

**Molekulargenetische und biochemische
Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus
Cofaktor-freier 2,4-Dioxygenasen**

Vom
Fachbereich 7 der
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
angenommene Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

von
Frank Fischer
geb. am 30.01.1969 in Jever

Oldenburg, 2000

Erstreferent: apl. Prof. Dr. Susanne Fetzner
Koreferent: Prof. Dr. Thomas Höpner
Tag der Diputation: 20.04.2001

Veröffentlichungen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sind folgende Veröffentlichungen erschienen:

FISCHER, F., KÜNNE, S., FETZNER, S. 1999

Bacterial 2,4-dioxygenases: new members of the α/β hydrolase-fold superfamily of enzymes functionally related to serine hydrolases.

J. Bacteriol. **181**(18):5725-5733.

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**(1):21-27.

Für meine Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von apl. Prof. Dr. S. Fetzner in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie des Fachbereiches 7 der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg angefertigt.

Frau apl. Prof. Dr. S. Fetzner danke ich für die Überlassung des Themas, ihre großzügige Unterstützung, für die vielen anregenden Diskussionen und für die gewährte Freiheit bei der Anfertigung der Dissertation.

Mein Dank geht an Stefan Künne, der mich bei der kinetischen Untersuchung der Proteinvarianten unterstützt hat.

Ich bedanke mich insbesondere bei Katja, Ursula und Gerd für die ständige Diskussionsbereitschaft im Labor, die vielen Tipps und die ausgesprochene Hilfsbereitschaft. Allen anderen Mitarbeitern und Diplomanden der Arbeitsgruppe danke ich für die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Für die Herstellung des Substrates der Qdo danke ich Herrn Prof. Dr. J. O. Metzger aus dem Fachbereich 9 der Universität Oldenburg.

Roberto Steiner von der Universität Groningen, Niederlande, danke ich für die Versuche zur Kristallisation und die Durchführung des Dynamic Light Scattering.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. R. Kappl, Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes, für die Anfertigung der ESR-Spektren.

Für die Durchführung der MALDI-TOF-Spektroskopie bedanke ich mich bei Herrn Dr. H.-J. Hecht von der GBF in Braunschweig.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung
1.1	Dioxygenasen
1.2	1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinolin- und 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinaldin 2,4-Dioxygenase: Zwei neuartige Dioxygenasen
1.3	Kohlenmonoxid-bildende Enzyme
1.4	Aufgabenstellung
2	Material und Methoden
2.1	Definitionen
2.2	Geräte
2.3	Chemikalien und sonstige Materialien
2.4	Puffer und Lösungen
2.5	Kulturmedien
2.6	Bakterienstämme
2.7	Züchtungsbedingungen und Stammhaltung
2.8	Expressionssystem (QIAGEN, 1999)
2.8.1	Die Expressionsvektoren pQE-30 und pQE-50
2.8.2	Das Repressorplasmid pREP4
2.8.3	Regulation der Expression
2.9	Isolierung von Plasmid-DNA
2.9.1	Alkalische Lyse
2.9.2	QIAprep Spin Miniprep Kit
2.9.3	QIAGEN Plasmid Midi Kit
2.10	Bestimmung von Größe, Konzentration und Reinheit von DNA
2.11	Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
2.12	Agarosegelelektrophorese
2.13	Herstellung elektrokompetenter Zellen
2.14	Elektroporation
2.15	Selektion transformierter Klone
2.16	Klonierung der Gene <i>qdo</i> und <i>hod</i>
2.16.1	Polymerase-Kettenreaktion
2.16.1.1	Konstruktion der Primer
2.16.1.2	Amplifikation der Gene <i>qdo</i> und <i>hod</i>
2.16.2	DNA-Extraktion aus Agarosegelen
2.16.3	Ligation
2.17	Ortsspezifische Mutagenese
2.17.1	Konstruktion der Primer
2.17.2	Mutagenese mittels PCR
2.17.3	Transformation CaCl ₂ -kompetenter Zellen
2.18	Computeranalysen von Aminosäuresequenzen
2.19	Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)
2.20	Ultrafiltration
2.21	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)
2.21.1	SDS-PAGE
2.21.2	Native PAGE
2.22	Isoelektrische Fokussierung (IEF)
2.23	Bestimmung der Enzymaktivitäten
2.23.1	Enzymtest für die 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase

-
- 2.23.2 Enzymtest für die 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase
 - 2.24 Züchtung von Expressionsklonen
 - 2.25 Zellaufschluß
 - 2.25.1 Zellaufschluß mit Ultraschal
 - 2.25.2 Zellaufschluß mit Lysozym
 - 2.26 Reinigung der His₆Qdo, ihrer Varianten und der His₆Hod aus *E. coli* # M15[pREP4] pQE-30::*qdo* bzw. -pQE-30::*hod*
 - 2.26.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie an Ni-NTA Superflow
 - 2.26.2 Anionenaustauschchromatographie an UNO Q
 - 2.27 Reinigung der Qdo und Hod aus *E. coli* M15[pREP4] pQE-50::*qdo* bzw. -pQE-50::*hod*
 - 2.27.1 Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel
 - 2.27.2 Adsorptionschromatographie an Hydroxyapatit
 - 2.27.3 Anionenaustauschchromatographie an UNO Q
 - 2.27.4 Gelfiltration an Bio-Prep 1000/17
 - 2.28 Untersuchungen zur Homogenität der His₆Qdo
 - 2.28.1 Stabilisierung der His₆Qdo
 - 2.28.2 Massenspektrometrie
 - 2.28.3 Dynamic Light Scattering
 - 2.29 Enzym-Kinetik
 - 2.29.1 Bestimmung von K_m und k_{cat}
 - 2.29.2 Detektion ionisierbarer Gruppen
 - 2.30 Chemische Derivatisierung der His₆Qdo
 - 2.31 "Chemical Rescue"
 - 2.32 Effektoren und Spin-Traps
 - 2.32.1 Einfluß von Effektoren auf die enzymatische Reaktion
 - 2.32.2 Reduktion von Elektronenakzeptoren
 - 2.33 Basenkatalysierte Umsetzung des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolins
 - 2.33.1 Basenkatalyse mit verschiedenen Katalysatoren
 - 2.33.2 Basenkatalyse in Gegenwart von Inhibitoren
 - 2.34 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)
 - 2.34.1 Statische Spektren
 - 2.34.2 Dynamische Spektren
 - 2.35 Untersuchung zur Substratbindung
 - 3 Ergebnisse
 - 3.1 Reinigung der His₆Qdo und His₆Hod aus *E. coli* M15[pREP4] pQE-30::*qdo* bzw. -pQE-30::*hod*
 - 3.1.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie an Ni-NTA Superflow
 - 3.1.2 Anionenaustauschchromatographie an UNO Q
 - 3.1.3 Zusammenfassung der Reinigungen
 - 3.2 Untersuchungen zur Homogenität der His₆Qdo
 - 3.2.1 Native PAGE
 - 3.2.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)
 - 3.2.3 Massenspektrometrie
 - 3.2.4 Dynamic Light Scattering
 - 3.3 Herstellung der Expressionsklone *E. coli* M15[pREP4] pQE-50::*qdo* und -pQE-50::*hod*
 - 3.3.1 PCR-Amplifikation der Gene *qdo* und *hod*
 - 3.3.2 Präparation des Vektors pQE-50 und der Gene *qdo* und *hod*

-
- 3.3.3 Klonierung der Gene *qdo* und *hod* in den Vektor pQE-50
 - 3.3.4 Identifizierung der Klone
 - 3.4 Reinigung der Qdo aus *E. coli* M15[pREP4] pQE-50::*qdo*
 - 3.4.1 Gewinnung von Rohextrakten
 - 3.4.2 Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel
 - 3.4.3 Adsorptionschromatographie an Hydroxyapatit
 - 3.4.4 Anionenaustauschchromatographie an UNO Q
 - 3.4.5 Gelfiltration an Bio-Prep 1000/17
 - 3.4.6 Zusammenfassung der Reinigung
 - 3.5 Reinigung der Hod aus *E. coli* M15[pREP4] pQE-50::*hod*
 - 3.5.1 Gewinnung von Rohextrakten
 - 3.5.2 Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel
 - 3.5.3 Adsorptionschromatographie an Hydroxyapatit
 - 3.5.4 Anionenaustauschchromatographie an UNO Q
 - 3.5.5 Gelfiltration an Bio-Prep 1000/17
 - 3.5.6 Zusammenfassung der Reinigung
 - 3.6 Aminosäuresequenz-Analyse der Qdo
 - 3.6.1 Multiple Aminosäure-Sequenzvergleiche der 2,4-Dioxygenasen
 - 3.6.2 Sekundärstrukturvorhersage der 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase
 - 3.6.3 Sekundärstrukturvorhersage der His₆Qdo-Varianten
 - 3.7 Ortsspezifische Mutagenese des *qdo*-Gens
 - 3.7.1 Mutagenese
 - 3.7.2 Überexpression und Reinigung der mutanten His₆Qdo-Proteine
 - 3.7.3 Bestimmung von K_m und k_{cat}
 - 3.8 Chemical Rescue der Proteinvariante His₆QdoH244A
 - 3.9 Chemische Derivatisierungen der His₆Qdo
 - 3.10 Detektion ionisierbarer Gruppen der His₆Qdo
 - 3.11 Enzyme zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies, Effektoren und Spin-Traps
 - 3.11.1 Einfluß von Effektoren und Spin-Traps auf die enzymatische Reaktion
 - 3.11.2 Reduktion von Radikalfängern
 - 3.12 Basenkatalysierte Umsetzung des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolins
 - 3.13 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)
 - 3.13.1 Statische Spektren
 - 3.13.2 Dynamische Spektren
 - 3.14 Untersuchung zur Substratbindung
 - 4 Diskussion
 - 4.1 Reinigung und Homogenität der Proteine His₆Qdo und His₆Hod
 - 4.1.1 Reinigung der rekombinanten Proteine His₆Qdo und His₆Hod
 - 4.1.2 Homogenität der Fusionsproteine
 - 4.2 Klonierung der Gene *qdo* und *hod* in den Vektor pQE-50
 - 4.3 Reinigung der Enzyme Qdo und Hod aus den Klonen *E. coli* M15[pREP4] pQE-50::*qdo* und -pQE-50::*hod*
 - 4.4 Aminosäuresequenzanalyse und Reaktionsmechanismus der 2,4-Dioxygenasen
 - 4.4.1 Aminosäuresequenzanalyse
 - 4.4.1.1 Sequenzvergleich der 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase

	mit α/β -Hydrolasen
4.4.1.2	Konservierte Sequenzmotive der 2,4-Dioxygenasen und der α/β -Hydrolasen
4.4.1.3	Struktur der α/β -Hydrolasen
4.4.2	Ortsspezifische Mutagenese des <i>qdo</i> -Gens: Besitzt die Qdo eine katalytische Triade?
4.4.2.1	Nukleophiler Ellbogen und nukleophiler Rest der vermeintlichen katalytischen Triade
4.4.2.2	Saure Aminosäure der hypothetischen katalytischen Triade
4.4.2.3	Histidin der hypothetischen katalytischen Triade
4.4.3	Biochemische Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus
4.4.4	Versuch zur Substratbindung
4.4.5	Katalysemechanismus der 2,4-Dioxygenasen: Ionischer oder radikalischer Mechanismus?
4.4.6	Sauerstoffaktivierung an reduzierten Flavinen
4.5	Ausblick
5	Zusammenfassung
6	Literaturverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Beispiele für die Spaltung aromatischer Verbindungen durch Dioxygenasen.
- Abb. 2: Abbau von Chinaldin durch *Arthrobacter ilicis* Rü61a und von 1*H*-4-Oxochinolin durch *Pseudomonas putida* 33/1.
- Abb. 3: Die Basenkatalyse als hypothetischer Reaktionsmechanismus der 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod nach BAUER (1995).
- Abb. 4: Vergleich der Reaktionen bekannter CO-bildender Dioxygenasen.
- Abb. 5: Restriktionskarten der Expressionsvektoren pQE-30 und pQE-50 und des Repressorplasmids pREP4.
- Abb. 6: Verlauf einer enzymkatalysierten Reaktion mit zwei dissoziierbaren Gruppen.
- Abb. 7: Metallchelate-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Superflow Matrix (His₆Qdo).
- Abb. 8: Anionenaustauschchromatographie an UNO Q (His₆Qdo).
- Abb. 9: Native PAGE der His₆Qdo.
- Abb. 10: IEF der His₆Qdo sowie der Qdo.
- Abb. 11: MALDI-TOF-Untersuchung der His₆Qdo.
- Abb. 12: PCR-Amplifikate der Gene *qdo* und *hod*.
- Abb. 13: Restriktionsanalyse der Plasmide pQE-50::*qdo* und pQE-50::*hod*.
- Abb. 14: Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel (Qdo).
- Abb. 15: Adsorptionschromatographie an Hydroxyapatit (Qdo).
- Abb. 16: Anionenaustauschchromatographie an UNO Q (Qdo).
- Abb. 17: Gelfiltration an Bio-Prep 1000/17 (Qdo)
- Abb. 18: Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel (Hod).
- Abb. 19: Adsorptionchromatographie an Hydroxylapatit (Hod).
- Abb. 20: Anionenaustauschchromatographie an UNO Q (Hod).
- Abb. 21: Gelfiltration an Bio-Prep 1000/17 (Hod).
- Abb. 22: Multiples Aminosequenz-Alignment der Qdo und der Hod mit Enzymen der α/β -Hydrolase-Superfamilie; Sekundärstrukturelement der Qdo und der Dh1A.
- Abb. 23: SDS-PAGE der rekombinanten His₆Qdo und ihrer Varianten.
- Abb. 24: SDS-PAGE der Rohextrakte von *E. coli* pQE-30::*qdo* und einiger Mutanten.
- Abb. 25: Einfluß verschiedener Modifizierungssubstanzen auf die Aktivität der His₆Qdo in Abhängigkeit von der Zeit.
- Abb. 26: Einfluß des pH-Wertes auf den p*K*_m-Wert der 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase.
- Abb. 27: Dynamisches ESR-Spektrum des Qdo-Substrates 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin in Gegenwart des Spin-Traps NtB bei RT.
- Abb. 28: Multiple Sequenzalignments von Peptidsegmenten im Bereich der Reste der potentiellen katalytischen Triade der Qdo, Hod, verschiedener Hydrolasen und Cofaktor-freier Haloperoxidasen.
- Abb. 29: Katalysemechanismus der bakteriellen Luciferase und hypothetischer Mechanismus der Qdo-katalysierten dioxygenolytischen Ringspaltung des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolins

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Ortsspezifische Mutagenese des Gens für das Protein His ₆ Qdo.
Tab. 2:	Zusammenfassung der Reinigungen der His ₆ Qdo und der His ₆ Hod.
Tab. 3:	Zusammenfassung der Reinigung der Qdo aus <i>E. coli</i> M15 pREP4 pQE-50:: <i>qdo</i> .
Tab. 4:	Zusammenfassung der Reinigung der Hod aus <i>E. coli</i> M15 pREP4 pQE-50:: <i>hod</i> .
Tab. 5:	Kinetische Parameter verschiedener Qdo-Varianten.
Tab. 6:	Einfluß verschiedener Effektoren und Spin-Traps auf die Aktivität der His ₆ Qdo.
Tab. 7:	Reduktion verschiedener Radikalfänger in Gegenwart der Qdo-katalysierten Reaktion bzw. des Enzyms oder des Substrates.
Tab. 8:	Basenkatalysierte Umsetzung des 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinolin in Gegenwart der Basen Bu ^t OK und NaOH.
Tab. 9:	Untersuchungen zur Bindung des 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinolin an die Qdo unter anoxischen Bedingungen.

Abkürzungen

Allgemeine Abkürzungen

A	Absorption
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
(Bu ^t OK)	Kalium- <i>tert.</i> -butylat
Da	Dalton
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMPO	5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-oxid
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithio-DL-threit
ε	Molarer Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HEPPSO	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-(2-hydroxy-propansulfonsäure)
His ₆ - <i>hod</i>	Hexahistidin- <i>Gen der 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase</i>
<i>Hod</i>	<i>1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase</i>
<i>INT</i>	<i>Iodnitrotetrazoliumchlorid</i>
<i>IPTG</i>	<i>Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid</i>
kb	Kilobasenpaare
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser-desorption ionization – time of flight
N	Normal

VERZEICHNISSE

NBT	Nitrotetrazoliumblausulfat
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	nicht detektierbar
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NtB	2-Methyl-2-Nitrosopropan
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei der Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
4-POBN	N- <i>tert.</i> -butyl- α -phenylnitron
POPSO	Piperazin-1,4- <i>bis</i> -(2-Hydroxy-propansulfonsäure)
<i>qdo</i>	Gen der 1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase
Qdo	1 <i>H</i> -3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxid-Dismutase
ssDNA	einsträngige (single stranded) DNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen-Prozent
w/v	Gewicht/Volumen-Prozent

Abkürzungen für Aminosäuren

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

1. Einleitung

1.1 Dioxygenasen

Oxidative Transformationen verschiedenster organischer Verbindungen gehören zu den wichtigsten enzymatischen Reaktionen im mikrobiellen Stoffwechsel. Derartige Reaktionen spielen eine signifikante Rolle in der Aufrechterhaltung des globalen Kohlenstoffkreislaufes durch Transformation oder vollständige Mineralisierung dieser Moleküle (SARIASLANI, 1989). Oxygenasen initiieren den aeroben bakteriellen Abbau aromatischer Verbindungen zum einen durch die Hydroxylierung des aromatischen Ringes zur Vorbereitung der Ringspaltung, wobei zwei Hydroxygruppen in *ortho*- oder *para*-Stellung zueinander eingebaut werden, und zum anderen durch die Katalyse dieser Spaltung (HARAYAMA & REKIK, 1989). Auch die einleitende Reaktion des Alkanabbaus wird von Oxygenasen katalysiert.

Die Oxygenasen werden in Monooxygenasen und Dioxygenasen unterteilt. Während Monooxygenasen nur ein Atom des molekularen Sauerstoffs in das organische Substrat einbauen und das zweite Sauerstoffatom zu H₂O reduzieren, katalysieren Dioxygenasen den Einbau beider Sauerstoffatome in das Substrat. Um den Sauerstoff, der im Grundzustand nicht reaktiv ist, zu aktivieren, benötigen diese Enzyme Cofaktoren (HARAYAMA et al., 1992). Sie müssen in der Lage sein, mit dem paramagnetischen molekularen Sauerstoff, der zwei freie Elektronen mit ungepaartem Spin besitzt, einen Komplex zu bilden. Auf diese Weise wird das Spin-Verbot einer Reaktion zwischen Triplett-Sauerstoff und dem Singulett-Kohlenstoff der organischen Verbindung umgangen.

In vielen Oxygenasen sind Übergangsmetalle wie z. B. Eisen als Cofaktoren vorhanden. Bei der Verwendung von Eisen unterscheidet man zwischen nicht-Häm- und nicht-Eisen-Schwefel-haltigen Enzymen, die Fe(II) (Catechol-2,3-Dioxygenase; NOZAKI et al., 1968) oder Fe(III) (Catechol-1,2-Dioxygenase; PATEL et al., 1976; NAKAI et al., 1988) enthalten, und Häm-Enzymen (Tryptophan-2,3-Dioxygenase; ISHIMURA et al., 1970). Als weitere Übergangsmetalle dienen in Oxygenasen Mangan, Kupfer und Kobalt. Alternativ oder in Verbindung mit Metallionen werden Flavine oder Pterine als organische Cofaktoren eingesetzt, deren Semichinon-Form die Spinumkehrung eines Elektrons bewirken kann (GHISLA & MASSEY, 1989). Ein Beispiel für eine Flavin-haltige Dioxygenase ist die 2-Methyl-3-hydroxypyridin-5-carboxyl-Dioxygenase (SPARROW et al., 1969). Die Semichinon-Formen des Flavins oder Pterins reagieren mit molekularem Sauerstoff und bilden dabei ein kovalent gebundenes Hydroperoxid-Intermediat.

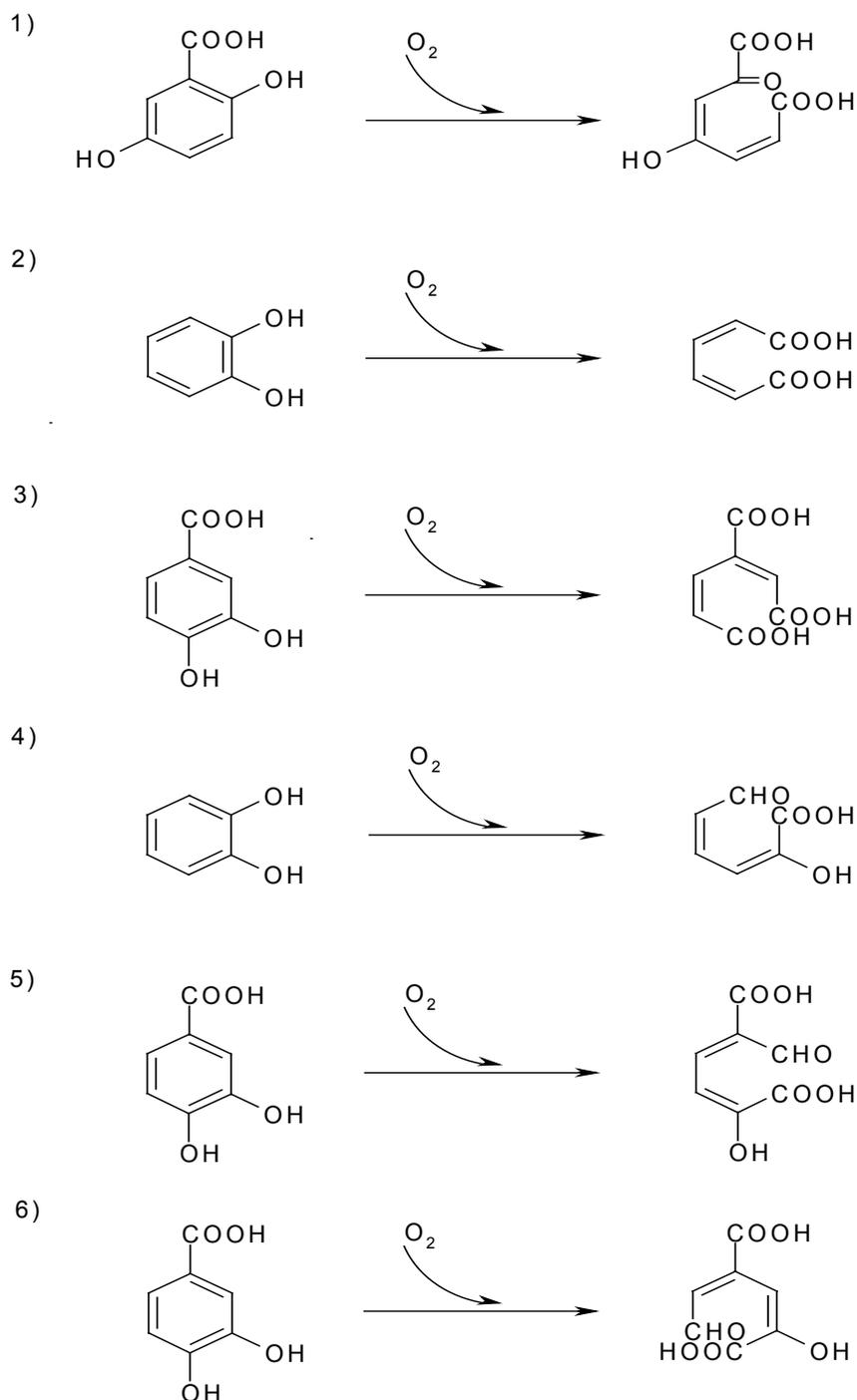


Abb. 1: Beispiele für die Spaltung aromatischer Verbindungen durch Dioxygenasen. 1) Gentisat-1,2-Dioxygenase; 2) und 3) *ortho*-Spaltung: 2) Catechol-1,2-Dioxygenase, 3) Protocatechuat-3,4-Dioxygenase; 4) - 6) *meta*-Spaltung: 4) Catechol-2,3-Dioxygenase, 5) Protocatechuat-2,3-Dioxygenase, 6) Protocatechuat-4,5-Dioxygenase.

NOZAKI (1979) teilt die Aromatenring-spaltenden Dioxygenasen nach Art der Ringöffnung in die *ortho*- (oder intradiolischen) und die *meta*- (oder extradiolischen) Enzyme ein (Abb. 1). Zu den *ortho*-spaltenden Enzymen gehören z. B. die Catechol-1,2-Dioxygenase und die Protocatechuat-3,4-Dioxygenase (FUJISAWA & HAYAISHI, 1968; DURHAM et al., 1980). *Meta*-spaltende Enzyme sind die

Protocatechuat-2,3-Dioxygenase (WOLGEL et al., 1993) und die 1,2-Dihydroxynaphthalin-2,3-Dioxygenase (KUHLM et al., 1991). Nach LIPSCOMB et al. (1988) deutet die unterschiedliche Art der Ringspaltung auf verschiedene katalytische Mechanismen hin und HARAYAMA & REKIK postulierten 1989 die unterschiedliche Zuordnung der *ortho*- und *meta*-spaltenden Dioxygenasen zu zwei verschiedenen Genfamilien.

Eine Ringspaltung anderer Art katalysiert die Gentisat-1,2-Dioxygenase aus *Pseudomonas acidovorans* und *Comamonas testosteroni* (HARAYAMA et al., 1992). Das Enzym besitzt ein Fe(II) als Cofaktor und öffnet den Ring des Substrates zwischen dem C1 mit einer Carboxylgruppe und dem C2 mit einer Hydroxylgruppe (Abb. 1).

1.2 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin- und 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin- 2,4-Dioxygenase: Zwei neuartige Dioxygenasen

Die beiden Enzyme 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase (Qdo) aus *Pseudomonas putida* 33/1 und 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase (Hod) aus *Arthrobacter ilicis* R61a, die an dem Abbauweg des 1H-4-Oxochinolin bzw. des Chinaldin beteiligt sind (Abb. 2), katalysieren die oxygenolytische Ringspaltung des N-Heterozyklus ihrer Substrate 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin und 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin (BAUER et al., 1994; BOTT et al., 1990; HUND et al., 1990). Dabei entstehen die Produkte N-Formylantranilsäure bzw. N-Acetylantranilsäure und Kohlenmonoxid.

Durch Isotopenmarkierungsversuche mit $^{18}\text{O}_2/^{16}\text{O}_2$ zeigte BAUER (1994), daß in beiden Reaktionen eine 2,4-Dioxygenierung des Substrates stattfindet, bei der beide Sauerstoffatome in das organische Molekül eingebaut werden und (im Gegensatz zu anderen Dioxygenasen) zwei C-C-Bindungen gespalten werden. In biochemischen sowie spektroskopischen Untersuchungen wurde nachgewiesen (BAUER et al., 1996), daß diese Enzyme weder ein Metallion noch einen organischen Cofaktor besitzen, um den molekularen Sauerstoff für die Reaktion zu aktivieren.

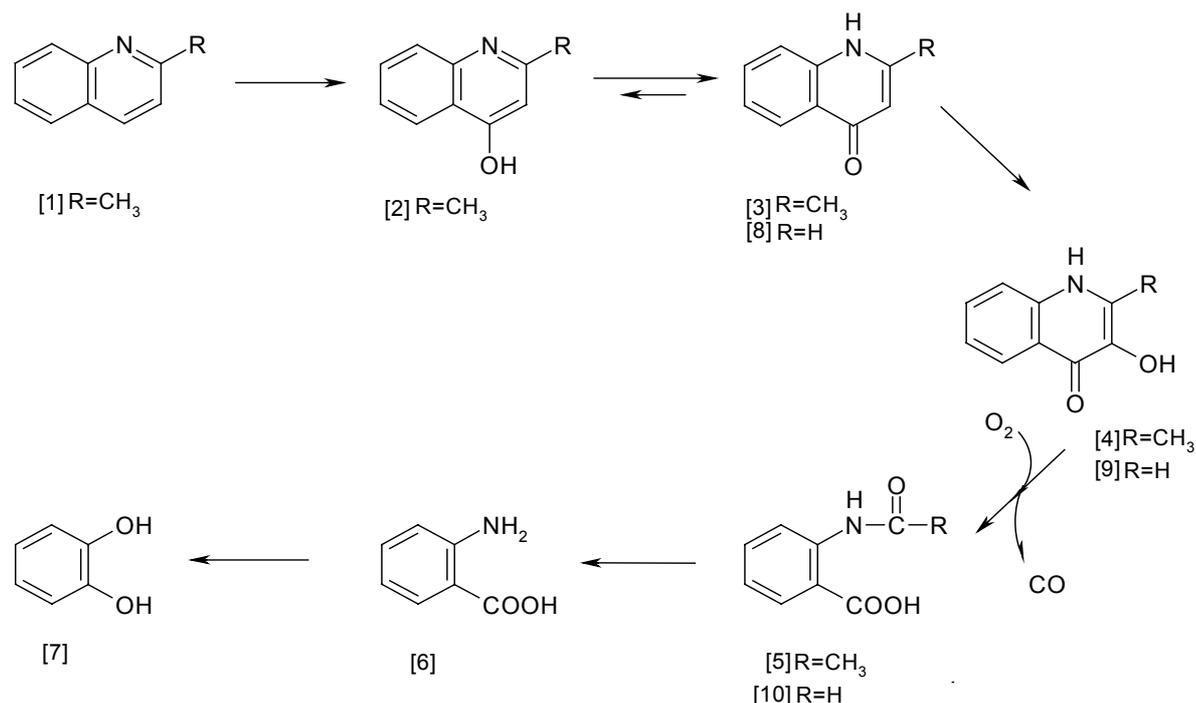


Abb. 2: Abbau von Chinaldin durch *Arthrobacter ilicis* Rü61a ([1] – [7]) und von 1H-4-Oxochinolin durch *Pseudomonas putida* 33/1 ([8] – [10] und [6] – [7]). [1] Chinaldin (2-Methylchinolin), [2] 4-Hydroxychinaldin, [3] 1H-4-Oxochinaldin, [4] 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin, [5] N-Acetylanthranilsäure, [6] Anthranilsäure, [7] Brenzcatechin, [8] 1H-4-Oxochinolin, [9] 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin [10] N-Formylanthranilsäure.

Für die äußerst ungewöhnliche Reaktion dieser kleinen monomeren Enzyme postulierte BAUER (1995) einen Mechanismus auf der Basis einer Basenkatalyse nach NISHINAGA et al. (1979), bei dem der Sauerstoff ohne Cofaktor aktiviert werden kann (Abb. 3). Dabei wird die Hydroxylgruppe in Position 3 des Substrates aufgrund der basischen Umgebung im aktiven Zentrum deprotoniert. Die mesomeren Grenzstrukturen lassen nun die Formulierung eines Carbanions zu, an dem ein elektrophiler Angriff des O₂ im Grundzustand (Triplett-Sauerstoff) stattfinden kann. Das so entstandene Peroxyanion reagiert mit der Carbonylfunktion in 4-Stellung und es kommt auf diese Weise zur Ausbildung eines fünfgliedrigen zyklischen Peroxids. Dieses Peroxid zerfällt dann unter der Bildung des Produktes (N-Formylanthranilsäure bzw. N-Acetylanthranilsäure) und der Freisetzung von Kohlenmonoxid.

Nach der Sequenzierung der Gene *qdo* und *hod* wurden von MAX (1997, 1999) erste Aminosäuresequenzanalysen durchgeführt. Die Datenbankrecherche ergab keine signifikanten Homologien zu bisher bekannten Dioxygenasen.

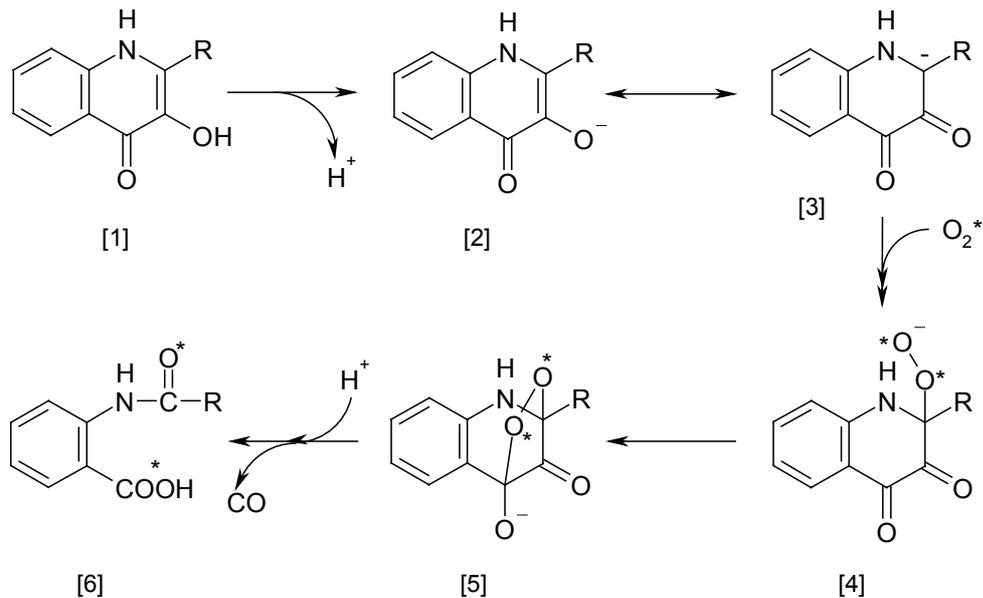


Abb. 3: Die Basenkatalyse als hypothetischer Reaktionsmechanismus der 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod nach BAUER (1995). [1] R=H: 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin, R=CH₃: 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin, [2] Substratanion, [3] Carbanion, [4] Peroxyanion, [5] zyklisches Peroxid, [6] R=H: N-Formylanthranilsäure, R=CH₃: N-Acetylanthranilsäure. *=Atome des molekularen Sauerstoffs.

1.3 Kohlenmonoxid-bildende Enzyme

Eine weitere ungewöhnliche Eigenschaft der beiden 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod ist die Freisetzung von Kohlenmonoxid, da CO-bildende Enzyme in der Natur nur sehr selten zu finden sind. Die Häm-Oxygenase, die aus ihrem Substrat Eisen-Protoporphyrin IX in Gegenwart von molekularem Sauerstoff und NADPH Kohlenmonoxid und Biliverdin IX α bildet (TENHUNEN et al., 1969), ist inzwischen sehr gut charakterisiert.

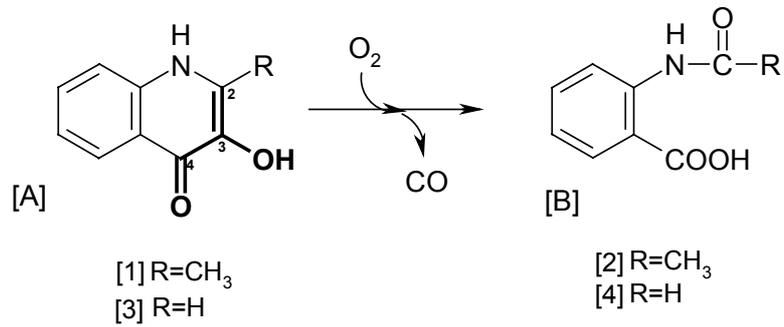
Die 1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentenanon-1,3-Dioxygenase aus *Klebsiella pneumoniae* wurde 1993 von WRAY & ABELES isoliert. Das Enzym ist am Methioninstoffwechsel beteiligt und katalysiert die Umsetzung seines aliphatischen Substrates zu 5-Methylthiopropionat und Kohlenmonoxid (WRAY & ABELES, 1995).

Erst 1997 wurde von STRINGFELLOW et al. die Haloalkanoat-Dehalogenase II aus *Rhizobium* sp. beschrieben. Sie spaltet das aliphatische Substrat Trichloressigsäure unter Einsatz von H₂O in CO₂, CO und HCl.

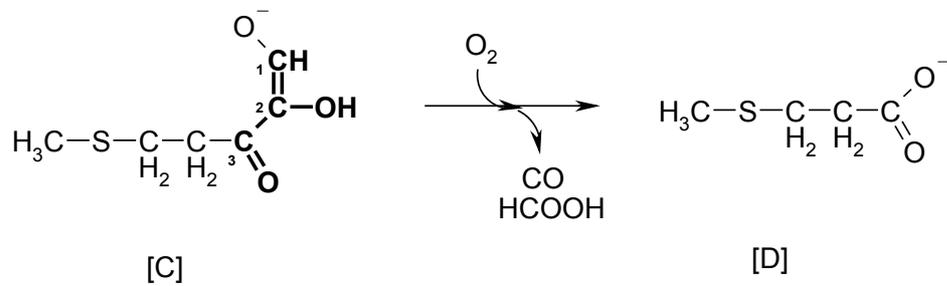
Das O-heterozyklische Substrat der Flavonol-2,4-Dioxygenasen (Quercetinasen) aus *Aspergillus flavus* (OKA et al., 1972; TAUSCHER, 1995), *Aspergillus niger* (HUND et al., 1999) und *Actinoplanes missouriensis* (WAGEGG et al., 1997) wird ähnlich wie die N-heterozyklischen Substrate der 2,4-Dioxygenasen aus *Pseudomonas putida* 33/1 und *Arthrobacter ilicis* R61a 2,4-dioxygenolytisch unter der Bildung von Kohlenmonoxid gespalten.

Der Vergleich der Substrate der CO-bildenden Enzyme Qdo, Hod, 1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentenanon-1,3-Dioxygenase und Quercetinase zeigt Gemeinsamkeiten, die auf eine ähnlich ablaufende Reaktion hindeuten: Eine Doppelbindung zwischen dem C2 und C3 (C1 und C2), eine Hydroxylgruppe an C3 (C2), eine Carbonylgruppe an C4 (C3) und ein Heteroatom an vergleichbarer Position. Während die Flavonol-2,4-Dioxygenasen der Pilze Cu(II) besitzen, findet man weder in den 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod noch in der 1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentenanon-1,3-Dioxygenase aus *Klebsiella pneumoniae* einen Cofaktor. Als Reaktionsmechanismus für diese Enzyme wird eine Basenkatalyse vorgeschlagen. Nach NISHINAGA et al. (1979) könnte allerdings auch das Cu(II) der Quercetinasen als Base funktionieren, weshalb auch für diese Reaktion ein analoger Mechanismus denkbar wäre.

1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase ([1] und [2]) und
1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase ([3] und [4])



1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentenianion-1,3-Dioxygenase



Flavonol-2,4-Dioxygenase

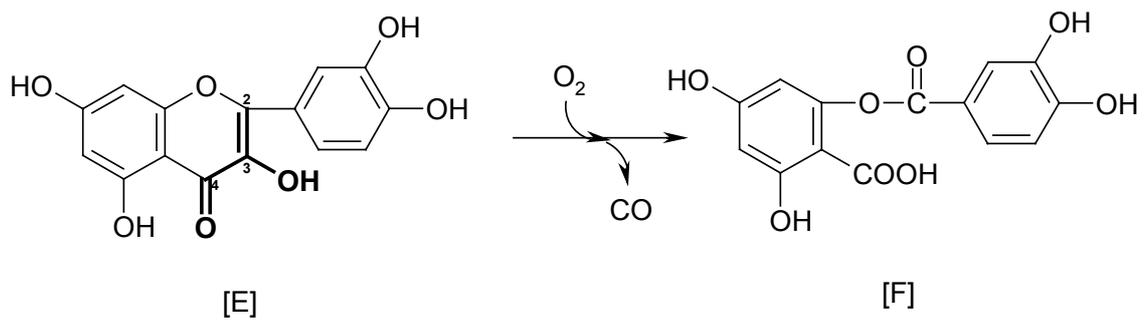


Abb. 4: Vergleich der Reaktionen bekannter CO-bildender Dioxygenasen. [A] 1H-4-Oxochinolin ([1]) bzw. 1H-4-Oxochinaldin ([3]), [B] N-Formylanthranilsäure ([2]) bzw. N-Acetylanthranilsäure ([4]), [C] 1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopenten-Anion, [D] S-Methylthiopropionat, [E] Quercetin, [F] 2-Protocatechuoylphloroglucincarbonsäure.

1.4 Aufgabenstellung

Zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Enzyme 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase (Qdo) aus *Pseudomonas putida* 33/1 und 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase (Hod) aus *Arthrobacter ilicis* R61a ist die Röntgenstrukturanalyse von entscheidender Bedeutung. Zur Vorbereitung der Kristallisation sollte in dieser Arbeit die Reinigung der rekombinanten Proteine His₆Qdo und His₆Hod optimiert werden, um große Mengen an homogenem Protein zur Verfügung stellen zu können. Durch eine Klonierung der Gene *qdo* und *hod* in einen anderen Expressionsvektor sollte zusätzlich die Reinigung der beiden 2,4-Dioxygenasen ohne His₆-tag ermöglicht werden.

Der Austausch von Aminosäuren mit möglicher essentieller Bedeutung für die Katalyse sollte mittels ortsspezifische Mutagenese durchgeführt werden. Diese Untersuchungen sollten durch selektive chemische Derivatisierungen bestimmter Aminosäurereste unterstützt werden. In Zusammenarbeit mit Dr. Kappl an der Universität des Saarlandes in Homburg sollte durch ESR-spektroskopische Analyse die mögliche Entstehung von intermediären (organischen) Radikalen untersucht werden

2. Material und Methoden

2.1 Definitionen

Enzymaktivität:

1. Im Enzymtest: Eine Enzymeinheit (1 U) ist die Enzymmenge, welche die Umsetzung von 1 μmol Substrat bzw. die Bildung von 1 μmol Produkt pro Minute bei RT katalysiert.
2. Für Restriktionsenzyme: Eine Enzymeinheit (1 U) ist die Enzymmenge, welche 1 μg λ -DNA in einer Stunde bei den für das entsprechende Enzym optimalen Bedingungen vollständig spaltet.
 - a. Für Ligasen: 0.01 Weiss unit (WU) ist die Enzymmenge, welche die Ligation von 95% der Fragmente *Hind*III-restringierter λ -DNA in 20 min bei 16°C katalysiert.
3. Für Polymerasen: Eine Enzymeinheit (1 U) ist die Enzymmenge, die unter entsprechenden Bedingungen (Temperatur, Puffer) innerhalb von 30 min 10 nmol dNTP in eine säureunlösliche Substanz überführt.

Spezifische Aktivität:

U/mg Protein

Kilobasen:

1 kb = 1000 Basenpaare

Dalton:

1 Da = $1,66018 \times 10^{-24}$ g

2.2 Geräte

Anaerobenzelt: Coy Laboratory Products Inc., Michigan/USA

Chromatographie-Anlage: Biologic HR System mit Workstation, AV7-3 Sample Inject Valve, SV5-4 Select Valve, SV3-2 Diverter Valve, UV- und Leitfähigkeitsdetektoren, Model 2128 Fraction Collector: Bio-Rad, München; UNO Q-6, Bio-Prep 1000/17, Bio-Scale MT2 Säule, Econo-Column 1,0 x 10 cm, Flow Adaptor 1,0 x 14 cm: Bio-Rad, München

Elektronenspinresonanz-Spektroskop: Bruker ESP300E, Kryostat ESR900: Bruker Analytik GmbH, Karlsruhe

Elektrophorese: Agarosegelelektrophorese: Horizontalgelkammern, Bio-Rad, München; Polyacrylamidelektrophorese: Vertikalgelkammern, Ift-Labortechnik, Wasserburg; Isoelektrische Fokussierung: LKB 2117 Multiphor, Pharmacia LKB, Freiburg

Elektroporation: Gene Pulser™ und Pulse Controller: Bio-Rad, München; Elektroporationsküvetten 2 mm:peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Fotodokumentation: Digitalkamera DC 120 Zoom: Kodak, New York/USA; Transilluminator TFP-M/WL: Ift-Labortechnik, Wasserburg

Light scattering: DynaPro Dynamic Light Scattering: Proteinsolutions Inc., Charlottesville/USA

MALDI-TOF-Massenspektrometer: Bruker Reflex T: Bruker Analytik GmbH, Karlsruhe

Netzgeräte: Powerpack PP 3000: Biometra, Göttingen; PowerPac 300: Bio-Rad, München; 2103 Power Supply: Pharmacia LKB, Freiburg

PCR: Personal Cycler™: Biometra, Göttingen

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

Photometer: UV-160: Shimadzu Corporation, Kyoto/Japan

Schüttler: Tischschüttler Typ 3020: GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel; Test Tube Rotator: GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

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

Sterilisation: Tuttnauer 2540 ELV: Tuttnauer, Ronkonkoma/USA

Ultrafiltration: VIVASPIN 4 und VIVASPIN 15: Vivascience Ltd., Stonehouse/England; NANOSEP™ Microconcentrators: Pall Filtron, Dreieich

Ultraschallbad: Branson Typ 5210: G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd

Vakuumpumpe: Speed Vac® Plus SC110A: Savant Global Medical Instruments, Minnesota/USA

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

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

Wärmeschrank: HeraeusET 504: Heraeus Instruments, Hanau

Wasseraufbereitungsanlage: ELGA STAT® UHQ PS: KSN Wassertechnik, Nistertal

Wasserbäder: Typ 1002 und Typ 1086: GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

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

Zentrifugation: Tischzentrifuge Biofuge Fresco: Heraeus Instruments, Hanau; Beckman J2-21 M/E mit den Rotoren JA-10 und JA-20: Beckman Instruments,

München; Kontron-Kühlzentrifuge Hermle ZK 400 mit dem Rotor A6-14: Hermle KG, Eiching

2.3 Chemikalien und sonstige Materialien

Acros, New Jersey/USA: Palladiumdichlorid

Bio-Rad, München: Acrylamid, Ammoniumperoxodisulfat, Hydroxyapatit, IEF-Standard, Broad Range MW Standard, TEMED

Biozym, Hessisch Oldendorf: PCR-Tubes (0,2 ml)

Difco, Detroit/USA: Bacto Trypton, Bacto Hefeextrakt

Dr. H.M. Rombrecht, Quernheim: *N,N*-Dimethylformamid (DMF)

Eurogentec, Belgien: DNA-Smart Ladder

Fluka Chemie AG, Neu-Ulm: Ammoniumchlorid, Cytochrom *c* (aus Pferdeherz), Diethylpyrocarbonat, DTT, HCl, HEPES, INT, Iodacetamid, Kanamycin, Lysozym (aus Hühnereiweiß), Mercaptoethanol, NBT, Octyl- β -D-glucopyranosid, Phosphorsäure (85% w/v), Ribonuclease A, Saccharose

Interaktiva, Ulm: PCR-Primer

MBI-Fermentas, St. Leon Rot: T4-DNA-Ligase, Restriktionsenzyme *Bam*HI, *Bsu*15/*Cla*I, *Kpn*I, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I

Merck, Darmstadt: Anthranilsäure, Bromphenolblau, Chloroform, Harnstoff, *di*-Kaliumhydrogenphosphat, Magnesiumdichlorid, Magnesiumsulfat, D-Mannit, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, NZ-Amin (Casein-Hydrolysat), PMSF, SDS, RSA

Messer Griesheim, Duisburg: Formiergas, Helium

New England Biolabs: Broad Range Protein Marker

peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen: peqGold Universal Agarose, IPTG

Pharmacia LKB, Freiburg: DEAE-Sephacel

Promega, Mannheim: Mid-Range MW-Marker, *Pfu*-DNA-Polymerase, Restriktionsenzym *Dpn*I

Qiagen, Hilden: Ni-NTA Superflow, QIAGEN Plasmid Midi Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraktion Kit

Riedel de Haën AG, Seelze: Glucose, Kaliumchlorid

Roche Diagnostics, Mannheim: CompleteTM Mini, dNTP-Mix

Roth, Karlsruhe: Ampicillin, EDTA, Ethidiumbromid, Guanidin-HCl, HEPPSO, POPSO, Tris

Scharlau, Barcelona/Spanien: Agar-Agar, Ethanol (96%ig), Glycerin, Imidazol, Isopropanol, Kaliumdihydrogenphosphat, Trichloressigsäure

Serva/Boehringer Ingelheim, Heidelberg: Ampholyte Servalyt[®] 3-10 und Servalyt[®] 5-7, Serva Blau G (Coomassie Brilliant Blue), Serva Gel Fix für PAG
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen: DMPO, Hydroxylamin, Kalium-*tert.*-butylat (Bu^tOK), Katalase (aus Rinderleber), NtB, 4-POBN, Superoxid-Dismutase (aus Erythrozyten)

1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin wurde freundlicherweise im Fachbereich 9 der Universität Oldenburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Metzger nach EVANS & EASTWOOD (1974) hergestellt.

Alle Chemikalien wurden in der handelsüblichen Form mit dem Reinheitsgrad p.A. verwendet.

2.4 Puffer und Lösungen

Puffer für die Enzymreinigung:

Puffer A:	20 mM Tris/HCl, pH 7,8
Puffer B:	10 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,0
Puffer C:	150 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,0
Puffer D:	400 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,0

Alle Puffer für die Chromatographie wurden filtriert (Porengröße 0,45 µm) und entgast.

Puffer für DNA-Analysen:

NEB-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,9)
	150 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	1 mM DTT
TE (pH 8,0):	10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	1 mM EDTA (pH 8,0)

Puffer für die Agarosegelelektrophorese:

TAE (50-fach):	2,00 M Tris
	0,90 M Essigsäure
	0,05 M EDTA (pH 8,0)
6x Probenpuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau
	40% (w/v) Saccharose
	in H ₂ O _{deion.}

Puffer für die Polyacrylamidgelelektrophorese:

Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
Trenngelpuffer:	3,0 M Tris/HCl, pH 8,8
nativer Tankpuffer:	0,25 M Tris/HCl, 1,92 M Glycin, pH 8,3
SDS Tankpuffer:	0,25 M Tris/HCl 1,92 M Glycin 1% SDS pH 8,3
SDS-Probenpuffer:	50 mM Tris/HCl (pH 6,8) 10% (v/v) Glycerin 4% (w/v) SDS 0,005% (w/v) Bromphenolblau
nativer Probenpuffer:	gesättigte Bromphenolblau-Lösung in H ₂ O _{deion.}

Isoelektrische Fokussierung:

Anodenlösung:	1 M H ₃ PO ₄ für den Gradienten pH 3-10 0,5 M Essigsäure für den Gradienten pH 5-7
Kathodenlösung:	0,5 M NaOH

Lösungen für die Gelfärbung:

Färbelösung:	0,1% Coomassie Blue 50% Trichloressigsäure 49,9% H ₂ O _{deion.}
Entfärbelösung:	30% Methanol 10% Essigsäure 60% H ₂ O _{deion.}

Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie:

Laufmittel 1:	Diisopropylether/Ameisensäure/H ₂ O = 50/3,5/1,5 (v/v/v) (HUND et al., 1990)
Laufmittel 2:	Toluol/Essigsäureethylester/Eisessig = 60/48/8 (v/v/v) (BOTT et al., 1990)

BRADFORD-Reagenz (BRADFORD, 1976):

100 mg	Coomassie Brilliant Blue G-250
50 ml	Ethanol (96%ig)
100 ml	Phosphorsäure (85% w/v)

850 ml H₂O_{deion.}

Die Lösung muß zweimal filtriert und vor Licht geschützt bei 4°C aufbewahrt werden.

Britton-Robinson-Puffer: 0,04 mol Phosphorsäure (85% w/v)
 0,04 mol Essigsäure
 0,04 mol Borsäure
 in 1000 ml H₂O_{deion.}

Der pH-Wert wurde im Bereich pH 3 bis pH 10 mit 0,2 N NaOH eingestellt.

Antibiotika, IPTG, RNase:

Ampicillin: 100 mg/ml in H₂O_{deion.}
 Endkonzentration im Medium: 100 µg/ml
 Kanamycin: 50 mg/ml in H₂O_{deion.}
 Endkonzentration im Medium: 50 µg/ml
 IPTG: 1 M in H₂O_{deion.}
 Endkonzentration im Medium: 0,5 mM
 RNase A: 10 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5

Die Stammlösungen wurden in Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Alle Lösungen wurden sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium nach Abkühlung zugegeben.

Enzyme zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies, Effektoren und Spin-Traps:

D-Mannit: 0,5 M in H₂O_{deion.}
 Cytochrom *c*: 1 mM in H₂O_{deion.}
 Superoxid-Dismutase: 6000 U/ml in Puffer A
 Katalase: 6000 U/ml in Puffer A
 INT: 10 mM in H₂O_{deion.}
 NBT: 10 mM in H₂O_{deion.}-Isopropanol-Gemisch
 (50:50 v/v)
 4-POBN: 1 M in Ethanol
 NtB: Vor dem Einsatz als Spin-Trap mußte die Nitroso-Verbindung erst aus ihrer Dimer-Form in die Monomer-Form umgewandelt werden (RIESZ & RUSTGI, 1979). Dazu wurde eine 0,01 M Lösung in H₂O_{deion.} hergestellt und zunächst über Nacht bei 4°C gerührt. Nach weiteren 24 h Rühren bei RT stellte sich ein Gleichgewicht zwischen der Dimer- und der Monomer-Form ein.

Weitere Puffer und Lösungen sind bei den Beschreibungen der einzelnen Methoden aufgeführt.

2.5 Kulturmedien

Die Nährmedien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung fester Nährböden erfolgte die Zugabe von 16 g/l Agar.

LB-Medium (SAMBROOK et al., 1989):

10,0 g Bacto Trypton
5,0 g Bacto Hefeextrakt
5,0 g NaCl
ad 1 l H₂O_{deion.}

LB-Selektionsmedien

Dem LB-Medium wurden je nach Resistenz der zu züchtenden Stämme Antibiotika zugegeben:

Ampicillin: 100 µg/ml
Kanamycin: 50 µg/ml

NZY-Broth:

10,0 g NZ-Amin (Casein-Hydrolysat)
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
ad 965 ml H₂O_{deion.}

Vor Gebrauch zugeben:

12,5 ml 1 M MgCl₂ (sterilfiltriert)
12,5 ml 1 M MgSO₄ (sterilfiltriert)
10,0 ml 2 M Glucose-Lösung (sterilfiltriert)

2.6 Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue

(BULLOCK et al., 1987)

Genotyp: *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB, lac^fZΔM15, Tn10 (Tet^r)]*

Dieser Stamm der Firma Stratagene diente als Empfängerstamm für die mutierten pQE-30::*qdo* Plasmide.

E. coli XL1-Blue MRF'

(JERPSETH et al., 1992)

Genotyp: $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB^{\text{hsdSMR}}mrr)173$, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac[F' proAB, lacI^fZΔM15, Tn10 (Tet^r)]*

Dieser Stamm der Firma Stratagene diente als Empfängerstamm für die rekombinanten Plasmide pQE-50::*qdo* und pQE-50::*hod*.

E. coli M15 [pREP4]

(ZAMENHOF & VILLAREJO, 1972)

Genotyp: *nal^S*, *str^S*, *rif^S*, *thi⁻*, *lac⁻*, *ara⁺*, *gal⁺*, *mtl⁻*, *f⁻*, *recA⁺*, *uvr⁺*, *lon⁺*

Dieser Stamm diente als Wirtsstamm für die Plasmide pQE-30::*qdo*, pQE-30::*hod*, pQE-50::*qdo* und pQE-50::*hod* und wurde zur Überexpression der Proteine Hod und Qdo mit His₆-tag (pQE-30) und ohne His₆-tag (pQE-50) verwendet.

2.7 Züchtungsbedingungen und Stammhaltung

Alle *E. coli*-Stämme wurden bei 37°C in LB-Medium (2.5) kultiviert, das bei plasmidhaltigen Stämmen mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde. Die Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben auf einer Rundschüttelmaschine bei 130 UpM geschüttelt. LB-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert. Alle vier bis sechs Wochen wurden die Stämme auf frische Platten überimpft.

Zur Konservierung der Bakterien wurden die Flüssigkulturen mit 20% (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.8 Expressionssystem (QIAGEN, 1999)

2.8.1 Die Expressionsvektoren pQE-30 und pQE-50

Die beiden Expressionsvektoren pQE-30 und pQE-50 (Abb. 5) der Firma Qiagen (QIAGEN, 1999) ermöglichen die Überexpression von Proteinen in *E. coli*. Sie gehören zur pDS-Familie (BUJARD et al., 1987) und sind von dem Plasmid pDS56/RBSII abgeleitet. Als low-copy-number Plasmide liegen sie nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vor (10 Kopien pro Zelle). Die Überexpression von

Proteinen basiert auf dem T5-Promotor Transkriptions-Translationssystem. Neben dem Promotor des Phagen T5, der von der *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird, besitzen die pQE-Vektoren zwei *lac*-Operatorsequenzen, eine synthetische Ribosomenbindestelle (RBSII) und eine multiple cloning site (MCS). Der Vektor pQE-30 besitzt im Gegensatz zum pQE-50 vor der MCS eine für sechs Histidinreste codierende Sequenz, so daß sich am N-Terminus des Fusionsproteins ein Hexahistidin-tag befindet. Am Ende der MCS befinden sich drei Translations-Stopcodons in allen Leserastern. Die starken Transkriptionsterminatoren t_0 aus dem Phagen Lambda und T1 aus dem *rrn* Operon von *E. coli* verhindern eine Fortsetzung der Transkription in den Vektor. Das β -Lactamase-Gen (*bla*) bewirkt eine Resistenz gegen Ampicillin.

2.8.2 Das Repressorplasmid pREP4

Die extrem hohe Transkriptionsrate, die am T5-Promotor initiiert wird, kann nur durch große Mengen an *lac*-Repressor-Protein effizient reguliert und reprimiert werden. Daher besitzt der Wirtstamm *E. coli* M15 [pREP4] (2.6) bereits das Repressorplasmid pREP4 (Abb. 5). Wie die pQE-Vektoren ist auch dieses ein low-copy-number Plasmid. pREP4 ist abgeleitet vom pACYC und bewirkt eine Kanamycinresistenz (Gen *neo*). Es exprimiert das *lac*-Repressor-Protein, welches vom *lacI*-Gen codiert wird.

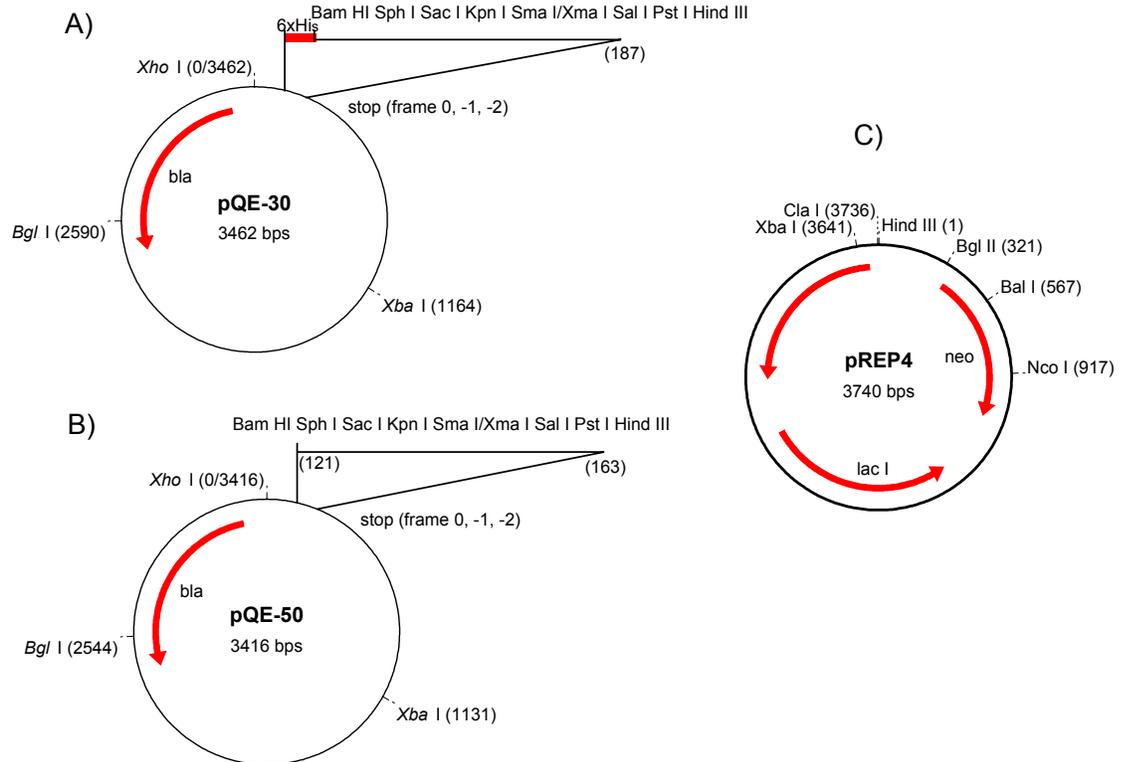


Abb. 5: Restriktionskarten der Expressionsvektoren (mit eingezeichneter MCS) und des Repressorplasmids des verwendeten Expressionssystems der Firma QIAGEN. A) pQE-30, B) pQE-50, C) Repressorplasmid pREP4.

2.8.3 Regulation der Expression

Die Expression des rekombinanten Proteins wird durch die Zugabe von IPTG induziert. Es bindet an das *lac*-Repressor-Protein, inaktiviert dieses und die RNA-Polymerase der Wirtszelle beginnt mit der Transkription. Das doppelte Operator-System der pQE-Vektoren (2.8.1) ermöglicht in Verbindung mit den hohen Mengen an *lac*-Repressor-Protein die stringente Kontrolle der Transkriptionsrate.

2.9 Isolierung von Plasmid-DNA

2.9.1 Alkalische Lyse

Diese Methode nach SAMBROOK et al. (1989) basiert auf dem Verfahren der alkalischen Lyse nach BIRNBOIM & DOLY (1979). Sie wurde zur schnellen Analyse von *E. coli*-Klonen verwendet. Dazu wurden die Klone über Nacht bei 37°C in 5 ml LB-Medium (2.5) unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums (2.4) gezüchtet. 1,5 ml dieser Kultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 µl Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA) resuspendiert, mit 10 µl RNase-Lösung (2.4) versetzt und es wurden 150 µl Lösung II (0,2 N NaOH, 1% (w/v) SDS) zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen durch mehrmaliges Drehen der Gefäße wurden die Ansätze 30 s bei RT inkubiert und anschließend durch Zugabe von 150 µl Lösung III (60 ml 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml H₂O_{deion.}) und nochmaligem gründlichen Mischen neutralisiert. Zum besseren Pelletieren des Kalium-SDS wurden jeweils 2 Tropfen Chloroform zu den Ansätzen gegeben und anschließend bei 10.000 x g und RT 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und 10 min inkubiert. Es folgte eine Ethanolfällung der DNA durch Zugabe von 1 ml 96%igem Ethanol und eine abschließende Zentrifugation (4°C, 15 min, 14.000 x g). Das Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer (2.4) aufgenommen und die DNA bei 4°C gelagert.

2.9.2 QIAprep Spin Miniprep Kit

Diese Methode der Plasmidisolierung nach QIAGEN (1997) basiert auf der alkalischen Lyse von Bakterien und der anschließenden Reinigung der DNA durch Adsorption an Silica-Gel in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (VOGELSTEIN & GILLESPIE, 1979). Sie wurde zur Reinigung der Plasmid-DNA für die Sequenzierung verwendet. Alle verwendeten Puffer und Materialien wurden dem von Qiagen erworbenen Kit entnommen.

5 ml einer Übernachtskultur der *E. coli*-Klone in LB-Selektionsmedium (2.5) wurden abzentrifugiert (5 min, 4°C, 14.000 x g) und das Pellet in 250 µl RNase-haltigem Puffer P1 resuspendiert. Durch die Zugabe von 250 µl Puffer P2 und vorsichtigem Mischen wurden die Zellen lysiert und der Ansatz nach 5 min Inkubation bei RT mit 350 µl Puffer N3 neutralisiert. Durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 14.000 x g) bildete sich ein klarer Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt. Dieser wurde auf eine QIAprep-Säule pipettiert, welche sofort

zentrifugiert wurde (1 min, 4°C, 14.000 x g). Um die an das Silica-Gel gebundene Plasmid-DNA zu reinigen, wurde die Säule mit 0,5 ml Puffer PB und 0,75 ml Puffer PE mittels Zentrifugation gespült. Danach wurde die Säule zum vollständigen Entfernen der Flüssigkeiten noch einmal zentrifugiert (Bedingungen für alle Zentrifugationen: 1 min, 4°C, 14.000 x g). Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 50 µl sterilem H₂O_{deion.} und die DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.9.3 QIAGEN Plasmid Midi Kit

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das QIAGEN Plasmid Midi Kit verwendet (QIAGEN, 1998). Nach der alkalischen Lyse der Zellen wird bei dieser Methode die DNA über einen Anionenaustauscher gereinigt und anschließend mit Isopropanol gefällt. Die verwendeten Puffer und Säulen wurden dem von Qiagen erworbenen Kit entnommen.

Eine 100 ml Übernachtskultur (LB-Selektionsmedium (2.5)) des entsprechenden *E. coli*-Stammes wurde abzentrifugiert (4°C, 5500 x g, 10 min) und in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Die Lyse wurde durch die Zugabe von 4 ml Puffer P2 und vorsichtigem Schütteln eingeleitet. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz mit 4 ml eiskaltem Puffer P3 neutralisiert, weitere 15 min auf Eis inkubiert, das Präzipitat abzentrifugiert (4°C, 20000 x g) und der Überstand auf eine mit Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Säule gegeben. Nachdem die Säule zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen wurde, konnte die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert und mit 0,7 Vol. Isopropanol bei RT gefällt werden. Das durch die 30 min Zentrifugation (4°C, 20000 x g) gewonnene Pellet wurde mit 2 ml 70%igem Ethanol (RT) gewaschen, weitere 10 min zentrifugiert (4°C, 20000 x g), 5 min im Vakuumkonzentrator getrocknet und in 200 µl TE-Puffer (2.4) aufgenommen.

2.10 Bestimmung von Größe, Konzentration und Reinheit von DNA

Die Konzentrations- und Größenbestimmung der DNA erfolgte nach Agarosegelelektrophorese und Dokumentation (2.12) mit Hilfe des Bildauswertungsprogramms WinCam 2.1. Die Kalibrierung des Programms wurde mit Hilfe des Größen- und Mengenstandards Smart-Ladder durchgeführt.

Die Reinheit eines DNA-Präparates wurde über den Quotienten E_{260}/E_{280} bestimmt. Die DNA wird als rein bezeichnet, wenn der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegt. Bei niedrigeren Werten liegen Verunreinigungen vor.

2.11 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von DNA wurde diese mit Restriktionsenzymen behandelt. Diese Enzyme schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. In einem Restriktionsansatz (30 μ l) wurden zu der gelösten DNA (0,2 bis 1 μ g) die entsprechende Menge an 10-fach konzentriertem Reaktionspuffer und 1-10 U des jeweiligen Restriktionsenzym pro μ g DNA zugegeben. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad 1 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Soweit nötig wurden die Restriktionsenzyme hitzeinaktiviert (30 min bei 65°C). Die Doppelrestriktion von DNA mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I zur Vorbereitung der Klonierung wurde mit NEB-Puffer (2.4) durchgeführt. Zu 3 μ g DNA wurden je 3 U der beiden Restriktionsenzyme pipettiert und mit NEB-Puffer auf das Reaktionsvolumen von 100 μ l aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 6 h bei 37°C. Nach der Restriktion wurde die DNA über eine Gelextraktion (2.16.2) gereinigt.

2.12 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung, Identifizierung, Isolierung und Reinigung von DNA-Molekülen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist von verschiedenen Faktoren abhängig: dem Molekulargewicht und der Konformation der DNA, der Agarosekonzentration im Gel und der elektrischen Feldstärke. Mit Hilfe des interkalierenden Agens Ethidiumbromid kann die Position der DNA-Fragmente im Agarosegel unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Da die Wanderungsgeschwindigkeit linearer doppelsträngiger DNA im Agarosegel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist, kann man die Größe der Fragmente durch den Vergleich mit Längenstandards bestimmen.

Für die gelelektrophoretische Untersuchung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Gele hergestellt, die 0,7 bzw. 1% Agarose enthielten. Dazu wurde die Agarose in 1-fach TAE-Puffer (2.4) aufgenommen und durch Kochen gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde die Lösung in die Elektrophoresekammer gegeben und erstarrte dort. Die Proben wurden mit 1/6 ihres Volumens mit Probenpuffer (2.4) vermischt und neben dem Längenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C mit einer konstanten Spannung von 1-5 V/cm Elektrodenabstand.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer genommen und für 30 min bei RT in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml in TAE-Puffer) gefärbt, 20 min in H₂O_{deion.} gewässert und anschließend auf dem Transilluminator im UV-Licht ausgewertet. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe einer Digitalkamera.

2.13 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 500 ml LB-Selektionsmedium (2.5) mit 1 ml einer Übernachtskultur der entsprechenden Zellen beimpft. Die Kultur wurde dann bei 37°C auf einem Schüttler (130 UpM) inkubiert. Während der Inkubation wurde im Abstand von 30 min die OD₆₀₀ bestimmt. Bei einem Wert zwischen 0,5 und 0,6 befinden sich die Zellen in der mittleren logarithmischen Phase und haben ihre optimale Kompetenz erreicht. Die Zellen wurden geerntet und dreimal mit 100 ml sterilem H₂O_{deion.} gewaschen (Zentrifugation: 4°C, 10 min, 5500 x g). Abschließend wurden die Zellen in 1 ml sterilem 10%igem (v/v) Glycerin in H₂O_{deion.} aufgenommen und in Aliquots von 40 µl in Eppendorfgläsern bei -80°C eingefroren. Die Zellzahl pro 40 µl betrug ~10¹¹ und die Effizienz lag bei 5 x 10⁸ Transformanten/µg DNA.

2.14 Elektroporation

Für die Elektroporation (DOWER et al., 1988) wurden 40 µl elektrokompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut und 1 bis 2 µl DNA-haltige Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde in eine mit Eis gekühlte Elektroporationsküvette überführt und die Elektroporation durchgeführt (25 µFD, 200 Ω, 2,5 kV). Mit einer sterilen Pasteurpipette wurde der Ansatz in ein ebenfalls steriles Kunststoffröhrchen pipettiert, 500 µl LB-Medium (2.5) zugegeben und 1 h bei 37°C auf einem Schüttler (230 UpM) inkubiert. Je 50, 100, 150 und 200 µl des Ansatzes wurden auf Antibiotika-haltige LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.15 Selektion transformierter Klone

Die Klone wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt, auf frische Antibiotika-haltige LB-Platten (2.5) überimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plasmide wurden mit Hilfe der alkalischen Lyse (2.9.1), Restriktion (2.11) und Agarosegelelektrophorese (2.12) auf das gewünschte Insert hin untersucht.

2.16 Klonierung der Gene *qdo* und *hod*

2.16.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die selektive Anreicherung bestimmter DNA-Bereiche erfolgte *in vitro* mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach SAIKI et al. (1985). Dabei wird entlang ssDNA, ausgehend von einem Primer, von einer DNA-Polymerase der dazu komplementäre Strang synthetisiert.

Zunächst wird die dsDNA-Matrize (Template-DNA) durch Hitzebehandlung (95°C) denaturiert und es entstehen zwei Einzelstränge. Im zweiten Schritt (Annealing) lagern sich bei niedriger Temperatur (40-65°C) die beiden Primer, welche die zu amplifizierende DNA-Sequenz einrahmen, an den entsprechenden Einzelstrang an. Im dritten Schritt (Elongation) synthetisiert die DNA-Polymerase den zu dem Einzelstrang komplementären Strang und es entstehen Doppelstränge des zu amplifizierenden DNA-Bereiches. Das Wiederholen der drei Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation führt zur exponentiellen Zunahme der gewünschten DNA-Sequenz.

2.16.1.1 Konstruktion der Primer

Anhand der bekannten Sequenzen der Gene *qdo* (EMBL-Zugangsnummer Y14779.2) und *hod* (EMBL-Zugangsnummer Y14778) einschließlich ihrer flankierenden Bereiche wurden für die Amplifikation geeignete Primer konstruiert.

Bezeichnung	Sequenz
qdo-left	5'-TCATGGTACCGGATCCATGCAATCGTTGAATGTGAACGGCACCC-3'
qdo-right	5'-TTAATCCCGGGTCGACCAGTACTCAGGCCTGCAGGAATTCGCG-3'
hod-left	5'-TCATGGTACCGGATCCATGACCGACACATATCTGCATGAAACGC-3'
hod-right	5'-TTAATCCCGGGTCGACGGGAAGTTACTGGCCTTGGCGGATTGCC-3'

Die unterstrichenen Bereiche der Primersequenzen kennzeichnen die eingefügten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen (qdo-left und hod-left: *Bam*HI; qdo-right und hod-right: *Sal*I), die eine gerichtete Klonierung der Gene in den

Expressionsvektor pQE-50 (2.8.1) gewährleisten. Stromaufwärts folgen inhomologe Bereiche, die jeweils eine weitere Restriktionsschnittstelle (qdo-left und hod-left: *KpnI*; qdo-right und hod-right: *SmaI*) und 4 bzw. 5 zusätzliche Nukleotide besitzen.

Die homologen 3'-Bereiche der Primer (Fettdruck) waren zu folgenden Sequenzabschnitten der Gene *qdo* bzw. *hod* komplementär:

Bezeichnung	Gen	Sequenzabschnitt (nach EMBL-Datenbank)
qdo-left	<i>qdo</i>	-3 bis 28
qdo-right	<i>qdo</i>	795-775 und weitere 6 Nukleotide stromaufwärts
hod-left	<i>hod</i>	0-28
hod-right	<i>hod</i>	831-810 und weitere 7 Nukleotide stromaufwärts

Die erwarteten Fragmentgrößen der PCR-Produkte betragen 823 bp für das *qdo*-Gen und 861 bp für das *hod*-Gen.

2.16.1.2 Amplifikation der Gene *qdo* und *hod*

Die beiden Gene *qdo* und *hod* wurden mit *Pfu*-DNA-Polymerase amplifiziert. Als Template-DNA dienten die Vektoren pQE-30::*qdo* und pQE-30::*hod*, die nach 2.9.3 präpariert wurden. Damit die Exonucleaseaktivität der *Pfu* nicht zu einer Degradierung der Primer führte, wurden je zwei Mastermixes für die *qdo*- und *hod*-Amplifizierung auf Eis präpariert. Direkt vor dem Start der PCR wurden die Lösungen zu 50 µl-Ansätzen in PCR-Tubes gemischt und in das Gerät eingesetzt. Die Mastermixes setzten sich wie folgt zusammen:

Mastermix 1 *qdo*:

0,5 µl	Primer qdo-left	(1 µM im Ansatz)
0,5 µl	Primer qdo-right	(1 µM im Ansatz)
1,0 µl	Nukleotid-Mix	(200 µM im Ansatz)
4,0 µl	Template-DNA	(200 ng im Ansatz)
19 µl	H ₂ O _{bidest.}	

Mastermix 2 *qdo*:

5,0 µl	10-fach Polymerase-Puffer
1,0 µl	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)
19 µl	H ₂ O _{bidest.}

Mastermix 1 *hod*:

2,5 µl	Primer hod-left	(1 µM im Ansatz)
--------	-----------------	------------------

2,5 µl	Primer hod-right	(1 µM im Ansatz)
1,0 µl	Nukleotid-Mix	(200 µM im Ansatz)
1,0 µl	Template-DNA	(200 ng im Ansatz)
18 µl	H ₂ O _{bidest.}	

Mastermix 2 *hod*: entspricht dem Mastermix 2 *qdo*.

Die Bedingungen für die PCR richteten sich nach der Annealingtemperatur (sie wird 5-10°C unterhalb des T_m-Wertes des Primerpaares gewählt), dem Temperaturoptimum der *Pfu*-DNA-Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes (Elongationszeit 2 min/kb) (2.16.1.1). Daraus ergaben sich folgende Parametereinstellungen für die Polymerase-Kettenreaktion:

Anzahl der Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Reaktion
1	94	300	Denaturierung
30	94	45	Denaturierung
	58	45	Annealing
	72	110	Elongation
1	72	300	Elongation
1	4	∞	

Nach Ablauf der Reaktion wurden die Ansätze nach 2.16.2 gereinigt oder über Nacht bei -80°C eingefroren.

2.16.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen diente der Reinigung von PCR-Produkten und restringierter DNA und erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kit. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung von DNA an eine Silicamembran in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration (VOGELSTEIN et al., 1979). Alle Verunreinigungen werden durch Waschen der Membran entfernt und die DNA mit Lösungen niedriger Salzkonzentration eluiert. Die verwendeten Puffer und Materialien wurden dem von Qiagen erworbenen Kit entnommen.

Die DNA wurde nach der PCR (2.16.1) bzw. der Doppelrestriktion (2.11) auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt (2.12) und die Banden mit einem Skalpell herausgeschnitten. Das Gelstück wurde gewogen, in ein Eppendorfgefäß überführt, mit drei Volumina Puffer QG (1 g Gel \approx 1 ml) bei 50°C im Wasserbad gelöst und dabei einige Male gemischt. Nachdem sich das Gel vollständig gelöst hatte, wurde zum Ansatz ein Gelvolumen Isopropanol gegeben und vorsichtig gemischt. Die DNA-haltige Lösung wurde auf eine Qiagen-Säule mit Silicagel pipettiert und diese eine Minute bei 4°C und 14.000 x g zentrifugiert. Um die an das Silicagel gebundene DNA zu waschen, wurde die Säule zunächst mit 0,5 ml Puffer QG und anschließend mit 0,75 ml Puffer PE mittels Zentrifugation (je 1 min, 4°C, 14.000 x g) gespült. Es folgte eine weitere Zentrifugation (je 1 min, 4°C, 14.000 x g), um den restlichen Puffer zu entfernen, bevor die DNA mit 50 μ l Puffer EB oder sterilem H₂O_{deion.} durch Zentrifugation eluiert und in einem sterilen Eppendorfgefäß aufgefangen wurde.

2.16.3 Ligation

Die Verknüpfung der Gene *qdo* bzw. *hod* mit dem linearisierten Vektor pQE-50 erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Die Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 3'-OH Ende und einem 5'-Phosphatende doppelsträngiger DNA-Moleküle in Gegenwart von ATP und Mg²⁺-Ionen.

Für die Ligation wurde nach 2.11 restringierte und über Agarosegelelektrophorese (2.12, 2.16.2) gereinigte DNA eingesetzt, deren Konzentration nach 2.10 bestimmt wurde. Es wurde ein molares Verhältnis Vektor- zu Insert-DNA von 1:2 gewählt. Für einen 30 μ l Ansatz wurden die entsprechenden Mengen Vektor- und Insert-DNA, 10-fach Reaktionspuffer, Ligase (5 U/Ansatz) und H₂O_{deion.} in ein Reaktionsgefäß pipettiert, vorsichtig gemischt und der Ansatz 48 h bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Ligation durch Erwärmen auf 65°C für 10 min gestoppt. Der Ligationsansatz wurde direkt zur Transformation (2.14) verwendet.

2.17 Ortsspezifische Mutagenese

Mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese kann man Aufschlüsse über die Beziehung zwischen Struktur und Funktion von Proteinen erhalten. Durch Punktmutationen werden bestimmte Aminosäuren eines Proteins ausgetauscht und

nach der Expression des daraus resultierenden Enzyms wird dessen Aktivität untersucht.

Bei der hier angewendeten Methode der ortsspezifischen Mutagenese dient doppelsträngige Plasmid-DNA direkt als Template (BRAMAN et al., 1996). Für die Mutation wird ein zueinander komplementäres Primerpaar benötigt, welches in der zentralen Position die Mutation trägt. Während der PCR hybridisieren die Primer an die Template-DNA und werden durch die DNA-Polymerase verlängert. Um die parentale nichtmutierte DNA zu entfernen, wird der PCR-Ansatz nach der Reaktion mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* (Zielsequenz: 5'-GA^{m6}TC-3') restringiert. Fast alle *E. coli*-Stämme (auch die für diese Arbeit verwendeten (2.6)) enthalten die Dam-Methylase, welche die Adeninbasen der DNA methyliert. Da die auf diese Weise methylierte DNA durch *DpnI* verdaut wird, bleibt nur die gewünschte mutierte DNA übrig.

2.17.1 Konstruktion der Primer

Aus multiplen Alignments (2.18) der Qdo-Aminosäuresequenz mit Proteinen, deren Struktur aufgeklärt ist oder die deutliche Homologien aufweisen, wurden Aminosäuren ausgewählt, die eventuell eine Rolle im Katalysemechanismus spielen. Verschiedene Serin- und Aspartatreste und ein Histidin wurden gegen das ungeladene Alanin, ein Serin gegen das stärker nukleophile Cystein und ein Histidin gegen das ungeladene Phenylalanin ausgetauscht. Da alle drei Aminosäuren im Vergleich zu den ursprünglichen kleiner oder ähnlich groß sind, sollte die sterische Hinderung im aktiven Zentrum des Enzyms möglichst gering sein.

Das Triplet der auszutauschenden Aminosäure wurde so verändert, daß möglichst wenig Basen ersetzt wurden. Desweiteren wurde der Codongebrauch von *E. coli* berücksichtigt. Die Tab. 1 zeigt die ursprünglichen und die veränderten Codons sowie die daraus resultierenden Proteinvarianten. Alle Mutationen wurden am Gen der His₆Qdo durchgeführt

Tab. 1: Ortsspezifische Mutagenese des Gens für das Protein His₆Qdo. Aufgeführt sind die durchgeführten Mutationen der entsprechenden Codons und die daraus resultierenden Proteinvarianten. Fettdruck: Eingeführte Punktmutation.

Ursprüngliche AS	Original-Codon	mutiertes Codon	Eingeführte AS	Proteinvariante
Serin 28	AGT	GCT	Alanin	S28A
Cystein 31	TGC	GCC	Alanin	C31A
Serin 93	TCC	GCC	Alanin	S93A
Threonin 94	ACC	GCC	Alanin	T94A
Serin 95	TCC	GCC	Alanin	S95A
Serin 95	TCC	TGC	Cystein	S95C
Histidin 96	CAC	TTC	Phenylalanin	H96F
Cystein 98	TGT	GCT	Alanin	C98A
Aspartat 120	GAC	GCC	Alanin	D120A
Serin 213	TCG	GCG	Alanin	S213A
Glutamin 214	CAA	GCA	Alanin	Q214A
Serin 217	TCC	GCC	Alanin	S217A
Aspartat 219	GAC	GCC	Alanin	D219A
Histidin 244	CAC	GCC	Alanin	H244A
Serin 93/Serin95	TCC/TCC	GCC/GCC	Alanin	S93A+S95A
Threonin94/Serin 95	ACC/TCC	GCC/GCC	Alanin	T94A+S95A
Serin 95/Cystein 98	TCC/TGT	GCC/GCT	Alanin	S95A+C98A

Für die Einführung der Mutationen wurden folgende Primerpaare verwendet (das veränderte Triplett ist unterstrichen):

His₆Qdo-S28A

S28A-f	5'-CTGTTTCTGCTC <u>GCT</u> GGCTGGTGCCAG-3'
S28A-r	5'-CTGGCACCAGCC <u>AGCG</u> GAGCAGAAACAG-3'
<u>His₆Qdo-C31A</u>	
C31A-f	5'-CTCAGTGGCTGG <u>GCCC</u> AGGACCATCGC-3'
C31A-r	5'-GCGATGGTCCTGG <u>GCCC</u> AGCCACTGAG-3'
<u>His₆Qdo-S93A</u>	
S93A-f	5'-TTCCAAATGGTC <u>GCC</u> ACCTCCCACGGC-3'
S93A-r	5'-GCCGTGGGAGGT <u>GCG</u> ACCATTTGGAA-3'
<u>His₆Qdo-T94A</u>	
T94A-f	5'-CAAATGGTCTCC <u>GCC</u> TCCCACGGCTGT-3'
T94A-r	5'-ACAGCCGTGGG <u>AGCG</u> GAGACCATTTG-3'
<u>His₆Qdo-S95A</u>	
S95A-f	5'-ATGGTCTCCAC <u>CGCC</u> ACGGCTGTTGG-3'
S95A-r	5'-CCAACAGCCGTGG <u>GCG</u> GTGGAGACCAT-3'
<u>His₆Qdo-S95C</u>	
S95C-f	5'-ATGGTCTCCAC <u>CTG</u> CCACGGCTGTTGG-3'
S95C-r	5'-CCAACAGCCGTGG <u>CAG</u> GTGGAGACCAT-3'
<u>His₆Qdo-H96F</u>	
H96F-f	5'-GTCTCCACCTC <u>CTTC</u> GCGCTGTTGGGTG-3'
H96F-r	5'-CACCCAACAGCC <u>GAAG</u> GAGGTGGAGAC-3'
<u>His₆Qdo-C98A</u>	
C98A-f	5'-ACCTCCCACGGC <u>GCT</u> TGGGTGAACATT-3'
C98A-r	5'-AATGTTACCCA <u>AGCG</u> CCGTGGGAGGT-3'
<u>His₆Qdo-D120A</u>	
D120A-f	5'-ACCATCGTCATC <u>GCC</u> TGGCTGCTGCAACCG-3'
D120A-r	5'-CGGTTGCAGCAGCC <u>AGGC</u> GATGACGATGGT-3'
<u>His₆Qdo-S213A</u>	
S213A-f	5'-TGCCACATCTAC <u>GCG</u> CAACCCCTTTCC-3'
S213A-r	5'-GGAAAGGGGTTG <u>GCG</u> GTAGATGTGGCA-3'
<u>His₆Qdo-Q214A</u>	
Q214A-f	5'-CACATCTACTCG <u>GCA</u> CCCCTTTCCCAG-3'
Q214A-r	5'-CTGGGAAAGGGG <u>TGCC</u> GAGTAGATGTG-3'

His₆Qdo-S217AS217A-f 5'-TCGCAACCCCTTGCCCCAGGACTACCGC-3'S217A-r 5'-GCGGTAGTCCTGGGCAAAGGGGTTGCGA-3'His₆Qdo-D219AD219A-f 5'-CCCCTTTCCAGGCCTACCGCCAGCTAC-3'D219A-r 5'-GTAGCTGGCGGTAGGCCTGGGAAAGGGG-3'His₆Qdo-H244AH244A-f 5'-CCGGGACGGACCGCCTTCCTTCCCTG-3'H244A-r 5'-CAGGGAAGGAAGGCGGTCCGTCCCGG-3'His₆Qdo-S93A/S95AS93A/S95A-f 5'-TTCCAAATGGTCGCCACCGCCCACGGCTGTTGG-3'S93A/S95A-r 5'-CCAACAGCCGTGGGCGGTGGCGACCATTTGGAA-3'His₆Qdo-T94A/S95AT94A/S95A-f 5'-CAAATGGTCTCCGCCGCCACGGCTGTTGG-3'T94A/S95A-r 5'-CCAACAGCCGTGGGCGGCAGAGACCATTTG-3'His₆Qdo-S95A/C98AS95A/C98A-f 5'-ATGGTCTCCACCGCCACGGCGCTTGGGTGAACATT-3'S95A/C98A-r 5'-AATGTTACCCAAGCGCCGTGGGCGGTGGAGACCAT-3'

Die Berechnung der Schmelztemperatur der Primer erfolgte nach der Formel

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - \frac{675}{N} - \%Fehler$$

mit T_m als Schmelztemperatur, N als Anzahl der Basenpaare und Fehler als Anzahl der ausgetauschten Basen. T_m sollte einen Wert $\geq 78^\circ\text{C}$ haben.

2.17.2 Mutagenese mittels PCR

Für die Einführung der Punktmutationen mittels PCR wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. Als Template-DNA diente nach 2.9.2 isolierter Vektor pQE-30::*qdo*. Da der Vektor aus dem Stamm *E. coli* M15pREP4 (2.6) isoliert

wurde, enthielt das Eluat auch den Vektor pREP4 (2.6). Durch die Restriktion (2.11) mit *ClaI* wurde dieser Vektor vor der PCR verdaut.

Zwei Mastermixes wurden auf Eis pipettiert und direkt vor dem Start der Reaktion in ein PCR-Tube pipettiert. Die Mastermixes setzten sich wie folgt zusammen:

Mastermix 1:

0,25 µl	Primer f	(1 µM im Ansatz)
0,25 µl	Primer r	(1 µM im Ansatz)
0,5 µl	Nukleotid-Mix	(200 µM im Ansatz)
1,0 µl	Template-DNA	(25 ng im Ansatz)
11 µl	H ₂ O _{bidest.}	

Mastermix 2:

2,5 µl	10-fach Polymerase-Puffer
0,5 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase (5 U/µl)
9 µl	H ₂ O _{bidest.}

Die Annealingtemperatur mußte für unterschiedliche Primerpaare variiert werden und die Temperatur für die Elongation richtete sich nach dem Optimum der Polymerase. Für die Berechnung der Elongationszeit wurden die Länge des Vektors ($\approx 4,5$ kb) und die Geschwindigkeit der *Pfu* (1 kb/min) berücksichtigt. Die Parameter der PCR wurden wie folgt gewählt:

Anzahl der Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Reaktion
1	95	30	Denaturierung
16	95	30	Denaturierung
	55-60	60	Annealing
	72	540	Elongation

Nach der PCR wurden 0,5 µl *DpnI* (10 U/µl) zum Ansatz gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend konnte das PCR-Produkt ohne weitere Reinigungsschritte direkt bei der Transformation (2.17.3) eingesetzt werden.

2.17.3 Transformation CaCl₂-kompetenter Zellen

Die Transformation superkompetente *E. coli* XL1-Blue der Firma Stratagene erfolgte mit mutierten Plasmiden. Dazu wurden zunächst 50 µl Zellsuspension

langsam auf Eis aufgetaut und in ein vorgekühltes steriles Kunststoffröhrchen überführt. Nach der Zugabe von 2 µl der mit *DpnI* restringierten DNA (2.17.2) wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert, dann im Wasserbad 45 s auf 42°C erwärmt und nochmals für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 500 µl auf 42°C vorgewärmtes NZY-Broth (2.5) zum Ansatz pipettiert und dieser bei 37°C für 1 h auf einem Schüttler (230 UpM) inkubiert. Die Zellsuspension wurde in verschiedenen Volumina (50, 100, 150 und 200 µl) auf Ampicillin-haltige LB-Platten (2.5) ausplattiert und über Nacht bei 31°C inkubiert.

2.18 Computeranalysen von Aminosäuresequenzen

Die Datenbanksuche und die binären Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm BLAST durchgeführt (ALTSCHUL et al., 1990). CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994) aus dem Programmpaket HUSAR 4.0 des EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg) diente zur Anfertigung multipler Alignments. Sekundärstrukturvorhersagen wurden mit dem Programm PredictProtein (ROST & SANDER, 1994) durchgeführt.

Der theoretische pI der His₆Qdo wurde mit dem Programm PROTPARAM des ExpASY (Expert Protein Analysis System) Molecular Biology Server berechnet (<http://www.expasy.ch/>).

2.19 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach einer von ZOR & SELINGER (1996) modifizierten Methode nach BRADFORD (1976). Dabei wird neben der Entstehung des blauen Protein-Farbstoff-Komplexes (Absorption bei 590 nm) auch die Abnahme des freien Farbstoffes (Absorption bei 450 nm) gemessen und der Quotient A_{590}/A_{450} gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Neben der Linearisierung der Beziehung zwischen Absorption und Proteinkonzentration wird durch diese Modifikation der ursprünglichen Methode auch die Sensitivität der Bestimmung verbessert.

0,8 ml BRADFORD-Reagenz (2.4) wurden mit 0,2 ml Proteinlösung in einem Reaktionsgefäß gemischt. Nach 10 min wurde die Probe in eine Küvette pipettiert und die Absorptionen bei 590 und 450 nm gemessen. Als Standard diente RSA.

2.20 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration diente zum Einengen, Waschen und Umpuffern von Qdo und Hod. Dazu wurden die Filtrationseinheiten VIVASPIN 4 und 15 verwendet.

2.21 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes werden mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) geladene Moleküle getrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle hängt von der Feldstärke und der elektrophoretischen Beweglichkeit ab. Die native und die SDS-PAGE wurden zur Überprüfung der Reinheit und der Molekülmasse der Qdo und Hod eingesetzt.

2.21.1 SDS-PAGE

Bei dieser Methode nach LAEMMLI (1970) werden die Proteine in der Polyacrylamidmatrix nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese zunächst 1:6 mit einem Gemisch aus SDS-Probenpuffer (2.4) und Mercaptoethanol (85/15) versetzt und zum vollständigen Denaturieren der Proteine 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf ein 10%iges SDS-Gel (10% T, 3% C im Trenngel) mit einer Schichtdicke von 0,7 mm bzw. 1 mm aufgetragen. Dabei beschreibt T die Gesamtkonzentration der beiden Monomere Acrylamid und Bisacrylamid und C die Konzentration des Bisacrylamid bezogen auf die Gesamtkonzentration T. Zur Größenbestimmung wurden Protein-Größenstandards verwendet.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel über Nacht in Coomassie-Färbelösung (2.4) gleichzeitig gefärbt und fixiert und am nächsten Tag mit der Entfärbelösung (2.4) entfärbt.

2.21.2 Native PAGE

Die analytische diskontinuierliche PAGE unter nativen Bedingungen wurde nach HAMES & RICKWOOD (1990) durchgeführt. Die Trennung der Proteine ist bei dieser Methode abhängig von der Ladung und der Molekülmasse.

Die Proben wurden mit 1 µl des nativen Probenpuffers (2.4) und wenig Saccharose versetzt. Danach wurden sie auf das Gel aufgetragen. Es wurden 0,7

bis 1 mm starke 10%ige native Gele (10% T, 3% C im Trenngel) und das „High-pH discontinuous“-Puffersystem verwendet. Die Färbung der Gele erfolgte wie unter 2.21.1 beschrieben.

2.22 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Mit dieser Technik werden Proteine nach ihrer Nettoladung getrennt. Dazu wird eine Mischung aus zwitterionischen Verbindungen (Ampholyte) auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Im elektrischen Feld verteilen sich die Ampholyte gemäß ihrer isoelektrischen Punkte (pI) und es entsteht ein pH-Gradient. Wird diesem System ein Protein zugesetzt, wandert es ebenfalls durch das elektrische Feld und wird an seinem pI konzentriert.

Für die IEF wurden 4%ige Polyacrylamidgele (4% T, 0,1% C) mit einer Schichtdicke von 0,5 mm auf eine Trägerfolie gegossen, mit H₂O_{deion.} und 2% Glycerin gewaschen und über Nacht bei 50°C getrocknet. Zum Anlegen des pH-Gradienten (pH 3-10 bzw. pH 5-7) wurde das Gel mit einer Ampholytlösung (2,5% v/v Ampholyte, 10% w/v Sorbit) 1 h rehydratisiert. Nach dem Entfernen der Ampholytlösung wurde das Gel mit der Trägerfolie nach unten auf die Kühlplatte der Elektrophoreseeinheit gelegt. Bei einer Temperatur von 10°C wurde zunächst eine Vorfokussierung unter Verwendung der entsprechenden Elektrodenlösungen (2.4) durchgeführt (2000 V, 14 mA, 14 W, 30 min), bei der sich die Ampholyte entsprechend ihres pI anordnen. Anschließend wurden die Proteinproben aufgetragen und fokussiert (10°C, 2000 V, 14 mA, 14 W, 90-120 min). Zur Bestimmung des pI wurde ein IEF-Standard verwendet.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung (2.4) 1 h fixiert und gefärbt, mit Entfärbelösung (2.4) entfärbt, mit H₂O_{deion.} und 10% Glycerin gewaschen und über Nacht bei RT getrocknet.

2.23 Bestimmung der Enzymaktivitäten

2.23.1 Enzymtest für die 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase

Zur Aktivitätsbestimmung der Qdo und ihrer Varianten wurde am Spektralphotometer bei 337 nm der Verbrauch des Substrates 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin gemessen (BAUER, 1995).

Testansatz: 980 µl Puffer A (2.4)

10 µl Enzymlösung

10 µl 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin (10 mM in Ethanol)

Die Reaktion wurde mit Substrat gestartet. Die Messung erfolgte bei RT. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte unter Berücksichtigung des Extinktionkoeffizienten des Substrates: $\epsilon_{337\text{nm}} = 10.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Volumenaktivität wurde wie folgt errechnet:

$$\frac{U}{\text{ml}} = \frac{\Delta E}{\text{min}} \times \frac{1}{\epsilon \times d} \times \frac{V_{\text{Kivette}}}{V_{\text{Probe}}}$$

2.23.2 Enzymtest für die 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase

Im Rahmen der His₆Hod-Reinigung (2.26) wurde die Aktivität wie unter 2.23.1 mit dem Qdo-Substrat bestimmt. Die Aktivität mit diesem Substrat beträgt nach BAUER (1995) 20% bezogen auf die Aktivität der Hod mit dem Substrat 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin.

2.24 Züchtung von Expressionsklonen

Zur Anzucht der Klone *E. coli* M15[pREP4] wurde LB-Selektionsmedium (2.5) mit Ampicillin und Kanamycin verwendet. Eine 100 ml Vorkultur wurde mit 1 ml einer Übernachtskultur beimpft. Während der Inkubation bei 37°C wurde im Abstand von 30 min die OD₆₀₀ gemessen. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,6 wurde die gesamte Vorkultur in die 700 ml Hauptkultur überführt. Nach der Zugabe von IPTG (2.4) wurde weitere 16 h bei 20°C auf einem Schüttler inkubiert und anschließend geerntet (4°C, 5500 x g, 20 min). Die Zellen wurden entweder sofort nach 2.25.1 weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

Erfolgte die Anzucht der Klone *E. coli* M15[pREP4] im kleinen Maßstab zur Überprüfung der Induktion, so wurden zunächst aus einer 10 ml Übernachtskultur der in LB-Selektionsmedium (2.5) 0,5 ml in 10 ml frisches Medium überführt. Bei 37°C wurde ca. 30 min inkubiert. Sobald die OD₆₀₀ einen Wert von 0,5-0,7 erreicht hatte, wurde IPTG-Stammlösung (2.4) bis zu einer Endkonzentration von

1 mM im Medium zugegeben und die Zellen weitere 4-5 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (1 min, 15.000 x g), das Pellet in 400 µl Puffer A (2.4) resuspendiert und sofort nach 2.25.2 weiterverarbeitet.

2.25 Zellaufschluß

2.25.1 Zellaufschluß mit Ultraschall

Zunächst wurden X g Zellen in 5 x X ml Puffer A (2.4) suspendiert und in ein Aufschlußgefäß überführt. Der Aufschluß durch Ultraschall erfolgte bei 0°C (Stufe 7, 50% Intervalle, 15 min). Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (4°C, 48000 x g, 40 min) und der Überstand (Rohextrakt) weiterverarbeitet.

2.25.2 Zellaufschluß mit Lysozym

Die nach 2.24 im kleinen Maßstab gezüchteten und in Puffer A (2.4) suspendierten Zellen wurden unter nativen Bedingungen aufgeschlossen. Dazu wurde der Ansatz mit Lysozym in einer Endkonzentration von 1 mg/ml versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellabfall wurde abzentrifugiert (4°C, 20000 x g, 20 min), der Rohextrakt in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und mittels Enzymtests (2.23) und SDS-PAGE untersucht.

2.26 Reinigung der His₆Qdo, ihrer Varianten und der His₆Hod aus *E. coli* M15[pREP4] pQE-30::*qdo* bzw. -pQE-30::*hod*

2.26.1 Metallchelat-Affinitätschromatographie an Ni-NTA Superflow

Die Reinigung wurde in Anlehnung an MAX (1997) durchgeführt, jedoch im Detail verbessert.

6 ml des Ni-NTA Superflow (50%ige Suspension in 20%igem Ethanol) wurden mit 10 mM Imidazol in Puffer A (2.4) äquilibriert und zum Rohextrakt (2.25.1) pipettiert. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4°C langsam rotiert. Das Ni-NTA Superflow wurde in eine Econo-Säule gepackt und diese an das Biologic-System angeschlossen.

Um ungebundene Fremdproteine von der Säule zu entfernen, wurde diese zunächst mit 10 mM Imidazol in Puffer A gespült (Flußrate: 0,5 ml/min), bis die $A_{280} \leq 0,1$ war. Schwach gebundene Proteine wurden mit 3 Bettvolumina 20 mM Imidazol und 2 Bettvolumina 50 mM Imidazol (jeweils in Puffer A) mit einer Flußrate von 0,5 ml/min von der Säule gespült. Das Fusionsprotein wurde anschließend mit einem linear aufsteigenden Gradienten von 50 mM bis 300 mM Imidazol in Puffer A über 32 ml eluiert und in Fraktionen zu 1 ml gesammelt.

Die Fraktionen mit Enzymaktivität (2.23) wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (2.20) eingeengt. Das Protein wurde aliquotiert und entweder sofort in weiteren Versuchen eingesetzt oder bei -80°C eingefroren.

2.26.2 Anionenaustauschchromatographie an UNO Q

Für Kristallisationsversuche wurden His₆Hod und His₆Qdo in einem zweiten Schritt über eine Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Dazu wurde der eingeengte Pool aus 2.26.1 auf eine mit Puffer A (2.4) äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 1 Bettvolumen 0,1 M KCl in Puffer A gespült, um schwach gebundene Proteine zu entfernen. Mit einem linear aufsteigenden Gradienten von 0,1 bis 0,4 M KCl in Puffer A über 4 Bettvolumina wurde das Protein desorbiert und in Fraktionen zu 0,5 ml gesammelt. Die Flußrate betrug für alle Schritte 1 ml/min. Fraktionen mit Enzymaktivität (2.23) wurden vereinigt, nach 2.20 mit Puffer A gespült, eingeengt und in Aliquots bei -80°C eingefroren.

2.27 Reinigung der Qdo und Hod aus *E. coli* M15[pREP4] pQE-50::*qdo* bzw. -pQE-50::*hod*

Die Reinigung der Enzyme Qdo und Hod aus den Klonen *E. coli* M15[pREP4] pQE-50 erfolgte mit den unten beschriebenen Reinigungsschritten mit Hilfe des Biologic System. Während die Abfolge der Chromatographien für beide Enzyme gleich war, wurde die Durchführung variiert.

2.27.1 Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel

Der Rohextrakt wurde auf eine mit Puffer A (2.4) äquilibrierte Econo-Säule (1 x 10 cm) mit DEAE-Sephacel (5 ml Bettvolumen) aufgetragen. Zunächst wurde sie mit Puffer A gespült (1 ml/min), bis die Absorption bei 280 nm $\leq 0,1$ war. Der Spülvorgang wurde mit 0,1 M KCl in Puffer A wiederholt (1 ml/min). Mit einem linear aufsteigenden Gradienten von 0-0,4 M (Qdo) bzw. 0,1-0,4 M (Hod) KCl in

Puffer A über 50 ml mit einer Flußrate von 1 ml/min wurde das jeweilige Enzym eluiert und in Fraktionen zu 2 ml gesammelt. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, durch Ultrafiltration (2.20) eingengt und mit Puffer A gespült.

2.27.2 Adsorptionschromatographie an Hydroxyapatit

Eine mit Hydroxyapatit gepackte Econo-Säule (1 x 10 cm, 5 ml Bettvolumen) wurde zunächst mit Puffer B (2.4) äquilibriert. Der Pool aus 2.27.1 wurde aufgetragen und die Säule anschließend mit Puffer B gespült (1 ml/min), bis A_{280} konstant war. Es folgte bei der Qdo-Reinigung ein Spülschritt mit Puffer D (2.4) und bei der Hod-Reinigung ein linear aufsteigender Kaliumphosphat-Gradient (Puffer B bis Puffer C (2.4), 30 ml, 1 ml/min). Die Fraktionsgröße betrug 1 ml. Die Fraktionen mit Enzymaktivität wurden eingengt und mit Puffer A gespült (2.4).

2.27.3 Anionenaustauschchromatographie an UNO Q

Der Pool aus der Hydroxyapatit-Chromatographie wurde auf eine mit Puffer A (2.4) äquilibrierte Säule (6 ml Bettvolumen) aufgetragen. Die Durchführung dieser Chromatographie erfolgte wie unter 2.26.2 beschrieben mit den Gradienten 0,1-0,4 M (Qdo) bzw. 0-0,4 M (Hod) KCl in Puffer A. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, mit Puffer A gewaschen (2.20) und auf 0,35 ml eingengt.

2.27.4 Gelfiltration an Bio-Prep 1000/17

Die mit Puffer A (2.4) äquilibrierte Säule wurde mit dem Pool aus 2.27.3 beladen. Bei einer Flußrate von 0,5 ml/min wurden die Proteine entsprechend ihrer Größe getrennt und in Fraktionen zu 0,5 ml gesammelt. Der Pool der aktiven Fraktionen wurde mittels Ultrafiltration (2.20) eingengt und in Aliquots bei -80°C eingefroren.

2.28 Untersuchungen zur Homogenität der His₆Qdo

Da alle zu kristallisierenden Proteine in einer homogenen Lösung vorliegen müssen, wurde die His₆Qdo auf eventuell vorhandene Verunreinigungen und Aggregatbildung untersucht.

2.28.1 Stabilisierung der His₆Qdo

Um die Qdo für die Kristallisation zu stabilisieren, wurde das Enzym in verschiedenen Puffern und in Gegenwart verschiedener Additive gelagert. Wichtigster Gesichtspunkt war dabei die Vermeidung der Aggregatbildung bei hohen Enzymkonzentrationen.

Die Reduktionsmittel DTT und TCEP (Endkonzentration jeweils 1-10 mM) sowie das Detergenz Octyl-β-D-glucopyranosid (0,1-0,5% v/w) wurden sowohl separat als auch in Kombination in Puffer A (2.4) eingesetzt. Die Proteinkonzentration betrug 5 mg/ml. Das Protein wurde direkt nach der Additiv-Zugabe und nach Lagerung bei -80°C, -20°C, 4°C und 25°C mittels nativer PAGE (2.21.2) untersucht. Der Einfluß der Reduktionsmittel auf die Aktivität des Enzyms wurde im Standardenzymtest (2.23.1) untersucht. In einem weiteren Versuch wurden der Zellaufschluß (2.25.1) und die Reinigung der His₆Qdo (2.26) in Gegenwart von 1 mM DTT in allen Puffern durchgeführt. Der Pool nach jeder Säule wurde ebenfalls mittels nativer PAGE untersucht.

Die Verwendung der Good-Puffer HEPES, HEPPSO und POPSO (50 mM) wurde ebenfalls untersucht. Die His₆Qdo wurde nach der Reinigung (2.26) eingeeengt (2.20) und in den Puffern aufgenommen (5 mg/ml). Die Enzymlösungen wurden bei 4 bzw. 25°C aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen gelelektrophoretisch untersucht.

Der Proteasehemmer-Mix CompleteTM wurde nach Herstellerangaben in Puffer A und in HEPES-Puffer gelöst. His₆Qdo wurde in den beiden Lösungen aufgenommen (10 mg/ml) und wie oben beschrieben gelagert und ausgewertet.

2.28.2 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchung der His₆Qdo diente der Überprüfung der Reinheit und der Feststellung der Molekularmasse und erfolgte mittels MALDI-TOF. Die His₆Qdo wurde dazu in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in 0,03 M Ammoniumcarbonat-Puffer pH 8,1 mit 1 mM DTT und 0,5% Octyl-β-D-glucopyranosid gelöst. Als Trägermatrix diente ein Gemisch der Substanzen 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure, Trifluoressigsäure und Acetonitril.

2.28.3 Dynamic Light Scattering

Die zufällige Aggregatbildung eines Proteins kann ein Störfaktor bei der Kristallisation sein (FERRÉ-D'AMARÉ & BURLEY, 1994). Mit der Methode des Dynamic Light Scattering wurde bei der His₆Qdo über die Bestimmung der Molekularmasse das Auftreten von Protein-Aggregaten untersucht.

2.29 Enzym-Kinetik

Zur näheren Charakterisierung der His₆Qdo und ihrer Varianten (2.17) wurden kinetische Untersuchungen der Enzyme mit dem Ziel durchgeführt, nähere Erkenntnisse über die Beteiligung bestimmter Aminosäuren am aktiven Zentrum zu bekommen.

2.29.1 Bestimmung von K_m und k_{cat}

Die Michaelis-Konstante (K_m) gibt die Substratkonzentration [S] an, bei der ein Enzym die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht (DIXON & WEBB, 1979). Dabei gilt die Michaelis-Menten-Gleichung

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{mit } v_0 = \text{Anfangsgeschwindigkeit, } v_{max} = \text{maximale Reaktionsgeschwindigkeit.}$$

Zur Ermittlung des K_m -Wertes und v_{max} wurde der Standard-Enzymtest (2.23) herangezogen und leicht verändert. Die Stammlösung des Substrats wurde 1:10 mit Ethanol verdünnt (1 mM) und im Testansatz wurde die Substratkonzentration zwischen 3 und 50 μ M variiert. Als Enzymmenge wurden 30 bzw. 50 mU gewählt. Die Messungen erfolgten bei RT und es wurden jeweils Vierfach-Messungen durchgeführt. Die Werte wurde in Form eines Lineweaver-Burk-Diagrammes (LINEWEAVER & BURK, 1934) ausgewertet und die Schnittpunkte der Geraden mit den Achsen durch lineare Regression bestimmt.

Die Wechselzahl k_{cat} ist identisch mit der Geschwindigkeitskonstante k_2 (Abb. 6) und läßt sich direkt aus der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit und der eingesetzten Enzymmenge ermitteln:

$$v_{\max} = k_2 \cdot e \quad \text{mit } e = \text{eingesetzte Enzymmenge in mol.}$$

2.29.2 Detektion ionisierbarer Gruppen

Die katalytische Effizienz eines Enzyms beruht auf der Fähigkeit einer Komplexbildung mit dem Substrat (Michaelis-Menten-Komplex). Diese Komplexe können Wechselwirkungen zwischen freien ionisierbaren Aminosäureseitenketten des Enzyms mit dem Substratmolekül beinhalten. Die Aktivität eines Enzyms ist pH-abhängig. Dieser Effekt kann unter anderem auf die pH-Abhängigkeit des Dissoziationsgrades einer für die Katalyse essentiellen ionisierbaren Gruppe im aktiven Zentrum zurückzuführen sein. In der Abb. 6 ist der Grundmechanismus mit zwei für die Katalyse essentiellen Aminosäureresten dargestellt. Nur ein Dissoziationszustand des Proteins (HE^-) kann die Umsetzung des Substrates katalysieren.

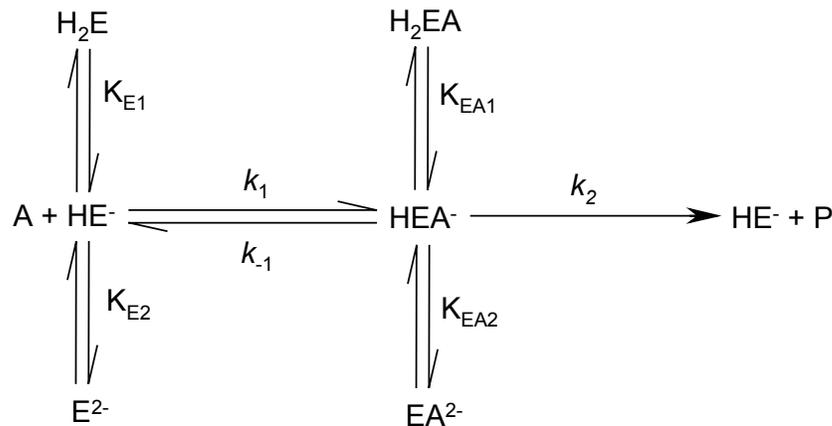


Abb. 6: Verlauf einer enzymkatalysierten Reaktion mit zwei dissoziierbaren Gruppen. Katalytisch aktiv ist nur die einfach protonierte Form des Proteins HE^- .

Im folgenden wird zur Veranschaulichung ein Beispiel angeführt, in dem zwei ionisierbare Gruppen (z.B. Aspartat und Histidin) im aktiven Zentrum eine für die Katalyse essentielle Rolle spielen.

Zur Berechnung des K_m -Wertes wird der Mechanismus zunächst in einen pH-abhängigen und einen pH-unabhängigen Teil getrennt. Der pH-unabhängige Teil K_m' entspricht dem gewöhnlichen Michaelis-Menten-Mechanismus und beinhaltet die von der H^+ -Konzentration unbeeinflussten Konstanten k_1 , k_{-1} und k_2 . Für die

Umsetzung des Substrates beim pH-Optimum gilt die Michaelis-Menten-Gleichung

$$v = \frac{k_2 e_0 a}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + a} = \frac{V' a}{K_m' + a} \quad (1)$$

mit v = Reaktionsgeschwindigkeit, a = Substratkonzentration, e_0 = Enzymkonzentration, V' und K_m' als pH-unabhängige Parameter. Um den Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit und den K_m -Wert zum Ausdruck zu bringen, muß die Gleichung (1) mit den pH-abhängigen Dissoziationskonstanten, bei denen zwischen den Konstanten des freien Enzyms (K_{E1} und K_{E2}) und des Enzym-Substrat-Komplexes (K_{EA1} und K_{EA2}) unterschieden werden muß, erweitert werden. Daraus ergibt sich

$$V = \frac{V'}{\frac{h}{K_{EA1}} + 1 + \frac{K_{EA2}}{h}} \quad (2)$$

und

$$\frac{V}{K_m} = \frac{\frac{V'}{K_m'}}{\frac{h}{K_{E1}} + 1 + \frac{K_{E2}}{h}} \quad (3)$$

mit $h = H^+$ -Konzentration. Das Verhalten von V bei Veränderungen des pH-Wertes zeigt dabei die Ionisierung des Enzym-Substrat-Komplexes und das Verhalten von V/K_m die Ionisierung des freien Enzyms an. Aus den Gleichungen (2) und (3) läßt sich der pH-abhängige K_m -Wert berechnen:

$$K_m = K_m' \cdot \frac{\frac{h}{K_{E1}} + 1 + \frac{K_{E2}}{h}}{\frac{h}{K_{EA1}} + 1 + \frac{K_{EA2}}{h}} \quad (4).$$

Trägt man den negativen dekadischen Logarithmus von K_m (pK_m) gegen den pH-Wert auf, so kann man die vier pH-abhängigen Dissoziationskonstanten K_{E1} , K_{E2} , K_{EA1} und K_{EA2} bestimmen. Der Graph nähert sich einer Reihe von geradlinigen Abschnitten mit einer Steigung von +1, 0 oder -1. Ein Anstieg der Steigung

entspricht dabei einem pK_a -Wert eines essentiellen Aminosäurerestes des freien Enzyms, (pK_{E1} oder pK_{E2}), und eine Abnahme der Steigung entspricht einem pK_a -Wert des Enzym-Substrat-Komplexes (pK_{EA1} oder pK_{EA2}).

Die Detektion ionisierbarer Gruppen der His₆Qdo erfolgte über die Bestimmung des K_m -Wertes (2.29.1) bei verschiedenen pH-Werten. Als Universalpuffer wurde Britton-Robinson-Puffer (2.4) verwendet. Der negative dekadische Logarithmus des K_m -Wertes, der pK_m -Wert, wurde dann nach DIXON & WEBB (1979) gegen den pH-Wert aufgetragen. Dem aus einem Wendepunkt ermittelten pK_s -Wert wurde dann wenn möglich eine Aminosäure zugeordnet.

2.30 Chemische Derivatisierung der His₆Qdo

Die gezielte chemische Modifizierung einzelner Aminosäurereste kann Hinweise auf die für die Enzymfunktion essentiellen Aminosäuren geben. Dazu wird das Protein mit den entsprechenden Reagenzien unter milden Bedingungen (wässrige Lösungen im Neutralbereich) inkubiert. Die Veränderung der Enzymaktivität wird registriert.

Die Substanzen Iodacetamid (1 M in Puffer A; modifiziert Sulfhydryl-Gruppen), PMSF (0,1 M in Ethanol; modifiziert Hydroxyl-Gruppen) und Diethylpyrocarbonat (0,3 M in Ethanol; modifiziert bevorzugt Iminogruppen) wurden auf ihren Einfluß auf die Aktivität der Qdo untersucht. Grundlage war der Standardenzymtest (2.23). Pro 1 ml-Ansatz wurden 0,08 U Enzym mit den Inhibitoren in Endkonzentrationen von 0,1-10 mM inkubiert. Nach 2, 5 und 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von Substrat gestartet und die Aktivität bestimmt. Während der Inkubation mit Diethylpyrocarbonat wurden Lichtabsorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 200-400 nm aufgenommen (MILES, 1977). Als Referenz diente dabei ein Ansatz mit 0,08 U Enzym, 10 µl Ethanol und Puffer A.

Die Reaktion des Diethylpyrocarbonat mit Histidin ist im Gegensatz zur Reaktion mit Tryptophan und Arginin reversibel und kann durch Inkubation mit Hydroxylamin aufgehoben werden. Nach der Zugabe von bis zu 50 mM Hydroxylamin zum Reaktionsansatz mit Qdo und Diethylpyrocarbonat wurde die Enzymreaktion durch Substratzugabe gestartet und die Absorptionsänderung bei 337 nm verfolgt.

2.31 „Chemical Rescue“

LEHOUX & MITRA (1999) zeigten für die (S)-Mandelat-Dehydrogenase, daß die Aktivität der vollständig inaktiven Proteinvarianten H274G und H274A dieses Enzyms durch die Zugabe von Imidazol teilweise wiederhergestellt werden konnte.

In einem Standard-Enzymtest (2.23) wurden 60 µg der nach 2.26 gereinigten Enzymvariante His₆Qdo-H244A (2.17) eingesetzt. Die Enzymaktivität wurde in Gegenwart von 10-500 mM Imidazol bestimmt.

2.32 Effektoren und Spin-Traps

Der Einsatz von verschiedenen Effektoren und Spin-Traps sollte Hinweise darauf geben, ob die enzymkatalysierte Umsetzung von 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin durch die Qdo ein radikalischer Prozess ist.

2.32.1 Einfluß von Effektoren auf die enzymatische Reaktion

Um den Einfluß von Effektoren und Spin-Traps auf die Reaktion der Qdo zu untersuchen, wurde die Enzymaktivität in Gegenwart eines Effektors im Standard-Enzymtest (2.23) gemessen. Dazu wurden Qdo (1,3 µM) und Effektor bzw. Spin-Trap (2.4) in verschiedenen Konzentrationen in einer Quarzküvette gemischt und der Ansatz 10 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit Substrat (100 µM) gestartet. Als Referenz diente der Standard-Enzymtest mit 1,3 µM Qdo und 100 µM Substrat im Ansatz. In Kontrollversuchen mit Effektor und Substrat bzw. Qdo wurde ebenfalls die Absorptionsänderung bei 337 nm gemessen.

2.32.2 Reduktion von Elektronenakzeptoren

Die Entstehung von O₂^{•-} in einer möglichen Nebenreaktionen wurde durch die Reduktion von Elektronenakzeptoren untersucht. Dazu wurden INT (100 µM), NBT (100 µM) oder Cytochrom *c* (10 µM) (2.4) mit Qdo (1µM) oder Substrat (0,5 mM) in Puffer A (2.4) in eine Quarzküvette pipettiert und die Veränderung der Extinktion bei dem entsprechenden Absorptionsmaximum (Cytochrom *c* 550 nm, INT 503 nm, NBT 560 nm) über 5 min gemessen. Wurde eine Reduktion festgestellt, so wurden in einem neuen Ansatz vor der Zugabe des Radikalfängers

600 U SOD zugegeben, um die durch $O_2^{\bullet-}$ verursachte Reduktion zu verhindern. Die Versuche wurden sowohl aerob als auch anaerob unter Helium-Begasung bei RT durchgeführt.

In Kontrollversuchen wurde die mögliche Reduktion von Cytochrom *c* (10 μ M) durch Substrat (0,5 mM) bzw. durch Qdo (1 μ M) untersucht (20 min Inkubation bei RT).

2.33 Basenkatalysierte Umsetzung des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolins

2.33.1 Basenkatalyse mit verschiedenen Katalysatoren

Die chemische Umsetzung des Substrates der Qdo zu N-Formylantranilsäure durch eine Basenkatalyse nach NISHINAGA et al. (1979) wurde mit verschiedenen Basen als Katalysator untersucht.

Die basischen Substanzen Bu^tOK in DMF, NaOH in H₂O_{deion.} und Imidazol in DMF und H₂O_{deion.} wurden als Katalysatoren eingesetzt. Zunächst wurde das Substrat in dem entsprechenden Lösungsmittel in einem 2 ml-Reaktionsgefäß gelöst. Die Basen wurden in den molaren Verhältnissen 5:1 (Bu^tOK:Substrat), 10:1 (NaOH:Substrat) und 6:1 bzw. 12:1 (Imidazol:Substrat) mit dem Substrat gemischt und die Ansätze 0,5-24 h bei RT inkubiert. Zum Nachweis der CO-Bildung wurde in den Deckel des Reaktionsgefäßes ein in Palladiumdichloridlösung (1:500 in H₂O_{deion.}) getränktes Filterpapier gelegt (ARENDE & DÖRMER, 1972). Das PdCl₂ wird zu metallischem Pd reduziert und ein schwarz bis silbrig glänzender Niederschlag ist zu beobachten. Alle Ansätze wurden sowohl aerob als auch anaerob (N₂-Atmosphäre) durchgeführt.

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Ansätze mit 3 Tropfen Eisessig neutralisiert und mit 3%iger wässriger NH₄Cl-Lösung 1:2 verdünnt. Danach wurden sie mit Petrolether 60/80 (Petrolether mit einem Siedebereich von 60-80°C) ausgeschüttelt und der Etherextrakt dünnschichtchromatographisch mit den Laufmitteln 1 und 2 (2.4) auf Anthranilsäure untersucht.

2.33.2 Basenkatalyse in Gegenwart von Inhibitoren

Durch die Zugabe verschiedener Radikalfänger und Spin-Traps zur basenkatalysierten Umsetzung des Qdo-Substrats wurde untersucht, ob die Reaktion durch diese Substanzen verhindert werden kann.

Als Katalysatoren wurden in diesem Versuch Bu^tOK und NaOH unter den gleichen Bedingungen wie unter 2.33.1 verwendet. Die Effektoren D-Mannit und 4-POBN wurden in folgenden molaren Effektor:Substrat-Verhältnissen eingesetzt: D-Mannit 5:1, 4-POBN 10:1. Von der NtB-Stammlösung (2.4) wurden 100 µl zum Ansatz pipettiert. Mit der Zugabe der Base wurde die Reaktion gestartet. Der Versuchsablauf erfolgte nach 2.33.1.

2.34 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

Mit Hilfe der ESR-Spektroskopie werden paramagnetische Eigenschaften von Atomen und Molekülen im Magnetfeld sichtbar gemacht. Durch ihren Spin erhalten Elektronen in einem von außen angelegten Magnetfeld verschiedene Energiezustände, deren Differenz von der Größe des Feldes abhängt. Die Absorption von elektromagnetischer Strahlung durch die Elektronen wird gemessen. Diese Methode eignet sich zur Identifizierung von freien Radikalen und zur Bestimmung paramagnetischer metallischer Co-Faktoren von Proteinen. Um weitere Erkenntnisse über den Reaktionsmechanismus der Qdo zu erlangen, wurde die Katalyse des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin mit dieser Methode untersucht.

2.34.1 Statische Spektren

Bei der Aufnahme statischer Spektren findet eine Messung unter anisotropen Bedingungen statt. Das heißt, daß alle physikalischen und chemischen Kräfte unterschiedlicher Wirkung in unterschiedliche Richtungen zeigen. Dies ist unter anderem in amorphen Kristallen der Fall, die sich beim Einfrieren einer wäßrigen Probe bilden.

Die Qdo wurde zunächst aerob ohne und mit Substrat unter flüssigem Stickstoff bei 77 K untersucht. Dazu wurden 40 nmol Enzym in Puffer A (2.4) in ein ESR-Probenröhrchen gefüllt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Ansätze mit Qdo (40 nmol) und Substrat (500 bis 3000 nmol) wurden sofort nach dem Start der Reaktion ebenfalls tiefgefroren. Um aus kurzlebigen Radikalen langlebigere Radikale zu machen, wurde die Reaktion in Gegenwart von Spin-Traps

untersucht: Die Qdo (40 nmol) wurde in einem ESR-Probenröhrchen bei RT mit 20-40 μmol 4-POBN bzw. 100 μl NtB-Lösung (2.4) 10 min inkubiert. Nach der Substratzugabe (2 μmol) wurde für weitere 30 min bei RT inkubiert und die Probe danach tiefgefroren.

Die Ansatzgröße betrug bei jeder Messung 200 μl und wurde durch Veränderung der Puffermenge eingestellt. Zur Kontrolle wurden Spektren vom Puffer, Substrat, 4-POBN und NtB aufgezeichnet.

2.34.2 Dynamische Spektren

Im Gegensatz zu den statischen Spektren wird bei dieser Methode unter isotropen Bedingungen gemessen: Alle physikalischen und chemischen Kräfte wirken in verschiedenen Richtungen gleich.

Die Messung dynamischer Spektren erfolgte in einer ESR-Flachzelle bei RT. Die Ansatzgröße betrug 200 μl und wurde über die Zugabe von Puffer A eingestellt.

70 nmol Qdo wurden mit 100 μl NtB-Lösung 15 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 5 μmol Substrat wurde die Probe in eine Flachzelle pipettiert und ein Spektrum aufgezeichnet. Außerdem wurden Spektren folgender Ansätze gemessen: Puffer A mit NtB-Lösung und Ethanol; Enzym mit NtB-Lösung; Substrat mit NtB-Lösung; Substrat in Puffer A.

2.35 Untersuchung zur Substratbindung

Unter anaeroben reduzierenden Bedingungen wurde untersucht, ob ein kovalent gebundenes Enzym-Substrat-Intermediat nachgewiesen werden kann. Alle Puffer und Lösungen wurden vorher mit Formiergas (90% N_2 , 10% H_2) begast und mit den Gefäßen in ein Anaerobenzelt geschleust, das ebenfalls mit Formiergas gefüllt war. In Eppendorf-Gefäßen wurden 0,5 ml-Reaktionsansätze mit 5 nmol Qdo, 10 bzw. 30 nmol Substrat und Puffer A (2.4) pipettiert. Nach 15 min Inkubation wurde der Ansatz in einen Zentrifugenfilter mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa überführt und im Anaerobenzelt 15 min bei 11000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde spektrophotometrisch bei 337 nm auf vorhandenes Substrat untersucht. In weiteren Ansätzen wurden zum Reaktionsgemisch mit Qdo und Substrat nach der Inkubation 10 μl 4 M Guanidin-HCl-Lösung pipettiert, um das Enzym zu denaturieren. Nach weiteren 15 min Inkubation wurde das Reaktionsgemisch filtriert und A_{337} des Filtrats bestimmt.

Die Substratkonzentration in den Filtraten wurde über eine Standardkurve ermittelt. Dazu wurden Substratmengen zwischen 5 und 50 nmol in 0,5 ml-

Ansätzen in Puffer A unter anaeroben Bedingungen mit den Konzentratoren filtriert. A_{337} wurde bestimmt und mittels Extinktionkoeffizient des Substrates (2.23) und dem Lambert-Beerschen Gesetz wurde die Substratkonzentration bestimmt.

Zur Kontrolle wurde das Enzym im Filter in Puffer A rückgelöst und auf Aktivität unter aeroben Bedingungen untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Reinigung der His₆Qdo und His₆Hod aus *E. coli* M15[pREP4] pQE-30::*qdo* bzw. -pQE-30::*hod*

3.1.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie an Ni-NTA Superflow

Nach dem Zellaufschluß nach 2.25.2 wurde die His₆Qdo bzw. His₆Hod über Nacht an das Säulenmaterial gebunden (2.26). Bei der Chromatographie wurden die Proteine während des Imidazolgradienten zunächst bei einer Imidazol-Konzentration von 160 mM eluiert (ein Beispiel ist in Abb. 7 dargestellt). Bei einem Anreicherungsfaktor von 4,5 für die Qdo und 4,2 für die Hod lagen die spezifischen Aktivitäten bei 10,3 U/mg (Qdo) und 2,5 U/mg (Hod; 2.23.2)

Im Laufe der Zeit veränderte sich das Adsorptionsverhalten der His₆Qdo und der His₆Hod und sie wurden bereits bei einer Imidazol-Konzentration von 50-70 mM eluiert. Diese Verschiebung führte zu einer leichten Zunahme der Verunreinigung im Enzympool, jedoch blieben Anreicherungsfaktor und spezifische Aktivität der Enzyme nahezu unbeeinflusst.

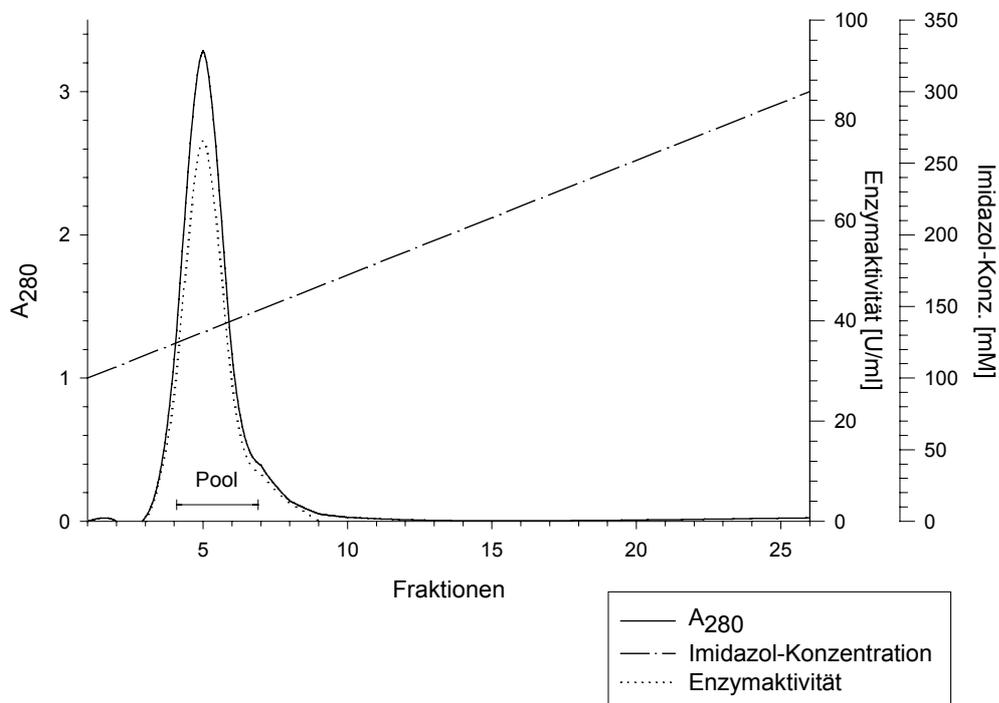


Abb. 7: Metallchelate-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Superflow Matrix (His₆Qdo).

3.1.2 Anionenaustauschchromatographie an UNO Q

Der Pool aus 3.1.1 wurde auf die Säule aufgetragen und die Chromatographie nach 2.26.2 durchgeführt. Die His₆Qdo und die His₆Hod wurden bei einer KCl-Konzentration von 0,22-0,25 M eluiert. In Abb. 8 ist beispielhaft das Chromatogramm einer His₆Qdo-Reinigung dargestellt. Die spezifische Aktivität der Qdo betrug 13,7 U/mg bei einem Anreicherungsfaktor von 6,0. Für die His₆Hod lagen die Werte bei 3,8 U/mg (spezifische Aktivität mit dem Substrat der Qdo) und 6,3 (Anreicherungsfaktor).

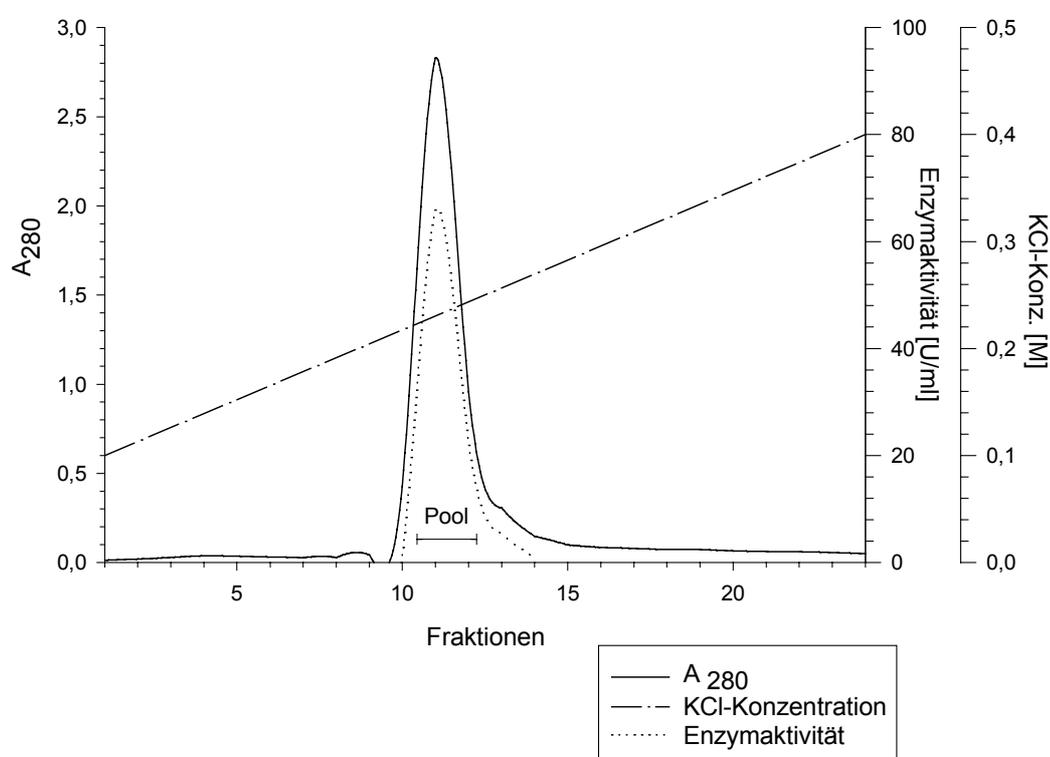


Abb. 8: Anionenaustauschchromatographie an UNO Q (His₆Qdo).

3.1.3 Zusammenfassung der Reinigungen

Die Tab. 2 zeigt die Zusammenfassung der Reinigungen der His₆-Enzyme. Der Anreicherungsfaktor (His₆Qdo: 6,0; His₆Hod: 6,3) und die Ausbeute (His₆Qdo: 23,5%; His₆Hod: 26%) waren für die Enzyme annähernd gleich. Die mit 3,8 U/mg recht niedrige spezifische Aktivität der His₆Hod ist auf das im Enzymtest (2.23.2) verwendete Substratanalogon zurückzuführen. Mit einer SDS-PAGE wurde die elektrophoretische Reinheit der 2,4-Dioxygenasen His₆Qdo und His₆Hod nachgewiesen (Daten nicht aufgeführt).

Tab. 2: Zusammenfassung der Reinigungen der His₆Qdo und der His₆Hod.

	Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (x-fach)
His₆Qdo	Rohextrakt	151	348	2,3	100	1
	Ni-NTA-Superflow	16,2	167	10,3	48	4,5
	UNO Q	6	82,2	13,7	23,5	6
His₆Hod	Rohextrakt	116	77	0,6	100	1
	Ni-NTA-Superflow	14,4	36	2,5	47,7	4,2
	UNO Q	5,3	20	3,8	26	6,3

3.2 Untersuchungen zur Homogenität der His₆Qdo

3.2.1 Native PAGE

Die Untersuchung der nach SDS-PAGE (2.21.1) reinen His₆Qdo mittels nativer PAGE (2.21.2) zeigte ein sehr gleichmäßiges Bandenmuster (Abb. 9), welches schon direkt nach der Reinigung zu beobachten war. Alle Banden waren von gleicher Intensität und die Anordnung ähnelte einer Leiter. Da dieser Effekt auf eine Oligomerisierung der His₆Qdo hinweist und in Bezug auf die Kristallisation von Nachteil sein könnte, wurde das Enzym mit verschiedenen Additiven versetzt (2.28.1), um die Homogenität zu verbessern.

In Gegenwart von 1 mM DTT bzw. TCEP konnte bereits ein deutlicher Rückgang der Bandenzahl festgestellt werden. Eine Konzentrationserhöhung der Reduktionsmittel auf 10 mM führte zu keiner weiteren Veränderung des Erscheinungsbildes. Dabei wurde eine sehr deutliche Bande im unteren Bereich des Gels und wenige feine Banden im oberen Bereich beobachtet. Die untere lief im Vergleich zur niedrigsten Bande im Bandenmuster der His₆Qdo ohne Additiv etwas tiefer. Unterschiedliche Lagertemperaturen hatten keinen Einfluß auf die Wirkung der Reduktionsmittel.

Wurde das Detergenz Octyl- β -D-glucopyranosid in einer Konzentration von 0,1% (w/v) zugegeben, so führte es weder alleine noch in Kombination mit DTT zu einer zusätzlichen Reduktion der Bandenzahl. Eine Erhöhung der Octyl- β -D-glucopyranosid-Konzentration auf 0,5% (w/v) führte in den meisten Fällen schon nach eintägiger Lagerung zur Präzipitation des Enzyms.

Im Enzymtest nach 2.23.1 wurde festgestellt, daß DTT und TCEP in Konzentrationen bis 10 mM keinen Einfluß auf die Aktivität der His₆Qdo hatten. Ein Aktivitätstest in Gegenwart von Octyl- β -D-glucopyranosid wurde nicht durchgeführt, da das

Detergenz keine Verbesserung der Enzymhomogenität hervorrief und daher nicht weiter eingesetzt wurde.

Um die Qdo schon während des Zellaufschlusses (2.25.1) und der Proteinreinigung (2.26) zu stabilisieren, wurden diese Schritte in Gegenwart von 1 mM DTT in allen verwendeten Puffern durchgeführt. Dabei wurde das Enzym von beiden Säulen früher eluiert als in 3.1 gezeigt. Die native PAGE zeigte anschließend sowohl nach der Affinitätschromatographie als auch nach der Anionenaustauschchromatographie dasselbe Bandenmuster wie nach der Reinigung ohne DTT. Durch die Zugabe des Reduktionsmittels nach der Reinigung konnte also ein deutlicherer Einfluß auf die Homogenität der His₆Qdo genommen werden.

Die Lagerung der His₆Qdo in Good-Puffern hatte keine Wirkung auf ihre Homogenität. Auch die Gegenwart des Proteasehemmer-Mix veränderte das Bandenmuster auf der nativen PAGE nicht.

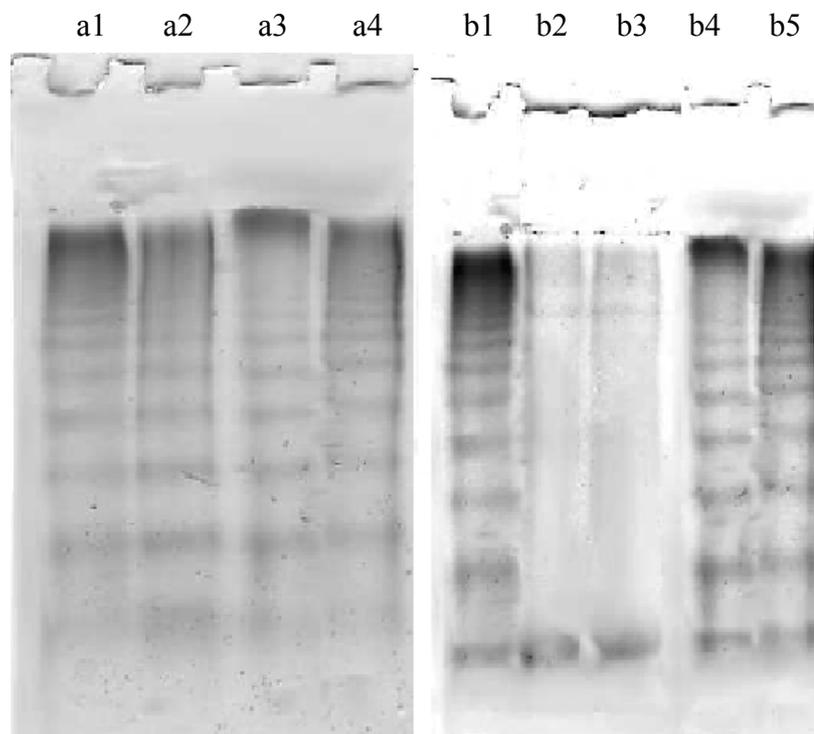


Abb.9: Native PAGE der His₆Qdo. Bahn a1: His₆Qdo in 20 mM Tris; Bahn a2: His₆Qdo in 50 mM HEPES; Bahn a3: His₆Qdo in 50 mM HEPPSO; Bahn a4: His₆Qdo in 50 mM POPSO; Bahn b1: His₆Qdo ohne Additiv; Bahn b2: His₆Qdo mit 1 mM DTT; Bahn b3: His₆Qdo mit 1 mM TCEP; Bahn b4: His₆Qdo mit 0,1% (w/v) Octyl-β-D-glucopyranosid; Bahn b5: His₆Qdo mit 1 mM DTT und 0,1% (w/v) Octyl-β-D-glucopyranosid.

3.2.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Wie unter 2.22 beschrieben, wurde die His₆Qdo einer isoelektrischen Fokussierung unterzogen. Dazu wurde His₆Qdo bzw. Qdo (aus *E. coli* M15[pREP4] pQE50::*qdo*; siehe 2.16) ohne Additiv, mit 6 mM DTT und mit DTT + 0,5% Octyl-β-D-glucopyranosid auf das Gel aufgetragen.

Wie in der Abb. 10 zu erkennen ist, fokussierte die His₆Qdo sowohl ohne als auch mit DTT in vielen Banden im Bereich von pH 5,5 bis 6,0. In Gegenwart von DTT und Octyl-β-D-glucopyranosid reduzierte sich die Anzahl der Banden auf zwei mit den pI-Werten 5,9 und 5,5. Der nach 2.18 bestimmte theoretische pI des Enzyms lag bei 5,8.

Die IEF der Qdo zeigte ein ähnliches Erscheinungsbild wie die His₆Qdo, allerdings in Folge des fehlenden His-tag in einem anderen pH-Bereich: Ohne und mit DTT war die Anzahl der Banden im Bereich von pH 5,0 bis 5,5 sehr hoch. Eine weitere Bande fokussierte mit dem pI 4,8. Der Zusatz von DTT und Octyl-β-D-glucopyranosid führte auch hier zur Reduzierung der Banden. Die Qdo fokussierte in drei Banden mit pI-Werten von 4,8, 5,0 und 5,1. Der theoretische pI der Qdo liegt bei 5,4.

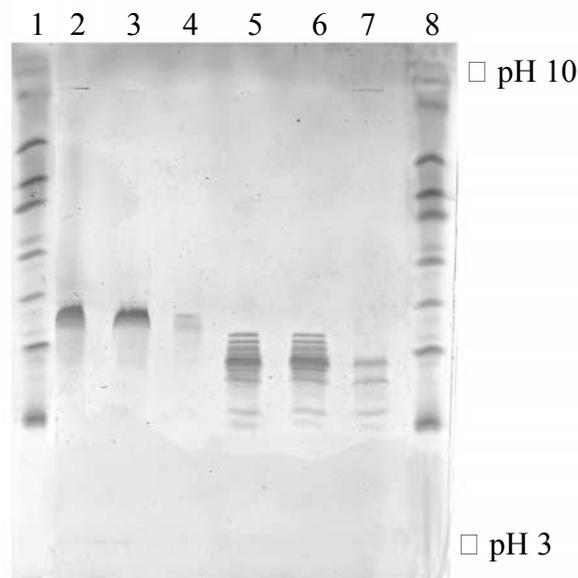


Abb. 10: IEF der His₆Qdo sowie der Qdo ohne Additiv sowie mit DTT bzw. mit DTT und Octyl-β-D-glucopyranosid. Der angelegte Gradient ist pH 3-10. Bahnen 1 und 8: Standard (pI 8,0/4,5/7,1/7,0/6,5/6,0/5,1/4,5); Bahn 2: His₆Qdo ohne Additiv; Bahn 3: His₆Qdo mit 6 mM DTT; Bahn 4: His₆Qdo mit 6 mM DTT und 0,5% Octyl-β-D-glucopyranosid; Bahn 5: Qdo ohne Additiv; Bahn 6: Qdo mit 6 mM DTT; Bahn 7: Wildtyp-Qdo mit 6 mM DTT und 0,5% Octyl-β-D-glucopyranosid.

3.2.3 Massenspektrometrie

Mit Hilfe der Massenspektrometrie nach 2.28.2 wurde eine His₆Qdo-Lösung auf Verunreinigungen untersucht und gleichzeitig die Molekularmasse des Enzyms bestimmt. Die Molekularmasse ergibt sich aus dem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z). Bei der MALDI-TOF-Untersuchung der His₆Qdo wurden vier Peaks aufgezeichnet (Abb. 11). Während der Peak bei $m/z = 31762$ dem reinen Enzym entspricht, sind die anderen drei auf Artefakte der MALDI-TOF zurückzuführen. Bei $m/z = 31978$ ist wahrscheinlich ein Addukt aus His₆Qdo und Trägermatrix zu sehen. Doppelt geladene Ionen sind verantwortlich für die beiden Peaks bei $m/z = 15878$ und $m/z = 15988$. Weitere Protein-Peaks sind nicht zu erkennen und deuten darauf hin, daß in der Lösung der His₆Qdo keine Verunreinigungen vorhanden sind.

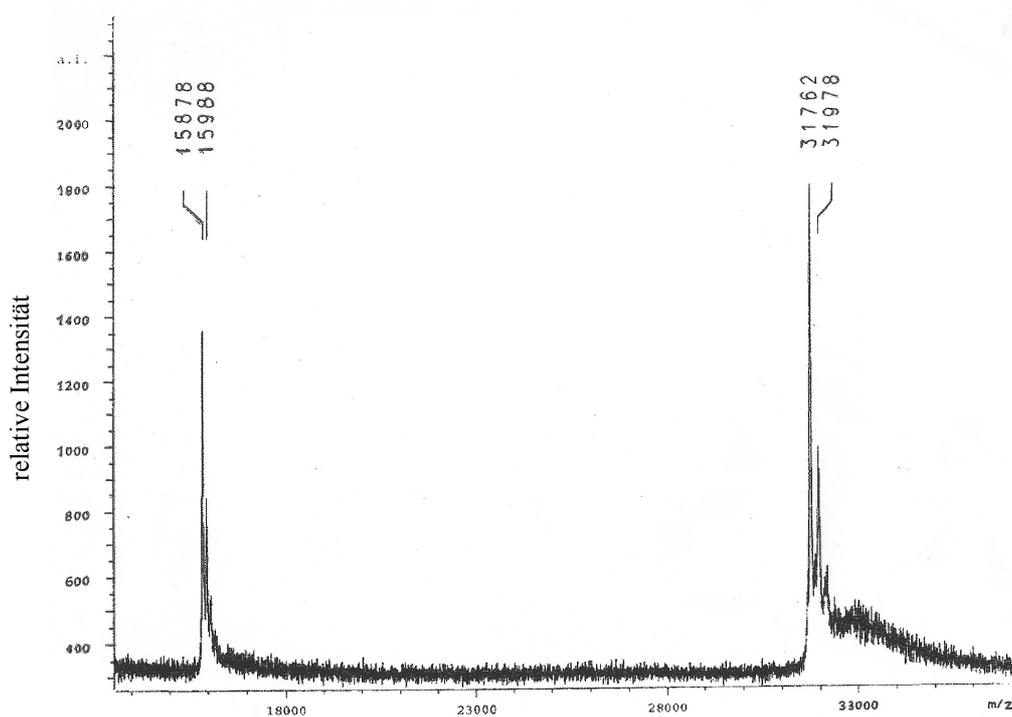


Abb. 11: MALDI-TOF-Untersuchung der His₆Qdo.

3.2.4 Dynamic Light Scattering

Die erste Untersuchung der His₆Qdo mittels Dynamic Light Scattering (2.28.3) deutete darauf hin, daß das Enzym zu 100% als Dimer vorliegt, da die durchschnittliche Molekularmasse bei ca. 58,2 kDa (13%) lag.

Nach der Filtration der Probe mit einem 0,02 µm Filter, in dem große Moleküle zurückgehalten werden, wurde diese erneut untersucht. Die Messung ergab diesmal, daß 99% der Moleküle im Filtrat eine Masse von ca. 34,2 kDa (0,5%) und nur 1% eine höhere Masse besitzen. Das bedeutet, daß die His₆Qdo in ihrer normalen Form als Monomer vorliegt und Aggregate erst bei der Lagerung des Proteins entstehen. Die sehr hohe und auf Dimere hinweisende Molekularmasse als Ergebnis der ersten Messung ist auf die Aggregatbildung der His₆Qdo zurückzuführen, welche die Messung deutlich beeinträchtigen kann.

3.3 Herstellung der Expressionsklone *E. coli* M15[pREP4] pQE-50::*qdo* und -pQE-50::*hod*

Um eine Beeinflussung der Homogenität und damit auch der Kristallisation des Proteins durch den His₆-tag zu vermeiden, wurden die Gene *hod* und *qdo* zur Überexpression in den Expressionsvektor pQE-50 (2.8.1) kloniert.

3.3.1 PCR-Amplifikation der Gene *qdo* und *hod*

Zur Amplifizierung der Gene *qdo* (795 bp) und *hod* (831 bp) dienen die beiden rekombinanten Plasmide pQE-30::*qdo* und pQE-30::*hod*, die zur Überexpression der His₆-tag-Enzyme verwendet wurden, als Template. Die DNA wurde nach 2.9.3 isoliert: Aus 100 ml *E. coli* M15 Kultur mit dem entsprechenden Vektor wurden 40 µg Plasmid-DNA mit einem E₂₆₀/E₂₈₀ von 1,7 (2.10) gewonnen.

Die PCR wurde nach 2.16.1 mit den unter 2.16.1.1 angegebenen Primern durchgeführt. Die Kontrolle der Amplifikation der Gene erfolgte mit einem Teil des ungereinigten PCR-Ansatzes mittels Agarosegelelektrophorese (2.12).

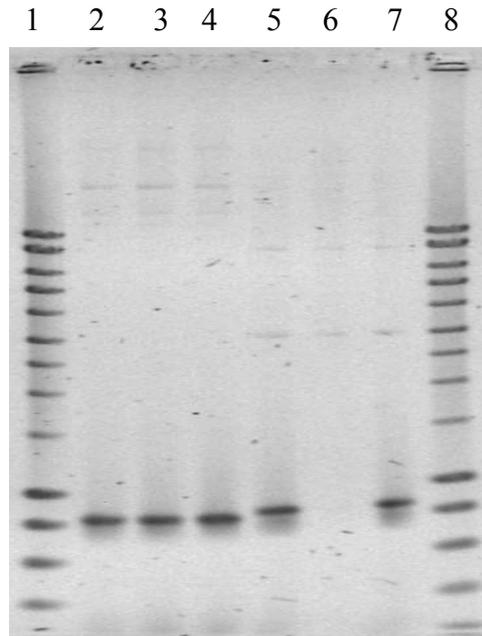


Abb. 12: PCR-Amplifikate der Gene *qdo* (Bahnen 2-4) und *hod* (Bahnen 5-7). Bahnen 1 und 8: Standard (10/8/6/5/4/3/2,5/2/1,5/1/0,8/0,6/0,4/0,2 kb). Negativdarstellung eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels.

Wie die Abb.12 zeigt, war die Amplifikation der Gene bis auf einen Ansatz erfolgreich. Die PCR-Produkte hatten nach 2.10 eine geschätzte Größe von 830 bp (*qdo*-Amplifikat) bzw. 875 (*hod*-Amplifikat) und entsprechen damit annähernd den erwarteten Größen (*qdo*: 823 bp; *hod*: 861 bp). Alle PCR-Ansätze wurden nach 2.16.2 über eine präparative Agarosegelelektrophorese gereinigt. Die Ausbeute betrug je Ansatz ca. 10 µg DNA.

3.3.2 Präparation des Vektors pQE-50 und der Gene *qdo* und *hod*

Zur Vorbereitung der Klonierung in den Vektor pQE-50 wurde sowohl die Vektor-DNA als auch das PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I restringiert (2.11). Dies ermöglichte eine gerichtete Insertion der Gene in den Vektor. Nach der Restriktion wurde die DNA mittels Gelextraktion (2.16.2) gereinigt und in H₂O_{deion.} eluiert.

3.3.3 Klonierung der Gene *qdo* und *hod* in den Vektor pQE-50

Die Ligation der restringierten PCR-Amplifikate und der Vektor-DNA (siehe oben) erfolgte nach 2.16.3. Elektrokompente *E. coli* XL1-Blue MRF⁺-Zellen (2.13) wur-

den anschließend mit 2 µl des Ligationsansatzes transformiert (2.14). Nach der Inkubation auf LB-Selektionsmedium (2.15) mit Ampicillin wurden 39 Kolonien selektiert und auf frische Agarplatten überimpft.

3.3.4 Identifizierung der Klone

Mittels alkalischer Lyse (2.9.1) wurde aus je acht Transformanten der Klonierung von *qdo* bzw. *hod* die Plasmid-DNA isoliert und mit Hilfe von Restriktionsanalysen (2.11), PCR (2.16.1.2) und Agarosegelelektrophorese (2.12) auf eine erfolgreiche Klonierung hin untersucht.

Die Restriktion mit *Xba*I zeigte, daß die aus je zwei Transformanten isolierten Plasmide mit 4,2 kb die erwartete Größe für ein DNA-Fragment aus pQE-50 und Insert (*qdo* bzw. *hod*) besaßen. Durch eine Doppelrestriktion mit *Bam*HI und *Sal*I konnten sowohl das *qdo*-Gen als auch das *hod*-Gen ausgeschnitten werden und auf dem Agarosegel waren Vektor- (3,4 kb) und Insertbanden (0,8 kb) zu sehen. In Abb. 13 sind die Ergebnisse der Restriktionsanalyse für einen *E. coli* pQE-50::*qdo*- und einen *E. coli* pQE-50::*hod*-Klon dargestellt.

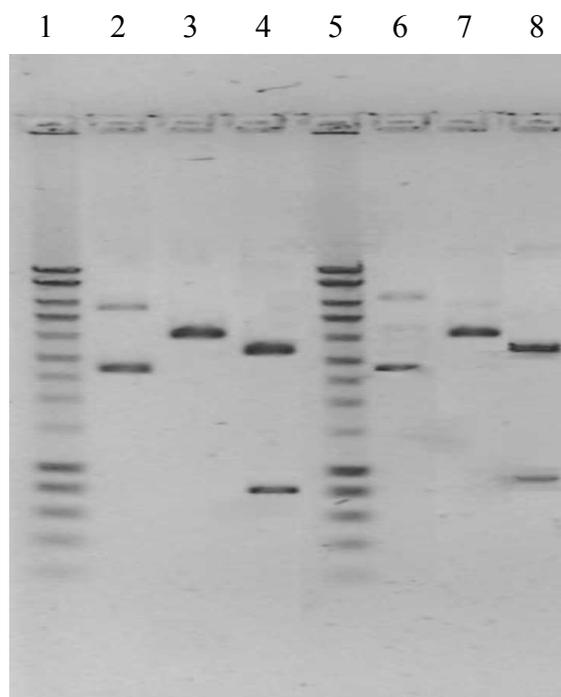


Abb. 13: Restriktionsanalyse der Plasmide pQE-50::*qdo* (Bahnen 2-4) und pQE-50::*hod* (Bahnen 6-8). Bahnen 1 und 5: Standard (10/8/6/5/4/3/2,5/2/1,5/1/0,8/0,6/0,4/0,2 kb). Bahnen 2 und 6: unverdautes Plasmid; Bahnen 3 und 7: *Xba*I-Verdau; Bahnen 4 und 8: Doppelverdau mit *Bam*HI und *Sal*I. Negativdarstellung eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels.

Die Plasmidpräparate, aus denen sich durch eine Doppelrestriktion mit *Bam*HI und *Sal*I das Insert ausschneiden ließ, dienten als Template für eine PCR nach 2.16.1 und die Produkte wurden mittels Agarosegel kontrolliert. Die PCR-Produkte entsprachen in ihrer Größe den amplifizierten Genen aus 3.3.1 (Daten nicht gezeigt).

3.4 Reinigung der Qdo aus *E. coli* M15[pREP4] pQE-50::*qdo*

3.4.1 Gewinnung von Rohextrakten

3 g Zellen wurden nach 2.25.1 mit Ultraschall aufgeschlossen und die unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert. Die spezifische Aktivität der Qdo im Rohextrakt betrug 3,6 U/mg.

3.4.2 Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel

Die Anionenaustauschchromatographie wurde nach 2.27.1 durchgeführt. Innerhalb des linearen Gradienten wurde die Qdo bei KCl-Konzentrationen von 0,2-0,3 M eluiert (Abb. 14). Die spezifische Aktivität betrug 5,7 U/mg bei einer 1,6-fachen Anreicherung.

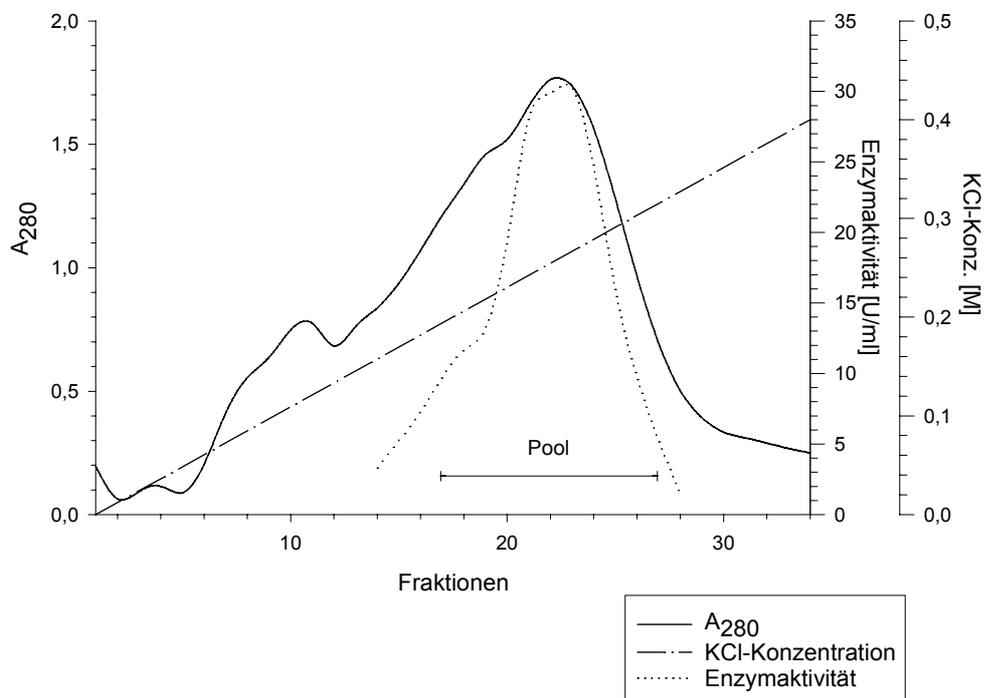


Abb. 14: Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel (Qdo).

3.4.3 Adsorptionschromatographie an Hydroxyapatit

Die Qdo adsorbierte im Gegensatz zu den Fremdproteinen nicht an Hydroxyapatit (2.27.2) und wurde sofort beim Spülen mit Puffer B eluiert (Abb. 15). Nach diesem Reinigungsschritt betrug die spezifische Aktivität 6,2 U/mg und es wurde eine Anreicherung um den Faktor 1,7 erzielt.

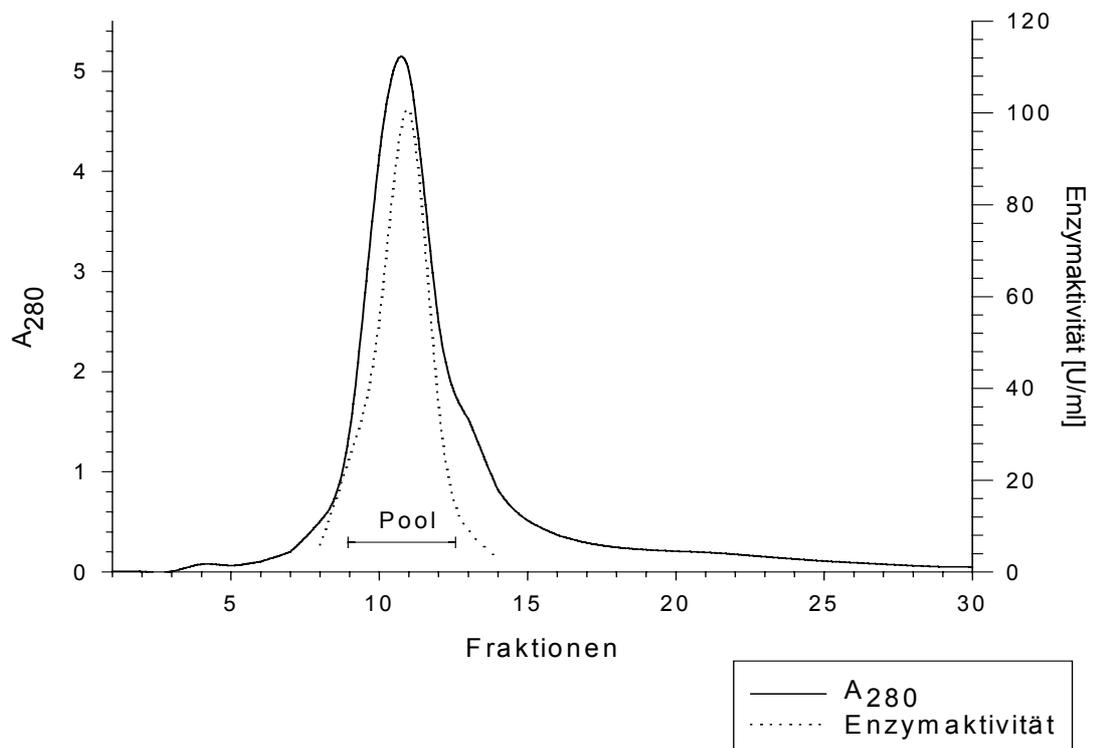


Abb. 15: Adsorptionschromatographie an Hydroxyapatit (Qdo).

3.4.4 Anionenaustauschchromatographie an UNO Q

Bei der nach 2.27.3 durchgeführten Anionenaustauschchromatographie an dem starken Ionentauscher UNO Q wurde die Qdo durch KCl-Konzentrationen zwischen 0,24-0,28 M desorbiert (Abb. 16). Danach lag die spezifische Aktivität der Qdo bei 7,6 U/mg. Der Anreicherungsfaktor betrug 7,6.

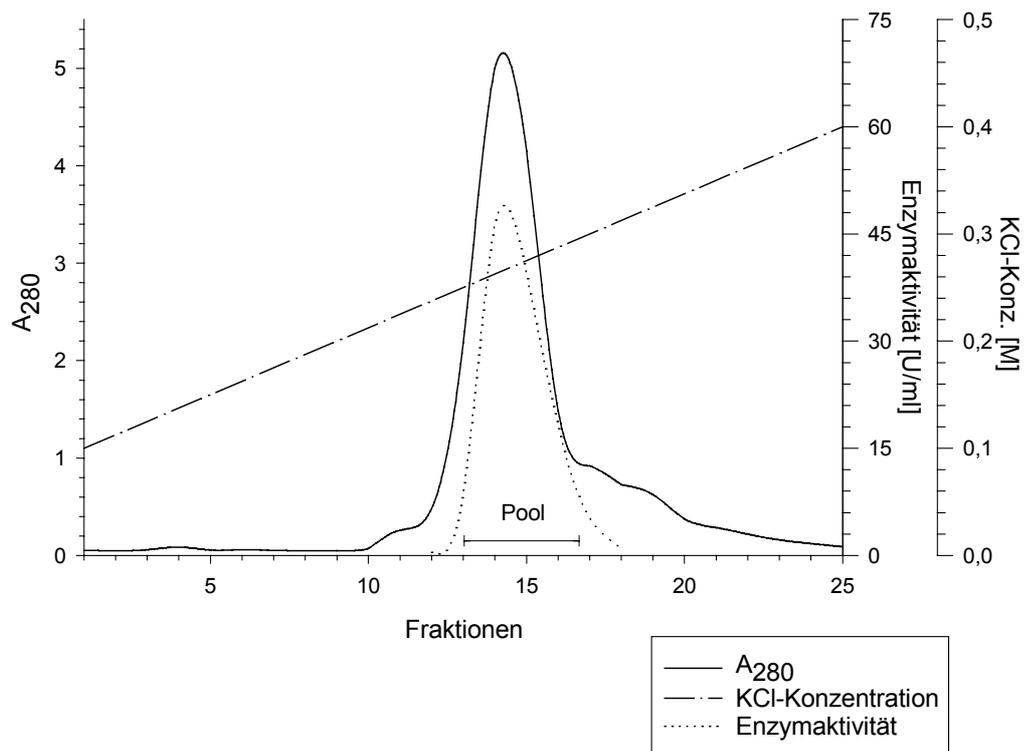


Abb. 16: Anionenaustauschchromatographie an UNO Q (Qdo).

3.4.5 Gelfiltration an Bio-Prep 1000/17

Im letzten Schritt der Reinigung wurde eine Gelfiltration nach 2.27.4 durchgeführt. Ein charakteristisches Elutionsdiagramm ist in Abb. 17 dargestellt. Durch die Auftrennung der konzentrierten Proteinlösung nach der Molekülgröße stieg die spezifische Aktivität der Qdo auf einen Wert von 11,8 U/mg. Der Anreicherungsfaktor betrug am Ende der Reinigung 3,3.

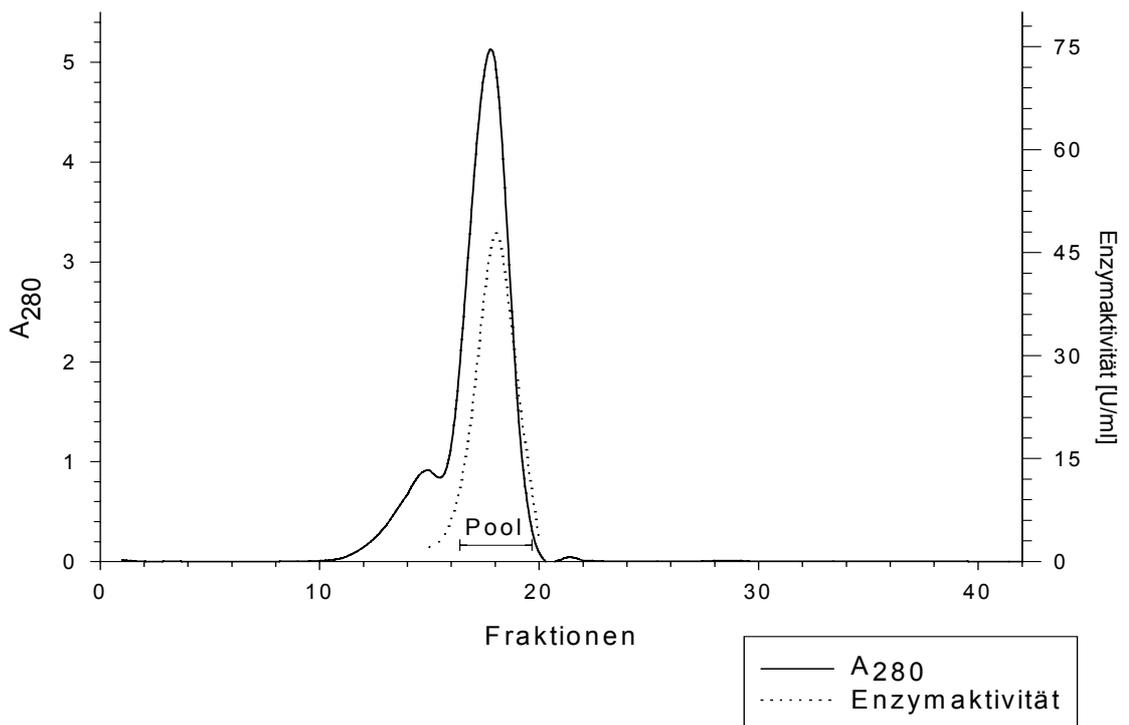


Abb. 17: Gelfiltration an Bio-Prep 1000/17 (Qdo)

3.4.6 Zusammenfassung der Reinigung

Die Ergebnisse einer typischen Reinigung der Qdo aus *E. coli* M15[pREP4] pQE-50::*qdo* sind in Tab. 3 zusammen gefaßt. Aus 3 g Zellmaterial (Naßgewicht) wurden 4,5 mg reine Qdo mit einer spezifischen Aktivität von 11,8 U/mg isoliert. Das entspricht einer Ausbeute von 8,3%.

Tab. 3: Zusammenfassung der Reinigung der Qdo aus *E. coli* M15 pREP4 pQE-50::*qdo*.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (x-fach)
Rohextrakt	178	644	3,6	100	1
DEAE-Sephacel	46	264	5,7	41	1,6
Hydroxyapatit	32	199	6,2	31	1,7
UNO Q	11	84	7,6	13	2,1
Gelfiltration	4,5	53	11,8	8,3	3,3

Die elektrophoretische Reinheit der Qdo wurde mittels einer SDS-PAGE nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.5 Reinigung der Hod aus *E. coli* M15[pREP4] pQE-50::*hod*

Da das Substrat der Hod (1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin) nicht zur Verfügung stand, wurde die Aktivität des Enzyms mit dem Substrat der Qdo (1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin bestimmt (2.23.2).

3.5.1 Gewinnung von Rohextrakten

Nach dem Ultraschallaufschluß (2.25.1) von 3 g Zellen und dem Abzentrifugieren der unlöslichen Zellbestandteile betrug die spezifische Aktivität der Hod im Rohextrakt 1,9 U/mg.

3.5.2 Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel

Bei der nach 2.27.1 durchgeführten Anionenaustauschchromatographie wurde die Hod innerhalb des linear aufsteigenden Gradienten ab einer Konzentration von 0,18 M KCl eluiert (Abb. 18). Bei einer 1,2-fachen Anreicherung betrug die spezifische Aktivität 2,2 U/mg.

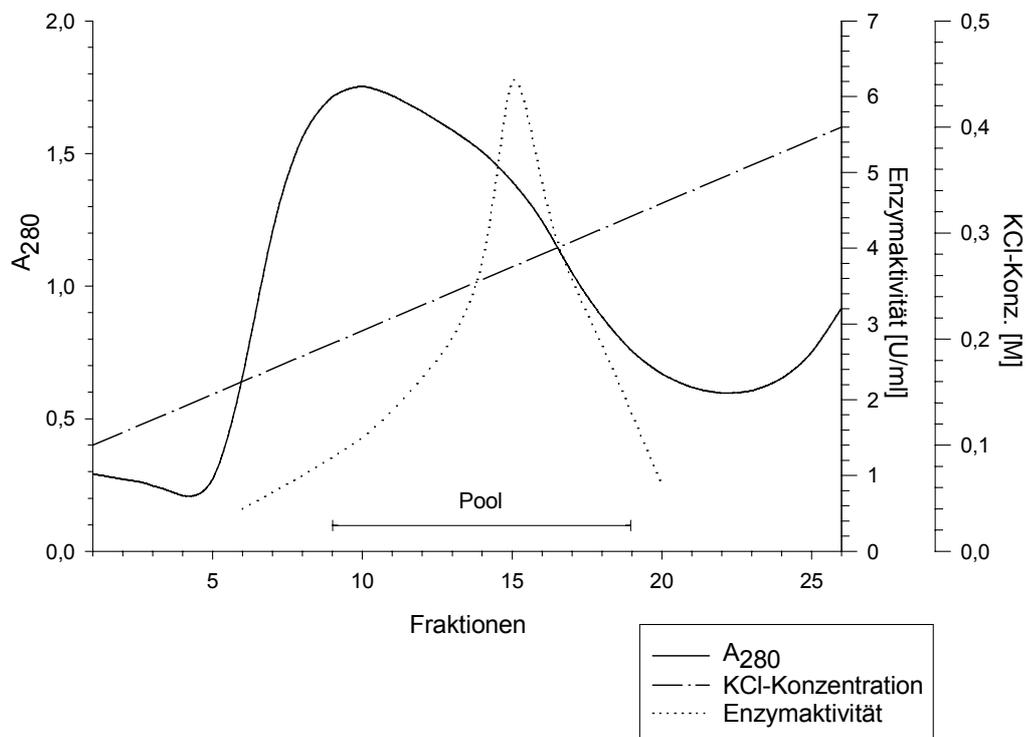


Abb. 18: Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel (Hod).

3.5.3 Adsorptionschromatographie an Hydroxyapatit

Die Adsorptionschromatographie wurde nach 2.27.2 durchgeführt. Dabei wurde die Hod an Hydroxyapatit gebunden und durch einen ansteigenden Kaliumphosphatgradienten bei Konzentrationen zwischen 70 und 90 mM Kaliumphosphat desorbiert (Abb. 19). Sowohl die spezifische Aktivität (2,2 U/mg) als auch der Anreicherungsfaktor (1,2) blieben gegenüber der DEAE-Säule unverändert.

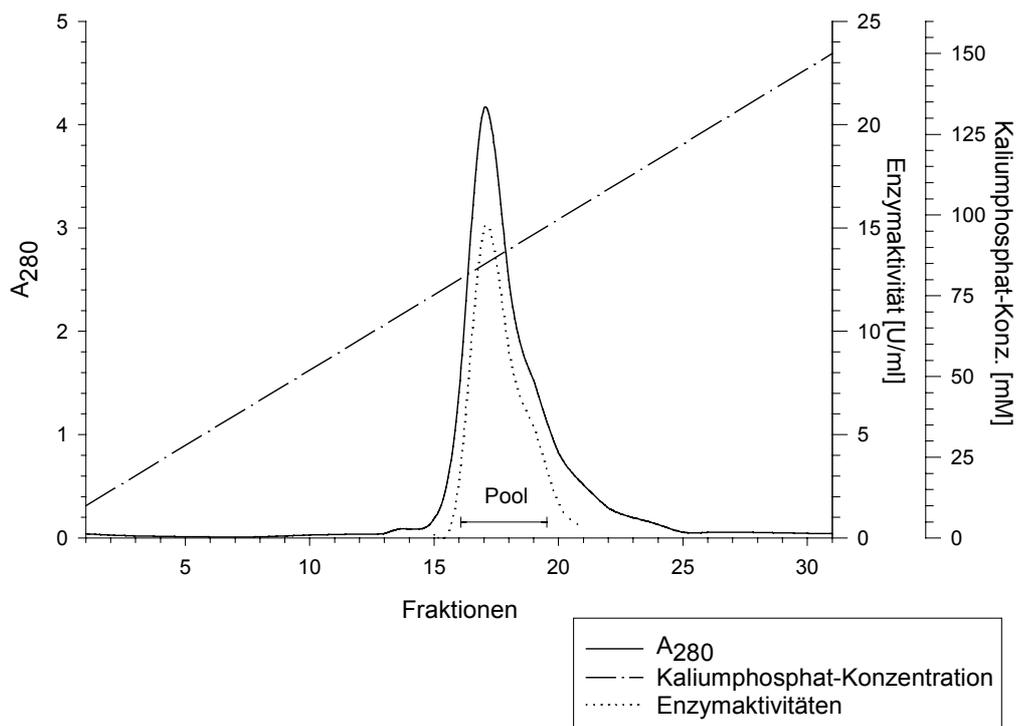


Abb. 19: Adsorptionchromatographie an Hydroxylapatit (Hod).

3.5.4 Anionenaustauschchromatographie an UNO Q

Während der Anionenaustauschchromatographie nach 2.27.3 wurde die Hod bei KCl-Konzentrationen zwischen 0,23 und 0,27 M innerhalb des linear ansteigenden Gradienten von der Säule gespült (Abb. 20). Bei einem Anreicherungsfaktor von 2,8 betrug die spezifische Aktivität der 2,4-Dioxygenase 5,3 U/mg.

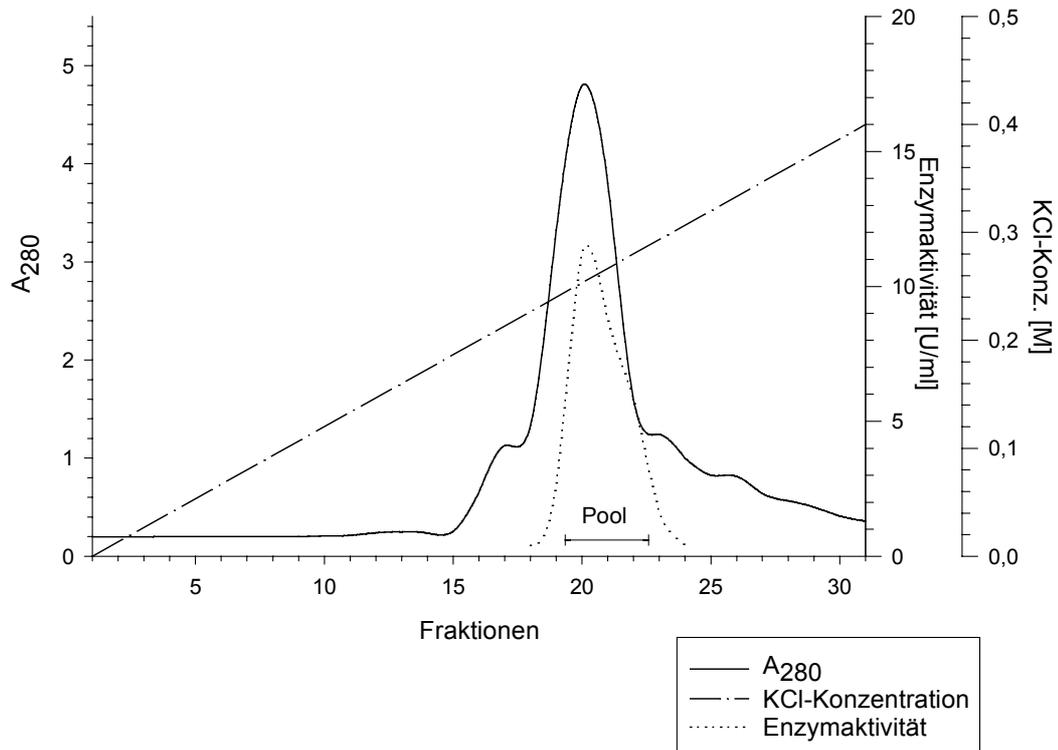


Abb. 20: Anionenaustauschchromatographie an UNO Q (Hod).

3.5.5 Gelfiltration an Bio-Prep 1000/17

In der Abb. 21 ist ein Elutionsdiagramm der Gelfiltration an Bio-Prep 1000/17 nach 2.27.4 zu sehen. Die spezifische Aktivität stieg bei diesem abschließenden Reinigungsschritt auf 8,2 U/mg und der Anreicherungsfaktor auf 4,3 an.

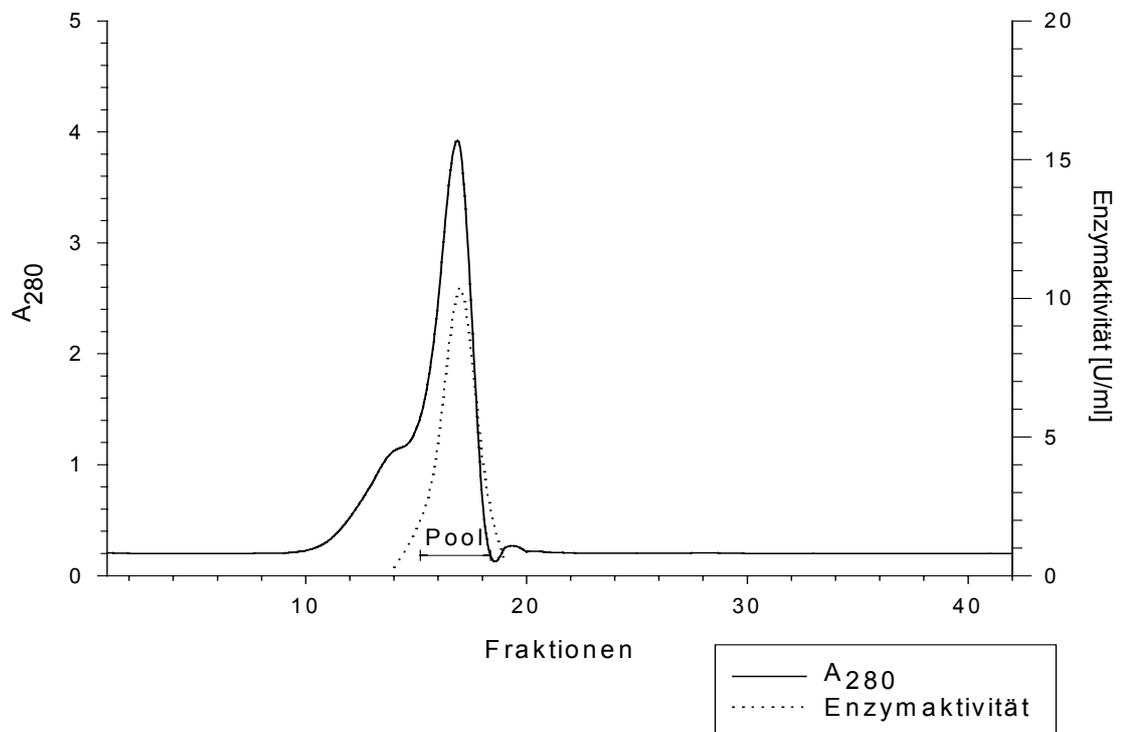


Abb. 21: Gelfiltration an Bio-Prep 1000/17 (Hod).

3.5.6 Zusammenfassung der Reinigung

In der Tab. 4 sind die Ergebnisse einer Reinigung der Hod aufgeführt. Ausgehend von 3 g Zellen wurden 2,8 mg reine Hod mit einer Ausbeute von 8,3% isoliert.

Tab. 4: Zusammenfassung der Reinigung der Hod aus *E. coli* M15 pREP4 pQE-50::*hod*.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (x-fach)
Rohextrakt	144	279	1,9	100	1
DEAE-Sephacel	40	88	2,2	31,5	1,2
Hydroxyapatit	17	37	2,2	13,3	1,2
UNO Q	5,7	30	5,3	10,8	2,8
Gelfiltration	2,8	23	8,2	8,3	4,3

Die elektrophoretische Reinheit der Hod wurde mittels einer SDS-PAGE nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.6 Aminosäuresequenz-Analyse der Qdo

Um Hinweise auf die Struktur und Funktionsweise der Qdo zu bekommen, wurde die Aminosäuresequenz der 2,4-Dioxygenase (EMBL-Zugangsnummer Y14779.2) mit Hilfe von multiplen Sequenz-Alignments untersucht. Zunächst wurde mit dem Programm BLAST (2.18) eine Datenbankrecherche durchgeführt und binäre Alignments erstellt. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen wurde anschließend der multiple Aminosäuresequenzvergleich der Qdo mit dem Programm CLUSTAL W (2.18) ausgeführt.

Für die Sekundärstrukturvorhersage nach 2.18 wurden bestimmte Aminosäuresequenzen aus dem multiplen Alignment ausgesucht.

3.6.1 Multiple Aminosäure-Sequenzvergleiche der 2,4-Dioxygenasen

Die Datenbanksuche mit anschließendem Sequenzvergleich ergab, daß außer zur Hod keine weiteren Homologien zu bekannten Oxygenasen bestehen. Die Identität zwischen den beiden Enzymen liegt bei 37%. Dagegen ist die Ähnlichkeit zu einer

Vielzahl von Enzymen mit α/β -Hydrolasefaltung mit Identitäten zwischen 23% bei der Atropinesterase (Tpes) aus *P. putida* (HESSING, 1983) und 15% bei der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase (XylF) aus *P. putida* (DÍAZ & TIMMIS, 1995) auffällig.

Das multiple Alignment (Abb. 22) zeigt, daß im Bereich des N-Terminus und im zentralen Bereich der Proteine nur eine sehr geringe Ähnlichkeit vorhanden ist. Deutliche Homologien gibt es zwischen diesen Sequenzbereichen (Position 41-160 des Alignments) und am C-Terminus. Hier befinden sich sowohl bei der Qdo als auch bei der Hod Ähnlichkeiten zu Konsensussequenzen der α/β -Hydrolasen, in denen die Aminosäuren der katalytischen Triade dieser Enzyme lokalisiert sind. Nach OLLIS (1992) besitzen alle Enzyme vom Faltungstyp der α/β -Hydrolasen eine katalytische Triade mit der Zusammensetzung nukleophile AS-saure AS-Histidin.

3.6.2 Sekundärstrukturvorhersage der 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase

Zur Überprüfung der Qualität der Sekundärstrukturvorhersage für die Qdo nach 2.18 wurde auch eine Sekundärstrukturvorhersage für die Haloalkan-Dehalogenase (Dh1A) aus *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (JANSSEN et al., 1989) durchgeführt und mit der von VERSCHUEREN et al. (1993) durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärten Sekundärstruktur der Dh1A verglichen.

Die Sekundärstrukturvorhersage für die Dh1A stimmt in Bezug auf die Lage der α -Helices und β -Faltblätter mit der tatsächlichen Struktur des Enzyms weitestgehend überein (Abb. 22). Nur im Bereich des N-Terminus gibt es Unterschiede in der Anzahl der Faltblattstrukturen und am C-Terminus fehlen in der Vorhersage eine Helix und ein Faltblatt. Vergleicht man nun die Vorhersage für die Qdo mit der Dh1A, so befinden sich auch hier die Strukturelemente an fast identischen Positionen. Auf den kurzen N-Terminus mit wenigen β -Faltblättern folgt ein Bereich in dem sich α -Helices und β -Faltblätter abwechseln. Der zentrale Bereich, in dem die Homologien zwischen den Enzymen sehr gering sind, ist gekennzeichnet durch eine Abfolge von α -Helices: 5 bei der Qdo und 6 bei der Dh1A. Danach folgt wiederum ein Bereich, in dem sich α -Helices und β -Faltblätter abwechseln. Den Abschluß bildet eine α -Helix.

ERGEBNISSE

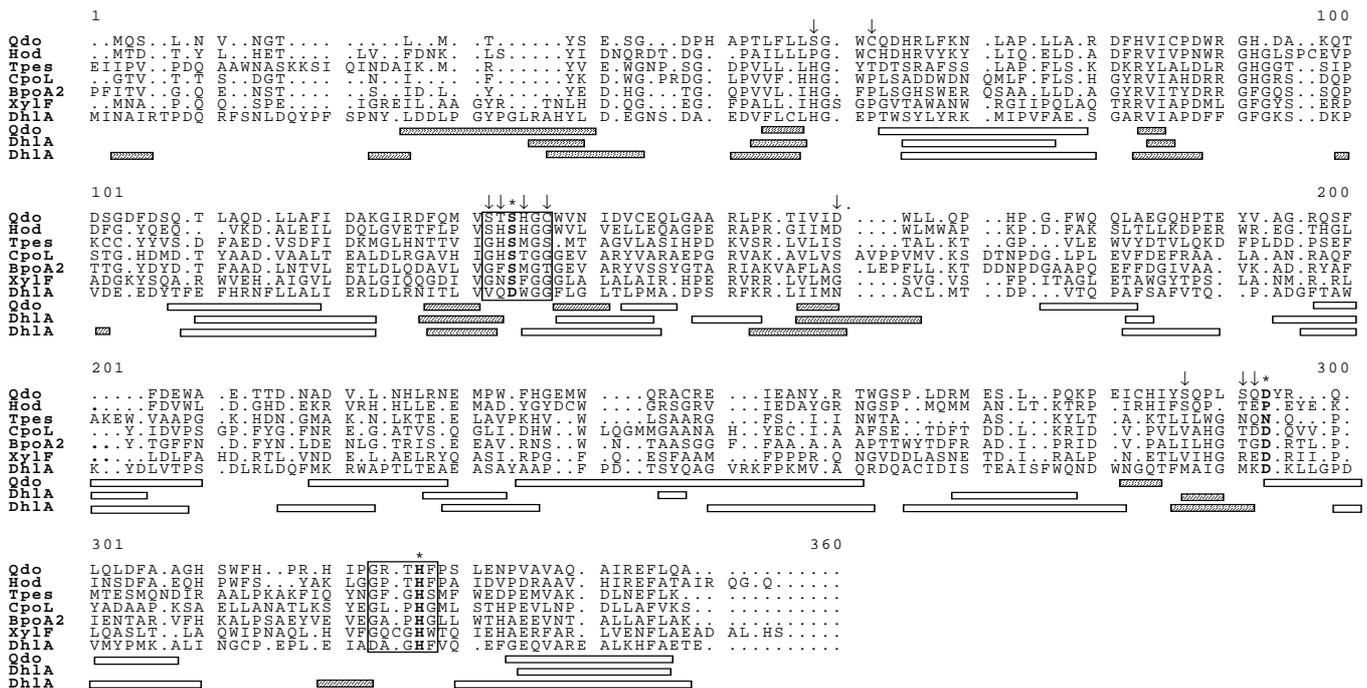


Abb. 22: Multiples Aminosäuresequenz-Alignment der Qdo und der Hod mit Enzymen der α/β -Hydrolase-Superfamilie; Sekundärstrukturelemente der Qdo und der Dh1A. Erläuterungen: Qdo: 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* 33/1 (EMBL-Zugangsnummer Y14779.2); Hod: 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase aus *Arthrobacter ilicis* Rü61a (EMBL-Zugangsnummer Y14778); Tpes: Atropinesterase aus *Pseudomonas putida* (E.C. 3.1.1.10); CpoL: Chlorperoxidase aus *Streptomyces lividans* TK64 (SWISSPROT-Zugangsnummer P49323); BpoA2: Bromperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762 (SWISSPROT-Zugangsnummer P29715); XylF: 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase aus *Pseudomonas putida*; Dh1A: Haloalkan-Dehalogenase aus *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (E.C. 3.8.1.5). Literaturhinweise befinden sich im Text. Die Aminosäuren der vermeintlichen bzw. bestätigten Triade sind durch sternförmige Symbole und Fettdruck gekennzeichnet. Konservierte Sequenzmotive um das Nukleophil und das Histidin der Triade sind eingerahmt. Die Pfeile und Sterne markieren die durch ortsspezifische Mutagenese ausgetauschten Aminosäuren. Unter dem Alignment befinden sich die Sekundärstrukturvorhersagen für die Qdo und die Dh1A (Reihe 1 und 2) und die nach VERSCHUEREN et al. (1993) aufgeklärte Struktur der Dh1A mit der Numerierung der α -Helices: Graue Balken kennzeichnen die β -Faltblätter, weiße Balken kennzeichnen die α -Helices.

3.6.3 Sekundärstrukturvorhersage der His₆Qdo-Varianten

Um den Einfluß der durchgeführten Aminosäureaustausche auf die Sekundärstruktur der His₆Qdo zu überprüfen, wurde für sämtliche Proteinvarianten eine Sekundärstrukturvorhersage durchgeführt. Eine Veränderung der Sekundärstrukturvorhersage

im Vergleich zur His₆Qdo konnte in keinem Fall festgestellt werden, so daß die Erwartung einer Strukturänderung des Enzyms aufgrund der Mutation gering war.

3.7 Ortsspezifische Mutagenese des *qdo*-Gens

3.7.1 Mutagenese

Der Austausch von Aminosäuren in der His₆Qdo mittels PCR wurde nach 2.17 durchgeführt. Nach dem Verdau der parentalen DNA mit *DpnI* wurden die mutierten pQE-30::*qdo*-Plasmide in superkompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert (2.17.3) und auf Ampicillin-haltigen LB-Platten (2.5) ausplattiert.

Von jeder Mutation wurden 5 Klone untersucht. Nach Restriktion der isolierten Plasmide (2.9.2) mit *XbaI* (2.11) konnte auf dem Agarosegel (2.12) für jede Probe eine Bande bei 4,5 kb identifiziert werden. Da bei der Klonierung des Gens *qdo* in den Vektor pQE-30 von MAX (1997) ein Insert eingebaut wurde, das um 200 bp länger war als das eigentliche Gen, entspricht die Plasmidgröße von 4,5 kb dem Plasmid pQE-30::*qdo*. Alle Klone enthielten also dieses Plasmid. Die Sequenzierung der Plasmide bei der Firma SeqLab ergab, daß alle Mutationen erfolgreich waren. Zur späteren Überexpression der mutanten Proteine wurden die Plasmide in elektrokompente *E. coli* M15 [pREP4] transformiert (2.14) und nach 2.15 auf LB-Platten mit Ampicillin und Kanamycin selektioniert.

3.7.2 Überexpression und Reinigung der mutanten His₆Qdo-Proteine

Zellzüchtung und Zellaufschluß der Mutanten erfolgten wie für das His₆Qdo-Protein beschrieben. Bei der Reinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie an Ni-NTA Superflow (2.26.1) konnten fast alle Proteinvarianten unter den gleichen Bedingungen bei einer Imidazolkonzentration von 160 mM vom Säulenmaterial eluiert werden. Ihre elektrophoretische Reinheit wurde durch SDS-PAGE (2.21.1) überprüft und ist in Abb. 23 dargestellt. Lediglich die Proteinvarianten His₆Qdo-H96F, His₆Qdo-S213A und His₆Qdo-S95A+C98A ließen sich nicht reinigen. Mit Hilfe einer SDS-PAGE, bei der die Rohextrakte der drei Qdo-Varianten aufgetragen wurden, konnte in allen Proben nur eine schwache Bande bei ca. 31 kDa identifiziert werden (Abb. 24). Diese Bande könnte der His₆Qdo oder einem wirtseigenen Protein entsprechen. Die korrekte Expression der drei mutanten Proteine konnte allerdings nicht bestätigt werden.

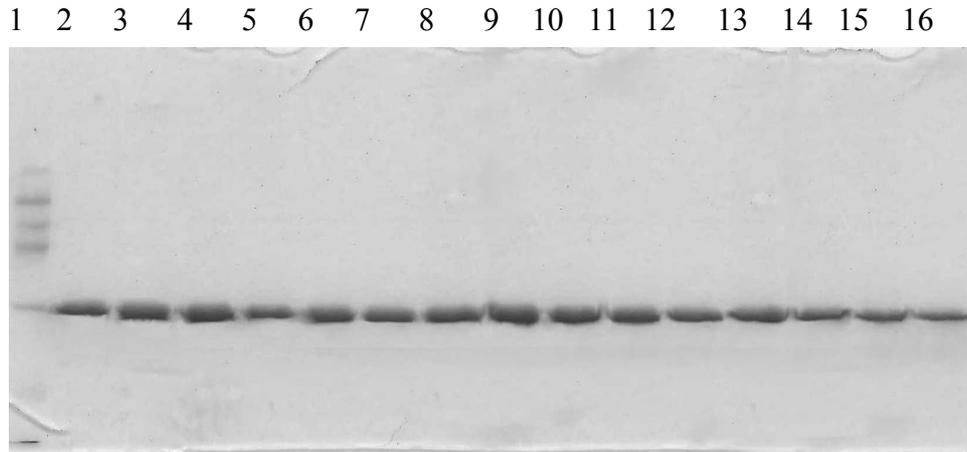


Abb. 23: SDS-PAGE der rekombinanten His₆Qdo und ihrer Varianten. Bahnen 1: Standard (66,2/55/42,7/40/31 kDa); Bahn 2: His₆Qdo; Bahn 3: His₆QdoS28A; Bahn 4: His₆QdoC31A; Bahn 5: His₆QdoS93A; Bahn 6: His₆QdoT94A; Bahn 7: His₆QdoS95A; Bahn 8: His₆QdoS95C; Bahn 9: His₆QdoC98A; Bahn 10: His₆QdoD120A; Bahn 11: His₆QdoQ214A; Bahn 12: His₆QdoS217A; Bahn 13: His₆QdoD219A; Bahn 14: His₆QdoH244A; Bahn 15: His₆QdoS93A+S95A; Bahn 16: His₆QdoT94A+S95A.

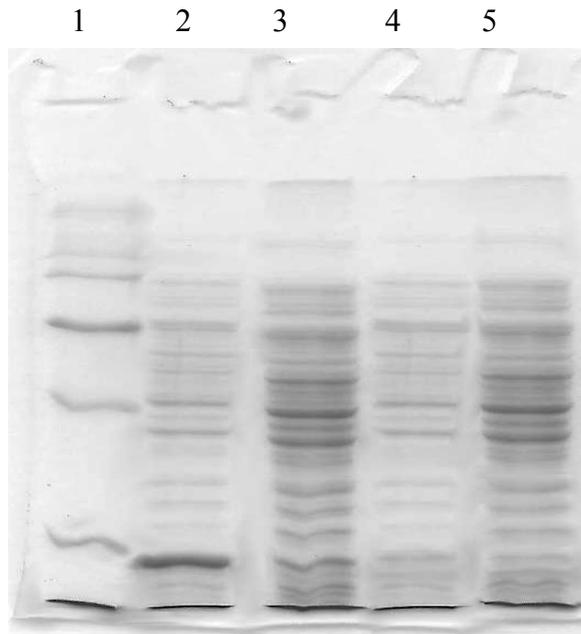


Abb. 24: SDS-PAGE der Rohextrakte von *E. coli* pQE-30::*qdo* und einiger Mutanten. Bahn 1: Standard (200/116,25/97,4/66,2/45/31 kDa); Bahn 2: *E. coli* pQE-30::*qdo*; Bahn 3: *E. coli* pQE-30::*qdo* H96F; Bahn 4: *E. coli* pQE-30::*qdo* S213A; Bahn 5: *E. coli* pQE-30::*qdo* S95A+S98A.

3.7.3 Bestimmung von K_m und k_{cat}

Nach der Reinigung der His₆Qdo und ihrer Varianten erfolgte deren kinetische Untersuchung nach 2.29.1. Im Vordergrund stand dabei das Ziel, Hinweise auf katalytisch essentielle Aminosäurereste zu bekommen. Zur besseren Übersicht sind die bestimmten Werte für K_m , k_{cat} und k_{cat}/K_m Werte in der Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Kinetische Parameter verschiedener Qdo-Varianten: Qdo aus *P. putida* 33/1, His₆Qdo und His₆Qdo-Varianten.

Enzym-Varianten	K_m -Wert (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)
Qdo aus <i>P.p.</i> 33/1	19	16,9	0,89
His ₆ Qdo	20	22,1	1,1
His ₆ QdoS28A	24	9,6	0,4
His ₆ QdoC31A	9	9,9	1,1
His ₆ QdoS93A	23	3,9	0,17
His ₆ QdoT94A	16	0,6	0,04
His ₆ QdoS95A	95	1,6	0,02
His ₆ QdoS95C	61	0,01	$1,6 \cdot 10^{-4}$
His ₆ QdoH96F	im Rohextrakt nicht nachweisbar		
His ₆ QdoC98A	22	2,4	0,12
His ₆ QdoD120A	35	12,9	0,37
His ₆ QdoS213A	im Rohextrakt nicht nachweisbar		
His ₆ QdoQ214A	15	0,5	0,03
His ₆ QdoS217A	17	2,9	0,17
His ₆ QdoD219A	50	3,9	0,08
His ₆ QdoH244A	n.d.	n.d.	n.d.
His ₆ QdoS93A+S95A	18	0,1	$7,4 \cdot 10^{-3}$
His ₆ QdoT94A+S95A	38	0,4	$9,7 \cdot 10^{-3}$
His ₆ QdoS95A+C98A	im Rohextrakt nicht nachweisbar		

Bei dem Vergleich der Qdo-Varianten fällt zunächst auf, daß die His₆Qdo bei fast identischem K_m -Wert (20 μM) eine leicht höhere Wechselzahl (22,1 s^{-1}) hat als die Wildtyp-Qdo (19 μM , 16,9 s^{-1}).

Bei den durch Mutagenese erzeugten Proteinvarianten der His₆Qdo liegen die K_m -Werte zwischen 15 μM bei His₆QdoQ214A und 38 μM bei His₆QdoT94A+S95A. Ausnahmen sind die Varianten His₆QdoS95A (95 μM), His₆QdoS95C (61 μM) und His₆QdoD219A (50 μM), deren Werte bis zu viermal so hoch sind wie bei der His₆Qdo. Die einzige His₆Qdo-Variante mit einem deutlich niedrigeren K_m -Wert ist His₆QdoC31A mit 9 μM .

Bei allen Proteinvarianten der His₆Qdo liegen die Wechselzahlen deutlich unter dem k_{cat} des unveränderten Enzyms. Während die Wechselzahlen für His₆QdoD120A (12,9 s^{-1}), His₆QdoC31A (9,9 s^{-1}) und His₆QdoS28A (9,6 s^{-1}) ungefähr 50% des Ausgangswertes betragen, liegen die Werte für die anderen Varianten nur noch zwischen 0,05 und 17%. Die kleinsten Wechselzahlen wurden für die Proteinvarianten His₆QdoS95C (0,01 s^{-1}), His₆QdoS93A+S95A (0,1 s^{-1}), His₆QdoT94A+S95A (0,4 s^{-1}) und His₆QdoQ214A (0,5 s^{-1}) errechnet.

Die niedrigsten Werte für den Quotienten k_{cat}/K_m ergaben sich für die Proteinvarianten His₆QdoS95C, His₆QdoS93A+S95A und His₆QdoT94A+S95A. Sie betragen nur ca 0,9% des Wertes der His₆Qdo.

Nur in einem Fall führte der Austausch einer Aminosäure zum völligen Verlust der Aktivität: Bei der His₆Qdo-Variante H244A konnte spektrophotometrisch keine Umsetzung von 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin festgestellt werden.

3.8 Chemical Rescue der Proteinvariante His₆QdoH244A

Die Gegenwart von hohen Imidazolkonzentrationen sollte versucht werden, eine Reaktivierung der Proteinvariante His₆Qdo H244A zu bewirken (2.31). Doch auch nach der Zugabe von bis zu 500 mM Imidazol zu 60 μg Enzym, der ca. 10-fach höheren Menge als im Enzymtest mit der nichtmutierten His₆Qdo, konnte keine Umsetzung des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolins beobachtet werden. Das Enzym His₆Qdo H244A blieb inaktiv.

3.9 Chemische Derivatisierungen der His₆Qdo

Der Einfluß verschiedener Modifizierungssubstanzen auf die Aktivität der His₆Qdo wurde nach 2.30 untersucht. Die Daten sind in Abb. 25 graphisch dargestellt.

Die Inkubation der His₆Qdo mit den drei Reagenzien führte in allen Fällen zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität. In Gegenwart des Sulfhydryl-Gruppen-blockie-

renden Agenz Iodacetamid (10 mM) betrug die Restaktivität nach 10 min lediglich 15% des Wertes für das nicht-modifizierte Enzym. Die Inkubation mit 10 mM PMSF senkte die Enzymaktivität nach 10 min um 67%.

Einen vollständigen Verlust der Aktivität hatte die Inkubation der Qdo mit 5 mM Diethylpyrocarbonat, welches zur Derivatisierung der Histidinreste eingesetzt wurde, zur Folge. Bereits nach zwei Minuten konnte keine Umsetzung des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin nachgewiesen werden. Durch die Zunahme der Absorption bei 242 nm wurde die Reaktion des Diethylpyrocarbonat mit dem Enzym bestätigt. Die anschließende Zugabe von 50 mM Hydroxylamin führte zu einer Reaktivierung der His₆Qdo: Die Aktivität lag danach bei mehr als 40% der Ausgangsaktivität nicht-modifizierter Qdo.

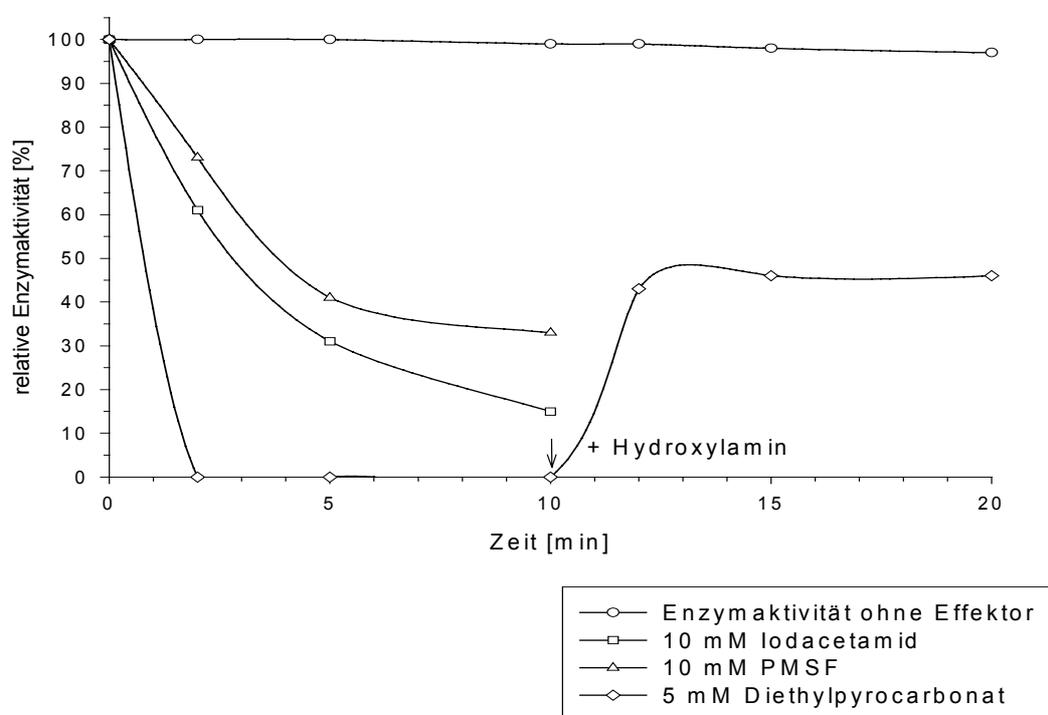


Abb. 25: Einfluß verschiedener Modifizierungssubstanzen auf die Aktivität der His₆Qdo in Abhängigkeit von der Zeit.

3.10 Detektion ionisierbarer Gruppen der His₆Qdo

Die Bestimmung der K_m -Werte der His₆Qdo für das Substrat 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin bei verschiedenen pH-Werten nach 2.29.2 zeigte eine deutliche Verschlechterung der Affinität des Enzyms bei einer Absenkung des pH-Wertes ab pH 6,5. Bei pH-Werten 4,5 und 10,0 konnte keine Aktivität des Enzyms mehr festgestellt werden. Das ϵ des Qdo-Substrates 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin ist im

untersuchten Bereich pH-unabhängig und hat daher keine Auswirkung auf die Messung.

Trägt man die errechneten pK_m -Werte gegen den pH-Wert auf, so kann man nach 2.29.2 den pK_s -Wert einer ionisierbaren Gruppe der His₆Qdo ermitteln. Die Abb. 26 zeigt, daß die 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase eine ionisierbare Gruppe mit einem pK_s -Wert von 6,0 für den Enzym-Substrat-Komplex und 6,8 für das freie Enzym besitzt. Diese Werte liegen im Bereich des pK_s -Wertes für den Imidazol-Rest des Histidin.

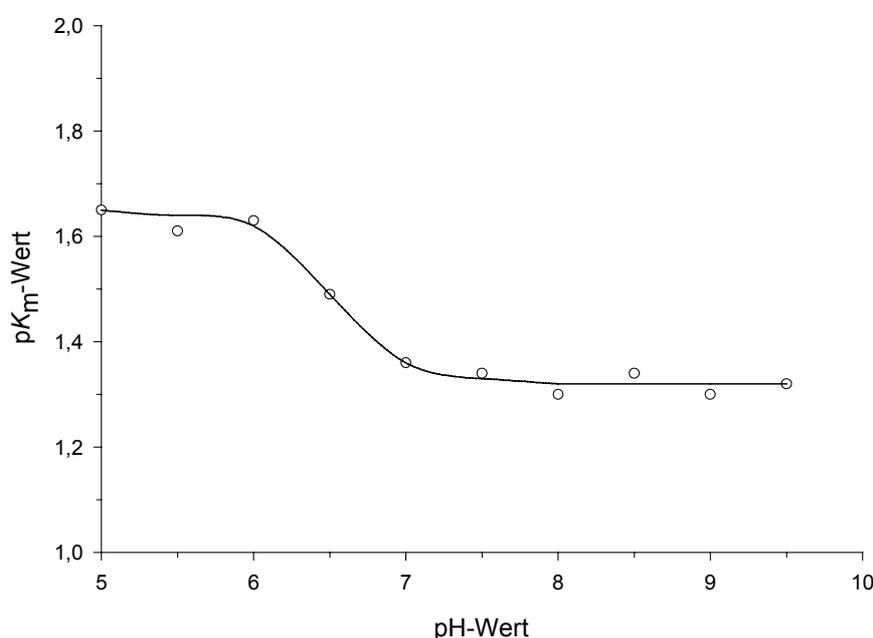


Abb. 26: Einfluß des pH-Wertes auf den pK_m -Wert der 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase.

3.11 Enzyme zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies, Effektoren und Spin-Traps

3.11.1 Einfluß von Effektoren und Spin-Traps auf die enzymatische Reaktion

Wie unter 2.32.1 beschrieben, wurde der Einfluß verschiedener Radikalfänger auf die enzymkatalysierte Umsetzung des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolins untersucht. In Tab. 6 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Die Anwesenheit von Cytochrom *c*, Superoxid-Dismutase, Katalase und DMPO hatte keinerlei Beeinträchtigung der relativen Aktivität der His₆Qdo zur Folge: Auch nach

der Zugabe der Substanzen betrug sie 100%. Die Gegenwart der Inhibitoren D-Mannit, 4-POBN und NtB hingegen bewirkte eine deutliche Minderung der Enzymaktivität. Die Substanzen mußten dazu jedoch in Konzentrationen eingesetzt werden, die deutlich über der Enzymkonzentration (1,3 µM) lagen.

Tab. 6: Einfluß verschiedener Effektoren und Spin-Traps auf die Aktivität der His₆Qdo. ^aDMPO: 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-*N*-oxid; ^b4-POBN: α-(4-Pyridyl-1-oxid)-*N*-*tert*-butylnitron; ^cNtB: 2-Methyl-2-nitrosopropan (oder: Nitroso-*tert*-butan); ^dGesättigte Lösung in H₂O

Wirkstoff	Konzentration im Ansatz	Relative Aktivität der His ₆ Qdo in %
Ohne	-	100
D-Mannit	5 mM	93
	50 mM	54
	100 mM	26
Cytochrom <i>c</i>	50 µM	100
Superoxid-Dismutase	200 units	100
Katalase	600 units	100
DMPO ^a	100 mM	100
4-POBN ^b	10 mM	43
	20 mM	22
	50 mM	8
NtB ^c	10 µl ^d	99
	50 µl	68
	100 µl	24

In Kontrollversuchen, die nach 2.32.1 durchgeführt wurden, wurde ein möglicher Einfluß auf die Absorptionsänderung bei 337 nm untersucht, der nicht auf die enzymatische Reaktion der Qdo mit dem Substrat zurückzuführen ist, jedoch durch eine Überlagerung die Messung beeinträchtigen könnte. In keinem der Ansätze mit Effektor und His₆Qdo bzw. Effektor und Substrat wurde eine Veränderung der Absorption bei 337 nm festgestellt. Daher kann eine Überlagerung von Extinktionsänderungen ausgeschlossen werden.

3.11.2 Reduktion von Radikalfängern

In den Untersuchungen nach 2.32.2 konnte lediglich eine Reduktion des Cytochrom *c* beobachtet werden (Tab. 7). Eine geringe Reduktion des Cytochrom *c* fand in Gegenwart des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen statt (dE₅₅₀/min 0,012 und 0,019). Eine Zugabe von 600 U Superoxid-Dismutase zum Ansatz mit Cytochrom *c* und Substrat verhinderte die Reduktion nicht (dE₅₅₀/min 0,017). Wurde nach der Inkubation des Cytochrom *c* mit Substrat Qdo zugegeben, so wurde auch in diesem Fall die Reduktion nicht beeinflusst und der Wert für dE₅₅₀/min blieb konstant bei 0,011. Bei der Inkubation der Wirkstoffe mit His₆Qdo wurde keine Veränderung der A₅₅₀ beobachtet (aerob und anaerob).

Da auch die Radikalfänger NBT und INT in keinem der Ansätze reduziert wurden, konnte kein Nachweis für die Entstehung von O₂^{•-} erbracht werden.

Tab. 7: Reduktion verschiedener Radikalfänger in Gegenwart der Qdo-katalysierten Reaktion bzw. des Enzyms oder des Substrates.^adE/min: Die Reduktion der Radikalfänger wurde bei folgenden Wellenlängen spektralphotometrisch gemessen: Cytochrom *c* bei 550 nm, NBT bei 560 nm, INT bei 503 nm; ^bBlindwert: Als Blindwert wurde die Reduktion der Radikalfänger in 20 mM Tris-Puffer, pH 7,8 gemessen; ^c: Das Substrat wurde zunächst 50 min mit dem Radikalfänger inkubiert und anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe des Enzyms gestartet.

Ansatz	Absorptionsänderung (dE/min ^a) durch die Reduktion von		
	10 µM Cytochrom <i>c</i>	100 µM NBT	100 µM INT
Blindwert^b, aerob	-	-	-
His₆Qdo, aerob	-	-	-
Substrat, aerob	0,012	-	-
Substrat + His₆Qdo, aerob^c	0,011	n.b.	n.b.
Substrat + SOD, aerob	0,017	n.b.	n.b.
Blindwert, anaerob	-	-	-
His₆Qdo, anaerob	-	-	-
Substrat, anaerob	0,019	-	-

3.12 Basenkatalysierte Umsetzung des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolins

Das Substrat der Qdo, 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin, wurde unter stark alkalischen Bedingungen (2.33.1) in Gegenwart der Katalysatoren Bu^tOK bzw. NaOH mit Luftsauerstoff umgesetzt (Tab. 8). Da N-Formylanthranilsäure, das eigentliche Reaktionsprodukt der Basenkatalyse, in basischem Milieu zu Anthranilat und Formiat hydrolysiert, wurde als Endprodukt der Reaktion neben Kohlenmonoxid lediglich Anthranilat nachgewiesen. Mit Bu^tOK als Katalysator lief die Reaktion sehr schnell ab und bereits nach 30 min (NaOH: 24 h) wurden die Reaktionsprodukte aufgezeigt. Unter anoxischen Bedingungen wurde keine Reaktion des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolins festgestellt. Ebenfalls keine Umsetzung des Substrates fand in Gegenwart von Imidazol als Katalysator statt (Daten nicht gezeigt).

Tab. 8: Basenkatalysierte Umsetzung des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolins in Gegenwart der Basen Bu^tOK und NaOH: Auswirkung verschiedener Radikalfänger auf die chemische Reaktion. ^a: Bei der Verwendung von Bu^tOK diente DMF als Lösungsmittel und das molare Verhältnis von Base zu Substrat betrug 5:1; ^b: Bei der Verwendung von NaOH diente H₂O als Lösungsmittel und das molare Verhältnis von Base zu Substrat betrug 10:1. +: Nachweis von Anthranilat und Kohlenmonoxid; -: Weder Anthranilat noch Kohlenmonoxid wurden nachgewiesen.

Katalysator	Effektor	Nachweis der Reaktionsprodukte Anthranilat und Kohlenmonoxid nach	
		0,5 h	24 h
Bu^tOK^a	-	+	+
	D-Mannit	+	n.b.
	NtB	+	n.b.
	4-POBN	+	n.b.
NaOH^b	-	-	+
	D-Mannit	-	+
	NtB	-	+
	4-POBN	-	+

Die basenkatalysierte Spaltung des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolins wurde nach 2.33.2 zusätzlich in Gegenwart von Inhibitoren untersucht, die einen deutlichen Einfluß auf

die enzymkatalysierte Umsetzung des Substrats hatten. Wie die Tab. 8 zeigt, wurde die Reaktion weder durch den Radikalfänger D-Mannit noch durch die beiden Spin-Traps NtB und 4-POBN gehemmt und es konnten die Produkte Anthranilat und Kohlenmonoxid nachgewiesen werden. Eine Verlangsamung des Umsetzungsprozesses konnte mit dieser Methode nicht festgestellt werden.

3.13 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

3.13.1 Statische Spektren

Die statischen ESR-Analysen (2.34.1) der nativen His₆Qdo zeigten keine Signale und ergaben damit keinen Hinweis auf einen metallischen Co-Faktor. Auch in Gegenwart von 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin und Spin-Traps (NtB bzw. 4-POBN) unter aeroben Bedingungen konnten keine ESR-Signale aufgezeichnet werden, die eine Zuordnung zu einem während der Reaktion entstehenden organischen Radikal zuließen.

3.13.2 Dynamische Spektren

Die Aufzeichnung dynamischer ESR-Spektren (2.34.2) zeigte bei den Ansätzen mit His₆Qdo, Substrat und NtB sowie mit Substrat und NtB unter aeroben Bedingungen drei deutliche Signale bei 3433, 3450 und 3467 Gauss (Abb. 27). Dabei waren die Peaks in Abwesenheit von His₆Qdo größer. Dieses Triplett entspricht den Signalen eines NO[•]-Radikals und deutet somit auf die Stabilisierung entstandener Radikale durch den Spin-Trap NtB hin. Die Untersuchung der Ansätze His₆Qdo/NtB bzw. Ethanol/Puffer/NtB zeigten keine Signale.

Die Entstehung von ist nach dieser ESR-Analyse auf eine Reaktion des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolins zurückzuführen und sind kein Produkt der enzymatischen Katalyse.

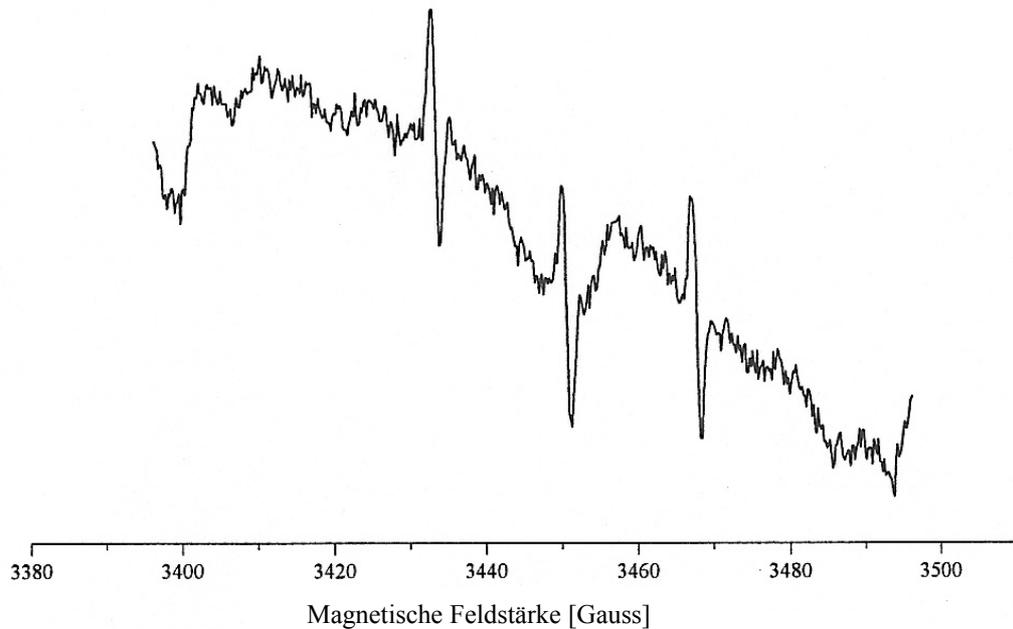


Abb. 27: Dynamisches ESR-Spektrum des Qdo-Substrates *1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin* in Gegenwart des Spin-Traps NtB bei RT.

3.14 Untersuchung zur Substratbindung

Wie die Tab. 9 zeigt, konnte im nach 2.35 durchgeführten Versuch unter anaeroben Bedingungen keine kovalente Bindung des Substrates an die His₆Qdo nachgewiesen werden. Auch ohne die Denaturierung des Enzyms wurde das eingesetzte *1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin* vollständig im Filtrat wiedergefunden. Die Standardabweichungen der Messergebnisse waren mit Werten zwischen 7 und 0,6% sehr gering. In einem Kontrollversuch unter aeroben Bedingungen konnte nachgewiesen werden, daß die im Versuch eingesetzte His₆Qdo noch aktiv war.

Tab. 9: Untersuchungen zur Bindung des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin an die Qdo unter anoxischen Bedingungen.

Inkubationsansatz	Substratmenge im Filtrat (Standardabweichung) in nmol
10 0,58 nmol Substrat	10 0,7
30 0,29 nmol Substrat	30 0,7
10 0,39 nmol Substrat 5 nmol His ₆ Qdo	10 0,29
30 0,39 nmol Substrat 5 nmol His ₆ Qdo	30 0,19
10 0,29 nmol Substrat 5 nmol His ₆ Qdo 80 mM Gu-HCl	10 0,39
30 0,19 nmol Substrat 5 nmol His ₆ Qdo 80 mM Gu-HCl	30 0,29

4. Diskussion

4.1 Reinigung und Homogenität der Proteine His₆Qdo und His₆Hod

4.1.1 Reinigung der rekombinanten Proteine His₆Qdo und His₆Hod

Die Reinigung der rekombinanten Enzyme His₆Hod, His₆Qdo und ihrer Varianten erfolgte mit Hilfe des fusionierten Hexa-Histidin-tags am N-Terminus der Proteine mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie nach SCHMITT et al. (1993) und CHEN & HAI (1994). Die Reinigung wurde in Anlehnung an MAX (1997) unter optimierten Bedingungen mit Tris-Puffer durchgeführt. Während zu Beginn dieser Arbeit die Elution wie von MAX (1997) beschrieben erfolgte, änderte sich im Laufe der Zeit das Adsorptionsverhalten der His₆Qdo und der His₆Hod und sie wurden bereits bei sehr viel geringeren Imidazol-Konzentration eluiert, was eine leicht erhöhte Verunreinigung des angereicherten Proteins zur Folge hatte. Dies führte zu der Vermutung, daß zum einen der His-tag nur unvollständig synthetisiert wird und die Affinität zu den Nickel-Ionen der Chromatographie-Matrix geringer geworden ist. Zum anderen könnte durch die starke Überexpression der Enzyme eine zu geringe Anzahl an Chaperonen in der Zelle veränderte Tertiärstrukturen zur Folge haben, die den His-tag unzugänglich machen. Die Sequenzierung des *hod*-Gens zeigte jedoch, daß der für den His-tag codierende Sequenzbereich auf dem Plasmid pQE30::*hod* vollständig erhalten ist und daher eine nur teilweise Expression der sechs Histidinreste unwahrscheinlich werden läßt. Eine fehlerhafte Faltung der Proteine aufgrund der hohen Überexpression hätte sich in der Aktivität der Enzyme und im Elutionsprofil bemerkbar machen müssen. Trotz des veränderten Elutionsverhaltens blieb jedoch die spezifische Aktivität unverändert. Da es unwahrscheinlich erscheint, daß jedes Enzymmolekül während der Überexpression eine falsche Faltung erhält, könnte man die Elution des Proteins mit der korrekten Faltung und daher einen zweiten Peak bei einer höheren Imidazol-Konzentration erwarten. Aber auch dies war nicht der Fall.

Der Verlust des Inserts oder seine teilweise Beschädigung während der Kultivierung eines Expressionsklones auf Agarplatten über einen längeren Zeitraum hinweg ist kein seltenes Phänomen. Um dieses für den Expressionsklon der 2,4-Dioxygenase auszuschließen, wurden eingefrorene Zellen des Stammes *E. coli* M15 [pREP4] pQE30::*qdo* auf LB-Medium kultiviert und die exprimierte His₆Qdo ebenfalls mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt. Auch in diesem Fall wurde das Enzym bei der gleichen Imidazolkonzentration eluiert wie das Protein aus den auf Agar-Platten kultivierten Zellen.

Eine Erklärung für die Elution der Fusionsproteine bei niedrigen Imidazol-Konzentrationen konnte nicht gefunden werden. Um für einen hohen Reinheitsgrad des Pro-

teins zu sorgen, der vor allem für die Kristallisationsversuche der His₆Qdo und der His₆Hod notwendig ist, erfolgte nach der Metallchelate-Affinitätschromatographie ein weiterer Reinigungsschritt mittels eines starken Anionenaustauschers. Dadurch konnte sowohl der Anreicherungsfaktor als auch die spezifische Aktivität beider Enzyme leicht verbessert werden.

4.1.2 Homogenität der Fusionsproteine

Neben dem bereits erwähnten hohen Reinheitsgrad des zu kristallisierenden Proteins muß die Probe auch ein hohes Maß an Homogenität aufweisen, da auch die Gegenwart verschiedener Oligomere eines Moleküls in einer Lösung die Bildung eines homogenen Kristalls beeinflussen kann (PERUTZ, 1992). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Löslichkeit des Proteins. Während geringe Salzkonzentrationen die Kristallbildung unter Umständen fördern können, führen hohe Ionenstärken zu einer Konkurrenz um die Wassermoleküle und damit zu einer schlechteren Löslichkeit.

Die SDS-PAGE der His₆Qdo vermittelte zunächst den Eindruck, daß die Proteinlösung nach der Reinigung homogen ist und keine Verunreinigungen durch Fremdproteine aufweist. Eine native PAGE dagegen zeigt eine große Anzahl an Banden mit einer annähernd gleichen Intensität und sehr regelmäßigen Abständen. Die Gegenwart von Proteaseinhibitoren und die Lagerung des Enzyms in verschiedenen Good-Puffern konnte dieses Erscheinungsbild nicht verhindern. Da jedoch durch die Zugabe eines Reduktionsmittels (DTT oder TCEP) die Anzahl der Banden auf ein Minimum reduziert werden konnte, ist die Entstehung dieses Bandenmusters sehr wahrscheinlich auf die Oligomerbildung aufgrund einer Oxidation zurückzuführen. Die 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase besitzt insgesamt 6 Cysteinreste und läßt daher die Bildung von Disulfidbrücken zwischen Enzymmolekülen möglich erscheinen.

Die Analyse der Qdo mittels Massenspektrometrie ergab abweichende Ergebnisse. Die MALDI-TOF zeigte zunächst, daß die untersuchte Proteinlösung keine Verunreinigungen enthält und die Qdo als Monomer vorliegt. Dagegen konnte mit dem Dynamic Lightscattering die Bildung von Oligomeren nachgewiesen werden, welche durch eine Filtration entfernt werden konnten.

Einen weiteren Nachweis der Inhomogenität der Qdo lieferte die isoelektrische Fokussierung. Die Elektrophorese zeigte zunächst sehr viele Banden im Bereich zwischen den pH-Werten 5,5 und 6,0. Auch in diesem Fall konnte die Zahl der Banden durch die Zugabe von DTT und Octyl- β -D-glucopyranosid auf zwei reduziert werden (pI¹ 5,5 und pI² 6,0).

GARFIN (1990) beschreibt das Auftreten mehrerer Banden während der IEF einer reinen Proteinprobe als nicht ungewöhnlich. Ursachen dafür können molekulare In-

teraktionen und damit einhergehende Konformationsänderungen während der Elektrophorese und die isoelektrische Heterogenität des Enzyms sein. Die molekularen Interaktionen beziehen sich nach CANN (1979) auf Wechselwirkungen mit den Trägerampholyten des pH-Gradienten. Diese Komplexbildung führt zur Veränderung des Makromoleküls und somit zu einer Veränderung des pI. Die isoelektrische Heterogenität eines Enzyms kann auch aufgrund einer Deaminierung der Amidfunktion der Aminosäuren Asparagin und Glutamin auftreten. Im Fall der rekombinanten Phenylalanin-Hydroxylase des Menschen (SOLSTAD & FLATMARK, 2000) führt diese Deaminierung zur Bildung mehrerer Banden unterschiedlicher Intensität auf einem IEF-Gel. Das Bandenmuster ist in diesem Fall allerdings abhängig von der Induktionsdauer des Expressionsklones mit IPTG und läßt sich nicht wie bei der Qdo durch Zugabe eines Reduktionsmittels reduzieren.

Die Kristallisation der rekombinanten 2,4-Dioxygenasen His₆Qdo und His₆Hod konnte bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden (H.-J. HECHT und R. STEINER: persönliche Mitteilungen). Gründe dafür könnten die deutlich erkennbare Oligomerbildung durch Oxidationsvorgänge und die mögliche Heterogenität der Qdo sein, die durch die IEF sichtbar wird. Nach WIEGAND (1990) ist die SDS-PAGE-Homogenität des Proteins die minimale Anforderung für eine Kristallisation. Störungen wie die Oxidation oder Reduktion, Konformationsänderungen des Makromoleküls und auch die Effekte der Mikroheterogenität können die Kristallbildung negativ beeinflussen.

4.2 Klonierung der Gene *qdo* und *hod* in den Vektor pQE-50

Zur Aufklärung der Struktur und des Katalysemechanismus der 2,4-Dioxygenasen ist die Kristallisation der Proteine von enormer Bedeutung. Während der Überexpression des *qdo*-Gens wurde an den N-Terminus des Proteins ein sechs Histidinreste umfassender tag fusioniert, um eine schnellere und weniger verlustreiche Reinigung zu erzielen. Obwohl in der Literatur kein Hinweis auf die Beeinflussung der Kristallbildung durch einen His-tag existiert, scheiterten bisher alle unternommenen Versuche der Kristallisation des Fusionsproteins, so daß eine Störung der Kristallisation durch den His-tag nicht ausgeschlossen werden kann.

Für die Überexpression der Gene *qdo* und *hod* ohne His-tag wurde das gleiche Expressionssystem der Firma QIAGEN verwendet wie bisher. Der Vektor pQE-50 entspricht im wesentlichen dem Vektor pQE-30, besitzt jedoch keine für einen His-tag codierende Sequenz. Nach der Amplifikation der Gene aus den Vektoren pQE-30::*qdo* bzw. pQE-30::*hod* mittels PCR und der Ligation mit dem Plasmid pQE-50 über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I wurden *E. coli* M15[pREP4]-Zellen mit den Expressions-Vektoren pQE-50::*qdo* und pQE-50::*hod* transformiert. Die Restrikti-

onsanalyse der ausgesuchten Klone *E. coli* M15[pREP4] pQE-50::*qdo* und *E. coli* M15[pREP4] pQE-50::*hod* ergab, daß die entsprechenden Inserts der Plasmide die erwarteten Größen besaßen und auch in richtiger Richtung inseriert wurden. Außerdem konnten mit Hilfe einer PCR-Analyse die Gene *qdo* und *hod* amplifiziert werden.

4.3 Reinigung der Enzyme Qdo und Hod aus den Klonen *E. coli* M15[pREP4] pQE-50::*qdo* und –pQE-50::*hod*

Nach der Überexpression der Gene *qdo* und *hod* in den Klonen konnte die Reinigung der Proteine nicht mehr mit Hilfe der Metallchelate-Affinitätschromatographie stattfinden. Sie erfolgte für die beiden Enzyme Qdo und Hod in Anlehnung an die Hod-Reinigung aus *Arthrobacter ilicis* Rü61a nach BAUER (1995) in einem vier chromatographische Schritte umfassenden Verfahren. Durch Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel, Adsorptionschromatographie an Hydroxyapatit, Anionenaustauschchromatographie an UNO Q und Gelfiltration an Bio-Prep 1000/17 konnten beide Proteine bis zur Homogenität auf Ebene der SDS-PAGE gereinigt werden.

Im Vergleich zur Reinigung der Histag-Enzyme lag die Ausbeute aufgrund der zusätzlichen Reinigungsschritte mit je 8,3% deutlich darunter (23,5% für His₆Qdo und 26% für His₆Hod). Die spezifische Aktivität der Hod war mit 8,2 U/mg für das Substrat der Qdo mehr als doppelt so hoch wie die spezifische Aktivität der His₆Hod, während die Werte für Qdo und His₆Qdo annähernd gleich waren (11,8 U/mg bzw. 13,7 U/mg).

Der signifikanteste Unterschied zwischen den Reinigungen der Enzyme 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin- und 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase ist das abweichende Adsorptionsverhalten an Hydroxyapatit. Während die Qdo unter den gewählten Bedingungen nicht an das Chromatographiematerial adsorbierte, wurde die Hod durch einen Kaliumphosphatgradienten von der Säule eluiert. Die gleichen Effekte wurden auch bei den Reinigungen der jeweiligen Enzyme aus *Pseudomonas putida* 33/1 (MAX, 1992) und *Arthrobacter ilicis* Rü61a (BAUER, 1995) beobachtet. Erste Untersuchungen der gereinigten Enzyme mittels nativer PAGE zeigten für die Qdo das gleiche Bandenmuster, das auch schon für die His₆Qdo beobachtet wurde. Auch in diesem Fall konnte die Anzahl der Banden durch die Zugabe von DTT verringert werden. Eine IEF in Gegenwart von DTT und Octyl-β-D-Glucopyranosid führte zur Bildung von drei Banden mit pI-Werten von 4,8, 5,0 und 5,1. Die native PAGE der Hod zeigte drei Banden unterschiedlicher Intensität. Dabei handelt es sich nach einer MALDI-TOF-Analyse um zwei Formen des Monomers und ein Dimer (Ursula Frerichs-Deeken, persönliche Mitteilung).

4.4 Aminosäuresequenzanalyse und Reaktionsmechanismus der 2,4-Dioxygenasen

4.4.1 Aminosäuresequenzanalyse

4.4.1.1 Sequenzvergleich der 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase mit α/β -Hydrolasen

Die Analyse der Aminosäuresequenz der 2,4-Dioxygenase 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase (Qdo) aus *Pseudomonas putida* 33/1 zeigte wie schon von MAX (1999) beschrieben, daß die größte Homologie zur 1H-3-Hydroxy-4-oxochinoldin-2,4-Dioxygenase (Hod) aus *Arthrobacter ilicis* Rü61a besteht. Die beiden bakteriellen Dioxygenasen besitzen eine Identität von 37% und eine Ähnlichkeit von 50%. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß beide Enzyme die oxygenolytische Ringspaltung fast identischer Substrate katalysieren (Abb. 3) und sie sich auch in ihren biochemischen Eigenschaften sehr ähnlich sind (BAUER, 1996), ist die Identität sehr gering.

Die Homologien zu anderen Proteinen sind äußerst gering (Abb. 22). Eine Identität von 18% der Aminosäurereste zeigte die Atropinesterase (Tpes) aus *Pseudomonas putida*, welche die hydrolytische Spaltung von Atropin zu Tropin und Tropasäure katalysiert und als Modellenzym für die Serin-Esterasen gilt (HESSING, 1983). Identitäten zwischen 12% und 15% gab es zwischen der Qdo und weiteren Hydrolasen, z.B. der Haloalkan-Dehalogenase (Dh1A) aus *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (JANSSEN et al., 1989), der 2-Hydroxymuconsäure-semialdehyd-Hydrolase (XylF) aus *Pseudomonas putida* (DÍAZ & TIMMIS, 1995) und der Epoxidhydrolase (EchA) aus *Agrobacterium radiobacter* AD1 (RINK et al., 1997). Die Cofaktor-freien Haloperoxidasen CpoL aus *Streptomyces lividans* TK64 (BANTLEON et al., 1994), CpoP aus *Pseudomonas pyrrocinia* (WOLFFRAMM et al., 1993) und BpoA2 aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC10762 (PFEIFER et al., 1992) wiesen ebenfalls Homologien von ca. 15% auf. Neueste Datenbankrecherchen ergaben, daß es keine Hinweise auf Ähnlichkeiten zu bisher bekannten Dioxygenasen gibt.

Das Gesamtalignment der Qdo mit den nach der Sequenzanalyse ähnlichsten Primärstrukturen (Abb. 22) macht deutlich, daß die Homologien zwischen diesen Proteinen auf wenige Bereiche beschränkt sind. Am N-Terminus sowie im zentralen Segment der Enzyme finden sich keine Übereinstimmungen in der Abfolge der Aminosäuren. Lediglich in einem ca. 120 AS umfassenden Bereich zwischen dem N-Terminus und dem mittleren Segment und am C-Terminus sind Sequenzhomologien zu erkennen. Mit Hilfe der Kristallographie und anschließender Röntgenstrukturanalyse wurde die räumliche Struktur von drei zum Sequenzvergleich herangezogenen Enzymen aufgeklärt. Danach gehören die Proteine Dh1A (FRANKEN et al., 1991; VERSCHUEREN

et al., 1993b), BpoA2 (HECHT et al., 1994) und EchA (NARDINI et al., 1999) zur Superfamilie der Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung (4.4.1.3). Für alle anderen hier aufgeführten Enzyme wird nach eingehender Sequenzanalyse und über verschiedene multiple Alignments ebenfalls postuliert, daß auch sie die α/β -Hydrolasefaltung besitzen (ARAND et al., 1994; ARAND et al., 1996; DÍAZ & TIMMIS, 1995; HECHT et al., 1994; KROOSHOF et al., 1997).

Die Superfamilie der Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung wurde von OLLIS et al. (1992) aus zunächst 5 Enzymen gebildet, die nur geringe Gemeinsamkeiten aufwiesen. Neben der gleichen Tertiärstruktur besitzen alle Enzyme dieser Familie eine katalytische Triade. Trotz signifikanter Varianzen sind die Aminosäuren der Triade in der Primärstruktur in der Abfolge nukleophile AS–saure AS–Histidin konserviert, und auch die Topologie der katalytisch essentiellen Aminosäuren stimmt überein (NARDINI & DIJKSTRA, 1999b). Die Enzyme der Superfamilie katalysieren die Umsetzung verschiedenster Substrate. Bis heute ist durch Röntgenstrukturanalyse der Nachweis für insgesamt 50 Enzyme erbracht worden, daß sie zur Enzymfamilie mit α/β -Hydrolasefaltung gehören, und die Zahl nimmt stetig zu (HEIKINHEIMO et al., 1999). Zu der Familie gehören Proteasen, Lipasen, Esterasen, Dehalogenasen, Peroxidasen und Epoxid-Hydrolasen.

4.4.1.2 Konservierte Sequenzmotive der 2,4-Dioxygenasen und der α/β -Hydrolasen

Innerhalb der Primärstrukturen der Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung gibt es einige konservierte Bereiche. Diese Motive finden sich zum Teil nur gering verändert in allen Aminosäuresequenzen der Mitglieder der Superfamilie wieder und gelten daher als charakteristisch. Um diese Konsensussequenzen mit der Primärstruktur der Qdo zu vergleichen, zeigt die Abb. 28 kurze Ausschnitte eines multiplen Sequenzalignments.

Das auffälligste Motiv in den Aminosäuresequenzen der Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung ist der Bereich um den nukleophilen Rest der katalytischen Triade. Das Motiv lautet Sm-X-Nu-X-Sm-Sm, wobei Sm (small) für eine kleine und X für eine beliebige Aminosäure steht. Dieser hochkonservierte Bereich findet sich in allen Sequenzen im Alignment wieder und bildet den sogenannten nukleophilen Ellbogen (OLLIS et al., 1992). Durch diesen scharfen Knick, der durch extreme Werte für die Drehwinkel Σ und Ψ des Nukleophils entsteht (NARDINI et al., 1999), ist die Erreichbarkeit des nukleophilen Restes für das Substrat sehr groß. Von den Aminosäuren Nu-2 und Nu+2 muß mindestens eine, in der Regel aber beide aus sterischen Gründen klein sein, da sie nahe zusammen liegen können (OLLIS et al., 1992). Daher

dient in den meisten Fällen das Glycin (z.B. XylF und CpoL), teilweise aber auch ein Valin als kleine Aminosäure (z.B. DhIA).

Nach NARDINI & DIJKSTRA (1999b) kann die Position des (vermeintlichen) Nukleophils der Triade ein Serin, ein Aspartat oder ein Cystein einnehmen. Bei vielen Hydrolasen, z.B. XylF (DÍAZ & TIMMIS, 1995), und bei allen Cofaktor-freien Haloperoxidasen, z.B. BpoA2 (PELLETIER et al., 1995) ist es ein Serin (Abb. 28). Die Enzyme DhIA (PRIES et al., 1994), EchA (RINK et al., 1997) und die lösliche Epoxid-Hydrolase aus der Rattenleber (rsEH) (ARAND et al., 1996) besitzen dagegen ein Aspartat als nukleophile Aminosäure. Bei den beiden 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod befindet sich an vergleichbarer Position ein Serin. Die Umgebungen des S95 der Qdo und des S101 der Hod ähneln dem Konsensusmotiv der Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung. Lediglich die Position Nu-2 ist bei beiden Dioxygenasen nicht von einer kleinen Aminosäure, sondern ebenfalls von einem Serin besetzt.

Bei den Enzymen mit α/β -Hydrolasefaltung ist die dem nukleophilen Triadenrest folgende Aminosäure an der Positionierung des Substrates während der Katalyse beteiligt (NARDINI & DIJKSTRA, 1999b). Während es bei vielen Enzymen dieser Familie entweder eine aromatische Aminosäure (Phenylalanin oder Tryptophan) oder ein Methionin ist, besitzen die Qdo und die Hod als einzige Enzyme ein Histidin.

Das katalytisch essentielle Histidin ist die einzige Aminosäure der Triade, die in allen Hydrolasen und Cofaktor-freien Haloperoxidasen konserviert ist. Der Nachweis der Funktion als Base in der katalytischen Reaktion wurde für das Histidin der Triade bereits für die Enzyme BpoA2 (PELLETIER et al., 1995), DhIA (PRIES et al., 1995), EchA (NARDINI et al., 1999), rsEH (ARAND et al., 1996) und XylF (DÍAZ & TIMMIS, 1995) erbracht. Ein konserviertes Sequenzmotiv für die Umgebung des Histidin läßt sich nicht in allen Primärstrukturen erkennen. Die Hydrolasen der Superfamilie besitzen allerdings mit der Sequenz G-(X)-H-Ar-X-Q-X-E mit Ar für eine aromatische Aminosäure einen kurzen konservierten Bereich. Obwohl bei den Cofaktor-freien Haloperoxidasen dieses kurze Motiv nicht zu erkennen ist, wurde bei der Datenbankrecherche automatisch das (potentiell) katalytisch essentielle Histidin mit denen der Hydrolasen angeordnet. Im Alignment mit den Enzymen mit α/β -Hydrolasefaltung (Abb. 28) finden sich bei den 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod als äquivalente Histidinreste das H244 (Qdo) und H251 (Hod). Nach dem potentiellen Histidin der Triade folgt bei beiden Enzymen die aromatische Aminosäure in Form eines Phenylalanin. Ein Glycin befindet sich sowohl bei der Qdo als auch bei der Hod jedoch an Position H-3 und ein Glutamat am Ende des Konsensusmotivs besitzt nur die Qdo.

Die katalytisch essentielle saure Aminosäure der Triade befindet sich in keinem echten konservierten Motiv in der Primärstruktur wieder. Nach DÍAZ & TIMMIS (1995) befindet sich der saure Rest der Triade, der von einem Aspartat oder Glutamat

(NARDINI & DIJKSTRA, 1999b) gestellt wird, ca. 27 Aminosäuren NH₂-terminal vom Histidin der Triade. Aus dem Alignment (Abb. 28) kann für einige Hydrolasen das Motiv H/(X)-G-X-X-D-X-X-X-(X)-P abgeleitet werden. In einigen Aminosäuresequenzen befindet sich direkt vor dem katalytisch essentiellen Aspartat ein weiteres Aspartat, dessen Funktion aber unbekannt ist. Die abgeleitete Konsensussequenz findet sich in den Primärstrukturen von Qdo und Hod nicht wieder und gibt daher keinen Hinweis auf die Position der möglichen katalytisch essentiellen sauren Aminosäure. Im Abstand von 25 Resten NH₂-terminal vom Histidin befindet sich das D219 bei der Qdo, während in diesem Bereich bei der Hod drei Glutamatreste vorhanden sind (E224, E226, E228). Die Anwendung unterschiedlicher Algorithmen führte auch zu unterschiedlichen Alignments (Abb. 22 und Abb. 28). Bei allen Sequenzvergleichen mit BLAST wurde bei Qdo und Hod ein Glutamin an die äquivalente Position der sauren Aminosäure der Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung gesetzt. Auch für die Tpes wird an dieser Position kein Glutamat oder Aspartat sondern ein Asparagin angeordnet, dessen Funktion im Katalysemechanismus bisher jedoch nicht bestimmt ist.

Neben den Konsensussequenzen der katalytisch essentiellen Aminosäuren gibt es in der Superfamilie der α/β -Hydrolase-gefalteten Enzyme noch einige weitere Motive. 40-50 Aminosäuren N-terminal vom Nukleophil beginnt das Motiv R-V-I-A-P-D, welches nach FRANKEN et al. (1991) ein β -Faltblatt in der Tertiärstruktur der DhIA bildet. Dieser Sequenzbereich ist in den meisten Primärstrukturen der Enzyme dieser Superfamilie und auch in den Sequenzen der Qdo und der Hod zu finden. Direkt nach diesem Motiv folgt im Abstand von 34 Aminosäuren zum nukleophilen Rest (DÍAZ & TIMMIS, 1995) die Konsensussequenz G-X-G-X-S(-X_{2/4}-P), die ebenfalls in fast allen Hydrolasen und Cofaktor-freien Haloperoxidasen sowie in der Hod vorhanden ist. Die Primärstruktur der Qdo weist diesen Bereich nicht auf. Im Abstand von 8-9 Aminosäureresten N-terminal zum nukleophilen Rest taucht bei vielen Enzymen dieser Superfamilie die Sequenz D/E-A-L-G/D(/E)-L(/I) auf. In den Sequenzen von Qdo, Hod und auch Tpes ist dieser Bereich sehr unterschiedlich gestaltet. Das Motiv P-E-R-V ist 13-15 Aminosäuren C-terminal vom Nukleophil in den meisten der in den Alignments aufgeführten Sequenzen lokalisiert.

Aufgrund des Vorhandenseins der Konsensussequenzen der Enzymfamilie der α/β -Hydrolasefaltung und der typischen Reihenfolge der potentiellen Triadenreste Serin (als Nukleophil) und Histidin könnten die beiden 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod dieser Superfamilie zugeordnet werden. Trotz der insgesamt geringen Sequenz-homologien, welche die Enzyme dieser Familie aufweisen (OLLIS et al., 1992), besitzen die katalytisch essentiellen Triadenreste eine ähnliche Topologie und räumliche Position. Dies könnte auch auf die Qdo und Hod zutreffen.

DISKUSSION

(I)		120
Qdo	HVICPDWRGHDAKQTDSDG-----FDSQTLAQDLLAFIDAKGIRDFQM-VSTSHGCGW-VNIDVCEQLG--AARLPKTIVID	120
Hod	RVIVPNWRGHGLSPCEVPD-----FGYQEQVKDALEILDQLG-VETFLPVSHHGCGW-VLVELLEQAG-P-ERAPRGIIMD	126
Tpes	RYLALDLRGHGGTSIPKCC-----YYVSDFAEDVSDFIDKMGLHN-TTVIGHSMGSG--MTAGVLASIH-P-DKVSRLVLS	134
BphD	RVILKDSFGFNKSDAVVMDE-----QRGLVNARAVSGKGLMDALGI-DRAHLVGNMGGATALNF--AIEY-P-DRIGKLILMG	136
TodF	RVIAPDMVGFQFTQPHGIH----YGVESWVAHLAAGILDALDEL-DRVDLVGNMFGGALSALF--AIRF-P-HRVRRLLVLMG	129
XylF	RVIAPDMLGFYSERPADGK----YSQARWVEHAIGVLDALGI-QQADIVGNMFGGGLALAL--AIRH-P-ERVRRLLVLMG	131
DmpD	RVIAPDMLGFYSERPADAQ----YNRDVVVDHVAAGVLDALGI-EQADLVGNMFGGGLALAL--AIRH-P-ERVRRLLVLMG	131
Lip3	HLIIPDLLGFNGSKPMT-AD----YRADAQATRLHELMQAKGLASNTHVGGNMGGALSVA-YAAKY--PKEIK-SLWLVD	166
BpoA2	RVITYDRRGFGQSSQPTTG----YDYDTFAADLNTVLETLDLQDAV-LVGFSGMTG-EVARYVS-SYGT-ARIAKVAFLA	124
CpoL	RVIAHRRRGHGRSQPSTG----HMDTYAADVAALTEALDRLGAV-HIGHSTGGG-EVARYVA-RAEP-GRVAKAVLVS	122
CpoP	RVIAHRRRGHGRSAQVSDG----HMDHYAADAFVVEALDLRNAV-HIGHSTGGG-EVARYVANDGQPAGRVAKAVLVS	124
Dh1A	RVIAPDFFGFGKSDKP---VDEEDYTFEHRNFLALIERLDLRN-ITIVVQDWGGFGLTLTPMA---DP-SRFKRLIIMN	148
LinB	RLIACDLIGMGDSKLDPS-GPERYAYAHRDYLDALWEALDLDGDRVVLVHDSGALGFHW--ARRH-R-ERVQGIAYME	132
DhaA	RCIAPDLIGMGKSDKP---DLD-YFDDHVRYLDAFIEALGLEE-VVLVHDSGALGFHW--AKR-NP-ERVKGIACME	130
DehH1	-VVCADLRGYGDSKPKCLPDRSNYSFRTFAHDQLCVMRHLGF-ERFHLVGHDRGGRTGHRM--ALDH-P-EAVLSLTVMD	129
EchA	DVIVPDLRGGDSSEKP-DLNDLSKYSLDKAADDQAALDLALGIEKAY-VVGHDFAAI-VL-HKFIRKYS--DRVIAKAIFD	131
rsEH	RVLAIDMKGYGDSSSPP---ETEEYAMELLCEEMVTFNLKLGIPQAV-FIGHDWAGV-LV-WNMALFH-P-ERVRAVASLN	357
	↓	
hPL	NCICVDWKGGSRTGYTQASQNIIRIVGAEVAYFVEFLQSAFGYSPSNVHVIGHSLG-A-HAA-GEAGRRT-NGTIGRITGLD	176

(II)		264
Qdo	KPEICHIYSQP-LSQDYRQLQLDFAAGHSWFHPRHIPG-RT-HFPSLENPVAVAQAIREFLQA	264
Hod	TRPIRHIFSQP-TEPEYEKINSDFAEQHPWFSYAKLGG-PT-HFPAIDVPDRAAVHIREFATAIRQQQ	276
Tpes	KTLILWGNQ---PMTESMQNDIRAAIPKAKFIQYNG-FG-HSMFWEDEPMVAKDLNEFLK	272
BphD	KTFITWGRDDR-FVP-LDHGLKLLWNIDD-ARLHVVFSGK-GHWAQWBEHADEFNRLAIDFLRQA	286
TodF	ETLILHGRDDR-VIP-LETSRLRNQLIEP-SQLHVVFGRCG-HWVQIEQNRGFIRLVNDFLAED	276
XylF	ETLVLHGRDDR-IIP-LQASLT-LAQWIPNAQLHVVFQCG-HWTQIEHAERPARLVENFLAEADALH-S	282
DmpD	ETLVLHGREDDQ-IIP-LQTSLT-LADWIARAQLHVVFQCG-HWTQIEHAERPARLVENFLAEADAAAS	283
Lip3	PTLVVWGDKQVIKPETTELIE--IIPQAQ-VIMMNDVG-HVPMVEAVKDTANDYKAFRDGLKK	315
BpoA2	PALILHGTGDR-TLP-IENTARVFKAEPSAEYVEVEGAP--HGLLWTHAEVENTALLAFLAK	278
CpoL	PVLVAHGHTDQ-VVPYADAAP-KSAELLANATLKSVEGLP--HGMLSTHPEVLNPDLLAFVKS	275
CpoP	PTLVLHGEDDQ-IVPIADAAL-KSIKLLQNGTLKTYPGYS--HGMLTVNADVLNADLLAFVQA	278
Dh1A	QTFMAIGMKDKLLGPDVMYPMKALINGCPEPL--EI-ADAG-HFVQEFGEQVAREALKHFAETE	310
LinB	KLFIN-AEPGALTGRMRDFCRT--W-PNQT--EI-TVAGAHFIQEDSFDEIGAAIAAFVRRRLRPA	295
DhaA	KLLFW-GTPGVLIIPPAEAARLAESLPNC-KTV--DI-G-PGLHYLQEDNPDLLIGSEIARWLPAL	293
DehH1	PTLVFYGSKGQM--GQLFDIPAWEAKRCNNT--NASL-PGGHFFVDQFPAETSEILKFLARNG	294
EchA	PVTMIWGLGD-TCVFPYALIEFVPKYYSNYTMET-IE-DCG-HFLMVKEP---EIALDRIKTAFR	294
rsEH	PALMVTAEKD--IVLRPEMSKN-MENWIPFLKRGHIE-DCG-HWTQIEKPAEVNQILIKWLKTEIQNPSVTSKI	554

Abb. 28: Multiple Sequenzalignments von Peptidsegmenten im Bereich der Reste der potentiellen katalytischen Triade der Qdo, Hod, verschiedener Hydrolasen und Cofaktor-freier Haloperoxidasen. Erläuterungen: Abkürzungen siehe auch Abb. 22, Literaturhinweise im Text; BphD: 2-Hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoat-Hydrolase aus *Pseudomonas putida* KF715 (EC 3.7.1.8); TodF: 2-Hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoat-Hydrolase aus *Pseudomonas putida* F1; DmpD: 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase aus *Pseudomonas* sp. CF600 (SWISSPROT-Zugangsnr. P23106); Lip3: Lipase 3 aus *Moraxella* sp. Stamm TA144 (EMBL-Zugangsnr. X53869.1); Cpo-P: Chlorperoxidase aus *Pseudomonas pyrocinia* (SWISSPROT-Zugangsnr. P25026); LinB: 1,3,4,6-Tetrachlor-1,4-cyclohexadien-Halidohydrolase aus *Sphingomonas paucimobilis*; DhaA: 1-Chloralkan-Dehalogenase aus *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064; DehH1: Haloacetat-Dehalogenase aus *Moraxella* sp. Stamm B (EC 3.8.1.3); EchA: Epoxid-Hydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1 (EMBL-Zugangsnr. Y12804.1); rsEH: lösliche Epoxid-Hydrolase aus der Rattenleber; hPL: Pankreas-Lipase des Menschen. Die möglichen Triadenreste sind unterstrichen und mit einem Stern markiert, das katalytische Aspartat der hPL ist mit einem Pfeil hervorgehoben und Aminosäuren, die in mehr als der Hälfte der angeordneten Sequenzen vorkommen sind fett gedruckt. Die Strukturen der unterstrichenen Enzyme sind aufgeklärt.

4.4.1.3 Struktur der α/β -Hydrolasen

Die gemeinsame Struktur der α/β -Hydrolasen besteht im Kern aus 8 überwiegend parallel angeordneten β -Faltblättern, die auf beiden Seiten von α -Helices eingerahmt werden (OLLIS et al., 1992). Die Topologie der zentralen β -Faltblätter nach RICHARDSON (1981) lautet +1, +2, -1x, +2x, (+1x)₃ und hat eine linksgängige superhelikale Windung, bei der das erste und letzte Faltblatt im Winkel von bis zu 90° zueinander stehen (NARDINI & DIJKSTRA, 1999b). Das Faltblatt β 2 ist antiparallel angeordnet. Die β -Faltblätter sind durch die α -Helices α A- α F miteinander verbunden. Dabei befinden sich die Helices α A und α F auf einer und die Helices α B bis α E auf der anderen Seite der Faltblätter (HEIKINHEIMO et al., 1999). Nach OLLIS et al. (1992) und NARDINI & DIJKSTRA (1999b) bietet dieser Faltungstyp ein stabiles Grundgerüst für das aktive Zentrum.

Die Struktur der α/β -Hydrolasefaltung toleriert sehr große Insertionen nach den Faltblättern β 3, β 4, β 6 und β 7, wodurch es innerhalb der Superfamilie zu extremen Varianzen in der Größe des Proteins kommen kann: Die Cutinase aus *Fusarium solani* hat eine Länge von 197 Aminosäuren (LONGHI et al., 1997), und die Acetylcholinesterase der Maus umfaßt 582 Aminosäuren. Die für die Substratbindung zuständige Domäne wird überwiegend wie bei der Dh1A (PRIES et al., 1994b) aus diesen Insertionen gebildet und liegt als sog. Cap-Domäne auf dem aktiven Zentrum. Sie kann allerdings auch als individuelle Domäne vorliegen, wie z.B. am C-Terminus bei den Pankreaslipasen (EGLOFF et al., 1995).

Bisher sind 52 unterschiedliche Enzyme kristallisiert worden und ihre Zugehörigkeit zur Familie der Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung bestätigt worden. In der Datenbank der Proteine mit α/β -Hydrolasefaltung ESTHER (COUSIN et al., 1998; <http://www.ensam.inra.fr/cholinesterase>) befindet sich eine vollständige Auflistung und Beschreibung der Enzyme dieser Superfamilie. Auch andere Datenbanken haben die Beschreibung der Struktur dieses Faltungstyps von OLLIS et al. (1992) übernommen: SCOP (MURZIN et al., 1995; <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>), CATH (ORENGO, 1997; <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath/>).

Um die Aussagekraft der Sekundärstrukturvorhersage für die 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase zu unterstützen, wurde ebenfalls eine Sekundärstrukturvorhersage für die Dh1A gemacht und diese mit der von FRANKEN et al. (1991) aufgeklärten Struktur verglichen (Abb. 22). Obwohl es geringe Unterschiede in der Anzahl und Position einzelner Strukturelemente gab, stimmte die Vorhersage für bestimmte Bereiche und die Abfolge der Strukturelemente im wesentlichen überein. Ein Vergleich der Vorhersage für die Qdo mit der bekannten Struktur der Dh1A zeigt, daß bei der 2,4-Dioxygenase die Faltblattstrukturen im Alignment an den entsprechenden Positionen liegen wie bei der Haloalkan-Dehalogenase. Differenzen gibt

es vor allem im N-terminalen Bereich, in dem die Primärstruktur der Qdo allerdings kürzer ist als die der Dh1A. In der Nähe des C-Terminus fehlt in der Vorhersage ein β -Faltblatt direkt vor dem Loop, in dem sich bei den Enzymen mit α/β -Hydrolasefaltung das katalytisch essentielle Histidin der Triade befindet. In diesen beiden Bereichen der Primärstruktur treten allerdings auch zwischen der Sekundärstrukturvorhersage für die Dh1A und deren wirklicher Sekundärstruktur Differenzen auf: Auch hier fehlen in der berechneten Struktur die Faltblätter $\beta 1$ und $\beta 2$ am N-Terminus und das Faltblatt $\beta 10$ direkt vor dem Histidin am C-Terminus.

Die sechs Helices der Kernstruktur der Superfamilie $\alpha A-\alpha F$ finden sich in der vorhergesagten Struktur der Qdo wieder und die Lage in der Primärstruktur entspricht den Positionen in der Dh1A. Das zentrale Segment besteht bei der Haloalkan-Dehalogenase aus fünf Helices, die eine für die Substratbindung verantwortliche Cap-Domäne bilden. Die vermeintlichen vier Helices der Qdo in diesem Sequenzbereich könnten ebenfalls eine solche Domäne bilden und für die Substratspezifität verantwortlich sein.

Nach der Vorlage des typischen topologischen Diagramms der α/β -Hydrolasefaltung läßt sich ein solches auch für die Qdo aus der Sekundärstrukturvorhersage ableiten. Ausgehend von der Struktur nach OLLIS et al. (1992) beginnt die Tertiärstruktur der Qdo mit dem antiparallelen Faltblatt $\beta 2$. Das Nukleophil der katalytischen Triade, bei der Qdo das S95, liegt auf dem nukleophilen Ellbogen nach dem Faltblatt $\beta 5$ und zwischen $\beta 6$ und der Helix αC befindet sich eine Insertion aus vier Helices, die eine Cap-Domäne bilden könnte. Der saure Aminosäurerest der Triade ist in vielen Enzymen nach dem β -Faltblatt 7 angeordnet. Nach NARDINI (1999b) befindet sich dieser Rest jedoch nicht grundsätzlich an dieser Position. Das katalytische Histidin liegt in der Regel zwischen $\beta 8$ und αF . Die Sekundärstrukturvorhersagen für die Dh1A haben gezeigt, daß keine genaue Vorhersage der Struktur möglich ist. Nach der Sekundärstrukturberechnung befindet sich das mutmaßliche Histidin der Qdo vor der Helix αF . Und obwohl das Faltblattes $\beta 8$ in dieser Vorhersage fehlt ist anzunehmen, das es in der tatsächlichen Struktur vorhanden ist.

1999 haben HEIKINHEIMO et al. vier Bedingungen als minimale Voraussetzungen für die Zugehörigkeit eines Enzyms zur Superfamilie der α/β -Hydrolasen definiert, von denen drei erfüllt werden müssen: Die Reihenfolge der katalytische Triade lautet Nukleophil-Säure-Histidin mit dem nukleophilen Rest nach $\beta 5$, das Nukleophil befindet sich in einem nukleophilen Ellbogen mit der Sequenz Sm-X-Nu-X-Sm, die typische Struktur der α/β -Hydrolasen beginnt nach dem Faltblatt $\beta 3$ und besitzt mindestens 5 Faltblätter, ein Loop nach $\beta 7$ ermöglicht den Seitenketten der Triadenreste die Bildung von Wasserstoffbrücken. Die Aminosäuresequenzanalyse der Qdo deutet darauf hin, daß die Qdo eine katalytische Triade in der Reihenfolge S95 als Nukle-

ophil, ein saurer Rest, der noch nicht definiert ist und das H244 besitzen könnte. Die Struktur in der typischen Abfolge der Strukturelemente ab $\beta 3$ mit fünf Faltblättern deutet sich nach der Sekundärstrukturvorhersage ebenfalls an, obwohl das $\beta 8$ fehlt. Ob der Loop nach dem Faltblatt $\beta 7$ die Anforderungen erfüllt, kann aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse nicht bestimmt werden. Trotzdem kann vermutet werden, daß die sich Qdo in die Superfamilie der Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung einordnen läßt.

4.4.2 Ortsspezifische Mutagenese des *qdo*-Gens: Besitzt die Qdo eine katalytische Triade?

Die Analyse der Aminosäuresequenz deutet darauf hin, daß die 2,4-Dioxygenase Qdo zur Familie der α/β -Hydrolasen gehört und möglicherweise auch eine katalytische Triade besitzt. Die Aminosäuren, die über die Sequenzalignments als potentielle Kandidaten für diese Triade in Frage kommen, wurden mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese ausgetauscht und die Kinetik der verschiedenen His₆Qdo-Varianten untersucht. Wenn trotz der Mutation die Faltung des Proteins korrekt ist, so kann ein Aktivitätsverlust als Konsequenz des Austausches einer katalytisch essentiellen Aminosäure gedeutet werden. Die korrekte Faltung der Enzymvarianten wurde vorausgesetzt, wenn diese das gleiche Verhalten bei der Proteinreinigung und der Gelelektrophorese zeigten wie die rekombinante Qdo. Zusätzlich wurde für jeden Austausch eine Sekundärstrukturvorhersage durchgeführt.

4.4.2.1 Nukleophiler Ellbogen und nukleophiler Rest der vermeintlichen katalytischen Triade

Aufgrund der Sekundärstrukturvorhersage der Qdo und des Sequenzalignments liegt die Vermutung nahe, daß S95 das Nukleophil der Triade sein könnte. Der Austausch dieser Aminosäure gegen das nichtionisierbare Alanin hatte zwar einen deutlichen Rückgang der Aktivität zur Folge, allerdings würde durch das Entfernen des katalytisch essentiellen nukleophilen Restes im aktiven Zentrum der völlige Verlust der Aktivität erwartet werden (z.B. DÍAZ & TIMMIS, 1992; PATHAK et al., 1991). Das Nukleophil der Hydrolasen mit einer katalytischen Triade kann ein Serin, ein Aspartat oder ein Cystein sein. Da das Cystein ein stärkeres Nukleophil darstellt als das Serin, wurde die Proteinvariante His₆QdoS95C hergestellt. Auch bei dieser Variante war die Aktivität drastisch reduziert mit einer Wechselzahl, die ca. 2200-fach kleiner war als die der rekombinanten His₆Qdo.

Auch bei den Serin-Proteasen Trypsin (HIGAKI et al., 1989; YOKOSAWA et al., 1977) und Subtilisin (NEET et al., 1966; POLGAR et al., 1966) sowie bei der

Acetylcholinesterase (GIBNEY et al., 1990) und Xyl F (DÍAZ & TIMMIS, 1995) blieb die Enzymaktivität durch den Austausch des aktiven Serin gegen ein Cystein nur in geringem Maße erhalten. Dagegen bewiesen WITKOWSKI et al. (1992, 1995) bei der Serin-Hydrolase Thioesterase II aus der Brustdrüse der Ratte, daß der Austausch des katalytisch essentiellen Serin durch ein Cystein nicht generell einen Aktivitätsverlust bewirken muß: Die Proteinvariante S101C hatte eine Restaktivität von 90% im Vergleich zum Wild-Typ.

Ein Grund für die geringe Aktivität einiger Enzyme nach dem Austausch des Serin gegen Cystein liegt sicherlich in der sterischen Behinderung im aktiven Zentrum durch die Thiolgruppe. Berücksichtigt man nun noch, daß nach CHEAH et al. (1993) die Cystein-Hydrolasen einen Glutamatrest zur Aktivierung des Cystein benötigen und dieses Glutamat im Zuge der Evolution nicht verloren gegangen ist, erklärt sich die unterschiedliche Aktivität der Enzyme nach einem Austausch des katalytischen Serin gegen ein Cystein. Nach BRENNER (1988) haben sich die Serin-Hydrolasen aus den Cystein-Hydrolasen entwickelt. Unterstützt wird diese Hypothese von DÍAZ & TIMMIS (1995), der die Neigung zum Serin als Nukleophil mit dem evolutionären Shift der Enzyme zu größerer Genauigkeit des Katalysemechanismus begründet. Tatsächlich deutet die Analyse der Nukleinsäuresequenz der Thioesterase II darauf hin, daß dieser Shift möglich war. Die Thioesterase II verwendet beide Typen des Serin-Codos, TCN (N= U,C,A oder G) und AGY (Y=T oder C). Durch den Austausch nur einer Base kann das Codon AGY aus dem Cystein-Codon TGY entstanden sein und damit auch die Serin-Hydrolase.

Die Qdo verwendet nur TCN als Codon für das Serin. Eine Entwicklung aus einer Cystein-Hydrolase und damit auch das Vorkommen eines entsprechenden Glutamatrestes ist daher eher unwahrscheinlich.

In der näheren Umgebung des S95 befinden sich in der Primärstruktur weitere Aminosäurereste, die bei entsprechender Ausrichtung im aktiven Zentrum die Funktion des Nukleophils S95 übernehmen oder auch den eigentlichen nukleophilen Rest darstellen könnten. Das Serin an Position 93, welches in der Sekundärstrukturvorhersage direkt hinter einem β -Faltblatt liegt, oder das C98 als potentielle Kandidaten, wurden gegen Alanin ausgetauscht. Während der K_m -Wert der His₆QdoS93A und His₆QdoC98A im Bereich der rekombinanten Qdo lag, war der k_{cat} bei beiden Proteinvarianten niedriger als bei der S95A-Variante des Enzyms. Das Threonin ist bisher als Aminosäurerest einer katalytischen Triade nicht bekannt, besitzt jedoch eine Hydroxylgruppe in der Seitenkette. Allerdings zeigte auch die Proteinvariante His₆QdoT94A noch Restaktivität (die Wechselzahl lag im Bereich der His₆QdoS95A) und scheidet als Nukleophil der Triade aus.

Wenn nach dem Austausch der nukleophilen Aminosäure eine der benachbarten Seitenketten diese Funktion übernimmt, so sollte der Austausch der entsprechenden

Aminosäuren in einer Qdo-Variante zu einem vollständigen Verlust der Aktivität führen. Während die Enzymvarianten His₆QdoS93A+S95A und His₆QdoT94A+S95A Enzymaktivität zeigten, die sich bei Wechselzahlen von 0,1 s⁻¹ bzw. 0,4 s⁻¹ im Bereich des His₆QdoT94A bewegten, konnte die Qdo-Variante S95A+C98A im Rohextrakt wahrscheinlich aufgrund der Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten durch unkorrekte Faltung nicht nachgewiesen werden.

Die Enge des Motivs Faltblatt-Turn-Helix im nukleophilen Ellbogen der α/β -Hydrolasen sorgt dafür, daß das Nukleophil der Triade extreme und energetisch ungünstige Drehwinkel Σ und Ψ einnehmen muß (NARDINI et al., 1999), damit die katalytisch essentielle Seitenkette möglichst weit in das aktive Zentrum ragt und somit für das Substrat erreichbar ist. Den benachbarten Aminosäureresten, die ihrerseits zur Stabilität dieser Struktur beitragen, werden starke sterische Beschränkungen auferlegt. Wie schon beschrieben, dient die Seitenkette der Aminosäure direkt nach dem Nukleophil der Positionierung des Substrates während der Katalyse. Eine Übernahme der Funktion der nukleophilen Seitenkette durch eine benachbarte Aminosäure ist nur denkbar, wenn infolge einer Strukturveränderung des nukleophilen Ellbogens, z.B. nach einer ortsspezifischen Mutation, dieser Rest eine identische Position im aktiven Zentrum einnimmt. Da die Mutationen der Qdo in diesem Bereich nicht zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führten, scheint das Enzym keinen katalytisch essentiellen nukleophilen Rest in diesem Bereich zu besitzen.

Es besteht die Möglichkeit, daß das Nukleophil der Qdo durch einen Shift innerhalb der Primärstruktur eine andere Position eingenommen hat. In der räumlichen Lage der potentiellen sauren Aminosäure der Triade befinden sich im Alignment zwei Serinreste, das S213 und das S217. Die Proteinvariante His₆QdoS217A zeigte jedoch eine signifikante Restaktivität. Ebenso wie das Enzym His₆QdoS95A+C98A konnte auch die Variante His₆QdoS213 im Rohextrakt nicht nachgewiesen werden.

Viele Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung besitzen ein sogenanntes Oxyanion-Hole, in dem die Stickstoffatome zweier Peptidbindungen zur Stabilisierung der negativen Ladung eines Übergangsstadiums während der Katalyse zuständig sind (NARDINI & DIJKSTRA, 1999b). Eine der beteiligten Aminosäuren ist die dem Nukleophil folgende und die zweite liegt zwischen dem Faltblatt β_3 und der Helix α_A . Da diese Bindungen nahe dem aktiven Zentrum liegen, könnte bei der Qdo ein Shift des Nukleophils der Triade an die Position der ersten Oxyanion-Hole-Aminosäure erfolgt sein. Nach dem Alignment (Abb. 22) könnten die Reste S28 und C31 diese Lage einnehmen. Die Qdo-Varianten His₆QdoS28A und His₆QdoC31A waren aber deutlich aktiv und können daher keine essentielle Rolle im Katalysemechanismus spielen.

Durch den Austausch des H96 gegen ein Phenylalanin sollte überprüft werden, ob dieser Rest eine Rolle bei der Positionierung des Substrates hat. Die Proteinvariante konnte jedoch nach der Expression im Rohextrakt nicht nachgewiesen werden.

4.4.2.2 Saure Aminosäure der hypothetischen katalytischen Triade

Die Identifizierung des sauren Restes der Triade ist sehr schwierig, da es für diese keinen hoch konservierten Bereich gibt. Nach DÍAZ & TIMMIS (1995) ist der Abstand von ca. 27 Aminosäuren zwischen dem katalytischen Histidin und der in N-terminaler Richtung gelegenen sauren Aminosäure charakteristisch. Das D219 der Qdo-Sequenz liegt 25 Reste N-terminal vom H244 und wird im Alignment in Abb. 22 an der Position des katalytischen Aspartats der α/β -Hydrolasen angeordnet. Allerdings sagt die Sekundärstrukturvorhersage für diesen Sequenzbereich eine α -Helix voraus. Die Qdo-Variante His₆QdoD219A zeigte für eine an der Katalyse beteiligte Aminosäure mit einem k_{cat} von $3,9 \text{ s}^{-1}$ eine zu hohe Restaktivität. Die Beteiligung des D219 als essentielles Mitglied an der Katalyse ist deshalb eher unwahrscheinlich.

Nach OLLIS et al. (1992) nimmt der saure Triadenrest eine Position direkt nach dem Faltblatt β 7 ein. Aber nicht nur die 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod sondern auch die Sequenzen der Enzyme LinB, DhaA und DehH1 weisen im Alignment nach BLAST (Abb. 28) in diesem Bereich weder ein Aspartat noch ein Glutamat auf. Das Alignment mit der Sequenz der hPL (Abb. 28) zeigt jedoch Übereinstimmungen mit dem katalytisch essentiellen D176 dieses Enzyms. Dieses Aspartat befindet sich im Loop nach dem Faltblatt β 6 der Pankreaslipase (SCHRAG et al., 1992), die sonst kaum signifikante Homologien mit den angeordneten Sequenzen aufweist. Der saure Triadenrest der Enzyme LinB, DhaA und DehH1 könnte ebenfalls hinter dem β -Faltblatt 6 lokalisiert sein, (KROOSHOF et al., 1997). Die analoge Position bei der Dh1A ist das N148, welches eine Wasserstoffbrücke zum Nukleophil D124 bildet (VERSCHUEREN et al., 1993). Nach dem gleichzeitigen Austausch der eigentlichen sauren Triadenaminosäure D260 gegen Asparagin und des N148 gegen Glutamat bzw. Aspartat in den Enzymvarianten Dh1A-D260N+N148D und Dh1A-D260N+N148E konnten KROOSHOF et al. (1997) tatsächlich eine geringe aber signifikante Aktivität nachweisen, während die Varianten Dh1A-D260N, -N148D und -N148E inaktiv waren.

Da im Alignment das D120 der Qdo die analoge Position zum D176 der hPL einnimmt, liegt die Vermutung nahe, daß dieses Aspartat katalytisch essentiell ist. Der Austausch gegen Alanin führte hingegen nicht zu einem drastischen Aktivitätsverlust, so daß auch dieses Aspartat kein Bestandteil einer katalytischen Triade sein kann.

Die binären Vergleiche mit BLAST (Abb. 28) ordneten die Sequenzen im Alignment im Bereich des sauren Triadenmitgliedes etwas anders an als im Gesamtalignment (Abb. 22), so daß bei der Qdo und bei der Hod ein Glutaminrest an der äquivalenten Position des sauren Restes liegt. Die Atropinesterase besitzt an gleicher Stelle ein Asparagin. Während das Asparagin in keiner bekannten Triade einer α/β -Hydrolase vorhanden ist und die Funktion des N225 der Tpes noch nicht bekannt ist, hat die Cystein-Protease Papain eine katalytische Triade mit der Reihenfolge Cys–His–Asn (OLLIS et al., 1992). Das Asparagin dieser Protease, deren Cystein nicht in einem nukleophilen Ellbogen angeordnet ist, unterstützt in diesem Enzym die Bildung eines Cys⁻/His⁺-Ionenpaares. Um den Einfluß des Q214 der Qdo zu untersuchen, wurde dieses gegen Alanin ausgetauscht. Bei einer sehr niedrigen Wechselzahl ($k_{\text{cat}} = 0,5 \text{ s}^{-1}$) verbesserte sich die Affinität zum Substrat leicht.

4.4.2.3 Histidin der hypothetischen katalytischen Triade

Der Austausch des H244 gegen Alanin führte zu einem völligen Aktivitätsverlust. Da sich das Protein bei der Reinigung und der SDS-PAGE wie die rekombinante Qdo verhielt, ist die Inaktivität sehr wahrscheinlich allein auf den Austausch zurückzuführen. Das Histidin an Position 244 der Qdo-Primärstruktur hat daher eine essentielle Bedeutung für den Katalysemechanismus.

Von der vermeintlichen Triade der Qdo konnte mit Hilfe der Mutagenese-Experimente lediglich das H244 als katalytisch essentielle Aminosäure identifiziert werden. Signifikante Änderungen der Aktivität in Form der Wechselzahl bei gleichbleibendem K_m -Wert konnten vor allem bei den Varianten His₆QdoS93A, His₆QdoQ214A, His₆QdoS93A+S95A und His₆QdoT94A+S95A festgestellt werden. Obwohl diese Aminosäurereste nicht zur vermeintlichen Triade gehören, so können sich nach HIGAKI (1989) im und um das aktive Zentrum positioniert sein und entweder für dessen Geometrie oder das Umfeld der katalytisch essentiellen Aminosäuren zuständig sein.

4.4.3 Biochemische Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus

Die Derivatisierung der frei zugänglichen Histidinreste der His₆Qdo mit Diethylpyrocarbonat wurde durch die Zunahme der Absorption bei 242 nm nachgewiesen und führte zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms. Nach MILES (1977) ist diese Inaktivierung jedoch nur dann auf die Modifikation der Histidinreste zurückzuführen, wenn diese durch Hydroxylamin wieder aufgehoben werden kann, da auch Tryptophan- und Argininreste irreversibel durch Diethylpyrocarbonat

derivatisiert werden. Durch die Zugabe von Hydroxylamin konnte die Aktivität der His₆Qdo zu 50% wiederhergestellt werden.

Trotz des His₆-tag der rekombinanten Qdo ist die Wahrscheinlichkeit der Beteiligung eines Histidinrestes am Katalysemechanismus sehr groß, da der His-tag keinen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms im Vergleich zur Qdo zeigt. BAUER (1995) konnte für die Hod ebenfalls die Inaktivierung des Enzyms in Gegenwart des Diethylpyrocarbonat feststellen, jedoch gelang die Reaktivierung des Enzyms mit Hydroxylamin nicht und somit war kein Rückschluß auf die Beteiligung eines Histidin am Katalysemechanismus möglich.

Einen weiteren Beweis für die Beteiligung eines Histidinrestes an der Katalyse ergab die Detektion ionisierbarer Gruppen. Schon BLOCK (1992) untersuchte die pH-Abhängigkeit der 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase und ermittelte ein pH-Optimum von 8,0. Der Einfluß des pH-Wertes auf die Affinität des Enzyms zum Substrat gibt Aufschluß darüber, welche ionisierbaren Gruppen an der Katalyse beteiligt sind. Für die Qdo wurde eine ionisierbare Gruppe mit einem p*K*_a-Wert von 6,0 für den Enzym-Substrat-Komplex ermittelt. Dieser Wert liegt im Bereich des p*K*_a-Wertes der Aminosäure Histidin (p*K*_a 6,1).

LEHOUX & MITRA (1999) bewiesen für die (*S*)-Mandelat-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida*, daß die Aktivität der durch den Austausch des essentiellen Histidin durch Punktmutation vollständig inaktiven Proteinvariante zum Teil hervorgerufen werden konnte. In Gegenwart von Imidazol wurde eine deutliche Aktivität des Enzyms festgestellt. Bei der Qdo-Variante His₆QdoH244A konnte keine Reaktivierung durch die Anwesenheit von Imidazol initiiert werden. Dies kann beispielsweise sterische Gründe haben.

In Gegenwart der Substanzen Iodacetamid und PMSF wurde eine Abnahme der His₆Qdo-Aktivität festgestellt. Da die relativ hohe Konzentration von 10 mM aber zu keiner vollständigen Inaktivierung führte, ist die Beteiligung eines Cystein oder Serin an der Katalyse fraglich. Auch die Derivatisierung von Cysteinresten durch Iodacetamid bei der Hod führte lediglich zu einem 50%igen Verlust der Aktivität (BAUER, 1995).

4.4.4 Versuch zur Substratbindung

Ausgehend von der Hypothese, daß die Qdo ebenso wie die Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung eine Triade besitzt, deren Reste eine ähnliche Funktion übernehmen, sollte die Substratbindung analog erfolgen. Bei der hydrolytischen Reaktion der α/β -Hydrolasen greift das Nukleophil das elektropositive Kohlenstoffatom des Substrates (z.B. ein Carbonyl-Kohlenstoff in einer Esterhydrolyse) an und bildet ein kovalent gebundenenes Enzym-Substrat-Intermediat (PRIES et al., 1994; VERSCHUEREN et al., 1993). Überträgt man diesen Mechanismus auf die Katalyse der Qdo, so könnte

das Nukleophil (S95) in seiner aktivierten, durch das Triadenhistidin deprotonierten Form einen nukleophilen Angriff auf das elektropositive Carbonyl-C-Atom C4 des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolins vornehmen und eine Esterbindung bilden.

Die Bildung eines kovalent gebundenen Enzym-Substrat-Intermediates unter anaeroben Bedingungen konnte nicht nachgewiesen werden. Nach der Inkubation des Enzyms mit dem Substrat und anschließender Ultrafiltration wurde alles eingesetzte Substrat im Filtrat wiedergefunden. Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, daß eine kovalente Substratbindung in Abwesenheit des Sauerstoffs nicht stattfindet. Ausgeschlossen werden kann diese Bindung jedoch nicht vollständig, denn entscheidend kann die Anlagerung/Bindung des O₂ vor dem nukleophilen Angriff auf das organische Substrat sein.

4.4.5 Katalysemechanismus der 2,4-Dioxygenasen: Ionischer oder radikalischer Mechanismus?

Die Untersuchung des Reaktionsmechanismus der beiden 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod beinhaltet die Frage, ob ein ionischer oder ein radikalischer Mechanismus vorliegt. Im Gegensatz zu den meisten Dioxygenasen besitzen weder die Qdo noch die Hod einen organischen oder metallischen Cofaktor (BAUER et al., 1996). Damit der molekulare Sauerstoff aber in das organische Substrat eingebaut werden kann, muß eins der beiden Substrate aktiviert werden, und dies geschieht in der Regel mit Hilfe eines Cofaktors.

Der Grundzustand des molekularen Sauerstoffs ist der Triplett-Zustand, in dem die beiden ungepaarten Elektronen über einen gleichgerichteten Spin verfügen. Gegenüber stabilen organischen Verbindungen im Singulett-Zustand (alle Elektronen sind gepaart), ist der Triplett-Sauerstoff reaktionsträge und die Reaktion dieser Substanzen wäre mit einem hohen Energieaufwand verbunden. Nach der Spinerhaltungsregel ist außerdem die Reaktion eines Triplettts mit einem Singulett zu einem Singulett-Produkt verboten.

Um diese Spinerhaltungsregel zu umgehen und die zu überwindende Energiebarriere möglichst gering werden zu lassen, verwenden Oxygenasen im allgemeinen einen Cofaktor. Dieser Cofaktor, der entweder metallisch oder organisch ist, bietet dem Enzym zwei Möglichkeiten. Zum einen kann ein Übergangsmetallion, welches wie der Sauerstoff ebenfalls ungepaarte Elektronen besitzt, einen Komplex mit dem Sauerstoff im Grundzustand bilden. Danach befindet sich der Sauerstoff zwar nicht im angeregten Singulett-Zustand mit zwei ungepaarten Elektronen mit gegenläufigem Spin, besitzt allerdings nach der Aufnahme eines Elektrons vom Metallions nur noch ein ungepaartes Elektron und kann eine Reaktion mit organischen Verbindungen im Singulett-Zustand eingehen.

Die zweite Möglichkeit betrachtet den Triplett-Sauerstoff in seiner Funktion als Biradikal. Bei diesem freien Radikal-Mechanismus reagiert der Sauerstoff mit einem

organischen Cofaktor als sog. Resonanz-stabilisiertes Radikal (HAMILTON, 1974; KEEVIL & MASON, 1978) und wird auf diese Weise aktiviert.

Um bei der Katalyse als Zwischenprodukt entstehende Radikale nachzuweisen wurde die Qdo-katalysierte Spaltung des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin zunächst in Gegenwart verschiedener Enzyme und Effektoren beobachtet. Lediglich der $\cdot\text{OH}$ -Radikalfänger D-Mannit führte dabei in einem hohen Konzentrationsüberschuß gegenüber dem Enzym zu einem Aktivitätsverlust von 74%, während Cytochrom *c*, Superoxid-Dismutase und Katalase keinen Effekt auf die Aktivität hatten. Die Reduktion von Cytochrom *c*, INT und NBT während der enzymkatalysierten Reaktion konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Allerdings ist die Erreichbarkeit von kurzlebigen Radikalen, die im aktiven Zentrum entstehen, für große Moleküle wie zum Beispiel die Proteine Superoxid-Dismutase und Katalase eher gering. Die Freisetzung von für die Reaktion essentiellen Superoxid-Radikalen vom Enzym ist unwahrscheinlich, wie die nicht vorhandene Reduktion von Elektronenakzeptoren zeigt.

Die Anwesenheit der Spin-Traps NtB und 4-POBN, die eine sehr geringe Molekülgröße besitzen und die Wahrscheinlichkeit der Entdeckung von Radikalen in einer enzymkatalysierten Reaktion erhöhen, führte, wie schon das D-Mannit, in hohen Konzentrationen zu einer deutlichen Beeinflussung der Aktivität. Mit Hilfe dieser Spin-Traps, die mit freien Radikalen reagieren und diese zu langlebigeren umformen, wurde die Ringspaltung des organischen Substrates der Qdo im Beisein von NtB bzw. 4-POBN untersucht. Doch die Ergebnisse aus dem Inhibitionsversuch konnten mit dieser Methode nicht dahingehend bestätigt werden, daß die teilweise Inaktivierung der Qdo auf das Entfernen von Radikalen durch die Spin-Traps zurückzuführen ist. Die Zugabe von NtB führte zwar dazu, daß bei der Spektroskopie die typischen Signale für ein $\text{NO}\cdot$ -Radikal (Triplet-peak) als Nachweis einer Reaktion des Spin-Traps aufgezeichnet wurden. Jedoch konnten die gleichen Signale mit einer sogar leicht erhöhten Intensität im Kontrollansatz mit NtB und 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin unter oxidischen Bedingungen beobachtet werden. Dies läßt den Schluß zu, daß zwar eine radikalische Reaktion zwischen Sauerstoff und organischem Substrat der Qdo vermutet werden kann, diese aber aufgrund der geringen Intensitäten der Signale keinen Einfluß auf die Katalyse haben können.

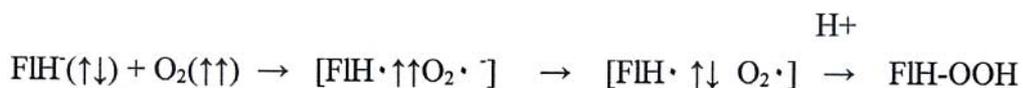
Die Beeinflussung der Enzymaktivität durch die Radikalfänger D-Mannit, NtB und 4-POBN sind wahrscheinlich auf die hohe Konzentration dieser Stoffe und die damit verbundene Blockierung des aktiven Zentrums und auf unspezifische Reaktionen der drei Substanzen zurückzuführen. Die Entstehung von Radikalen während der Katalyse scheint zwar aufgrund der bisherigen Ergebnisse unwahrscheinlich zu sein, kann aber dennoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Erreichbarkeit der sehr kurzlebigen Radikale ist gering, wenn diese am Ort des Entstehens, also im aktiven

Zentrum, sofort wieder für die weitere Reaktion benötigt werden und nicht freigesetzt werden.

BAUER (1995) schlug als Reaktionsmechanismus für die beiden 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod einen ionischen Reaktionsmechanismus in Anlehnung an die Basenkatalyse nach NISHINAGA et al. (1977, 1979) vor (1.2). Es gelang der Nachweis, daß die Umsetzung des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin und des 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin unter stark basischen Bedingungen zu den selben Produkten führte wie die enzymkatalysierte Reaktion. In dieser Arbeit wurde die Inhibition der Basenkatalyse durch die Inhibitoren untersucht, die einen Einfluß auf die enzymkatalysierte Reaktion hatten. Doch bei der rein chemischen Umsetzung in Gegenwart hoher pH-Werte konnte keine Inhibition der Reaktion festgestellt werden. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß bei der Reaktion, wie sie auch im Enzym ablaufen könnte, keine Radikale freigesetzt werden. Der hohe pH-Wert könnte allerdings auch die Funktion der Inhibitoren beeinflußt haben.

4.4.6 Sauerstoffaktivierung an reduzierten Flavinen

Ein Beispiel für einen radikalischen Mechanismus, bei dem Triplett-Sauerstoff mit einem organischen Substrat reagiert, ist die Reaktion von reduziertem Flavin mit Sauerstoff. Obwohl die direkte Reaktion zwischen dem Triplett-Sauerstoff und dem Singulett-Kohlenstoff verboten ist (Spinerhaltungsregel), geschieht diese mit freiem reduziertem Flavin und Sauerstoff in weniger als einer Sekunde (PALFEY et al., 1995). Die Reaktion geschieht sowohl autokatalytisch als auch in vielen Flavoenzymen. Zur Aktivierung des Sauerstoffs überträgt das reduzierte Flavin-Anion ein Elektron auf O₂ und bildet ein Flavin-Semichinon-Superoxid Radikalpaar. Dieses Radikalpaar kollabiert nach der Spin-Umkehrung in das Flavin C(4a)-Hydroperoxid (Hydroperoxyanion) (KEMAL et al., 1977; BRUICE et al., 1984):



Dieser Ein-Elektron-Transfer bei der Reaktion des freien Flavinanions mit O₂ scheint auch bei den von Flavoproteinen katalysierten Reaktionen der einleitende Schritt zur Aktivierung des Sauerstoffs zu sein (MASSEY, 1994). Auch in Pterin-abhängigen Hydroxylasen reagiert das reduzierte Pterin mit O₂ ähnlich dem Flavin und bildet ein C(4a)-Hydroperoxid, welches anschließend das Substrat hydroxyliert (EBERLEIN et al., 1984).

Das Zwischenprodukt Flavin C(4a)-Hydroperoxid (-Hydroperoxy-Anion) dient in vielen Enzymen in der weiteren Reaktion als Nukleophil. Ein Beispiel ist die Cyclohexanon-Monooxygenase, die eine Baeyer-Villinger Spaltung des Ketons seines Substrates katalysiert (CUMMINGS RYERSON et al., 1982). Ein zweites Beispiel ist die bakterielle Luciferase. Dieses Enzym ist eine Flavinhydroxylase, die im Gegensatz zu allen anderen Flavinhydroxylasen FMNH₂ als Cosubstrat verwendet und die Reaktion mit Sauerstoff und langkettigen aliphatischen Aldehyden zu FMN, H₂O, Carbonsäure und Licht katalysiert. Beide Enzyme, die Cyclohexanon-Monooxygenase und die bakterielle Luciferase, führen zunächst einen nukleophilen Angriff auf das Keton bzw. auf das Aldehyd durch und bilden die Zwischenprodukte Flavin C(4a)-Peroxyhemiketal bzw. -acetal (Abb. 29). In diesen beiden Reaktionen wird das Substrat (Keton oder Aldehyd) in einer intermolekularen Reaktion oxidiert.

Neben reduziertem Flavin und Pterin können auch Pyrazinonderivate mit O₂ zu Hydroperoxiden reagieren. Die Oxidation von Coelenterazin (3,7-Dihydro-2-benzyl-6-(*p*-hydroxyphenyl)-8-benzylimidazol-[1,2-*a*]-pyrazin-3-one), einem Imidazolopyrazinon-Luciferin, geschieht nach GOTO (1968) und HART et al. (1978) über die Bildung eines C2-Hydroperoxid (Hydroperoxy-Anion) als Intermediat, welches einen intramolekularen nukleophilen Angriff auf den C3-Carbonyl-Kohlenstoff durchführt. Dabei entsteht das viergliedrige zyklische Peroxid Dioxetanon als nächstes Zwischenprodukt, welches in CO₂ und Acylamino-Pyrazin zerfällt.

In den bakteriellen Luciferasen wurde ein Histidin, das H44, als katalytische Base identifiziert (XIN et al., 1991; HUANG et al., 1997). Dieses Histidin übernimmt bei der Luciferase aus *Vibrio harveyi* eine essentielle Rolle bei der Aldehyd-Oxidation, jedoch nicht bei der Bildung des FMNH-C(4a)-Hydroperoxid-Intermediates. Dieses katalytische Histidin könnte dafür zuständig sein, ein Proton vom FMNH-Peroxyhemiacetal-Zwischenprodukt zu entfernen (HUANG et al., 1997).

Vergleicht man diesen Mechanismus mit dem hypothetischen Mechanismus der dioxygenolytischen Ringspaltung der Substrate nach BAUER (1995), so stellt man einige Parallelen fest (Abb. 29). Auch die enzymkatalysierte Reaktion der Qdo könnte über ein gebundenes Radikalpaar ein C2-Hydroperoxyanion (oder Hydroperoxid) bilden. Dieses könnte als Nukleophil ebenso wie bei der Oxidation von Coelenterazin einen intramolekularen nukleophilen Angriff durchführen, in diesem Fall auf den C4 Carbonyl-Kohlenstoff. Dabei würde ein zyklisches C2-C4 Endoperoxid (Endoperoxy-Anion) entstehen. Das H244 der Qdo, welches als katalytisch essentielle Aminosäure des Enzyms in dieser Arbeit identifiziert wurde, könnte die Reaktion durch die Deprotonierung der Hydroxylgruppe am C3-Atom des Substrates einleiten.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse spricht vieles für die Hypothese, daß der Reaktionsmechanismus der 2,4-Dioxygenasen ähnlich der Sauerstoff-Aktivierung während der Katalyse vieler Flavoenzyme abläuft. Wie bei der Reaktion des redu-

zierten Flavin (-Anions) mit molekularem Sauerstoff könnte auch bei einer einfachen Basenkatalyse der Enzyme Qdo und Hod der Ein-Elektronen-Transfer vom reduzierten organischen Substrat auf den Sauerstoff für dessen Aktivierung sorgen. Dabei könnte das H244 als Base dienen und ein Proton vom Substrat abspalten, die anderen potentiellen Triadenreste könnten zur Stabilisierung des Substrates im aktiven Zentrum verantwortlich sein. Das Auftreten freier Radikale konnte bisher weder bei der Basenkatalyse noch bei der enzymkatalysierten Form festgestellt werden. Allerdings ist der Nachweis eines gebundenen Radikalpaares während der Reaktion ebenfalls aufgrund der geringen Lebensdauer unwahrscheinlich.

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse sprechen aufgrund der Homologien zu den α/β -Hydrolasen für das Vorhandensein einer katalytischen Triade. SCHRAG et al. (1992) vermutete allerdings, daß man aus den allgemein geringen Sequenzhomologien zwischen den Mitgliedern dieser Enzymsuperfamilie die Entwicklung von Proteinen ableiten kann, die ihre katalytische Hydrolasefunktion verloren haben. Für die 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod kann daher die Zugehörigkeit zur Superfamilie der Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung mit einem Histidin als einzige katalytisch essentieller Aminosäure postuliert werden.

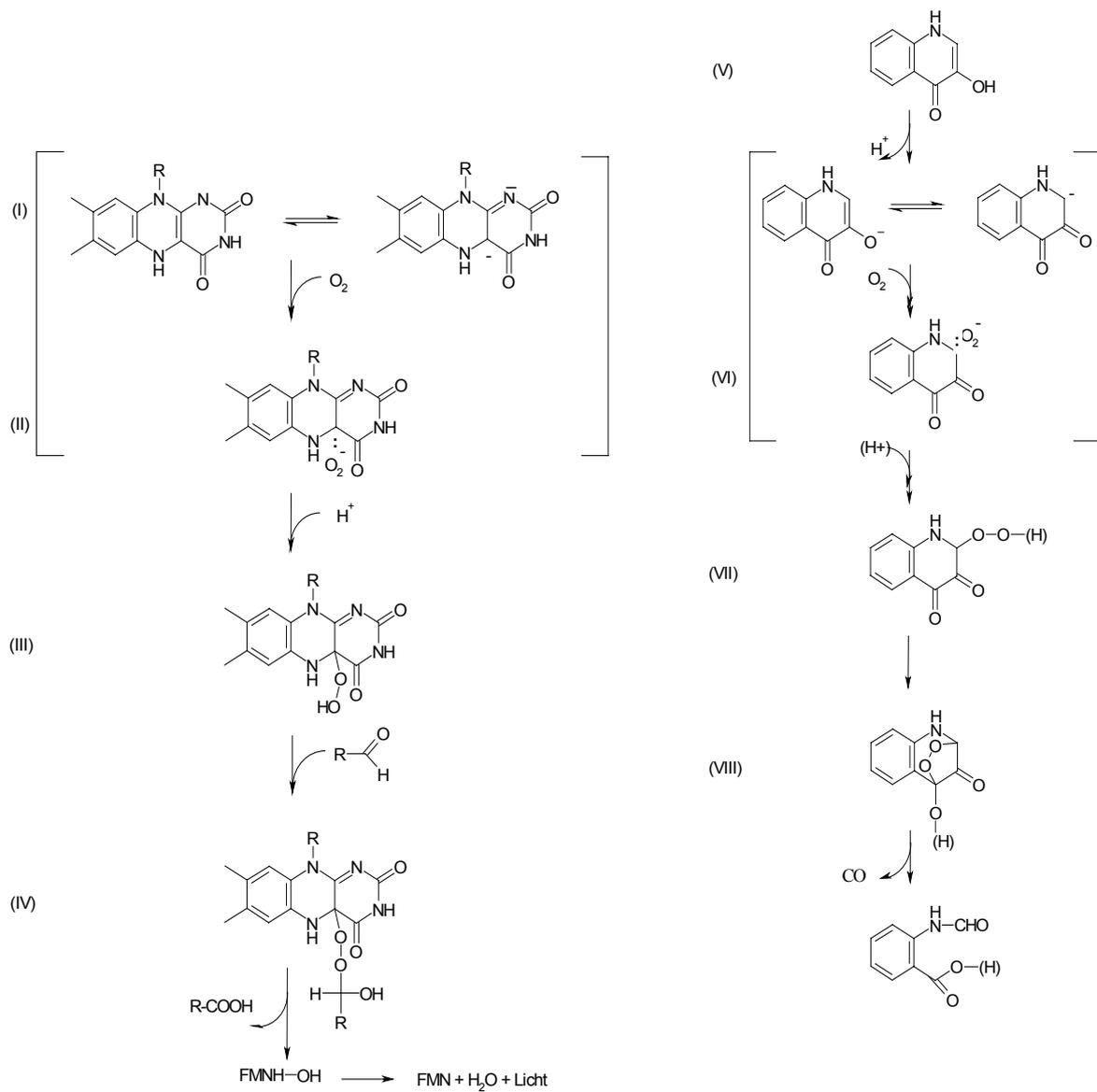


Abb. 29: Katalysemechanismus der bakteriellen Luciferase (I-IV) und hypothetischer Mechanismus der Qdo-katalysierten dioxygenolytischen Ringspaltung des 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolins. (I): FMNH; (II): Radikalpaar; (III): Flavin-Hydroperoxid; (IV): Peroxihemiacetal; (V): 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin; (VI): Radikalpaar; (VII)Hydroperoxid (Hydroperoxyanion); (VIII): Endoperoxid (Endoperoxyanion).

4.5 Ausblick

Auf biochemischer Ebene versprechen kinetische Untersuchungen weitere Erkenntnisse über den Katalysemechanismus der 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod. Aufbauend auf Ergebnissen der steady-state-Kinetik kann über die Methoden der schnellen Kinetik eine genauere Analyse einer enzymkatalysierten Reaktion stattfinden. Da das Prinzip der schnellen Kinetik auf einer kontinuierlichen Mischung von Substrat und Enzym beruht, können mit diesen Experimenten besonders schnelle Reaktionen verfolgt werden: Während die steady-state-Kinetik die Analyse von Reaktionsabläufen im Bereich von Minuten zuläßt, ist mit den Methoden der schnellen Kinetik die Beobachtung einer Reaktion im Bereich von Nanosekunden möglich.

Grundlegend für eine endgültige Aufklärung des Katalysemechanismus der 1H-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* 33/1 und der 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase aus *Arthrobacter ilicis* R61a ist die Kristallisation des Enzyms. Nur über eine Röntgenstrukturanalyse der Proteinkristalle, die einen Einblick in die räumliche Struktur eines Makromoleküls gewährt, kann die Zusammensetzung des aktiven Zentrums und auf diesem Wege der Mechanismus der Substratumsetzung geklärt werden.

Nachdem die Analyse der Primärstruktur erste Hinweise lieferte, wird eine Röntgenstrukturanalyse auch den Nachweis erbringen, ob die 2,4-Dioxygenasen tatsächlich zur Familie der Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung gehören. Im Hinblick auf den Reaktionsmechanismus ist dabei die Klärung der Existenz einer Triade von Bedeutung. Allerdings wäre es auch denkbar, daß die Enzyme Qdo und Hod lediglich strukturell in dieser Familie einzuordnen sind.

5 Zusammenfassung

Die bakteriellen 2,4-Dioxygenasen 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase (Qdo) aus *Pseudomonas putida* 33/1 und 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase (Hod) aus *Arthrobacter ilicis* R61a katalysieren die oxygenolytische Ringspaltung des N-Heterozyklus ihrer Substrate 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin und 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin. Dabei entstehen die Produkte N-Formylantranilsäure bzw. N-Acetylantranilsäure und Kohlenmonoxid. Im Gegensatz zu anderen Oxygenasen, die entweder einen metallischen oder organischen Cofaktor zur Aktivierung des molekularen Sauerstoffs besitzen, bewiesen biochemische und spektroskopische Untersuchungen, daß sowohl die Qdo als auch die Hod cofaktor-freie Dioxygenasen sind.

Die Analyse der Aminosäuresequenzen der beiden 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod ergab, daß es keine Homologien zu bisher bekannten Oxygenasen gibt. Dagegen zeigten Aminosäuresequenzvergleiche mit verschiedenen Enzymen der Superfamilie mit α/β -Hydrolasefaltung geringe aber signifikante Sequenzhomologien und der Vergleich der Sekundärstrukturvorhersage der Qdo mit der bekannten Struktur der Haloalkan-Dehalogenase (DhlA) aus *Xanthobacter autotrophicus* wies deutliche Übereinstimmungen auf. Die Ergebnisse der Aminosäuresequenzanalyse der beiden Enzyme Qdo und Hod lassen vermuten, daß sie zur Strukturfamilie der α/β -Hydrolasen gehören.

Aus den Aminosäuresequenzvergleichen konnten für die Qdo und die Hod hypothetische katalytische Triaden postuliert werden, die ein charakteristisches Merkmal der Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung darstellen. Die katalytische Triade setzt sich aus einer nukleophilen Aminosäure, einer sauren Aminosäure und einem Histidin zusammen. Mit Hilfe chemischer Derivatisierungen und ortsspezifischer Mutagenese konnte für die Qdo jedoch lediglich das Histidin an Position 244 als katalytisch essentielle Aminosäure identifiziert werden.

In weiteren Untersuchungen zum Katalysemechanismus konnte eine kovalente Bindung des Substrates 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin ebenso wenig nachgewiesen werden wie die Entstehung von Radikalen während der enzymkatalysierten Reaktion.

Aufgrund der basenkatalysierten chemischen Spaltung der organischen Substrate der 2,4-Dioxygenasen sowie aufgrund des Fehlens eines Cofaktors wird ein Katalysemechanismus postuliert, bei dem die Reaktion der Substrate mit molekularem Sauerstoff mit der Luciferase-katalysierten Reaktion des reduzierten FMN mit O₂ vergleichbar ist. Das H244 dient dabei als Base und deprotoniert das Substrat, welches dann über die Entstehung eines Radikalpaares mit dem molekularen Sauerstoff ein Hydroperoxid bilden kann. Bei diesem Mechanismus

wird der Sauerstoff direkt von dem Substrat der 2,4-Dioxygenasen aktiviert und es wird kein zusätzlicher Cofaktor benötigt.

Die Kristallisierung der Enzyme Qdo und Hod scheiterte bisher wahrscheinlich aufgrund der Inhomogenität der dafür verwendeten Fusionsproteine His₆Qdo und His₆Hod. Die Oxidation der Enzyme und die damit verbundene Oligomerbildung in Folge der Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Molekülen konnte durch die Zugabe von Reduktionsmitteln zwar deutlich reduziert werden. Eine vollständige Unterdrückung dieses Effektes wurde allerdings nicht bewirkt. Die Fokussierung der His₆Qdo in mehreren Banden während einer IEF belegt die Mikroheterogenität des Proteins, welche vermutlich die Kristallisation negativ beeinflusst.

Um eine mögliche Störung der Kristallbildung durch den His₆-tag der Fusionsproteine auszuschließen, wurden die Gene *qdo* und *hod* in den Expressionsvektor pQE-50 kloniert. Danach konnte die Wildtyp-Form der 2,4-Dioxygenasen Qdo und Hod überexprimiert werden. Mittels einer vier Chromatographieschritte umfassenden Reinigung wurden die Enzyme bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt. Erste Untersuchungen mit einer nativen PAGE und einer IEF deuten allerdings auch hier auf Probleme bei der Homogenität hin.

6 Literaturverzeichnis

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. 1990
Basic local alignment search tool.
J. Mol. Biol. **215**:403-410

ARAND, M., GRANT, D.F., BEETHAM, J.K., FRIEDBERG, T., OESCH, F.,
HAMMOCK, B.D. 1994
Sequence similarity of mammalian epoxide hydrolases to the bacterial haloalkane
dehalogenase and other related proteins. Implication for the potential catalytic
mechanism of enzymatic epoxide hydrolysis.
FEBS Lett. **338**:251-256

ARAND, M., WAGNER, H., OESCH, F. 1996
Asp³³³, Asp⁴⁹⁵, and His⁵²³ form the catalytic triad of rat soluble epoxide hydrolase.
J. Biol. Chem. **271**:4223-4229

ARENDE, R., DÖRMER, L. 1972
Technik der Experimentalchemie. S. 238-239
Verlag Quelle und Meyer, Heidelberg

BANTLEON, R., ALTENBUCHNER, J., VAN PEE, K.H. 1994
Chloroperoxidase from *Streptomyces lividans*: isolation and characterization of the
enzyme and the corresponding gene.
J. Bacteriol. **176**:2339-2347

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
1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline and 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline.
FEMS Microbiol. Lett. **117**:299-304

BAUER, I. 1995
Reinigung und Charakterisierung der 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxyge-
nase aus *Arthrobacter* sp. Rü61a – Vergleichende Untersuchungen zum
Reaktionsmechanismus von 2,4-Dioxygenasen.
Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Universität Hohenheim, Verlag Ulrich E.
Grauer, Stuttgart

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. Ru61a and comparison with 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase from *Pseudomonas putida* 33/1.

Eur. J. Biochem. **240**:576-583

BIRNBOIM, H.C., DOLY, J. 1979

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucl. Acids Res. **7**:1513-1523

BLOCK, D.W. 1992

Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von 1*H*-4-Oxochinolin. Reinigung und Charakterisierung der 1*H*-4-Oxochinolin-Monooxygenase und des Ring-spaltenden Enzyms aus *Pseudomonas putida* Stamm 33/1.

Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Universität Hohenheim

BOTT, G. 1987

Identifizierung und Charakterisierung von Monohydroxychinolin-abbauenden Bakterien.

Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Hohenheim

BOTT, G., SCHMIDT, M., ROMMEL, T.O., LINGENS, F. 1990

Microbial metabolism of quinoline and related compounds. V. Degradation of 1*H*-4-oxoquinoline by *Pseudomonas putida* 33/1

Biol. Chem. Hoppe-Seyler **371**:999-1003

BOURNE, Y., TAYLOR, P., BOUGIS, P.E., MARCHOT, P. 1999

Crystal structure of mouse acetylcholinesterase. A peripheral site-occluding loop in a tetrameric assembly.

J. Biol. Chem. **274**:2963-2970

BRADFORD, M.M. 1976

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem. **72**:248-254

- BRAMAN, J., PAPWORTH, C., GREENER, A. 1996
Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates.
Methods Mol. Biol. **57**:31-44
- BRENNER, S. 1988
The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serins.
Nature **334**:528-530
- BRUICE, T.C. 1984
Oxygen-flavin chemistry.
Isr. J. Chem. **24**:54-61
- BUJARD, H., GENTZ, R., LANZER, M., STUEBER, D., MUELLER, M.,
IBRAHIMI, I., HAEUPTLE, M. T., DOBBERSTEIN, B. 1987
A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in
vitro and in vivo.
Methods Enzymol. **155**:416-433
- BULLOCK, W.O., FERNANDEZ, J.M., SHORT, J.M. 1987
XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with
 β -galactosidase selection.
BioTechniques **5**:376-379
- CANN, J.R. 1979
Multibanded isoelectric focusing patterns produced by macromolecular interactions.
Methods Enzymol. **61**:142-147
- CHEAH, E., AUSTIN, C., ASHLEY, G.W., OLLIS, D. 1993
Substrate-induced activation of diene lactone hydrolase: an enzyme with a naturally
occurring Cys-His-Asp triad.
Protein Eng. **6**:575-583
- CHEN, B.P., HAI, T. 1994
Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using
Escherichia coli as host.
Gene **139**:73-75
- COUSIN, X., HOTELIER, T., GILES, K., TOUTANT, J.P., CHATONNET, A. 1998

aCHEdb: the database system for ESTHER, the alpha/beta fold family of proteins and the Cholinesterase gene server.

Nucl. Acids Res. **26**:226-228

CUMMINGS RYERSON, C., BALLOU, D.P., WALSH, C. 1982

Mechanistic studies on cyclohexanone oxygenase.

Biochemistry **21**:2644-2655

DÍAZ, E., TIMMIS, K.N. 1995

Identification of functional residues in a 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase. A new member of the alpha/beta hydrolase-fold family of enzymes which cleaves carbon-carbon bonds.

J. Biol. Chem. **270**:6403-6411

DIXON, M., WEBB, E.C. 1979

Enzymes.

3rd ed., R. Clay (The Chaucer Press) Ltd., Bungay, Suffolk, UK

DOWER, W.J., MILLER, J.F., RAGSDALE, C.W. 1988

High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.

Nucleic Acids Res. **16**:6127-6145

DURHAM, D.R., STIRLING, L.A., ORNSTON, L.N., PERRY, J.J. 1980

Intergeneric evolutionary homology revealed by the study of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Azotobacter vinelandii*.

Biochemistry **19**:149-155

EBERLEIN, G., BRUICE, T.C., LAZARUS, R.A., HENRIE, R., BENKOVIC, S.J. 1984

The interconversion of the 5,6,7,8-tetrahydro-, 7,8-dihydro-, and radical forms of 6,6,7,7-tetramethyldihydropterin. A model for the biopterin center of aromatic amino acid mixed function oxidases.

J. Am. Chem. Soc **106**:7916-7924

EGLOFF, M.P., MARGUET, F., BUONO, G., VERGER, R., CABBILLAU, C., VAN TILBEURGH, H. 1995

The 2.46 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate.

Biochemistry **34**:2751-2762

EVANS, D.J., EASTWOOD, F.W. 1974

Synthesis of an arylhydroxytetronimide and of 3-hydroxy-4(1*H*)-quinoline derivatives.

Aust. J. Chem. **27**:537-542

FELLER, G., THIRY, M., GERDAY, C. 1991

Nucleotide sequence of the lipase gene *lip2* from the antarctic psychrotroph *Moraxella* TA144 and site-specific mutagenesis of the conserved serine and histidine residues.

DNA Cell Biol. **10**:381-388

FERRÉ-D'AMARÉ, A.R., BURLEY, S.K. 1994

Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies.

Structure **2**:357-359

FRANKEN, S.M., ROZEBOOM, H.J., KALK, K.H., DIJKSTRA, B.W. 1991

Crystal structure of haloalkane dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes.

EMBO J. **10**:1297-1302

FUJISAWA, H., HAYAISHI, O. 1968

Protocatechuate 3,4-dioxygenase. I. Crystallization and characterization.

J. Biol. Chem. **243**:2673-2681

GARFIN, D.E. 1990

Isoelectric focussing.

Methods Enzymol. **182**:459-477

GHISLA S, MASSEY V. 1989

Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions.

Eur. J. Biochem. **181**:1-17

GIBNEY, G., CAMP, S., DIONNE, M., MACPHEE-QUIGLEY, K., TAYLOR, P.
1990

Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**:7546-7550

GOTO, T. 1968

Chemistry of bioluminescence.
Pure Appl. Chem. **17**: 421-441

HAMES, B.D., RICKWOOD, D. 1990

One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.
in: Hames, B. D., Rickwood, D. (eds.), Gel electrophoresis of proteins
2. Auflage, Oxford University Press

HAMILTON, G.A. 1974

Chemical models and mechanisms for oxygenases.
In: Hayaishi, O. (ed.), Molecular Mechanisms of oxygen activation, S. 405-451
Academic Press, New York

HARAYAMA, S., REKIK, M. 1989

Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families.
J. Biol. Chem. **264**:15328-15333

HARAYAMA, S., KOK, M., NEIDLE, E.L. 1992

Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases.
Annu. Rev. Microbiol. **46**:565-601

HART, R.C, STEMPEL, K.E., BOYER, P.D., CORMIER, M.J. 1978

Mechanism of the enzyme-catalyzed bioluminescent oxidation of coelenterate-type luciferin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **81**:980-986

HAYASE, N., TAIRA, K., FURUKAWA, K. 1990

Pseudomonas putida KF715 *bphABCD* operon encoding biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation: cloning, analysis, and expression in soil bacteria.
J. Bacteriol. **172**:1160-1164

HECHT, H.-J., SOBEK, H., HAAG, T., PFEIFER, O., VAN PÉE, K.-H. 1994
The metal-ion-free oxidoreductase from *Streptomyces aureofaciens* has an α/β hydrolase-fold.

Nat. Struct. Biol **1**:532-537

HEIKINHEIMO, P., GOLDMAN, A., JEFFRIES, C., OLLIS, D.L. 1999
Of barn owls and bankers: a lush variety of alpha/beta hydrolases.

Structure. **7**:R141-R146

HESSING, J.G.M. 1983

The primary structure of atropinesterase from *Pseudomonas putida*.

Dissertation, Universität Leiden, Leiden/Niederlande

HIGAKI, J.N., EVNIN, L.B., CRAIK, C.S. 1989

Introduction of a cysteine protease active site into trypsin.

Biochemistry **28**:9256-9263

HOFER, B., ELTIS, L.D., DOWLING, D.N., TIMMIS, K.N. 1993

Genetic analysis of a *Pseudomonas* locus encoding a pathway for biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation.

Gene **130**:47-55.

HORN, J.M., HARAYAMA, S., TIMMIS, K.N. 1991

DNA sequence determination of the TOL plasmid (pWWO) *xylGFJ* genes of *Pseudomonas putida*: implications for the evolution of aromatic catabolism.

Mol. Microbiol. **5**:2459-2474

HUANG, S., TU, S.C. 1997

Identification and characterization of a catalytic base in bacterial luciferase by chemical rescue of a dark mutant.

Biochemistry **36**:14609-14615.

HUND, H.K., DE BEYER, A., LINGENS, F. 1990

Microbial metabolism of quinoline and related compounds. VI. Degradation of quinaldine by *Arthrobacter* sp.

Biol. Chem. Hoppe-Seyler **371**:1005-1008

HUND HK, BREUER J, LINGENS F, HUTTERMANN J, KAPPL R, FETZNER S. 1999

Flavonol 2,4-dioxygenase from *Aspergillus niger* DSM 821, a type 2 CuII-containing glycoprotein.

Eur. J. Biochem. **263**:871-878

ISHIMURA, Y., NOZAKI, M., HAYAISHI, O. 1970

The oxygenated form of L-tryptophan 2,3-dioxygenase as reaction intermediate.

J. Biol. Chem. **245**:3593-3602

JANSSEN, D.B., PRIES, F., VAN DER PLOEG, J., KAZEMIER, B., TERPSTRA, P., WITHOLT, B. 1989

Cloning of 1,2-dichloroethane degradation genes of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and expression and sequencing of the *dhlA* gene.

J. Bacteriol. **171**:6791-6799

JANZEN, E.G. 1980

A critical review of spin trapping in biological systems. In: Free radicals in biology Vol. IV, Pryor, W.A. (ed.), S. 115-154, Academic Press, London

JERPSETH, B., GREENER, A., SHORT, J.M., VIOLA, J., KRETZ, P.L. 1992

XL1-Blue MRF' *E. coli* cells: *mcrA*⁻, *mcrCB*⁻, *mcrF*⁻, *mrr*⁻, *hsdR*⁻ derivative of XL1-Blue cells.

Strategies Mol. Biol. **5**:81 –83

KAWASAKI, H., TSUDA, K., MATSUSHITA, I., TONOMURA, K. 1992

Lack of homology between two haloacetate dehalogenase genes encoded on a plasmid from *Moraxella* sp. strain B.

J. Gen. Microbiol. **138**:1317-1323

KEEVIL, T., MASON, H.S. 1978

Molecular oxygen in biological oxidations – an overview.

Methods Enzymol. **52**:3-40

KEMAL, C., CHAN, T.W., BRUICE, R.C. 1977

Reaction of ³O₂ with dihydroflavins. 1. N^{3,5}-dimethyl-1,5-dihydrolumiflavin and 1,5-dihydroisalloxazines.

J. Am. Chem. Soc. **99**:7272-7286

KNEHR, M., THOMAS, H., ARAND, M., GEBEL, T., ZELLER, H.D., OESCH, F. 1993

Isolation and characterization of a cDNA encoding rat liver cytosolic epoxide hydrolase and its functional expression in *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem. **268**:17623-17627

KROOSHOF, G.H., KWANT, E.M., DAMBORSKY, J., KOCA, J., JANSSEN, D.B. 1997

Repositioning the catalytic triad aspartic acid of haloalkane dehalogenase: effects on stability, kinetics, and structure.

Biochemistry **36**:9571-9580

KUHM, A.E., STOLZ, A., NGAI, K.L., KNACKMUSS, H.J. 1991

Purification and characterization of a 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase from a bacterium that degrades naphthalenesulfonic acids.

J. Bacteriol. **173**:3795-3802

KULAKOVA, A.N., LARKIN, M.J., KULAKOV, L.A. 1997

The plasmid-located haloalkane dehalogenase gene from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064.

Microbiology **143**:109-115

LAEMMLI, U.K. 1970

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature **227**:680-685

LEHOUX, I.E., MITRA, B. 1999

(S)-Mandelate dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: mutations of the catalytic base histidine-274 and chemical rescue of activity.

Biochemistry **38**:9948-9955

LINEWEAVER, H., BURK, D. 1934

The determination of enzyme dissoziation constants.

J. Am. Chem. Soc. **56**:658-666

LIPSCOMB, J.D., WITTAKER, J.W., ARCIERO, D.M., ORVILL, A.M., WOLGEL, S.A. 1988

Mechanisms of catecholic dioxygenases. In: Microbial metabolism and the carbon cycle, Hagedorn, S.R., Hanson, R.S., Kunz, D.A. (eds.), S. 259-281, Harwood Academic Publisher, Chur/Schweiz

LONGHI, S., CZJZEK, M., LAMZIN, V., NICOLAS, A., CABBILLAU, C. 1997
Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis.

J. Mol. Biol. **268**:779-799

MASSEY, V. 1994

Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins.

J. Biol. Chem. **269**:22459-22462

MAX, N. 1997

Das Gen der Kohlenmonoxid-bildenden 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* 33/1: Klonierung, Sequenzierung und Überexpression.

Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Universität Hohenheim, Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart

MAX, N., BETZ, A., FACEY, S., LINGENS, F., HAUER, B., FETZNER, S. 1999
Cloning, sequence analysis, and expression of the *Pseudomonas putida* 33/1 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase gene, encoding a carbon monoxide forming dioxygenase.

Biochim Biophys Acta. **1431**:547-552

MENN, F.M., ZYLSTRA, G.J., GIBSON, D.T. 1991

Location and sequence of the *todF* gene encoding 2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate hydrolase in *Pseudomonas putida* F1.

Gene **104**:91-94

MILES, E.W. 1977

Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate.

Methods Enzymol. **42**:431-442

- MURZIN, A.G., BRENNER, S.E., HUBBARD, T., CHOTHIA, C. 1995
SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures.
J. Mol. Biol. **247**:536-540
- NAGATA, Y., NARIJA, T., OHTOMO, R., FUKUDA, M., YANO, K., TAKAGI, M. 1993
Cloning and sequencing of a dehalogenase gene encoding an enzyme with hydrolase activity involved in the degradation of gamma-hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas paucimobilis*.
J. Bacteriol. **175**:6403-6410
- NAKAI C, NAKAZAWA T, NOZAKI M. 1988
Purification and properties of catechol 1,2-dioxygenase (pyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2 in comparison with that from *Pseudomonas arvilla* C-1.
Arch. Biochem. Biophys. **267**:701-713
- 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
- NARDINI, M., DIJKSTRA, B.W. 1999b
 α/β hydrolase-fold enzymes: the family keeps growing.
Curr. Opin. Struct. Biol. **9**:732-737
- NEET, K.E., KOSHLAND, D.E. Jr. 1966
The conversion of serine at the active site of subtilisin to cysteine: a "chemical mutation".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **56**:1606-1611
- NISHINAGA, A., SHIMIZU, T., MATSUURA, T. 1977
Reaction of potassium superoxide with phenoxy radicals. On the mechanism of base-catalyzed oxygenations of phenols.
Chem. Letters 547-550

NISHINAGA, A., TOJO, T., TOMITA, H., MATSUURA, T. 1979

Base-catalysed oxygenolysis of 3-hydroxyflavones.

J. Chem. Soc. Perkin I, 2511-2516

NORDLUND, I., SHINGLER, V. 1990

Nucleotide sequences of the meta-cleavage pathway enzymes 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase and 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase from *Pseudomonas* CF600.

Biochim. Biophys. Acta **1049**:227-230

NOZAKI, M., ONO, K., NAKAZAWA, T., KOTANI, S., HAYAISHI, O. 1968

Metapyrocatechase. II. The role of iron and sulfhydryl groups.

J. Biol. Chem. **243**:2682-2690

NOZAKI, M. 1979

Oxygenases and dioxygenases.

Top. Curr. Chem. **78**:145-186

OKA T, SIMPSON FJ, KRISHNAMURTY HG. 1972

Degradation of rutin by *Aspergillus flavus*. Studies on specificity, inhibition, and possible reaction mechanism of quercetinase.

Can. J. Microbiol. **18**:493-508

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., GOLDMAN, A., 1992

The alpha/beta hydrolase fold.

Protein Eng. **5**:197-211

ORENGO, C.A., MICHIE, A.D., JONES, S., JONES, D.T., SWINDELLS, M.B., THORNTON, J.M. 1997

CATH - a hierarchic classification of protein domain structures.

Structure **5**:1093-1108

PALFEY, B.A., BALLOU, D.P., MASSEY, V. 1995

Oxygen activation by flavins and pterins. In: Active Oxygen in Biochemistry, Selverstone Valentine, J., Foote, C.S., Greenberg, A., Liebman, J.F., (eds.), S. 37-83, Blackie Academic and Professional (Chapman and Hall), London

- PATEL, R.N., HOU, C.T., FELIX, A., LILLARD, M.O. 1976
Catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: purification and properties.
J. Bacteriol. **127**:536-544
- PATHAK, D., ASHLEY, G., OLLIS, D. 1991
Thiol protease-like active site found in the enzyme dienelactone hydrolase: localization using biochemical, genetic, and structural tools.
Proteins **9**:267-279
- PELLETIER, I., ALTENBUCHNER, J., MATTES, R. 1995
A catalytic triad is required by the non-heme haloperoxidases to perform halogenation.
Biochim. Biophys. Acta **1250**:149-157
- PERUTZ, M. 1992
Protein structure – new approaches to diseases and therapy.
W.H.Freeman and Company, New York
- PFEIFER, O., PELLETIER, I., ALTENBUCHNER, J., VAN PEE, K.H. 1992
Molecular cloning and sequencing of a non-haem bromoperoxidase gene from *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762.
J. Gen. Microbiol. **138**:1123-1131
- POLGAR, L., BENDER, M.L. 1967
The reactivity of thiol-subtilisin, an enzyme containing a synthetic functional group.
Biochemistry **6**:610-620
- PRIES, F., KINGMA, J., PENTENGA, M., VAN POWDEROYEN, G., JERONIMUS-STRATINGH, 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
- PRIES, F., VAN DEN WIJNGAARD, A.J., BOS, R., PENTENGA, M., JANSSEN, D.B. 1994b
The role of spontaneous cap domain mutations in haloalkane dehalogenase specificity and evolution.
J. Biol. Chem. **269**:17490-17494

PRIES, F., KINGMA, J., KROOSHOF, G.H., JERONIMUS-STRATINGH, C.M.,
BRUINS, A.P., JANSSEN, D.B. 1995

Histidine 289 is essential for hydrolysis of the alkyl-enzyme intermediate of haloalkane dehalogenase.

J. Biol. Chem. **270**:10405-10411

QIAGEN GmbH. 1997

QIAprep Miniprep Handbook, Qiagen GmbH, Hilden

QIAGEN GmbH. 1998

QIAGEN Plasmid Purification Handbook, Qiagen GmbH, Hilden

QIAGEN GmbH. 1999

The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, 3rd Edition, Qiagen GmbH, Hilden

RICHARDSON, J.S. 1981

The anatomy and taxonomy of protein structure.

Adv. Prot. Chem. **34**:167-339

RIESZ, P., RUSTGI, S. 1979

Aqueous radiation chemistry of protein and nucleic acid constituents: ESR and spin-trapping studies.

Radiat. Phys. Chem. **13**:21-40

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

ROST, B., SANDER, C. 1994

Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure.

Proteins **19**:55-72

SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N. 1985

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

Science **230**:1350-1354

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989

Molecular cloning. A laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

SARIASLANI, F.S. 1989

Microbial enzymes for oxidation of organic molecules.

Crit. Rev. Biotechnol. **9**:171-257

SCHMIDT, M. 1989

Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von Chinolinderivaten.

Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Hohenheim

SCHMITT, J., HESS, H., STUNNENBERG, H.G. 1993

Affinity purification of histidine-tagged proteins.

Mol. Biol. Rep. **18**:223-230

SCHRAG, J.D., WINKLER, F.K., CYGLER, M. 1992

Pancreatic lipases: evolutionary intermediates in a positional change of catalytic carboxylates?

J. Biol. Chem. **267**:4300-4303

SOLSTAD, T., FLATMARK, T. 2000

Microheterogeneity of recombinant human phenylalanine hydroxylase as a result of nonenzymatic deamidations of labile amide containing amino acids Effects on catalytic and stability properties.

Eur. J. Biochem. **267**:6302-6310

SPARROW, L.G., HO, P.P., SUNDARAM, T.K., ZACH, D., NYNS, E.J., SNELL, E.E. 1969

The bacterial oxidation of vitamin B6. VII. Purification, properties, and mechanism of action of an oxygenase which cleaves the 3-hydroxypyridine ring.

J. Biol. Chem. **244**:2590-2600

- STRINGFELLOW JM, CAIRNS SS, CORNISH A, COOPER RA. 1997
Haloalkanoate dehalogenase II (DehE) of a *Rhizobium* sp.--molecular analysis of the gene and formation of carbon monoxide from trihaloacetate by the enzyme.
Eur. J. Biochem. **250**:789-793
- TAUSCHER, M. 1995
Optimierung der Zellzüchtung von *Aspergillus flavus* auf Rutin und Reinigung der Flavonol-2,4-Dioxygenase.
Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Hohenheim
- TENHUNEN, R., MARVER, H.S., SCHMID, R. 1969
Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme.
J. Biol. Chem. **244**:6388-6394
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. 1994
CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.
Nucleic. Acids Res. **22**:4673-4680
- VERSCHUEREN, K.H.G., FRANKEN, S.M., ROZEBOOM, H.J., KALK, K.H., DIJKSTRA, B.W. 1993
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, SELJÉE, F., ROZEBOOM, H.J., KALK, K.H., DIJKSTRA, B.W. 1993 b
Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase.
Nature **363**:693-698
- VOGELSTEIN, B., GILLESPIE, D. 1979
Preparative and analytical purification of DNA from agarose.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**:615-619
- WAGEGG, T., FETZNER, S., LINGENS, F. 1997
Ring cleavage and decarbonylation of quercetin, catalyzed by flavonol 2,4-dioxygenase from *Actinoplanes missouriensis*.
BIOspektrum PF164, 130

WIEGAND, G. 1990

How do you get large protein crystals? Two familiar laboratory methods improved and simplified.

In: Modern methods in protein and nucleic acid research: review articles. H. Tschesche (ed) de Gruyter, Berlin, S 343-366

WINKLER, F.K., D'ARCY, A., HUNZIKER, W. 1990

Structure of human pancreatic lipase.

Nature **343**:771-774

WITKOWSKI, A., NAGGERT, J., WITKOWSKA, H.E., RANDHAWA, Z.I., SMITH, S. 1992

Utilization of an active serine 101→cysteine mutant to demonstrate the proximity of the catalytic serine 101 and histidine 237 residues in thioesterase II.

J. Biol. Chem. **267**:18488-18492

WITKOWSKI A, WITKOWSKA HE, SMITH S. 1994

Reengineering the specificity of a serine active-site enzyme. Two active-site mutations convert a hydrolase to a transferase.

J. Biol. Chem. **269**:379-383.

WOLFFRAMM, C., LINGENS, F., MUTZEL, R., VAN PEE, K.H. 1993

Chloroperoxidase-encoding gene from *Pseudomonas pyrrocinia*: sequence, expression in heterologous hosts, and purification of the enzyme.

Gene **130**:131-135

WOLGEL, S.A., DEGE, J.E., PERKINS-OLSON, P.E., JAUREZ-GARCIA, C.H., CRAWFORD, R.L., MUNCK, E., LIPSCOMB, J.D. 1993

Purification and characterization of protocatechuate 2,3-dioxygenase from *Bacillus macerans*: a new extradiol catecholic dioxygenase.

J. Bacteriol. **175**:4414-4426

WRAY, J.W., ABELES, R.H. 1993

A bacterial enzyme that catalyzes formation of carbon monoxide.

J. Biol. Chem. **268**:21466-21469

WRAY, J.W., ABELES, R.H. 1995

The methionine salvage pathway in *Klebsiella pneumoniae* and rat liver. Identification and characterization of two novel dioxygenases.

J. Biol. Chem. **270**:3147-3153

XIN, X., XI, L., TU, S.C. 1991

Functional consequences of site-directed mutation of conserved histidyl residues of the bacterial luciferase alpha subunit.

Biochemistry **30**:11255-11262

YOKOSAWA, H., OJIMA, S., ISHII, S. 1977

Thioltrypsin. Chemical transformation of the active-site serine residue of *Streptomyces griseus* trypsin to a cysteine residue.

J. Biochem. (Tokyo) **82**:869-876

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

Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting complementation of galactosidase fragments in vivo.

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

ZOR, T., SELINGER, Z. 1996

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

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

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Oldenburg, den 26. November 2000

