reste in der *cap-domain* konserviert scheinen. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der bevorzugten Bindung von O<sub>2</sub> in aliphatischen unpolaren Bereichen und der Notwendigkeit zur Stabilisierung einer radikalischen Zwischenstufe. F<sup>136</sup>, W<sup>160</sup> und W<sup>185</sup> waren bislang nicht als Kandidaten mit katalytischer Relevanz in Betracht gezogen worden. Daher wurden bislang keine Substitutionen für F<sup>136</sup>, W<sup>160</sup> und W<sup>185</sup> durchgeführt. Hingegen wurde Y<sup>196</sup> in dieser Arbeit bereits gegen verschiedene AS-Reste ausgetauscht. Aufgrund der kinetischen Daten wird für Y<sup>196</sup> eher eine Beteiligung an der Umsetzung des zentralen Komplexes zugeschrieben und weniger ein Einfluß auf die Substratbindung (vgl. 4.2.4). Aus den theoretischen Strukturmodellen ergibt sich für Tyr<sup>196</sup> eine Ausrichtung zur potentiellen Oxyanion-Tasche und zwar gegenüber dem konservierten His<sup>251</sup> mit einer Schenkelänge zur Basislinie zwischen W<sup>36</sup> und H<sup>102</sup> von ca. 5 bis 9 Å. Die vier AS-Reste H<sup>251</sup>, W<sup>36</sup>, H<sup>102</sup> und Y<sup>196</sup> bilden die Eckpunkte einer Raute. Diese Lage für Y<sup>196</sup>, falls sie in Hod verwirklicht ist, könnte als Element einer Oxyanion-Tasche tatsächlich von Bedeutung für die Umsetzung eines ternären Komplexes sein. In den Haloalkan-Dehalogenasen sind konservierte Trp-Reste an der Ausbildung einer Haolgenid-Bindestelle und der Stabilisierung des freigesetzten Halogenid-Ions beteiligt (JANSSEN 2004). Identisch an der Ausbildung der Halogen-Bindestelle ist in allen Haloalkan-Dehalogenasen ein Trp in Position Nu<sup>+1</sup>. Das zweite Element der Halogen-Bindestelle kann ein Asp im Loop hinter dem Faltblatt  $\beta$ 3 der *core-domain* sein, diese Position entspricht dem zweiten Element einer klassischen Oxyanion-Tasche (Subfamilien HLD-II z. B. LinB und HLD-III), oder wie im Fall der Haloalkan-Dehalogenase aus *Xanthobacter autotrophicus* (DhIA; Subfamilie HLD-I) in der *cap-domain* lokalisiert sein (CHOVANCOVA et al. 2007). Analog der Stabilisierung eines Halogenid-Ions könnte Hod mit Hilfe einer Oxyanion-Tasche, gebildet aus W<sup>36</sup>, H<sup>102</sup> und Tyr<sup>196</sup>, ein geladenes O<sub>2</sub>-Derivat (Superoxidanion oder (Hydro)peroxy-Derivat) stabilisieren.

#### Die saure Aminosäure der klassischen Triade ist in Hod eher nicht verwirklicht

Die Position der sauren Aminosäure einer katalytischen Triade ist in den  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen in weitaus geringerem Maße konserviert als die anderen AS-Reste der katalytischen Triade oder die Elemente der Oxyanion-Tasche sind. Die saure Aminosäure kann sowohl nach Faltblatt  $\beta$ 6 aber auch nach  $\beta$ 7 lokalisiert sein. In den bakteriellen 2,4-Dioxygenasen und den potentiellen Oxygenasen mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung lassen sich bei beiden Faltblättern konservierte Bereiche erkennen (Abbildung 22), die zwar in der Gegenüberstellung der theoretischen Strukturmodelle der Hod erkennbar sind aber leichte Varianten zeigen. Direkt im Anschluß an Faltblatt  $\beta$ 6 ist in den potentiellen Oxygenasen mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung ein Asp konserviert (D<sup>126</sup> in Hod). Der konservierte AS-Rest Asp<sup>126</sup> ist innerhalb der theoretischen Strukturmodelle der Hod zwischen 7 bis 15 Å von der Position des konservierten His<sup>251</sup>, in entgegengesetzter Richtung zur potentiellen Oxyanion-Tasche. Die große Distanzdifferenz zwischen den verschiedenen theoretischen

Modellen läßt keine befriedigende Aussage über eine mögliche Beteiligung an der Katalyse der Hod zu. In Qdo wurde der entsprechende Rest bereits von FISCHER (2000) gegen ein Ala ausgetauscht. Der entsprechende Aminosäureaustausch führte zu einer leichten Verschlechterung des apparenten  $K_m$ -Wertes des aromatischen Substrates und zur Halbierung der Umsatzrate, was auf eine Beteiligung an der Substratbindung und/oder Umsetzung des Übergangszustandes hindeutet. Ein essentieller Einfluß auf die Katalyse war aber nicht nachzuweisen. Ebenfalls konserviert ist ein Bereich direkt im und kurz nach dem Faltblatt  $\beta 7$  mit einem strikt konserviertem His im Faltblatt (His<sup>217</sup> in Hod) und einem konserviertem Ser als ersten AS-Rest nach dem Faltblatt (S<sup>220</sup> in Hod). Die Proteinvariante H217Q in Hod zeigte Stabilitätsprobleme. Da auch aus den theoretischen Strukturmodellen der Hod bislang keine besondere Interaktion mit dem konserviertem His<sup>251</sup> (Distanz 10 bis 16 Å) oder den AS-Resten einer potentiellen Oxyanion-Tasche (Distanz größer 18 Å) zu erkennen ist, liegt die vorwiegende Bedeutung des His<sup>217</sup> und dem Loop nach  $\beta 7$  vermutlich eher in einer strukturgebenden Funktion. Dem Ser<sup>220</sup> in Hod wurde ausgehend von den kinetischen Daten der Proteinvariante S220Q die mögliche Beteiligung an einer Aktivierung oder Bindung von Sauerstoff zugeschrieben. Die Ausrichtung von S<sup>220</sup> in den theoretischen Strukturmodellen der Hod spricht aufgrund der großen Distanz gegen eine direkte Interaktion mit den AS-Resten der potentiellen Oxyanion-Tasche. S<sup>220</sup> scheint eher am äußeren Rand des aktiven Zentrums der Hod lokalisiert zu sein. Ein direkter Einfluß auf die Katalyse scheint auf Basis der momentanen Datenlage vorerst unwahrscheinlich.

#### Das Motiv II der EH-Faltung scheint von Bedeutung für die Abgrenzung des aktiven Zentrums zu sein

Ein letzter strikt konservierter Bereich mit der Sequenz W/IRGHG/D, der dem Motiv I der  $\alpha/\beta$ -Faltung und dem Motiv II der EH-Faltung entspricht, findet sich im Anschluß direkt an das Faltblatt  $\beta 4$  und bildet in allen theoretischen Strukturmodellen der Hod einen stark gebogenen Loop aus. Diesem Bereich ist, im Vergleich mit den  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen, vorerst kein AS-Rest mit katalytischer Bedeutung zuzuordnen. Eher scheint dieser Bereich strukturelle Bedeutung zu haben, indem z. B. das aktive Zentrum im Bereich der potentiellen Oxyanion-Tasche zum Lösungsmittel hin abgegrenzt wird. Eine funktionelle Bedeutung kann bislang allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden.

Die hier vorgestellten Überlegungen zur räumlichen Anordnung verschiedener AS-Reste der Hod und der sich daraus ergebenden möglichen Funktion für die Hod basieren auf theoretischen Strukturmodellen und sind nicht experimentell abgesichert und können nur als Anhaltspunkte für weitere AS-Substitutionen sein. Letztendlich bleibt abzuwarten, inwieweit die tatsächliche Struktur der Hod mit den theoretischen Strukturmodellen übereinstimmt. Dennoch ist die Aussage gerechtfertigt, dass die cofaktorfreen 2,4-Dioxygenasen zur katalytischen Triade homologe Elemente für die Katalyse nutzen, aber nicht über die klassische katalytische Triade der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen verfügen.

#### 4.4 Ausblick

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung des Katalysemechanismus der cofaktorfreien 2,4-Dioxygenolyse, wobei die Besonderheit und Einzigartigkeit der 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase (Hod) und der 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin 2,4-Dioxygenase (Qdo) ursprünglich im Zusammenspiel von Enzymstruktur, Substratreaktivitäten und der außergewöhnlichen Reaktion (cofaktorfreie Dioxygenolyse mit CO-Freisetzung) gesehen wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten einige Teilaspekte des Mechanismus der cofaktorfreien 2,4-Dioxygenolyse und der Reaktivität ihrer heteroaromatischen Substrate geklärt werden. Die Identifizierung katalytisch relevanter AS-Reste, die Klärung ihrer Interaktionen untereinander bzw. mit den Substraten ist allerdings noch nicht abgeschlossen. Die in absehbarer Zeit vorliegenden Strukturinformationen der bakteriellen 2,4-Dioxygenasen werden neue Ansatzpunkte zur Identifizierung potentiell relevanter AS-Reste liefern, so dass zukünftig gezielt AS-Substitutionen durchgeführt werden können um den Mechanismus der 2,4-Dioxygenolyse weiter zu ergründen. Strukturdaten zu Enzym-Substrat-Komplexen (physiologisches und alternative Substrate sowie Inhibitoren) wären allerdings noch notwendig, um die aus den bisherigen und zukünftigen AS-Substitutions-Studien ermittelten Effekte zu beurteilen.

Für die Enzymreaktion konnte bisher nur ein Substratanion als Intermediat nachgewiesen werden. Die Beteiligung weiterer Intermediate wie zum Beispiel ein Radikalpaar oder ein Substratperoxid-Derivat ist bisher nicht geklärt. Eine Untersuchung dieser Fragestellung könnte mit Hilfe der *stopped-flow*-Spektroskopie und der zeitaufgelösten paramagnetischen Elektronen-Spin-Resonanz (TREPR) erfolgen.

Bisher durchgeführte Mutagenesestudien im Zusammenhang mit der kürzlich bestätigten Struktur der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung zeigen deutlich, dass von den cofaktorfreien 2,4-Dioxygenasen eine neuartige Untergruppe innerhalb der Superfamilie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung gebildet wird, die nicht über eine klassische Triade verfügt. Die Superfamilie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung stellt eine der umfangreichsten Enzymfamilien dar, die mit einer stark konservierten Struktur ein großes Repertoire unterschiedlicher Reaktionen katalysieren. Die Aufklärung der Struktur und des Katalysemechanismus der cofaktorfreien 2,4-Dioxygenasen und weiterer cofaktorfreier Oxygenasen mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung kann in Zusammenhang mit phylogenetischen Analysen helfen, Prinzipien der Enzymervolution zu erkennen.

2-Heptyl-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolin, das "Pseudomonas-Chinolon-Signal (PQS)" ist ein Eisen-Chelator und ein Signalmolekül der *quorum-sensing* Kaskade in *P. aeruginosa*, welche die Expression zahlreicher Virulenzgene steuert. *Pseudomonas aeruginosa* ist einer der hauptsächlichen Verursacher nosocomialer Infektionen und die häufigste Todesursache bei Mukoviszidose Patienten. PQS wird eine Schlüsselrolle bei der Pathogenität von *P. aeruginosa* zugeschrieben und stellt daher ein mögliches Zielmolekül bei der Therapie von Infektionen mit *P. aeruginosa* dar. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Hod-Substrates mit dem PQS-Molekül wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. S. Fetzner (Universität Münster) erste erfolgreiche Versuche zur Umsetzbarkeit von PQS durch Hod durchgeführt. In Kulturen von *P. aeruginosa* konnten durch externe Zugaben von Hod *quorum-quenching* Effekte beobachtet werden. Hod ist

bislang das einzige bekannte Enzym, mit der Fähigkeit zur Spaltung des PQS-Moleküls. Da Hod relativ klein, cofaktorfrei und außergewöhnlich stabil ist, könnte es hilfreich bei der Untersuchung und Aufklärung des PQS-Quorum-Sensing-Regelkreises sein, vorausgesetzt die Aktivität gegenüber PQS könnte gesteigert werden. Zukünftige Aufgaben wären u.a. *enzyme-engineering* mit gezielter Enzym-Evolution zur Verbesserung der Umsetzung von PQS durch Hod.

## 5 Zusammenfassung

Mono- und Dioxygenasen besitzen in der Regel einen metallischen oder organischen Cofaktor der es ihnen ermöglicht  $O_2$  und/oder ihr organisches Substrat zu aktivieren. Bislang sind nur wenige cofaktorfremde  $O_2$  nutzende Enzyme bekannt. Für diese Enzyme ergibt sich die Frage nach der Art der Aktivierung von  $O_2$  für die Katalyse. Die cofaktorfremde 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase (Hod) ist beteiligt am Abbau von Chinaldin (2-Methylchinalin) durch *Arthrobacter nitroguajacolicus* R61a und katalysiert die 2,4-dioxygenolytische Spaltung von 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin zu *N*-Acetylanthraniisäure und CO.

Auf der Grundlage von Sequenz-Alignments und Sekundärstruktur-Vorhersagen wurde Hod als Mitglied der Superfamilie des  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungstyps zugeordnet, deren Mitglieder in der Regel eine konservierte katalytische Triade, bestehend aus einer nukleophilen Aminosäure, einer sauren Aminosäure und einem konservierten Histidin-Rest besitzen.

Kinetische Untersuchungen (*bi substrate steady state*) und Produkthemmstudien zeigen für HodC, der C69A Proteinvariante, einen geordneten ternären Komplex-Mechanismus auf, in dem das aromatische Substrat vor  $O_2$  gebunden wird und CO als erstes Produkt freigesetzt wird.

Untersuchungen der basenkatalysierten Modellreaktion von 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin mittels Elektronen-Spin-Resonanz-(ESR)-Spektroskopie belegen die Bildung eines resonanzstabilisierten Substratradikals unter  $O_2$ -Einfluß. Austauschbare Protonen sind an der Modellreaktion nicht beteiligt, da ESR-Spektren in  $H_2O$  oder  $D_2O$  identisch sind. Hieraus läßt sich ableiten, dass ein Substratanion als reaktives Intermediat einer 1-Elektronen-Oxidation unterliegt. Für einen zentralen Enzym-Substrat-Komplex wird ein direkter Elektronentransfer vom Substratanion auf  $O_2$  postuliert, der in der Bildung eines Radikalpaares resultiert. Aufgrund der beobachteten Spin-Verteilung im Substrat-Radikal-Anion sind als Produkte einer anschließenden Radikalkombination C4- oder C2-Hydroperoxy-(di)-Anionen denkbar. Ein intramolekularer Angriff könnte zur Bildung eines 2,4-Endoperoxids führen, das letztendlich in die bekannten Reaktionsprodukte zerfällt.

Kinetische Untersuchungen verschiedener HodC-Varianten stützen die Annahme, dass Hod Aminosäure-Reste des aktiven Zentrums der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen für die 2,4-Dioxygenolyse nutzt. Während HodC die Bildung des Substratanions vor der eigentlichen  $O_2$ -Bindung katalysiert, hat die H251A-Variante diese Fähigkeit verloren. H<sup>251</sup> entspricht dem konservierten Histidin-Rest der katalytischen Triade der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen und wirkt als Base indem ein Proton vom organischen Substrat abstrahiert wird. Der Aminosäure-Rest S<sup>101</sup> entspricht dem Nukleophil der katalytischen Triade der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen und scheint an der Bindung des hetero-aromatischen Substrates beteiligt zu sein. Der Aminosäure-Rest H<sup>102</sup> und Aminosäure-Reste einer Region entsprechend dem Bereich der sauren Aminosäure der katalytischen Triade der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen scheinen Einfluß auf die  $O_2$ -Bindung und -Reaktivität zu nehmen. Ein Tyrosin-Rest (Y<sup>196</sup>) könnte ebenfalls an der Umsetzung des ternären Komplexes beteiligt sein.

Die Bindung des organischen Substrates stellt keinen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Produktfreisetzung und/oder  $O_2$ -Bindung sind als limitierende Schritte der enzymatischen Umsetzung ebenfalls auszuschließen, da Viskositätseffekte auf die Reaktionsgeschwindigkeit nicht beobachtet werden konnten. Die Bindung des aromatischen Substrates zeigte keine

Lösungsmittel-Isotopen-Effekte. Somit sind Protonenübertragungsvorgänge bei der Substrataktivierung ebenfalls nicht geschwindigkeitsbestimmend.

Vergleiche der Reaktionen cofaktorfreier Oxygenasen bzw. Oxidasen zeigen, dass die Fähigkeit zur cofaktor-unabhängigen O<sub>2</sub>-Aktivierung nicht an spezielle Enzymstrukturen gebunden ist, sondern eher in den chemisch-physikalischen Eigenschaften der vorwiegend aromatischen oder ungesättigten organischen Substrate begründet liegt.

## 6 Summary

Mono- and dioxygenases usually depend on a transition metal or an organic cofactor to activate dioxygen, or their organic substrate, or both. Only few cofactor-less dioxygen dependent enzymes are known. These enzymes present the mechanistically intriguing problem of how dioxygen is activated for catalysis. The cofactor-less 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinaldine 2,4-dioxygenase (Hod) from *Arthrobacter nitroguajacolicus* strain R 61a is a catabolic enzyme involved in the pathway of quinaldine (2-methylquinoline) utilization. It catalyzes the 2,4-dioxygenolytic cleavage of 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinaldine, resulting in the formation of carbon monoxide and *N*-acetylanthranilate. On the basis of sequence alignments and secondary structure predictions Hod has been classified as a member of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold superfamily. The catalytic residues of the  $\alpha/\beta$ -hydrolases as a rule constitute a highly conserved triad consisting of a nucleophilic amino acid, an acidic residue and an absolutely conserved histidine.

Bisubstrate steady-state kinetics and product inhibition patterns of HodC, the C69A protein variant of Hod suggested a compulsory-order ternary-complex mechanism, in which binding of the organic substrate precedes dioxygen binding, and carbon monoxide is released first.

Investigation of base-catalyzed dioxygenolysis of 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinaldine by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy revealed formation of a resonance stabilized radical upon exposure to dioxygen. Since in D<sub>2</sub>O spectral properties are not affected, exchangeable protons are not involved, confirming that a substrate anion is the reactive intermediate that undergoes single-electron oxidation. It is suggested that in the ternary complex of the enzyme, direct single-electron transfer from the substrate-anion to dioxygen may occur, resulting in a radical pair. Based on the estimated spin distribution within the substrate-radical observed in the model reaction of 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinaldine, radical recombination may produce a C4- or C2-(hydro)peroxy(di)anion. Subsequent intramolecular attack would result in the 2,4-endoperoxyanion that may collapse to the reaction products.

Analysis of protein variants suggested that Hod has adapted active site residues of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold for the dioxygenolytic reaction. Whereas HodC catalyzes formation of the anion of its organic substrate prior to dioxygen binding, HodC-H251A does not, suggesting that H<sup>251</sup>, which aligns with the histidine of the catalytic triad of the  $\alpha/\beta$ -hydrolases, acts as general base in catalysis and abstracts a proton from the organic substrate. Residue S<sup>101</sup>, which corresponds to the nucleophile of the catalytic triad of  $\alpha/\beta$ -hydrolases, presumably participates in binding of the heteroaromatic substrate. H<sup>102</sup> and residues located in the topological region of the triads acidic residue appear to influence O<sub>2</sub> binding and reactivity. A tyrosine residue might be involved in the turnover of the ternary complex.

Absence of viscosity effects and kinetic solvents isotope effects suggests that turnover of the ternary complex, rather than substrate binding, product release, or proton movements, involves the rate-determining step in the reaction catalyzed by Hod.

Making a comparison of the reactions catalyzed by different cofactor-less oxygenases or oxydases revealed an interesting feature. Cofactor-less dioxygen activation seems to rely on the physical and chemical properties of the substrates and not on enzyme structure.

## 7 Literatur

- ABELL L. M., SCHLOSS J. V. (1991)  
Oxygenase side reactions of acetolactate synthase and other carbanion-forming enzymes.  
*Biochemistry* **30**: 7883-7887.
- ALFIERI A., FERSINI F., RUANGCHAN N., PRONGJIT M., CHAIYEN P., MATTEVI A. (2007)  
Structure of the monooxygenase component of a two-component flavoprotein monooxygenase.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 1177-1182.
- ALLEN R. C. (1994)  
Role of oxygen in phagocyte microbicidal action.  
*Environ Health Perspect* **102**: 201-208.
- ALTSCHUL S. F., MADDEN T. L., SCHAFFER A. A., ZHANG J. H., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D. J. (1997)  
Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs.  
*Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- ARGIRIADI M. A., MORISSEAU C., GOODROW M. H., DOWDY D. L., HAMMOCK B. D., CHRISTIANSON D. W. (2000)  
Binding of alkylurea inhibitors to epoxide hydrolase implicates active site tyrosines in substrate activation.  
*J Biol Chem* **275**: 15265-15270.
- ARGIRIADI M. A., MORISSEAU C., HAMMOCK B. D., CHRISTIANSON D. W. (1999)  
Detoxification of environmental mutagens and carcinogens: Structure, mechanism, and evolution of liver epoxide hydrolase.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 10637-10642.
- ARNOLD K., BORDOLI L., KOPP J., SCHWEDE T. (2006)  
The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling.  
*Bioinformatics* **22**: 195-201.
- ATTWOOD T. K., BRADLEY P., FLOWER D. R., GAULTON A., MAUDLING N., MITCHELL A. L., MOULTON G., NORDLE A., PAINE K., TAYLOR P., UDDIN A., ZYGOURI C. (2003)  
PRINTS and its automatic supplement, prePRINTS.  
*Nucleic Acids Res* **31**: 400-402.
- BALLOU D. P., ENTSCH B., COLE L. J. (2005)  
Dynamics involved in catalysis by single-component and two-component flavin-dependent aromatic hydroxylases.  
*Biochem Biophys Res Commun* **338**: 590-598.
- BARTH S., FISCHER M., SCHMID R. D., PLEISS J. (2004)  
Sequence and structure of epoxide hydrolases: A systematic analysis.  
*Proteins* **55**: 846-855.
- BAUER I. (1995)  
Reinigung und Charakterisierung der 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase aus *Arthrobacter* spec. R61a: Vergleichende Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von 2,4-Dioxygenasen.  
*Institut für Mikrobiologie, Dissertation, Universität Hohenheim, Verlag E. Grauer, Stuttgart.*
- BAUER I., DE BEYER A., TSHISUAKA B., FETZNER S., LINGENS F. (1994)  
A novel type of oxygenolytic ring-cleavage: 2,4-Oxygenation and decarbonylation of 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline and 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline.  
*FEMS Microbiol Lett* **117**: 299-304.

- BAUER I., MAX N., FETZNER S., LINGENS F. (1996)  
2,4-Dioxygenases catalyzing *N*-heterocyclic-ring cleavage and formation of carbon monoxide - Purification and some properties of 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase from *Arthrobacter* sp. R61a and comparison with 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase from *Pseudomonas putida* 33/1.  
*Eur J Biochem* **240**: 576-583.
- BEERMANN B., GUDDORF J., BOEHM K., ALBERS A., KOLKENBROCK S., FETZNER S., HINZ H. J. (2007)  
Stability, unfolding, and structural changes of cofactor-free 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase.  
*Biochemistry* **46**: 4241-4249.
- BELLE V., FOURNEL A., WOUDESTRA M., RANALDI S., PRIERI F., THOME V., CURRAULT J., VERGER R., GUIGLIARELLI B., CARRIERE F. (2007)  
Probing the opening of the pancreatic lipase lid using site-directed spin labeling and EPR-spectroscopy.  
*Biochemistry* **46**: 2205-2214.
- BETZ A., FACEY S. J., HAUER B., TSHISUAKA B., LINGENS F. (2000)  
Molecular cloning, sequencing, expression, and site-directed mutagenesis of the 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase gene from *Arthrobacter* spec. R61a.  
*J Basic Microbiol* **40**: 7-23.
- BOHAC M., NAGATA Y., PROKOP Z., PROKOP M., MONINCOVA M., TSUDA M., KOCA J., DAMBORSKY J. (2002)  
Halide-stabilizing residues of haloalkane dehalogenases studied by quantum mechanic calculations and site-directed mutagenesis.  
*Biochemistry* **41**: 14272-14280.
- BRADFORD M. M. (1976)  
Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding.  
*Anal Biochem* **72**: 248-254.
- BRODERICK J. B. (1999)  
Catechol dioxygenases.  
*Essays Biochem* **34**: 173-189.
- BUCKEL W., GOLDING B. T. (2006)  
Radical enzymes in anaerobes.  
*Annu Rev Microbiol* **60**: 27-49.
- BUDAVARI S. (1989)  
*The Merck Index*.  
11<sup>th</sup> ed, Merck & Co Inc., New York.
- BUGG T. D. H. (2003)  
Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models.  
*Tetrahedron* **59**: 7075-7101.
- BUGG T. D. H. (2004)  
Diverse catalytic activities in the  $\alpha/\beta$ -hydrolase family of enzymes: activation of H<sub>2</sub>O, HCN, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and O<sub>2</sub>.  
*Bioorg Chem* **32**: 367-375.
- BUGG T. D. H., LIN G. (2001)  
Solving the riddle of the intradiol and extradiol catechol dioxygenases: How do enzymes control hydroperoxide rearrangements?  
*Chem Commun*: 941-952.

- BUJARD H., GENTZ R., LANZER M., STÜBER D., MÜLLER M., IBRAHIMI I., HÄUPTLE M. T., DOBBERSTEIN B. (1987)  
A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of protein in vivo and in vitro.  
*Methods Enzymol* **155**: 416-433.
- CHENNA R., SUGAWARA H., KOIKE T., LOPEZ R., GIBSON T. J., HIGGINS D. G., THOMPSON J. D. (2003)  
Multiple sequence alignment with the CLUSTAL series of programs.  
*Nucleic Acids Res* **31**: 3497-3500.
- CHOVANCOVA E., KOSINSKI J., BUJNICKI J. M., DAMBORSKY J. (2007)  
Phylogenetic analysis of haloalkane dehalogenases.  
*Proteins* **67**: 305-316.
- COLLOCHH N., ELHAJJI M., BACHET B., L'HERMITE G., SCHILTZ M., PRANGE T., CASTRO B., MORNON J. P. (1997)  
Crystal Structure of the protein drug urate oxidase-inhibitor complex at 2.05 angstrom resolution.  
*Nature Structural Biology* **4**: 947-952.
- CORNFORTH J. W., JAMES A. T. (1956)  
Structure of a naturally occurring antagonist of dihydrostreptomycin.  
*Biochem J* **63**: 124-130.
- CORNISH-BOWDEN A. (1995)  
*Analysis of enzyme kinetic data*. Oxford University Press, New York.
- CORNISH-BOWDEN A. (1999)  
*Fundamentals of enzyme kinetics*. Portland Press Ltd., London, UK.
- COULOMBE R., YUE K. Q., GHISLA S., VRIELINK A. (2001)  
Oxygen access to the active site of cholesterol oxidase through a narrow channel is gated by an arg-glu pair.  
*J Biol Chem* **276**: 30435-30441.
- COULSON A. F. W., MOULT J. (2002)  
A unfold, mesofold, and superfold model of protein fold use.  
*Protein Struct Funct Genet* **46**: 61-71.
- COVINGTON A. K., PAABO M., ROBINSON R. A., BATES R. G. (1968)  
Use of the glass electrode in deuterium oxide and the relation between the standardized pD scale and the operational pH in heavy water.  
*Anal Chem* **40**: 700-706.
- CZAUN M., SPEIER G. (2002)  
The base-catalyzed oxygenation of quinoline derivatives.  
*Tetrahedron Lett* **43**: 5961-5963.
- DAMBORSKY J., KOCA J. (1999)  
Analysis of the reaction mechanism and substrate specificity of haloalkane dehalogenases by sequential and structural comparisons.  
*Protein Eng Des Sel* **12**: 989-998.
- DIXON M., WEBB E. C. (1979)  
*Enzymes*.  
3<sup>th</sup> ed, The Chaucer Press, Suffolk, UK.
- DJORDJEVIC V. B. (2004)  
Free radicals in cell biology.  
in *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol. 237, pp 57-89.

- DOLL C., BELL A. F., POWER N., TONGE P. J., TIPTON P. A. (2005)  
Procatalytic ligand strain. Ionization and perturbation of 8-nitroxanthine at the urate oxidase active site.  
*Biochemistry* **44**: 11440-11446.
- DOWER W. J., MILLER J. F., RAGSDALE C. W. (1988)  
High-efficiency transformation of *Escherichia coli* by high-voltage electroporation.  
*Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.
- EIDEN F., WENDT R., FENNER H. (1978)  
Pyrones and Pyridones. 74. Quinolylidene Derivatives.  
*Arch Pharm (Weinheim)* **311**: 561-568.
- EVANS D. J., EASTWOOD F. W. (1974)  
Synthesis of an arylhydroxytetronimide and of 3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone derivatives.  
*Aust J Chem* **27**: 537-542.
- FARABAUGH P. J. (1978)  
Sequence of *lac I* gene.  
*Nature* **274**: 765-769.
- FETZNER S. (2000)  
Enzymes involved in the aerobic bacterial degradation of *N*-heteroaromatic compounds: Molybdenum hydroxylases and ring-opening 2,4-dioxygenases.  
*Naturwissenschaften* **87**: 59-69.
- FETZNER S. (2002)  
Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions.  
*Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 243-257.
- FISCHER F. (2000)  
Molekulargenetische und biochemische Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus cofaktorfreier 2,4-Dioxygenasen.  
*Fachbereich Biologie*, Dissertation, Universität Oldenburg.
- FISCHER F., FETZNER S. (2000)  
Site-directed mutagenesis of potential catalytic residues in 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase, and hypothesis on the catalytic mechanism of 2,4-dioxygenolytic ring cleavage.  
*FEMS Microbiol Lett* **190**: 21-27.
- FISCHER F., KUNNE S., FETZNER S. (1999)  
Bacterial 2,4-dioxygenases: New members of the  $\alpha/\beta$  hydrolase-fold superfamily of enzymes functionally related to serine hydrolases.  
*J Bacteriol* **181**: 5725-5733.
- FISHER A. J., RAUSHEL F. M., BALDWIN T. O., RAYMENT I. (1995)  
3-Dimensional structure of bacterial luciferase from *Vibrio harveyi* at 2.4 angstrom resolution.  
*Biochemistry* **34**: 6581-6586.
- FISHER A. J., THOMPSON T. B., THODEN J. B., BALDWIN T. O., RAYMENT I. (1996)  
The 1.5-angstrom resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions.  
*J Biol Chem* **271**: 21956-21968.
- FITZPATRICK P. F. (1999)  
Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases.  
*Annu Rev Biochem* **68**: 355-381.

FRERICHS-DEEKEN U., FETZNER S. (2005)

Dioxygenases without requirement for cofactors: Identification of amino acid residues involved in substrate binding and catalysis, and testing for rate-limiting steps in the reaction of 1H-3-hydroxy-4-oxoquinaldine 2,4-dioxygenase.

*Curr Microbiol* **51**: 344-352.

FRERICHS-DEEKEN U., RANGUELOVA K., KAPPL R., HUTTERMANN J., FETZNER S. (2004)

Dioxygenases without requirement for cofactors and their chemical model reaction: Compulsory order ternary complex mechanism of 1H-3-hydroxy-4-oxoquinaldine 2,4-dioxygenase involving general base catalysis by histidine 251 and single-electron oxidation of the substrate dianion.

*Biochemistry* **43**: 14485-14499.

FREY P. A., HEGEMAN A. D., REED G. H. (2006)

Free radical mechanisms in enzymology.

*Chem Rev* **106**: 3302-3316.

FRIDOVICH I. (1998)

Oxygen toxicity: A radical explanation.

*J Exp Biol* **201**: 1203-1209.

GLASOE P. K., LONG F. A. (1960)

Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide.

*J Phys Chem B* **64**: 188-190.

GOMEZ G. A., MORISSEAU C., HAMMOCK B. D., CHRISTIANSON D. W. (2004)

Structure of human epoxide hydrolase reveals mechanistic inferences on bifunctional catalysis in epoxide and phosphate ester hydrolysis.

*Biochemistry* **43**: 4716-4723.

GOTO T. (1968)

Chemistry of bioluminescence.

*Pure Appl Chem* **17**: 421-441.

GOYAL R. N., MITTAL A., AGARWAL D. (1994)

Electrochemical oxidation and kinetics of the decay of UV-absorbing intermediate of uric-acid oxidation at pyrolytic-graphite electrodes.

*Can J Chem* **72**: 1668-1674.

GUEX N., DIEMAND A., PEITSCH M. C. (1999)

Protein modelling for all.

*Trends Biochem Sci* **24**: 364-367.

GUEX N., PEITSCH M. C. (1997)

SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling.

*Electrophoresis* **18**: 2714-2723.

GUTTERIDGE A., THORNTON J. M. (2005)

Understanding nature's catalytic toolkit.

*Trends Biochem Sci* **30**: 622-629.

HAMES B. D. (1990)

One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.

in *Gel Electrophoresis of Proteins* Hames B. D., Roickwood D. (Eds.), 2<sup>th</sup> ed, Oxford University Press, London.

HAMILTON G. A. (1974)

Chemical models and mechanisms for oxygenases.

in *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*, Hayaishi O. (Ed.), Academic Press, New York, pp 405-451.

- HANES C. S. (1932)  
Studies on plant amylases: 1. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley.  
*Biochem J* **26**: 1406-1421.
- HARRIS R. L. N. (1976)  
Potential wool growth-inhibitors - Improved syntheses of mimosine and related 4(1*H*)-pyridones.  
*Aust J Chem* **29**: 1329-1334.
- HEIKINHEIMO P., GOLDMAN A., JEFFRIES C., OLLIS D. L. (1999)  
Of barn owls and bankers: A lush variety of  $\alpha/\beta$  hydrolases.  
*Struct Fold Design* **7**: R141-R146.
- HENIKOFF J. G., GREENE E. A., PIETROKOVSKI S., HENIKOFF S. (2000)  
Increased coverage of protein families with the blocks database servers.  
*Nucleic Acids Res* **28**: 228-230.
- HENIKOFF S., HENIKOFF J. G. (1994)  
Protein family classification based on searching a database of blocks.  
*Genomics* **19**: 97-107.
- HILAL S. H., CARREIRA L. A., KARICKHOFF S. W. (1994)  
SPARC - A computer-program for estimation of physicochemical properties.  
*Abstr Paper Am Chem Soc* **208**: 189-COMP.
- HILAL S. H., KARICKHOFF S. W., CARREIRA L. A. (1995)  
A rigorous test for SPARC's chemical reactivity models: Estimation of more than 4300 ionization pK(a)s.  
*Quant Struct-Act Relat* **14**: 348-355.
- HITCHMAN M. L. (1978)  
*Measurement of dissolved oxygen*. Vol. 49, John Wiley & Sons, New York.
- HO R. Y. N., LIEBMANN J. F., VALENTINE J. S. (1995)  
Biological reactions of dioxygen: An introduction in active oxygen in biochemistry. Vol. 3, Chapman & Hall, London, pp 1-36.
- HOLDEN M. J., MAYHEW M. P., GALLAGHER D. T., VILKER V. L. (2002)  
Chorismate lyase: Kinetics and engineering for stability.  
*Biochim Biophys Acta - Prot Struct Mol Enzymol* **1594**: 160-167.
- HOLMQUIST M. (2000)  
 $\alpha/\beta$ -Hydrolase fold enzymes: Structures, functions and mechanisms.  
*Curr Prot Pept Sci* **1**: 209-235.
- HOPMANN K. H., HIMO F. (2006a)  
Insights into the reaction mechanism of soluble epoxide hydrolase from theoretical active site mutants.  
*J Phys Chem B* **110**: 21299-21310.
- HOPMANN K. H., HIMO F. (2006b)  
Theoretical study of the full reaction mechanism of human soluble epoxide hydrolase.  
*Chemistry* **12**: 6898-6909.
- HORSMAN G. P., BHOWMIK S., SEAH S. Y. K., KUMAR P., BOLIN J. T., ELTIS L. D. (2007)  
The tautomeric half-reaction of BphD, a C-C bond hydrolase - Kinetic and structural evidence supporting a key role for histidine 265 of the catalytic triad.  
*J Biol Chem* **282**: 19894-19904.

- HOTELIER T., RENAULT L., COUSIN X., NEGRE V., MARCHOT P., CHATONNET A. (2004)  
ESTHER, the database of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold superfamily of proteins.  
*Nucleic Acids Res* **32**: D145-D147.
- HRADIL P., HLAVAC J., LEMR K. (1999)  
Preparation of 1,2-disubstituted-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolinones and the influence of substitution on the course of cyclization.  
*J Hetero Chem* **36**: 141-144.
- HUBBARD B. K., WALSH C. T. (2003)  
Vancomycin assembly: Nature's way.  
*Angew Chem Int Ed Engl* **42**: 730-765.
- HUND H. K., DEBEYER A., LINGENS F. (1990)  
Microbial-metabolism of quinoline and related-compounds: 6. Degradation of quinaldine by *Arthrobacter* sp.  
*Biol Chem Hoppe-Seyler* **371**: 1005-1008.
- IMHOFF R. D., POWER N. P., BORROK M. J., TIPTON P. A. (2003)  
General base catalysis in the urate oxidase reaction: Evidence for a novel thr-lys catalytic diad.  
*Biochemistry* **42**: 4094-4100.
- IWASAKI K., UCHIYAMA H., YAGI O., KURABAYASHI T., ISHIZUKA K., TAKAMURA Y. (1994)  
Transformation of *Pseudomonas putida* by electroporation.  
*Biosci Biotechnol Biochem* **58**: 851-854.
- JANSSEN D. B. (2004)  
Evolving haloalkane dehalogenases.  
*Curr Opin Chem Biol* **8**: 150-159.
- JERPSETH B., GREENER A., SHORT J. M., VIOLA J., KRETZ P. L. (1992)  
XL1-Blue MFT' *E. coli* cells: D (*mcrA*) 183, D (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173, *end A1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, [F' *proAB*, *lacIqD M15*, Tn10 (*tetr*).  
*Strategies Newsletter* **5**: 81-83.
- JOHNSON B. J., COHEN J., WELFORD R. W., PEARSON A. R., SCHULTEN K., KLINMAN J. P., WILMOT C. M. (2007)  
Exploring molecular oxygen pathways in *Hansenula polymorpha* copper-containing amine oxidase.  
*J Biol Chem* **282**: 17767-17776.
- JOHNSON R. J., METZLER D. E. (1970)  
Analyzing the spectra of vitamin B6 derivatives.  
*Methods Enzymol* **18A**: 433-471.
- KAHN K., TIPTON P. A. (1997)  
Kinetic mechanism and cofactor content of soybean root nodule urate oxidase.  
*Biochemistry* **36**: 4731-4738.
- KAHN K., TIPTON P. A. (1998)  
Spectroscopic characterization of intermediates in the urate oxidase reaction.  
*Biochemistry* **37**: 11651-11659.
- KANOFISKY J. R. (1989)  
Singlet oxygen production by biological systems.  
*Chem Biol Interact* **70**: 1-28.
- KARTHIKEYAN S., ZHOU Q. X., OSTERMAN A. L., ZHANG H. (2003)  
Ligand binding-induced conformational changes in riboflavin kinase: Structural basis for the ordered mechanism.  
*Biochemistry* **42**: 12532-12538.

- KEMAL C., CHAN T. W., BRUCE T. C. (1977)  
Reaction of  $^3\text{O}_2$  with dihydroflavins: 1. "N3,5-Dimethyl-1,5-dihydrolumiflavin and 1,5-dihydroisalloxazines.  
*J Am Chem Soc* **99**: 7272-7286.
- KENNES C., PRIES F., KROOSHOF G. H., BOKMA E., KINGMA J., JANSSEN D. B. (1995)  
Replacement of tryptophan residues in haloalkane dehalogenase reduces halide binding and catalytic activity.  
*Eur J Biochem* **228**: 403-407.
- KHAN A. U., GEBAUER P., HAGER L. P. (1983)  
Chloroperoxidase generation of singlet-delta molecular-oxygen observed directly by spectroscopy in the 1-Mu-M to 1.6-Mu-M Region.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 5195-5197.
- KLEBANOFF S. J. (2005)  
Myeloperoxidase: Friend and foe.  
*J Leukoc Biol* **77**: 598-625.
- KLEBER H.-P., SCHLEE D., SCHÖPP W. (1997)  
*Biochemisches Praktikum - Methoden für Studium, Praxis, Forschung*.  
5<sup>th</sup> ed, Verlag G. Fischer, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm.
- KLINMAN J. P. (2007)  
How do enzymes activate oxygen without inactivating themselves?  
*Acc Chem Res* **40**: 325-333.
- KLINMAN J. P., MU D. (1994)  
Quinoenzymes in biology.  
*Annu Rev Biochem* **63**: 299-344.
- KNAPP M. J., KLINMAN J. P. (2003)  
Kinetic studies of oxygen reactivity in soybean lipoxygenase-1.  
*Biochemistry* **42**: 11466-11475.
- KRIEGER-LISZKAY A. (2005)  
Singlet oxygen production in photosynthesis.  
*J Exp Bot* **56**: 337-346.
- KROOSHOF G. H., FLORIS R., TEPPER A., JANSSEN D. B. (1999)  
Thermodynamic analysis of halide binding to haloalkane dehalogenase suggests the occurrence of large conformational changes.  
*Protein Sci* **8**: 355-360.
- LARIO P. I., SAMPSON N., VRIELINK A. (2003)  
Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: What atomic resolution crystallography reveals about enzyme mechanism and the role of the FAD cofactor in redox activity.  
*J Mol Biol* **326**: 1635-1650.
- LEE D. S., FLACHSOVA E., BODNAROVA M., DEMELER B., MARTASEK P., RAMAN C. S. (2005)  
Structural basis of hereditary coproporphyrinuria.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 14232-14237.
- LI J. J., BUGG T. D. (2007)  
Investigation of a general base mechanism for ester hydrolysis in C-C hydrolase enzymes of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase superfamily: A novel mechanism for the serine catalytic triad.  
*Org Biomol Chem* **5**: 507-513.

- LINEWEAVER H., BURK D. (1934)  
The determination of enzyme dissociation constants.  
*J Am Chem Soc* **56**: 658—666.
- LORENZ W. W., MCCANN R. O., LONGIARU M., CORMIER M. J. (1991)  
Isolation and expression of a cDNA-encoding *Renilla-reniformis* luciferase.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4438-4442.
- LOW J. C., TU S. C. (2002)  
Functional roles of conserved residues in the unstructured loop of *Vibrio harveyi* bacterial luciferase.  
*Biochemistry* **41**: 1724-1731.
- MAGNUSSON O. T., ROSEFIGURA J. M., TOYAMA H., SCHWARZENBACHER R., KLINMAN J. P. (2007)  
Pyrroloquinoline quinone biogenesis: Characterization of PqqC and its H84N and H84A active site variants.  
*Biochemistry*.
- MAGNUSSON O. T., TOYAMA H., SAEKI M., ROJAS A., REED J. C., LIDDINGTON R. C., KLINMAN J. P., SCHWARZENBACHER R. (2004)  
Quinone biogenesis: Structure and mechanism of PqqC, the final catalyst in the production of pyrroloquinoline quinone.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 7913-7918.
- MAPLES K. R., MASON R. P. (1988)  
Free-radical metabolite of uric acid.  
*J Biol Chem* **263**: 1709-1712.
- MAREK J., VEVODOVA J., SMATANOVA I. K., NAGATA Y., SVENSSON L. A., NEWMAN J., TAKAGI M., DAMBORSKY J. (2000)  
Crystal structure of the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26.  
*Biochemistry* **39**: 14082-14086.
- MASSEY V. (1994)  
Activation of molecular-oxygen by flavins and flavoproteins.  
*J Biol Chem* **269**: 22459-22462.
- MASSEY V. (2000)  
The chemical and biological versatility of riboflavin.  
*Biochem Soc Trans* **28**: 283-296.
- MATTHEWS J. C., HORI K., CORMIER M. J. (1977)  
Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase.  
*Biochemistry* **16**: 85-91.
- MCCONNELL H. M. (1956)  
Indirect hyperfine interactions in the paramagnetic resonance spectra of aromatic free radicals.  
*J Chem Phys* **24**: 764-766.
- MCCONNELL H. M., CHESNUT D. B. (1958)  
Theory of isotropic hyperfine interactions in  $\pi$ -electron radicals.  
*J Chem Phys* **28**: 107-117.
- MERTZ E. L., KRISHTALIK L. I. (2000)  
Low dielectric response in enzyme active site.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 2081-2086.
- MÜLLER K. (1996)  
Antipsoriatic anthrones: Aspects of oxygen radical formation, challenges and prospects.  
*Gen Pharmacol* **27**: 1325-1335.

- NAQUI A., CHANCE B., CADENAS E. (1986)  
Reactive oxygen intermediates in biochemistry.  
*Annu Rev Biochem* **55**: 137-166.
- NARDINI M., DIJKSTRA B. W. (1999)  
 $\alpha/\beta$  Hydrolase fold enzymes: The family keeps growing.  
*Curr Opin Struct Biol* **9**: 732-737.
- NARDINI M., RIDDER I. S., ROZEBOOM H. J., KALK K. H., RINK R., JANSSEN D. B., DIJKSTRA B. W. (1999)  
The X-ray structure of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 - An enzyme to detoxify harmful epoxides.  
*J Biol Chem* **274**: 14579-14586.
- NELSON M. J., COWLING R. A., SEITZ S. P. (1994)  
Structural characterization of alkyl and peroxy radicals in solutions of purple lipoxygenase.  
*Biochemistry* **33**: 4966-4973.
- NELSON W. O., KARPISHIN T. B., RETTIG S. J., ORVIG C. (1988)  
Physical and structural studies of *N*-substituted-3-hydroxy-2-methyl-4(1*H*)-pyridinones.  
*Can J Chem* **66**: 123-131.
- NEWMAN J., PEAT T. S., RICHARD R., KAN L., SWANSON P. E., AFFHOLTER J. A., HOLMES I. H., SCHINDLER J. F., UNKEFER C. J., TERWILLIGER T. C. (1999)  
Haloalkane dehalogenases: Structure of a *Rhodococcus* enzyme.  
*Biochemistry* **38**: 16105-16114.
- O'BRIEN P. J., HERSCHLAG D. (1999)  
Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities.  
*Chem Biol* **6**: R91-R105.
- OAKLEY A. J., KLVANA M., OTYEPKA M., NAGATA Y., WILCE M. C. J., DAMBORSKY J. (2004)  
Crystal structure of haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 at 0.95 angstrom resolution: Dynamics of catalytic residues.  
*Biochemistry* **43**: 870-878.
- OKELEY N. M., VAN DER DONK W. A. (2000)  
Novel cofactors via post-translational modifications of enzyme active sites.  
*Chem Biol* **7**: R159-R171.
- OLLIS D. L., CHEAH E., CYGLER M., DIJKSTRA B., FROLOW F., FRANKEN S. M., HAREL M., REMINGTON S. J., SILMAN I., SCHRAG J., SUSSMAN J. L., VERSCHUEREN K. H. G., GOLDMAN A. (1992)  
The  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold.  
*Protein Eng* **5**: 197-211.
- ORENGO C. A., JONES D. T., THORNTON J. M. (1994)  
Protein superfamilies and domain superfolds.  
*Nature* **372**: 631-634.
- OTYEPKA M., DAMBORSKY J. (2002)  
Functionally relevant motions of haloalkane dehalogenases occur in the specificity-modulating cap domains.  
*Protein Sci* **11**: 1206-1217.
- OVERHAGE J., SIELKER S., HOMBURG S., PARSCHAT K., FETZNER S. (2005)  
Identification of large linear plasmids in *Arthrobacter* sp. encoding the degradation of quinaldine to anthranilate.  
*Microbiol* **151**: 491-500.

- PALFEY B. A., BALLOU D. P., MASSEY V. (1995)  
Oxygen activation by flavins and pterins.  
in *Active Oxygen in Biochemistry*, Valentine J. S., Foote C. S., Greenberg A., Liebman J. F. (Eds.), Blackie Academic and Professional (Chapman and Hall), London, pp 37-83.
- PAU M. Y. M., DAVIS M. I., ORVILLE A. M., LIPSCOMB J. D., SOLOMON E. I. (2007)  
Spectroscopic and electronic structure study of the enzyme-substrate complex of intradiol dioxygenases: Substrate activation by a high-spin ferric non-heme iron site.  
*J Am Chem Soc* **129**: 1944-1958.
- PETLICKI J., VAN DE VEN T. G. M. (1998)  
The equilibrium between the oxidation of hydrogen peroxide by oxygen and the dismutation of peroxy or superoxide radicals in aqueous solutions in contact with oxygen.  
*J Chem Soc Faraday Trans* **94**: 2763-2767.
- PHILLIPS J. D., WHITBY F. G., WARBY C. A., LABBE P., YANG C., PFLUGRATH J. W., FERRARA J. D., ROBINSON H., KUSHNER J. P., HILL C. P. (2004)  
Crystal structure of the oxygen-dependant coproporphyrinogen oxidase (Hem13p) of *Saccharomyces cerevisiae*.  
*J Biol Chem* **279**: 38960-38968.
- PRABHAKAR R., SIEGBAHN P. E. M., MINAEV B. F. (2003)  
A theoretical study of the dioxygen activation by glucose oxidase and copper amine oxidase.  
*Biochim Biophys Acta - Prot Proteom* **1647**: 173-178.
- PRABHAKAR R., SIEGBAHN P. E. M., MINAEV B. F., AGREN H. (2002)  
Activation of triplet dioxygen by glucose oxidase: Spin-orbit coupling in the superoxide ion.  
*J Phys Chem B* **106**: 3742-3750.
- PRIES F., KINGMA J., PENTENGA M., VANPOUDEROYEN G., JERONIMUSSTRATINGH C. M., BRUINS A. P., JANSSEN D. B. (1994)  
Site-directed mutagenesis and oxygen-isotope incorporation studies of the nucleophilic aspartate of haloalkane dehalogenase.  
*Biochemistry* **33**: 1242-1247.
- QI R., FETZNER S., OAKLEY A. J. (2007)  
Crystallization and diffraction data of 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase: A cofactor-free oxygenase of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase family.  
*Acta Crystallogr Sec F Struct Biol Cryst Commun* **63**: 378-381.
- QIAGEN (2001)  
The QIAexpressionist™: A handbook for high-level expression and purification. 5<sup>th</sup> ed, Qiagen GmbH, Hilden, Germany.
- RAJBHANDARY U. L. (2000)  
More surprises in translation: Initiation without the initiator tRNA.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 1325-1327.
- RENAULT L., NEGRE V., HOTELIER T., COUSIN X., MARCHOT P., CHATONNET A. (2005)  
New friendly tools for users of ESTHER, the database of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold superfamily of proteins.  
*Chem Biol Interact* **157-158**: 339-343.
- RINK R., FENNEMA M., SMIDS M., DEHMEL U., JANSSEN D. B. (1997)  
Primary structure and catalytic mechanism of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1.  
*J Biol Chem* **272**: 14650-14657.

- RINK R., KINGMA J., SPELBERG J. H. L., JANSSEN D. B. (2000)  
Tyrosine residues serve as proton donor in the catalytic mechanism of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*.  
*Biochemistry* **39**: 5600-5613.
- RINK R., SPELBERG J. H. L., PIETERS R. J., KINGMA J., NARDINI M., KELLOGG R. M., DIJKSTRA B. W., JANSSEN D. B. (1999)  
Mutation of tyrosine residues involved in the alkylation half reaction of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 results in improved enantioselectivity.  
*J Am Chem Soc* **121**: 7417-7418.
- RIVERA M., ZENG Y. H. (2005)  
Heme oxygenase, steering dioxygen activation toward heme hydroxylation.  
*J Inorg Biochem* **99**: 337-354.
- ROESER D., PREUSSER-KUNZE A., SCHMIDT B., GASOW K., WITTMANN J. G., DIERKS T., VON FIGURA K., RUDOLPH M. G. (2006)  
A general binding mechanism for all human sulfatases by the formylglycine-generating enzyme.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 81-86.
- ROESER D., SCHMIDT B., PREUSSER-KUNZE A., RUDOLPH M. G. (2007)  
Probing the oxygen-binding site of the human formylglycine-generating enzyme using halide ions.  
*Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**: 621-627.
- ROST B., YACHDAV G., LIU J. F. (2004)  
The PredictProtein Server.  
*Nucleic Acids Res* **32**: W321-W326.
- ROTH J. P., KLINMAN J. P. (2003)  
Catalysis of electron transfer during activation of O<sub>2</sub> by the flavoprotein glucose oxidase.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 62-67.
- RUDOLPH F. B. (1979)  
Product inhibition and abortive complex formation.  
*Methods Enzymol* **63**: 411-436.
- SAMBROOK J. T., FRITSCH E. F., MANIATIS T. (1989)  
*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SATO N., URAGAMI Y., NISHIZAKI T., TAKAHASHI Y., SAZAKI G., SUGIMOTO K., NONAKA T., MASAI E., FUKUDA M., SENDA T. (2002)  
Crystal structures of the reaction intermediate and its homologue of an extradiol-cleaving catecholic dioxygenase.  
*J Mol Biol* **321**: 621-636.
- SAWYER D. T. (1991)  
*Oxygen Chemistry*. Oxford University Press, New York.
- SAWYER D. T., VALENTINE J. S. (1981)  
How super is superoxide.  
*Acc Chem Res* **14**: 393-400.
- SCHAAB M. R., BARNEY B. M., FRANCISCO W. A. (2006)  
Kinetic and spectroscopic studies on the quercetin 2,3-dioxygenase from *Bacillus subtilis*.  
*Biochemistry* **45**: 1009-1016.

- SCHAFFER A. A., ARAVIND L., MADDEN T. L., SHAVIRIN S., SPOUGE J. L., WOLF Y. I., KOONIN E. V., ALTSCHUL S. F. (2001)  
Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements.  
*Nucleic Acids Res* **29**: 2994-3005.
- SCHANSTRA J. P., JANSSEN D. B. (1996)  
Kinetics of halide release of haloalkane dehalogenase: Evidence for a slow conformational change.  
*Biochemistry* **35**: 5624-5632.
- SCHRAG J. D., LI Y. G., CYGLER M., LANG D. M., BURGDORF T., HECHT H. J., SCHMID R., SCHOMBURG D., RYDEL T. J., OLIVER J. D., STRICKLAND L. C., DUNAWAY C. M., LARSON S. B., DAY J., MCPHERSON A. (1997)  
The open conformation of a *Pseudomonas* lipase.  
*Structure* **5**: 187-202.
- SCHWEDE T., KOPP J., GUEX N., PEITSCH M. C. (2003)  
SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server.  
*Nucleic Acids Res* **31**: 3381-3385.
- SCIARA G., KENDREW S. G., MIELE A. E., MARSH N. G., FEDERICI L., MALATESTA F., SCHIMPERNA G., SAVINO C., VALLONE B. (2003)  
The structure of ActVA-Orf6, a novel type of monooxygenase involved in actinorhodin biosynthesis.  
*EMBO J* **22**: 205-215.
- SHEN B., HUTCHINSON C. R. (1993)  
Tetracenomycin F1-monooxygenase - Oxidation of a naphthacenone to a naphthacenequinone in the biosynthesis of tetracenomycin-C in *Streptomyces glaucescens*.  
*Biochemistry* **32**: 6656-6663.
- SHOWEN K. B., SHOWEN R. L. (1982)  
Solvent isotope effects on enzyme systems.  
*Methods Enzymol* **87**: 551-606.
- SIMONOVIC M., GETTINS P. G. W., VOLZ K. (2000)  
Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a recombinant cysteine-free mutant of crmA.  
*Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**: 1440-1442.
- STEINER R. A., FRERICHS-DEEKEN U., FETZNER S. (2007)  
Crystallization and preliminary X-ray analysis of 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase from *Arthrobacter nitroguajacolicus* Ru61a: A cofactor-devoid dioxygenase of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase-fold superfamily.  
*Acta Crystallogr Sec F Struct Biol Cryst Commun* **63**: 382-385.
- STEPHENSON J. R., STACEY J. A., MORGENTHALER J. B., FRIESEN J. A., LASH T. D., JONES M. A. (2007)  
Role of aspartate 400, arginine 262, and arginine 401 in the catalytic mechanism of human coproporphyrinogen oxidase.  
*Protein Sci* **16**: 401-410.
- STOVER C., MAYHEW M. P., HOLDEN M. J., HOWARD A., GALLAGHER D. T. (2000)  
Crystallization and 1.1-angstrom diffraction of chorismate lyase from *Escherichia coli*.  
*J Struct Biol* **129**: 96-99.
- STRELTSOV V. A., PROKOP Z., DAMBORSKY J., NAGATA Y., OAKLEY A., WILCE M. C. J. (2003)  
Haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26: X-ray crystallographic studies of dehalogenation of brominated substrates.  
*Biochemistry* **42**: 10104-10112.

- STRYER L. (1996)  
*Biochemie*.  
4<sup>th</sup> ed, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- STUBBE J., VAN DER DONK W. A. (1998)  
Protein radicals in enzyme catalysis.  
*Chem Rev* **98**: 705-762.
- SZCZEPANKIEWICZ W., SUWINSKI J. (2000)  
One-pot synthesis of 3-(2-cyanophenyl)-quinazolin-4(3H)-one.  
*Chem Heterocycl Compd* **36**: 809-810.
- TAGA M. E., LARSEN N. A., HOWARD-JONES A. R., WALSH C. T., WALKER G. C. (2007)  
BluB cannibalizes flavin to form the lower ligand of vitamin B-12.  
*Nature* **446**: 449-453.
- TODD A. E., ORENGO C. A., THORNTON J. M. (2001)  
Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective.  
*J Mol Biol* **307**: 1113-1143.
- TSENG C. C., VAILLANCOURT F. H., BRUNER S. D., WALSH C. T. (2004)  
DpgC is a metal- and cofactor-free 3,5-dihydroxyphenylacetyl-CoA 1,2-dioxygenase in the vancomycin biosynthetic pathway.  
*Chem Biol* **11**: 1195-1203.
- ULLRICH V. (1984)  
The role of metal ions in the chemistry and biology of oxygen.  
in *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*, Bors S. T. (Ed.), Verlag Walter de Gruyter, Berlin, pp 391-402.
- VAILLANCOURT F. H., BOLIN J. T., ELTIS L. D. (2006)  
The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases.  
*Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**: 241-267.
- VALENTINE J. S., WERTZ D. L., LYONS T. J., LIOU L. L., GOTO J. J., GRALLA E. B. (1998)  
The dark side of dioxygen biochemistry.  
*Curr Opin Chem Biol* **2**: 253-262.
- VAN BERKEL W. J. H., KAMERBEEK N. M., FRAAIJE M. W. (2006)  
Flavoprotein monooxygenases: A diverse class of oxidative biocatalysts.  
*J Biotechnol* **124**: 670-689.
- VERSCHUEREN K. H. G., FRANKEN S. M., ROZEBOOM H. J., KALK K. H., DIJKSTRA B. W. (1993a)  
Refined X-ray structures of haloalkane dehalogenase at pH 6.2 and pH 8.2 and implications for the reaction mechanism.  
*J Mol Biol* **232**: 856-872.
- VERSCHUEREN K. H. G., SELJEE F., ROZEBOOM H. J., KALK K. H., DIJKSTRA B. W. (1993b)  
Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase.  
*Nature* **363**: 693-698.
- WANG Y., SCHERPEREL G., ROBERTS K. D., JONES A. D., REID G. E., YAN H. G. (2006)  
A point mutation converts dihydroneopterin aldolase to a cofactor-independent oxygenase.  
*J Am Chem Soc* **128**: 13216-13223.
- WASSERMANN H. H., MURRAY R. W. (1978)  
*Singlet Oxygen*. Academic Press, New York.

WEAST R. C., ASTLE M. J., BEYER W. H. (1983-1984)

*CRC Handbook of Chemistry.*

64<sup>th</sup> ed, CRC Press, Boca Raton, Florida.

WIDBOOM P. F., FIELDING E. N., LIU Y., BRUNER S. D. (2007)

Structural basis for cofactor-independent dioxygenation in vancomycin biosynthesis.

*Nature* **447**: 342-345.

WILKS A. (2002)

Heme oxygenase: Evolution, structure, and mechanism.

*Antioxid Redox Signal* **4**: 603-614.

YAMADA T., MORISSEAU C., MAXWELL J. E., ARGIRIADI M. A., CHRISTIANSON D. W., HAMMOCK B. D. (2000)

Biochemical evidence for the involvement of tyrosine in epoxide activation during the catalytic cycle of epoxide hydrolase.

*J Biol Chem* **275**: 23082-23088.

ZAMENHOF P. J., VILLAREJO M. (1972)

Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting  $\alpha$ -complementation of  $\beta$ -galactosidase fragments in-vivo.

*J Bacteriol* **110**: 171-178.

ZHAO H. T., JOSEPH J., ZHANG H., KAROUI H., KALYANARAMAN B. (2001)

Synthesis and biochemical applications of a solid cyclic nitron spin trap: A relatively superior trap for detecting superoxide anions and glutathionyl radicals.

*Free Radic Biol Med* **31**: 599-606.

ZOR T., SELIGER Z. (1996)

Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies.

*Anal Biochem* **236**: 302-308.

ZUEGG J., GRUBER K., GUGGANIG M., WAGNER U. G., KRATKY C. (1999)

Three-dimensional structures of enzyme-substrate complexes of the hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*.

*Protein Sci* **8**: 1990-2000.

## Veröffentlichungen

Aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Publikationen und Posterbeiträge hervorgegangen:

### Publikationen

- Frerichs-Deeken, U., Fetzner, S. (2005) Dioxygenases without requirement for cofactors – Identification of amino acid residues involved in substrate binding and catalysis, and testing for rate-limiting steps in the reaction of 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase, *Current Microbiology*, 51: 344-352.
- Frerichs-Deeken, U., Rangelova, K., Kappl, R., Hüttermann, J., Fetzner, S. (2004) Dioxygenases without requirement for cofactors, and their chemical model reaction: Compulsory or ternary complex mechanism of 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase involving general base catalysis by H251 and single electron oxidation of the substrate dianion. *Biochemistry*, 43: 14485-14499.
- Steiner, R. A., Frerichs-Deeken, U., Fetzner, S. (2007) Crystallization and preliminary X-ray analysis of 1-*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase from *Arthrobacter nitroguajacolicus* Rū61a: a cofactor-devoid dioxygenase of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold superfamily. *Acta Crystallographica Section F* **63**: 382-385.

### Posterbeiträge

- Frerichs-Deeken, U., Kappl, R., Hüttermann, J., Fetzner, S. (2004) Oxidative bacterial degradation of *N*-heterocyclic compounds: A novel enzymatic mechanism of 2,4-dioxygenolysis without requirement for cofactors. *BIOspectrum Sonderausgabe 3/2004* PF010.
- Frerichs-Deeken, U., Kappl, R., Hüttermann, J., Fetzner, S. (2002) Aromatic ring cleavage by cofactor-less 2,4-dioxygenases: Are radicals involved in catalysis? *BIOspectrum Sonderausgabe 3/2002* PB019.
- Bratke, K., Frerichs-Deeken, U., Fetzner, S. (2001) 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase (Hod) and 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase (Qdo): Identification of functional residues. *BIOspectrum Sonderausgabe 3/2001* PSP20

## Erklärung

Diese Dissertation wurde von mir zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) angefertigt.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit ist in Teilen bereits veröffentlicht.

Außerdem bestätige ich, dass diese Dissertation weder in ihrer Gesamtheit noch in Teilen einer anderen wissenschaftlichen Hochschule zur Begutachtung in einem Promotionsverfahren vorliegt oder vorgelegen hat.

Friedrichsfehn, Oktober 2007

.....  
(Ursula Frerichs-Deeken)

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Ursula Frerichs-Deeken  
Geburtsdatum: 15.04.1966  
Geburtsort: Oldenburg  
Familienstand: verheiratet, 1 Kind  
Nationalität: deutsch

## Schul-, Berufsausbildung und Berufliche Tätigkeit

1972 – 1976 Grundschule Friedrichsfehn  
1976 – 1978 Orientierungsstufe Friedrichsfehn  
1978 – 1982 Realschule Edeweicht – Bad Zwischenahn  
1982 – 1983 Höhere Handelsschule Rostrup  
1983 – 1986 Ausbildung zur Milchwirtschaftlichen Laborantin  
1986 – 1991 Milchwirtschaftliche Laborantin, Landwirtschaftskammer Weser-Ems  
1991 – 1994 Oldenburg Kolleg, Abschluss: Abitur  
2004 – 2005 Laborleiterin, Campbell's Germany Lübeck  
seit 2006 Biologin, Laboratorium für medizinische und veterinärmedizinische Diagnostik, Leer

## Studium

1994 – 2000 Studium der Biologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Abschluss: Diplom  
1999 – 2000 Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie unter Prof. Dr. S. Fetzner mit dem Titel:  
„Molybdo-Eisen/Schwefel-Flavoproteine: Klonierung und heterologe Expression der Gene der Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas putida* 86.“

## Wissenschaftliche Arbeit

2000 – 2004 Promotionsarbeit im Fachbereich Biologie der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie unter Prof. Dr. S. Fetzner mit dem Titel:  
„Bakterielle 2,4-Dioxygenasen: Untersuchungen zur Aufklärung des Katalysemechanismus der cofaktorfreen 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase.“