

**Etablierung von enzymatischer Aktivität auf künstlich  
erzeugten  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Proteinen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
– Biologie und vorklinische Medizin –  
der Universität Regensburg**



vorgelegt von

Josef Sperl

aus Straubing

im Jahr 2013

Promotionsgesuch eingereicht am: 21. Mai 2013

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 2013

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Reinhard Sterner

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Christoph Oberprieler
1. Prüfer:	Prof. Dr. Reinhard Sterner
2. Prüfer:	Prof. Dr. Volker Sieber
3. Prüferin:	Prof. Dr. Christine Ziegler

*Es ist nicht genug zu wissen – man muss auch anwenden.*

*Es ist nicht genug zu wollen – man muss auch tun.*

*(Johann Wolfgang von Goethe)*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2009 bis Mai 2013 am Lehrstuhl Biochemie II des Instituts für Biophysik und physikalische Biochemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner durchgeführt.

Die Arbeit wurde durch ein Doktorandenstipendium des Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

*für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>Formelverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>X</b>
<b>1      Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1    Enzyme: außergewöhnliche molekulare Maschinen .....	1
1.2    Struktur und Evolution von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Enzymen .....	3
1.3    Nachahmung der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Evolution im Labor.....	5
1.4    Rationales Design und gerichtete Evolution.....	8
1.5    Hybridkatalysatoren.....	9
1.6    Ziele der Dissertation.....	11
<b>2      Material .....</b>	<b>13</b>
2.1    Chemikalien.....	13
2.2    Kits .....	13
2.3    Enzyme .....	13
2.4    Bakterienstämme .....	14
2.5    Plasmide .....	15
2.6    Oligodesoxyribonukleotide .....	16
2.7    DNA-Längenstandard .....	18
2.8    Protein-Längenstandard.....	19
2.9    Medien, Lösungen und Puffer .....	19
2.9.1    Molekularbiologisches Arbeiten.....	19
2.9.2    Mikrobiologische Arbeiten mit <i>E. coli</i> .....	20
2.9.3    Arbeiten mit Proteinen.....	22
2.9.4    SDS-Polyacrylamidgelektrophorese .....	24
2.10    Software.....	25
2.10.1    Lokale Anwendungen.....	25

---

2.10.2 Servergestützte Anwendungen .....	26
<b>3 Methoden.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.1.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen.....	27
3.1.2 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	27
3.1.3 Transformation von <i>E.coli</i> .....	27
3.1.4 <i>In vivo</i> Komplementationstest .....	29
3.1.5 Entsorgung von Mikroorganismen.....	29
<b>3.2 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.2.1 Bestimmung der DNA-Konzentration .....	29
3.2.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR.....	30
3.2.3 PCR-Methoden zur gerichteten und zufälligen Mutagenese.....	31
3.2.4 Kolonie-PCR .....	34
3.2.5 Anlagerung von Oligonukleotiden.....	34
3.2.6 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA.....	35
3.2.7 Agarosegelektrophorese .....	35
3.2.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	36
3.2.9 Spaltung von dsDNA durch Restriktionsendonukleasen.....	36
3.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten.....	36
3.2.11 Restriktions-Ligationen.....	37
3.2.12 Herstellung von Genbanken.....	37
3.2.13 DNA-Sequenzierung .....	38
<b>3.3 Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>38</b>
3.3.1 Proteinexpression im analytischen Maßstab .....	38
3.3.2 Proteinexpression im präparativen Maßstab .....	39
3.3.3 Metallchelat-Affinitätschromatographie.....	39
3.3.4 Präparative Gelfiltration (SEC) .....	41
3.3.5 Ellmans Test (Ellman 1959) .....	41
3.3.6 Konjugation von Proteinen mit Mn-Salen .....	42
3.3.7 Dialyse von Proteinlösungen.....	42
3.3.8 Einkonzentrieren von Proteinlösungen .....	43
3.3.9 Umpuffern von Proteinen .....	43
3.3.10 Lagerung von gereinigten Proteinen .....	43
<b>3.4 Synthese von Mn-Salen .....</b>	<b>43</b>

---

3.4.1	Synthese von Natriummethylthiosulfonat (1) .....	43
3.4.2	Synthese von 4-[(2-Bromoethyl)oxy]salicylaldehyd (2) .....	44
3.4.3	Synthese von 4-[(methylthiosulfonylethyl)oxy]salicylaldehyd (3).....	44
3.4.4	Synthese von Di[methylthiosulfonylethyl]oxy]salen (4) .....	45
3.4.5	Synthese von Mn-di[methylthiosulfonylethyl]oxy]salen (Mn-Salen) (5) .....	45
<b>3.5</b>	<b>Oxidation von Thioanisol.....</b>	<b>45</b>
<b>3.6</b>	<b>Analytische Methoden .....</b>	<b>46</b>
3.6.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	46
3.6.2	SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
3.6.3	Analytische Gelfiltration.....	47
3.6.4	High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	48
3.6.5	Fluoreszenzspektroskopie.....	49
3.6.6	Kristallisation, Datenaufnahme und Strukturlösung .....	51
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1</b>	<b>Kristallisation und Strukturanalyse von Sym2.....</b>	<b>53</b>
4.1.1	Heterologe Expression und Reinigung von Sym2 .....	53
4.1.2	Kristallisation von Sym2 .....	54
4.1.3	Datenaufnahme und Strukturlösung.....	55
4.1.4	Strukturbeschreibung und Diskussion .....	57
4.1.5	Resümee und Ausblick .....	61
<b>4.2</b>	<b>Enzymatische Aktivierung von Sym2 .....</b>	<b>63</b>
4.2.1	Bindung von rCdRP .....	64
4.2.2	Erstellung einer Sym2-Genbank.....	68
4.2.3	Selektion auf TrpF-aktive Varianten <i>in vivo</i> .....	73
4.2.4	Reduktion der Mutationen von cpSym2-sel .....	74
4.2.5	Kristallisation von cpSym2_TrpF .....	79
4.2.6	Resümee .....	82
<b>4.3</b>	<b>Studien zur Erzeugung eines C2-symmetrischen Hybridkatalysators .....</b>	<b>84</b>
4.3.1	Auswahl des Liganden und der Reaktion .....	84
4.3.2	Synthese des Liganden Mn-Salen.....	85
4.3.3	Erstellung der Proteinvarianten .....	87
4.3.4	Ellmans Test auf reaktive Cysteine .....	89
4.3.5	Konjugation der Varianten mit Mn-Salen .....	91
4.3.6	Oxidation von Thioanisol.....	97

4.3.7	Kristallstruktur von hSym2-D9C_Mn-Salen .....	103
4.3.8	Resümee und Ausblick .....	106
<b>5</b>	<b>Abschließende Diskussion .....</b>	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>118</b>
8.1	Kalibrierungsgeraden für die Auswertung von analytischer Gelfiltrationschromatographie .....	118
	<b>Danksagung .....</b>	<b>120</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Faltung. ....	3
Abbildung 2: Modell für die Evolution des $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Enzyms HisF aus einem $(\beta\alpha)_4$ -Halbbarrel (nach Seitz 2006). ....	5
Abbildung 3: Design des $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Proteins Sym2 aus zwei identischen und fusionierten Halbbarrels als schematische Darstellung der Laborrekonstruktion der Evolution von HisF. ....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Vervollständigung der experimentellen Rekonstruktion der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Evolution. Farbgebung wie in Abbildung 3. ....	11
Abbildung 5: Schema für die Erzeugung von C2-symmetrischen Hybridkatalysatoren auf Basis des Sym2-Proteingerüsts. ....	12
Abbildung 6: Beispiel der Integration von annealten Oligonukleotiden in einen Vektor. ....	35
Abbildung 7: Reinigung von rekombinantem Sym2 über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie. ....	54
Abbildung 8: Kristalle von Sym2 in 0,2 M Ammoniumsulfat, 0,1 M Natriumacetat pH 4,6 und 30% PEG 2000 MME. ....	55
Abbildung 9: Kristall von Sym2 in Mutterlösung mit 25 % (v/v) Glycerin. ....	56
Abbildung 10: Cartoondarstellung der Röntgenstrukturen von Sym1 (pdb: 2w6r), HisF (pdb: 1thf) und Sym2 (pdb: 3og3). ....	57
Abbildung 11: B-Faktoren des in Sym1 nicht aufgelösten $(\beta\alpha)$ -Moduls 4 im Vergleich mit HisF und Sym2. ....	58
Abbildung 12: Vergleich der Salzbrückencluster durch Ansicht von „unten“ auf die zentralen Barrel von Sym1, HisF und Sym2. ....	59
Abbildung 13: $\pi$ -Stacking zwischen den Resten F93 und F120 (A), sowie zwischen F214 und F241 (B) von Sym2 (grün) im Vergleich zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen I93 und F120, sowie F214 und F241 in HisF (lachsfarben). ....	60
Abbildung 14: Strukturelle Unterschiede zwischen dem katalytisch wichtigen loop $\beta\alpha$ 1 aus HisF (lachsfarben) und dem N-terminalen loop $\beta\alpha$ 5 aus Sym2 (grün) anhand einer Superpositionierung der beiden Proteinstrukturen. ....	61
Abbildung 15: Mechanismus für die Isomerisierung von PRA zu CdRP durch HisF-D130V+D176V aus <i>T. maritima</i> . ....	64
Abbildung 16: Aufbau des artifiziellen $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Proteins Sym2 und von Varianten mit der Fähigkeit zur Bindung von rCdRP. ....	65
Abbildung 17: Reinigung von rekombinantem Sym2_bindN über Metallchelat-Affinitätschromatographie. ....	66
Abbildung 18: Analyse der rCdRP-Bindung. ....	68
Abbildung 19: Design des Ausgangskonstrukts cpSym2_bindC für Zufallsmutagenese. ....	69

Abbildung 20: Ergebnis der Komplementation von $\Delta trpF$ -Zellen mit der cpSym2_bindC-Genbank.....	74
Abbildung 21: Reinigung von rekombinantem cpSym2_TrpF über Nickelchelat-Affinitätschromatographie.....	77
Abbildung 22: PRA-Sättigungskurve von cpSym2_TrpF.....	78
Abbildung 23: Strukturelle Superpositionierung von cpSym2_TrpF (cyan) mit Sym2 (grau).....	81
Abbildung 24: Schematischer Überblick über die Simulation der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Evolution im Labor.....	83
Abbildung 25: Mn-Salen-Ligand Mn-di[methylthiosulfonylethyl]oxy]salen (im Folgenden als Mn-Salen bezeichnet) zur Erzeugung von Sym2-Hybridkatalysatoren (A) und Testreaktion, die von Sym2-Hybridkatalysatoren stereoselektiv katalysiert werden soll (B).....	85
Abbildung 26: Synthese von Mn-Salen nach Ma (2001) und Carey (2006).....	86
Abbildung 27: Schema für den Einbau des Liganden Mn-Salen in das Sym2-Proteingerüst. ....	87
Abbildung 28: Aminosäurereste in Sym2, welche für die Anbindung von Mn-Salen zu Cystein mutiert werden sollten.....	87
Abbildung 29: Vergleich der Konjugation von Sym2-Varianten im nativen (A) und hSym2-Varianten im denaturierten Zustand (B).....	88
Abbildung 30: Ellmans Reaktion zum Nachweis reaktiver Cysteine.....	89
Abbildung 31: Ellmans Test unter Zugabe von Cystamin.....	91
Abbildung 32: Kalibrierung der Gelfiltrationssäule S75 unter denaturierenden Bedingungen mit Sym2-(S23C) <sub>2</sub> (A) und hSym2-S23C (B).....	92
Abbildung 33: Gelfiltrationslauf unter denaturierenden Bedingungen von hSym2-S23C nach Konjugation mit Mn-Salen (blau).....	93
Abbildung 34: Gelfiltrationslauf von rückgefaltetem hSym2-S23C_Mn-Salen unter nativen Bedingungen.....	95
Abbildung 35: Absorptionsspektrum des Liganden Mn-Salen.....	96
Abbildung 36: Absorptionsspektrum des Konjugats hSym2-D9C_Mn-Salen.....	97
Abbildung 37: Chromatogramm eines Gemisches aus Thioanisol, Acetophenon und racemischem Methylphenylsulfoxid zur Analyse der Trennleistung der Chiralcel OD Säule.....	98
Abbildung 38: Chromatogramm des Produktgemisches der Sulfoxidation von Thioanisol unter Verwendung von hSym2-D9C_Mn-Salen als Katalysator.....	99
Abbildung 39: Analyse der Struktur von hSym2-D9C_Mn-Salen. ....	105
Abbildung 40: Kalibrierungsgerade der Superdex 75-Gelfiltrationssäule.....	119

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.</b> .....	14
<b>Tabelle 2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.</b> .....	15
<b>Tabelle 3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonukleotide.</b> .....	17
<b>Tabelle 4: Zusammensetzung von SDS-Trenngel (12,5 %) und Sammelgel (für 13 Gele).</b> .....	25
<b>Tabelle 5: Komponenten, Volumina und Konzentrationen von Bestandteilen der epPCR in 200 µl Gesamtvolumen.</b> .....	33
<b>Tabelle 6: Datenprozessierung und Verfeinerungsstatistik von Sym2. Schale mit der höchsten Auflösung in Klammern.</b> .....	56
<b>Tabelle 7: Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten bei 280 nm der in Abbildung 16 dargestellten Sym2_bind-Varianten.</b> .....	67
<b>Tabelle 8: Anzahl und Verteilung der Nukleotidaustausche bei 10 zufällig ausgewählten Klonen der cpSym2_bindC-Genbank.</b> .....	72
<b>Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide zur Erstellung von Varianten von Sel1 und Sel2.</b> .....	75
<b>Tabelle 10: Ergebnisse der <i>in vivo</i> Komplementationstests der Sel1 und Sel2 Varianten.</b> .....	76
<b>Tabelle 11: Molekulargewicht und Extinktionskoeffizienten bei 280 nm von cpSym2_TrpF.</b> ..	78
<b>Tabelle 12: Steady-state-Enzymparameter für die Isomerisierung von PRA.</b> .....	79
<b>Tabelle 13: Datenprozessierung und Verfeinerungsstatistik von cpSym2_TrpF.</b> .....	80
<b>Tabelle 14: Primer zur Klonierung der hSym2-Varianten im pET24a(+)-Vektor durch konventionelle PCR, QuikChange™-Mutagenese oder OE-PCR.</b> .....	89
<b>Tabelle 15: Anteil reaktiver Cysteine von verschiedenen hSym2-Varianten.</b> .....	90
<b>Tabelle 16: Vergleich der Ellmans Tests mit und ohne Cystamin der Varianten hSym2-D9C und hSym2-T50C.</b> .....	91
<b>Tabelle 17: Korrekturfaktoren zur Bestimmung der Reaktionsrate mittels internem Standard.</b> .....	99
<b>Tabelle 18: Katalyseresultate und Enantioselektivität verschiedener hSym2_Mn-Salen-Varianten.</b> .....	100
<b>Tabelle 19: Katalyseresultate und Enantioselektivität von hSym2-D9C_Mn-Salen in verschiedenen Lösungsmitteln.</b> .....	100
<b>Tabelle 20: hSym2-D9C-Varianten zur Verbesserung der Enantioselektivität.</b> .....	101
<b>Tabelle 21: Katalyseresultate von hSym2-D9C_Mn-Salen-Varianten mit Tyr/Phe/Val- bzw. His-Austauschen zur Verbesserung der Enantioselektivität.</b> .....	102
<b>Tabelle 22: Vergleich der Katalyseeigenschaften ausgewählter hSym2-D9C_Mn-Salen-Varianten mit Mn 1 apo-Mb(Y103C) und Mn 1 apo-Mb(L72C/Y103C).</b> .....	102
<b>Tabelle 23: Datenprozessierung und Verfeinerungsstatistik von hSym2-D9C_Mn-Salen.</b> .....	103

<b>Tabelle 24: Proteine für die Kalibrierung der Superdex 75-Gelfiltrationssäule mit gemessenem Retentionsvolumen, bekanntem Molekulargewicht und dessen dekadischem Logarithmus. ....</b>	<b>118</b>
--	------------

# Formelverzeichnis

<b>Formel 1: Berechnung der Transformationseffizienz. ....</b>	<b>29</b>
<b>Formel 2: Berechnung der DNA-Konzentration mittels Absorptionsmessung bei 260 nm.....</b>	<b>30</b>
<b>Formel 3: Berechnung der Schmelztemperatur <math>T_M</math> eines Primers. ....</b>	<b>31</b>
<b>Formel 4: Berechnung der Annealing-Temperatur <math>T_A</math> eines Primerpaars. ....</b>	<b>31</b>
<b>Formel 5: Berechnung des molaren Absorptionskoeffizienten <math>\epsilon_{280}</math> bei 280 nm [<math>M^{-1}cm^{-1}</math>]......</b>	<b>46</b>
<b>Formel 6: Berechnung des spezifischen Absorptionskoeffizienten <math>^{0,1\%}A_{280}</math> bei 280 nm [<math>cm^2mg^{-1}</math>]......</b>	<b>46</b>
<b>Formel 7: Berechnung der Proteinkonzentration c [mg/ml] unter Verwendung des Lambert- Beer'schen Gesetzes. ....</b>	<b>46</b>

# Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption; Adenosin; Ampere; Signalamplitude
Å	Ångström ( $10^{-10}$ m)
$0,1\% A_x$	spezifischer Extinktionskoeffizient bei x nm [ $\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$ ]
ADP	Adenosindiphosphat
AmOAc	Ammoniumacetat Puffer
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
$C_\alpha$	zentrales C-2 Kohlenstoffatom von Aminosäuren
cm	Zentimeter ( $1 \cdot 10^{-2}$ m)
C-terminal	Carboxyterminales Ende einer Polypeptidkette
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
Da	Dalton [g/mol]
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N= A, C, G oder T)
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoësäure)
DTT	Dithiothreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
epPCR	<i>error-prone</i> PCR
<i>et al.</i>	und andere (Autoren) ( <i>et alii</i> )
FPLC	<i>Fast performance liquid chromatography</i>
g	Gramm; Zentrifugalbeschleunigung
G	Guanosin
h	Stunde

---

(His) <sub>6</sub> -tag	Anhang von 6 Histidinen an ein Protein (Hexahistidin- <i>tag</i> )
HisA	5'-ProFAR-Isomerase
HisF	Synthase-Untereinheit der Imidazolglycerinphosphat-Synthase
HisF-N	N-terminale Hälfte von HisF
HisF-C	C-terminale Hälfte von HisF
HisF-CC	<i>in tandem</i> fusioniertes HisF-C
HisF-C*C	HisF-CC mit A124R und A220K in N-terminaler Hälfte
HisF-C**C	HisF-C*C mit den Austauschen Y143H und V234M N-terminal
HisF-C***C	HisF-C**C mit den Austauschen Y143H und V234M N- und C-terminal
HisH	Glutaminase-Untereinheit der Imidazolglycerinphosphat-Synthase
ImGP	Imidazolglycerinphosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante eines Komplexes, Gleichgewichtskonstante einer Reaktion
kDa	Kilodalton ( $1 \cdot 10^3$ g/mol)
KP	Kaliumphosphat Puffer
l	Liter
lacZ	Gen der $\beta$ -Galactosidase
LB	Luria-Bertani (-Medium), Vollmedium für <i>E. coli</i>
LMW	Low Molecular Weight
M	Molar [mol/l]
m	Milli- ( $1 \cdot 10^{-3}$ )
max	maximal
mcPCR	epPCR nach McCullum et al. 2010)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mn-Salen	Mn-di[methylthiosulfonylethyl]oxy]salen
MPa	Megapascal
MW	Molekulare Masse
mwco	<i>molecular weight cut off</i>
n	nano- ( $1 \cdot 10^{-9}$ )
NaP	Natriumphosphat Puffer
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
N-terminal	aminotermiales Ende einer Polypeptidkette
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei x nm

---

OE	<i>Overlap extension</i>
P	Pellet (unlösliche Fraktion eines Zellextraktes)
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PRA	Phosphoribosylanthranilat
5'PRFAR	N'-[5'-phosphoribulosyl]-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid
5'ProFAR	N'-[5'-phosphoribosyl]-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid
Pwo	<i>Pyrococcus woeseii</i>
R	Allgemeine Gaskonstante ( $8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )
rmsd	<i>root mean square deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie ( <i>size exclusion chromatography</i> )
SLS	<i>Swiss Light Source</i>
s.o.	siehe oben
SOB	<i>Super optimal broth</i> , Vollmedium für <i>E. coli</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
s.u.	siehe unten
SV	Säulenvolumen
T	Zeit
T	Temperatur; Thymidin
T <sub>A</sub>	<i>Annealing</i> -Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	<i>Tryptone broth</i> , Vollmedium für <i>E. coli</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
T <sub>E</sub>	Transformationseffizienz
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIM	Triosephosphat-Isomerase
TrpF	Phosphoribosylanthranilat-Isomerase
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur eines Oligonukleotids
U	<i>Unit</i> , 1U entspricht der Menge an Enzym, die unter Standardbedingungen 1 $\mu\text{mol}$ Substrat pro Minute umsetzt
Ü	Überstand (lösliche Fraktion eines Zellextrakts)

üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
(w/v)	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
$\Delta$	Differenz
$\varepsilon_x$	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu$	Mikro ( $1 \cdot 10^{-6}$ )
$\mu g$	Mikrogramm
$\mu l$	Mikroliter
$\mu M$	Mikromolar

# 1 Einleitung

## 1.1 Enzyme: außergewöhnliche molekulare Maschinen

Enzyme sind außergewöhnliche molekulare Maschinen, die dafür verantwortlich sind, dass eine unglaubliche Anzahl von chemischen Umwandlungen koordiniert abläuft (Seelig & Szostak 2007). Aufgrund ihrer enormen katalytischen Aktivität und der Selektivität mit der Reaktionen beschleunigt werden, formen sie alle lebenden Systeme. Im Unterschied zu chemischen Katalysatoren funktionieren sie unter milden Reaktionsbedingungen und unterliegen den mannigfältigsten Regulationsmechanismen. Mit Ausnahme von katalytischer RNA sind fast alle Enzyme Proteine, sie nehmen eine dreidimensionale Struktur ein und nutzen teilweise organische oder anorganische Kofaktoren (Voet *et al.* 1999).

Der Name Enzyme wurde 1878 durch Friedrich Wilhelm Kühne geprägt um katalytisch aktive Substanzen, welche zuvor Fermente genannt wurden, zu bezeichnen. Der Name stammt von den griechischen Wörtern *en*, „in“ und *zyme*, „Hefe“ ab, und soll verdeutlichen, dass biologische Reaktionen durch Substanzen ablaufen, die in der Hefe vorhanden sind und nicht durch die Hefe selbst (Berg *et al.* 2002). Eduard Buchner erhielt im Jahr 1907 den Nobelpreis in Chemie für seine bahnbrechende Entdeckung der Zell-freien Fermentation. Er benannte das Enzym, welches die Fermentation von Sukrose bewerkstelligte, Zymase (Buchner 1897). Seinem Beispiel folgend werden Enzyme auch heute benannt, indem das Suffix –ase an den Wortstamm des Substrates, welches umgesetzt wird, angehängt wird. Daneben gibt es mittlerweile für jedes Enzym eine systematische Klassifikationsnummer (Enzyme Commission (EC)-Nummer) und einen erweiterten systematischen Namen, der neben dem Substrat auch die Reaktionsbezeichnung enthält ([enzyme.expasy.org](http://enzyme.expasy.org)). Nach Entdeckung der Zymase gab es aber immer noch Unklarheiten über die chemische Zusammensetzung der Enzyme. Erst 1926 konnte James B. Sumner durch Kristallisation der Schwerbohnen-Urease zeigen, dass diese Kristalle nur aus Protein bestehen (Sumner 1926). Völlig neue Möglichkeiten zur Untersuchung dieser faszinierenden Makromoleküle ergaben sich später durch die Röntgenkristallographie. Im Jahr 1965 wurde die hochauflöste Struktur von Lysozym veröffentlicht (Blake *et al.* 1965). Auf diese Struktur folgte eine Vielzahl weiterer, wodurch in Kombination mit gerichteter Mutagenese und klassischen enzymologischen Techniken die Aufklärung der atomaren Details der enzymatischen Katalyse möglich wurde. In der jüngeren Vergangenheit beschäftigte man

sich vermehrt mit möglichen Geheimnissen, welche hinter der enormen katalytischen Kraft der Enzyme zu stecken scheinen. Es wurden zwei verschiedene Ansichten diskutiert. Die düstere Sichtweise betrachtete Enzyme als extrem feinjustierte Gebilde, als Endprodukte der Evolution, deren große Zahl an schwachen Wechselwirkungen unsere Rechen- und Designkünste übersteigt (Knowles 1991). Die optimistische Sichtweise dagegen, stellte sie als verständliche Maschinen dar, deren Prinzipien erkannt und für das Design von neuen Enzymen genutzt werden können (Kaplan & DeGrado 2004). Für Letztere sprechen jüngere herausragende Arbeiten, in denen Enzyme *de novo* entworfen wurden. Durch quantenmechanische Rechnungen wurden Übergangszustände modelliert. Anschließend wurden mögliche aktive Zentren bestimmt und schließlich wurde die Datenbank der Proteinstrukturen nach solchen Vertretern abgesucht, denen es möglich sein sollte dieses aktive Zentrum zu inkorporieren. Mit diesem Ansatz konnten neue Enzyme für eine in der Natur nicht vorkommende Kemp-Eliminierung (Röthlisberger *et al.* 2008), für eine Retro-Aldol-Reaktion (Jiang *et al.* 2008) und sogar für die Diels-Alder-Reaktion (Siegel *et al.* 2010) erzeugt werden. Dennoch waren die jeweils anfänglich erhaltenen Reaktivitäten gering und weit entfernt von den üblichen enzymatischen Reaktionsraten. Verbesserungen konnten zwar durch mehrere Runden gerichteter Evolution erzielt werden, die artifiziellen Enzyme blieben dennoch weit hinter den natürlich evolvierten zurück (Toscano *et al.* 2007; Sterner *et al.* 2008; Ward 2008; Khersonsky *et al.* 2011; Althoff *et al.* 2012; Khersonsky *et al.* 2012). Auch aus diesem Grund wird von Warshel und Benkovic seit einiger Zeit konträr diskutiert ob andere Effekte, wie die intrinsische Dynamik von Enzymen, wichtig für die Katalyse sind (Adamczyk *et al.* 2011; Bhabha *et al.* 2011). Doch nicht nur geringe Umsatzraten limitieren den Einsatz von Enzymen für industrielle Anwendungen. Viele Reaktionen, die für den synthetischen Chemiker wichtig sind, lassen sich mit Enzymen alleine nicht bewerkstelligen. Aus diesem Grund setzt man große Hoffnung in sogenannte Hybridkatalysatoren. Sie vereinigen die Reaktivität von Übergangsmetallen, welche von organischen Liganden gebunden werden, mit der Selektivität des Proteingerüsts (Mihovilovic 2007; Heinisch & Ward 2010). Erste Arbeiten von Whitesides wurden durch neuere Publikationen ergänzt (Wilson & Whitesides 1978; Letondor *et al.* 2005; Reetz & Jiao 2006; Roelfes *et al.* 2006). Das Gebiet der Hybridkatalysatoren sollte in der Zukunft sehr wichtig werden und dazu beitragen die Limitationen der Enzymkatalyse in der organischen Synthese zu überwinden (Park & Sugiyama 2010).

## 1.2 Struktur und Evolution von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Enzymen

Das  $(\beta\alpha)_8$ - oder (TIM)-*Barrel* ist eine weit verbreitete Faltungstopologie von Enzymen. Sie zählt zu den ältesten und vielseitigsten Proteindomänen und kommt mit einem Anteil von etwa 10 % aller bekannten Proteinstrukturen am häufigsten vor (Wierenga 2001). Mit wenigen Ausnahmen sind alle bekannten  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Proteine Enzyme. Diese decken ein breites Spektrum an verschiedenen Reaktionen ab. Sie werden von der SCOP Datenbank in 33 Superfamilien eingeteilt und katalysieren über 60 verschiedene Reaktionen.  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrels* sind sehr oft in Stoffwechselwegen und mit Ausnahme von Ligasen in allen EC-Hauptklassen zu finden.

Das kanonische  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* ist aus acht  $\beta\alpha$ -Einheiten ( $\beta\alpha$ -Modulen) aufgebaut, wovon jede aus einem  $\beta$ -Strang und einer nachfolgenden  $\alpha$ -Helix besteht, die über eine  $\beta\alpha$ -Schleife miteinander verbunden sind (Abbildung 1):

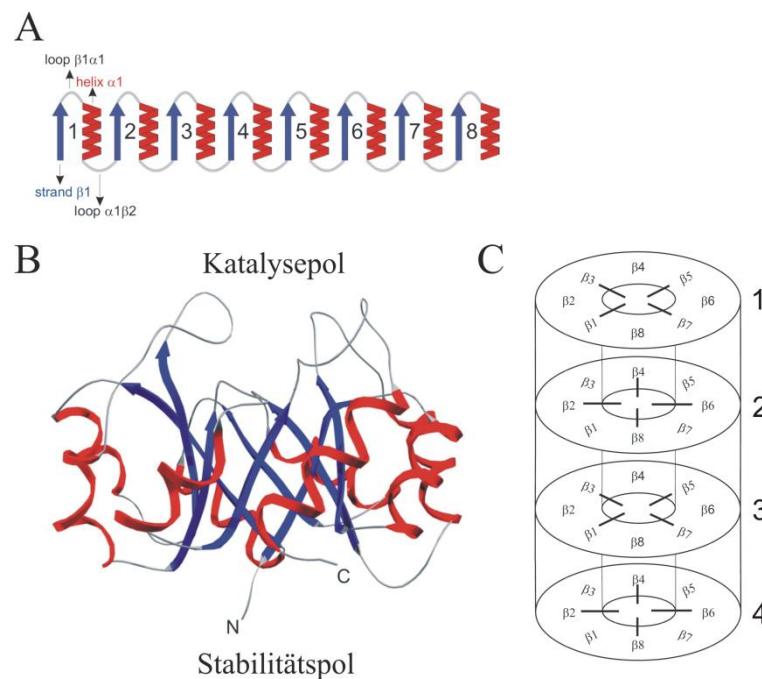


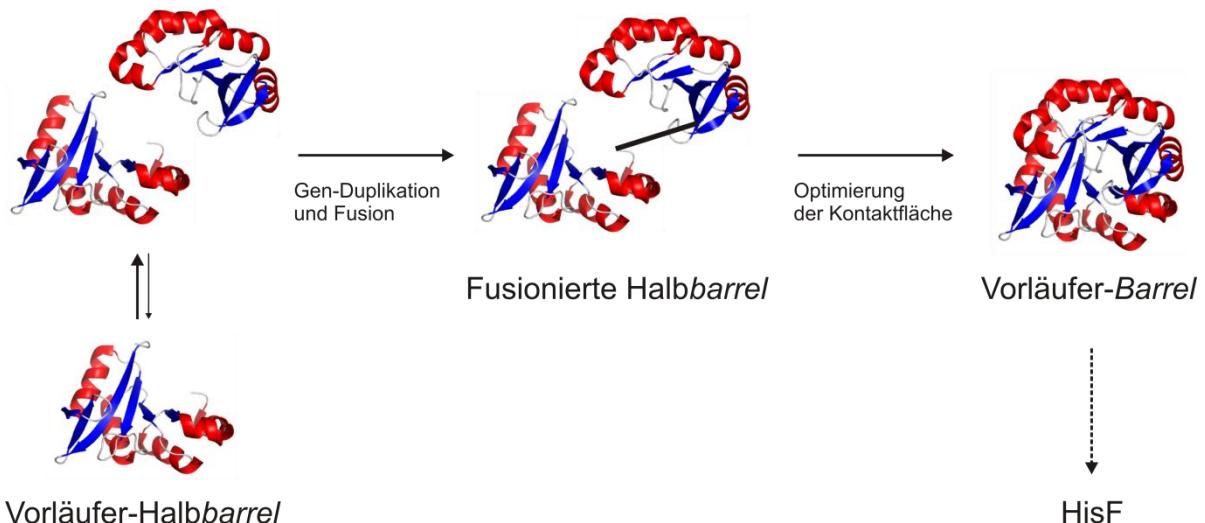
Abbildung 1: Die  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Faltung.

A: Topologische Darstellung der rechtsgängigen  $\beta\alpha$ -Supersekundärstruktur (Blau:  $\beta$ -Stränge / rot:  $\alpha$ -Helices). B: Seitenansicht des  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Proteins Imidazolglycerinphosphat-Synthase (HisF) aus *Thermotoga maritima* (Lang et al. 2000), C: Schematische Darstellung der vier Ebenen des *Barrels* vom Katalysepol (oben) zum Stabilitätspol (unten). Jede Ebene wird durch vier Seitenketten von Resten der ungerad- bzw. geradzahligen  $\beta$ -Stränge gebildet. Die Abbildung wurde aus (Sterner & Höcker 2005) entnommen.

Die Einheiten untereinander sind über  $\alpha\beta$ -Schleifen verbunden. Die acht  $\beta$ -Stränge bilden im Zentrum ein paralleles Faltblatt, das von den acht Helices umgeben ist (Wierenga 2001). In allen bekannten  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Enzymen befinden sich die katalytisch aktiven Reste dabei

an den C-terminalen Enden der  $\beta$ -Stränge und in den  $\beta\alpha$ -Schleifen (Katalysepol), während für die Stabilität wichtige Reste im zentralen Bereich und am entgegengesetzten Ende des *Barrels* ( $\alpha\beta$ -Schleifen) zu finden sind (Stabilitätspol). Dennoch kann die Gestalt des zentralen *Barrels* trotz der gemeinsamen Topologie und der konservierten Lage des aktiven Zentrum stark variieren und viele  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Enzyme besitzen N- oder C-terminale Erweiterungen oder Insertionen in *loop*-Regionen. Die  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Faltung scheint nicht durch eine definierte Sequenz bestimmt zu werden, sondern durch eine definierte Verteilung von polaren, unpolaren und geladenen Aminosäuren im gesamten Protein (Sterner & Höcker 2005). Dies spiegelt sich auch in einer Sequenzidentität von unter 20 % zwischen verschiedenen  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrels* wider. Es ist daher unklar, ob die Topologie der  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrels* mehrfach und unabhängig voneinander entstanden ist, oder ob alle rezenten Vertreter das Produkt einer divergenten Evolution ausgehend von einem gemeinsamen Vorläufer sind. Für die divergente Evolution sprechen unter anderem sehr ähnliche Substratbindemotive bei den phosphatbindenden  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrels* Phosphoribosylanthranilat (PRA)-Isomerase (TrpF), Indol-3-glycerinphosphat-Synthase (TrpC), der  $\alpha$ -Untereinheit der Tryptophan-Synthase (TrpA), sowie der N'-[(5'-phosphoribosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamidribonukleotid (ProFAR)-Isomerase (HisA) und der Imidazolglycerinphosphat-Synthase (HisF), welche drei aufeinanderfolgende Reaktionen in der Tryptophan- bzw. zwei aufeinanderfolgende Schritte in der Histidinbiosynthese katalysieren (Henn-Sax *et al.* 2001). Sie alle besitzen eine C-terminale Phosphatbindestelle, welche durch die  $\beta\alpha$ -Schleifen 7 und 8 gebildet wird. Es war daher naheliegend, dass es möglich ist die katalytischen Aktivitäten innerhalb dieser Gruppe von  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrels* ineinander umzuwandeln. Durch die Anwendung von rationalem Design und Zufallsmutationen konnte in der Tat PRA-Isomerase Aktivität auf HisA (Jürgens *et al.* 2000), HisF (Reisinger *et al.* 2012) und TrpA (Evran *et al.* 2012) erzeugt werden, was als weiterer Hinweis auf einen gemeinsamen Ursprung gewertet wurde.

Die auffallend hohe interne zweifache Symmetrie von HisF (16 % Sequenzidentität und *rmsd*-Wert der C $\alpha$ -Atome 1,58 Å zwischen  $(\beta\alpha)_{1-4}$  = HisF-N und  $(\beta\alpha)_{5-8}$  = HisF-C (Lang *et al.* 2000)) deutete zudem auf eine Evolution durch Genduplikation und Fusion aus einem  $(\beta\alpha)_4$ -Halbbarrel hin (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Modell für die Evolution des  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Enzyms HisF aus einem  $(\beta\alpha)_4$ -Halbbarrel (nach Seitz 2006).**

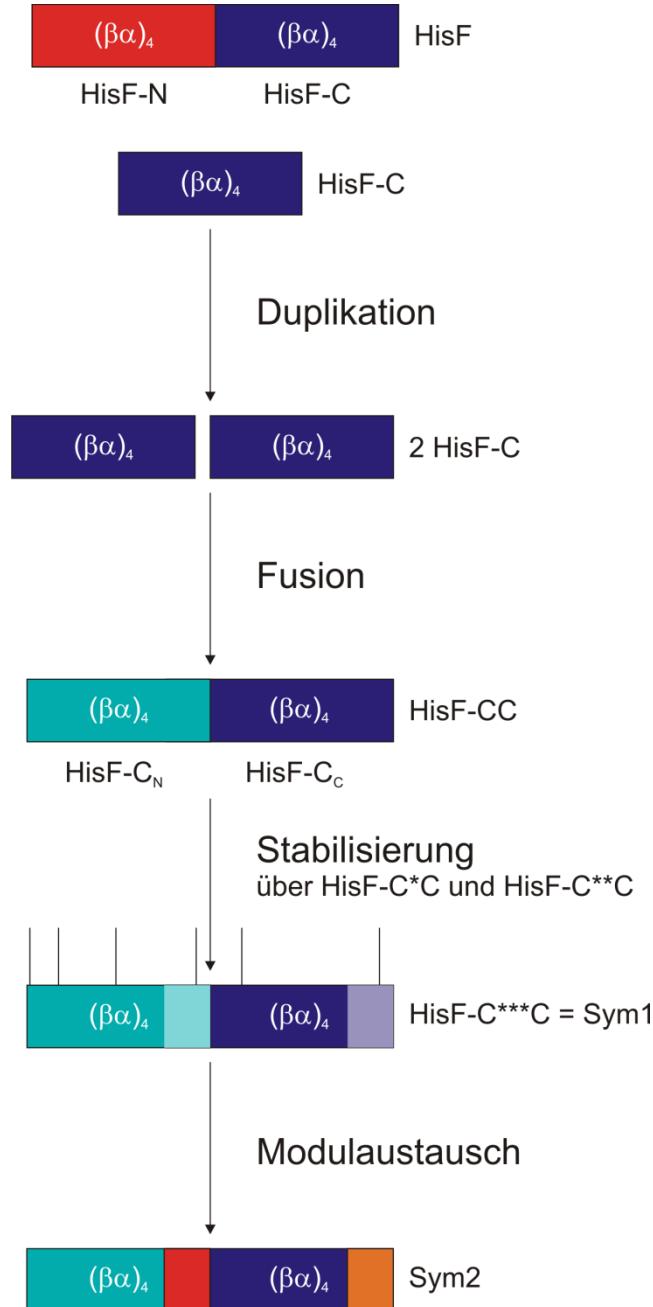
Ausgehend von einem Gen, das für ein ursprüngliches Halbbarrel mit unbekannter Funktion kodierte, führten Duplikationsereignisse mit anschließender Diversifikation zum Gen für HisF.

Genduplikation ist eine der wichtigsten natürlichen Strategien für die Schaffung von neuen Enzymen: Schätzungen gehen davon aus, dass etwa die Hälfte aller Gene von einem Genduplikationsereignis abstammen (Fani *et al.* 1998; Lynch & Conery 2000). Diese neuen Gene können dann neue Funktionen übernehmen oder sie können Fusionen unterliegen. Besonders das Auftreten von Proteinen mit einem hohen Grad an innerer Symmetrie unterstützt die Theorie, dass Proteine durch Duplikation und Fusion entstehen. Symmetrische Oligomere werden dabei in symmetrische Monomere umgewandelt (Yadid & Tawfik 2007; Richter *et al.* 2010). Neben benachbarten Genen können auch nicht-benachbarte Gene fusioniert werden (Höcker *et al.* 2004; Nikkhah *et al.* 2006; Yadid & Tawfik 2007), was das Spektrum an evolvierbaren Proteinstrukturen und Proteinfunktionen erheblich erweitert (Grishin 2001; Lupas *et al.* 2001; Koonin *et al.* 2002; Söding & Lupas 2003; Ponstingl *et al.* 2005; Riechmann & Winter 2006).

### 1.3 Nachahmung der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Evolution im Labor

Das symmetrische und aus evolutionärer Sicht früh entstandene HisF (Lang *et al.* 2000; Sterner & Höcker 2005; Caetano-Anolles *et al.* 2007) eignet sich ideal für die Untersuchung der evolutionären Mechanismen der Genduplikation und Genfusion. Aus diesem Grund wurde versucht diese Prozesse im Labor nachzuvollziehen, indem zwei identische Kopien der C-terminalen Hälfte von HisF (HisF-C) zunächst zu HisF-CC fusioniert wurden (Höcker *et al.* 2004). HisF-CC wurde anschließend durch die Einführung von vier Mutationen und

Verkürzung der *loop*-Region zwischen den Hälften mittels rationalem Proteindesign und gelenkter Evolution schrittweise zu HisF-C\*<sub>N</sub> und HisF-C\*\*<sub>C</sub> stabilisiert (Seitz *et al.* 2007). Durch die Einführung von zwei weiteren stabilisierenden Mutationen wurde das Protein HisF-C\*\*\*<sub>C</sub> erzeugt und kristallisiert. HisF-C\*\*\*<sub>C</sub> wird in der weiteren Arbeit als Sym1 bezeichnet (Carstensen *et al.* 2012). Obwohl die Röntgenstruktur dieses artifiziellen  $(\beta\alpha)_8$ -Barrels der des wildtypischen HisF-Enzyms ähnelt, war es noch deutlich weniger stabil (Höcker *et al.* 2009). Zudem waren die  $\beta\alpha$ -Module an den C-terminalen Enden von HisF-C<sub>N</sub> und HisF-C<sub>C</sub> nicht aufgelöst, was darauf hindeutete, dass diese Bereiche flexibel und nicht strukturiert sind (Abbildung 3). Um Sym1 weiter zu stabilisieren wurde beschlossen, die putativ labilen  $\beta\alpha$ -Module 8 gegen die entsprechenden Bereiche aus HisF-N auszutauschen. Der genaue Schnittpunkt wurde auf Basis einer Überlagerung der Strukturen von HisF und Sym1 gewählt, welche eine hohe Ähnlichkeit im Übergang zwischen den Bereichen  $\beta\alpha$  3 und  $\beta\alpha$  4 in HisF und  $\beta\alpha$  7 und  $\beta\alpha$  8 in Sym1 zeigte. Aus diesem Grund wurden die  $\beta\alpha$ -Module 8 in HisF-C<sub>N</sub> und HisF-C<sub>C</sub> in Sym1 gegen das  $\beta\alpha$ -Modul 4 von HisF ausgetauscht (Sperl 2009). Das erhaltene Konstrukt wurde Sym2 genannt (Carstensen *et al.* 2012). Abbildung 3 zeigt schematisch die Rekonstruktion der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Evolution im Labor.



**Abbildung 3: Design des  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Proteins Sym2 aus zwei identischen und fusionierten Halbbarrels als schematische Darstellung der Laborrekonstruktion der Evolution von HisF.**

Die C-terminale Hälften von HisF (HisF-C) wurde dupliziert und anschließend zu HisF-CC fusioniert. Dieses wurde durch rationales Design und gerichtete Evolution in mehreren Stufen zu Sym1 stabilisiert. Die Kristallstruktur zeigte nicht aufgelöste Bereiche, die transparent dargestellt sind. Mutationen, die zu Sym1 führten, sind als Linien angedeutet. Sym2 entstand durch den Austausch labiler Bereiche gegen die entsprechenden Sequenzabschnitte von HisF-N. Sequenzbereiche, die aus HisF-C stammen sind blau dargestellt bzw. cyan, wenn sie sich N-terminal befinden; Bereiche aus der N-terminalen Hälften von HisF (HisF-N) sind rot bzw. orange dargestellt.

## 1.4 Rationales Design und gerichtete Evolution

Bei der Nachahmung der Evolution der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Proteine im Labor wurden zwei komplementäre Methoden angewendet, um das primäre Duplikationsprodukt HisF-CC zu stabilisieren, welche eingangs schon erwähnt wurden: Rationales Design und gerichtete Evolution.

Beim rationalen Design verändert man die Sequenz eines Proteins gezielt. Basierend auf einer möglichst detaillierten Proteinstruktur und einem Verständnis der Funktion und Stabilität bestimmenden Mechanismen, werden exakte Änderungen der Proteinsequenz vorgenommen und anschließend einzeln durch geeignete Methoden analysiert (Toscano *et al.* 2007). Durch rationales Design war es möglich, industriell relevante Enzyme zu optimieren, Proteinfragmente zu rekombinieren und zu stabilisieren und neue Aktivitäten zu erzeugen (Bornscheuer & Pohl 2001; Woycechowsky *et al.* 2007; Eisenbeis *et al.* 2012). Computergestütztes Design ermöglichte sogar die *de novo* Etablierung von nicht-natürlichen Reaktionen auf Proteingerüsten. Dazu wurde zunächst ein aktives Zentrum auf Grundlage von rationalen Überlegungen entworfen. Anschließend wurde mithilfe des Programms Rosetta (Kuhlman & Baker 2000; Zanghellini *et al.* 2006) eine Bank von verschiedenen Proteinen danach abgesucht, ob sie das künstliche aktive Zentrum inkorporieren können. Die Proteine wurden nach der Energiefunktion von Rosetta geordnet und die besten Designs wurden exprimiert und biochemisch analysiert. So war es möglich, Enzyme für eine Retro-Aldol- (Jiang *et al.* 2008) und Kemp-Eliminierungs-Reaktion (Röthlisberger *et al.* 2008) *de novo* zu designen. Weiterhin konnten eine Diels-Alderase (Siegel *et al.* 2010) und kürzlich ein Zinkmetalloenzym (Khare *et al.* 2012) erstellt werden. Dennoch blieben die Aktivitäten weit hinter denen natürlich evolvierten Enzyme zurück (Sterner *et al.* 2008) und mussten teilweise durch gerichtete Evolution verbessert werden, um annehmbare Aktivitäten zu erhalten (Ward 2008; Khersonsky *et al.* 2011; Althoff *et al.* 2012; Khersonsky *et al.* 2012).

Im Gegensatz zum rationalen Design benötigt man für die Anwendung von gerichteter Evolution keine Informationen über die Struktur des Proteins oder darüber wie die Struktur mit der Funktion in Zusammenhang steht. Für diese Technik wird die Proteinsequenz durch Techniken wie epPCR, DNA-Shuffling oder ähnliche kombinatorische Methoden wie ITCHY und STEP zufällig mutiert und Varianten mit einer Verbesserung der gewünschten Eigenschaft (Stabilität, enzymatische Aktivität) selektiert (Zhao *et al.* 1998; Ostermeier *et al.* 1999; Chen 2001). Jede Methode zur Einführung zufälliger Mutationen unterliegt jedoch bestimmten Limitationen in der Verteilung der Mutationen, sodass die erhaltenen

Ergebnisse dabei nur mehr oder weniger völlig zufällig sind. Häufig findet man nach der Analyse von selektierten Varianten nur Punktmutationen. Aus diesem Grund wurden weitere Verfahren entwickelt, die neben Punktmutationen auch Insertionen und Deletionen einfügen können, um signifikante Backbone-Veränderungen zu erhalten, welche für eine völlige Neuanpassung eines aktiven Zentrums nötig sind (Chen 2001; Park *et al.* 2006). Während man beim rationalen Design alle Varianten einzeln charakterisiert, benötigt man für gerichtete Evolution entweder ein gutes Selektionssystem oder ein effektives Hochdurchsatzscreening.

Beide Methoden ermöglichen neben der Optimierung von Enzymen auch Studien zur Evolution von Proteinen. Welche Methode zum Einsatz kommt hängt jeweils vom Einzelfall ab. Besitzt man Kenntnis von der Struktur und den strukturellen Anforderungen wählt man rationales Design. Hat man ein funktionierendes Selektionssystem setzt man auf gerichtete Evolution. Idealerweise besitzt man beides, denn eine Kombination von rationalem Design und gerichteter Evolution scheint am effektivsten für das Design von maßgeschneiderten Enzymen (Toscano *et al.* 2007; Sterner *et al.* 2008; Ward 2008) und es gibt bereits einige Beispiele für eine erfolgreiche Kombination von beiden Methoden (Khersonsky *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012).

## 1.5 Hybridkatalysatoren

Enzymatisch katalysierte Reaktionen laufen unter milden Bedingungen in wässriger Lösung mit hohen Umsatzraten, sowie ausgeprägter Substratspezifität und Stereoselektivität ab. Auf Grund dieser vorteilhaften Eigenschaften werden Enzyme zunehmend zur asymmetrischen Synthese im organisch-chemischen Bereich und in der pharmazeutisch-chemischen Industrie eingesetzt. Dennoch sind trotz der enormen Leistungsfähigkeit moderner organischer Methoden, durch die eine Vielzahl an unterschiedlichen Molekülen hergestellt werden kann (Nicolaou 2003), viele Synthesen relativ ineffizient. Zur Erhöhung der Effizienz, die über die Atomökonomie (Li & Trost 2008) quantifiziert werden kann, wurde das Konzept der „Grünen Chemie“ entwickelt. In diesem Rahmen sollen spezifische Syntheseverfahren entworfen werden, bei denen die Menge an Abfallstoffen minimiert wird. Als ein wichtiges Werkzeug hierfür tritt in den letzten Jahren die enzymatische Katalyse zunehmend in den Vordergrund (Mihovilovic 2007). Die modernen Methoden der Molekularbiologie ermöglichen zudem durch Proteindesign Biokatalysatoren in Bezug auf Umsatzraten, Substratspezifitäten und Stereoselektivitäten zu optimieren. Dennoch scheint

die Anzahl der durch Enzyme katalysierbaren, mechanistisch unterschiedlichen Transformationen aus der Sicht eines synthetischen Chemikers limitiert, verglichen mit dem Arsenal an Metall-vermittelten Reaktionen der modernen organischen Chemie. Es bietet sich deshalb an, die Effizienz und Selektivität von Enzymen mit der durch Metall-vermittelte homogene Katalyse möglichen Reaktionsvielfalt zu verbinden (Mihovilovic 2007). Obwohl dieses allgemeine Konzept der Hybridkatalyse in Form von artifiziellen Metalloproteinen bereits lange bekannt ist (Wilson & Whitesides 1978), hat es in den letzten Jahren, auch im Zeichen der Grünen Chemie, eine Renaissance erlebt (Kramer 2006; Letondor & Ward 2006). Mehrere neuere Publikationen über artifizielle Metalloproteine bezeugen das Interesse an diesem spannenden und aufstrebenden Teilbereich der bioorganischen Chemie (Letondor *et al.* 2005; Reetz *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2009). Gleichzeitig belegen diese Arbeiten jedoch auch die Limitationen der bisher hergestellten artifiziellen Metalloproteine, die derzeit nur niedrige Umsatzraten und Stereoselektivitäten aufweisen. Hybridkatalysatoren bleiben diesbezüglich noch weit hinter klassischen Biokatalysatoren zurück, weshalb sich die Anwendungen dieses Konzepts momentan auf den Labormaßstab beschränken.

Bisher kamen verschiedene komplementäre Strategien zur Erzeugung und Optimierung artifizieller Enzyme zur Anwendung. In den späten 1970ern wurde erstmals chemische Modifizierung genutzt, um neuartige Aktivitäten in Proteine einzubringen (Wilson & Whitesides 1978). In solchen Hybridsystemen ist die organometallische Gruppe für die Aktivität zuständig, während das Makromolekül die Selektivität des Hybridkatalysators sicherstellt. Sehr wichtig ist deshalb die Anbindung des Liganden an das Protein, die entweder kovalent oder supramolekular erfolgen kann. Zum Beispiel führte die Substitution der prosthetischen Hämgruppe in Myoglobin durch einen Metall [Cr(III), Mn(III)]-Schiffbase-Komplex zu einem artifiziellen Metalloenzym für die Sulfoxidation von Thioanisol (Ohashi *et al.* 2003). Durch eine doppelte kovalente Verankerung des Liganden, anstatt der zunächst verwendeten supramolekularen Anbindung, konnten die erzielten Enantioselektivitäten stark verbessert werden (Carey *et al.* 2004). Entscheidend war dabei die Blockierung einer Seite des Katalysators durch das proximale Histidin, wodurch die Anzahl der möglichen Übergangszustände verringert wird. Roelfes und Feringa erreichten durch die supramolekulare DNA-Interkalation eines Cu(II)-Komplexes eine enantioselektive Diels-Alder Reaktion zwischen Cyclopentadien und einem prochiralen Dienophil (Roelfes *et al.* 2006). Reetz und Serner konnten durch den erfolgreichen Aufbau einer Technologie-Plattform zeigen, dass HisF als robustes und sehr gut exprimierbares Protein ein

geeignetes Proteingerüst für die Erzeugung von Hybridkatalysatoren darstellt (Reetz *et al.* 2008).

## 1.6 Ziele der Dissertation

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die Röntgenstruktur von Sym2 gelöst werden, um die strukturellen Grundlagen für weitere Designprojekte zu legen.

Auf die Struktur aufbauend sollte eine Ligandenbindestelle in Sym2 mittels rationalen Designs generiert werden und anschließend durch Zufallsmutagenese enzymatische Aktivität erzeugt werden. Das resultierende aktivierte artifizielle  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel aus identischen Halbbarrels sollte den Endpunkt in der experimentellen Rekonstruktion der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Evolution darstellen und die Abfolge von Duplikation, Fusion und Stabilisierung mit Aktivierung komplettieren (Abbildung 4).

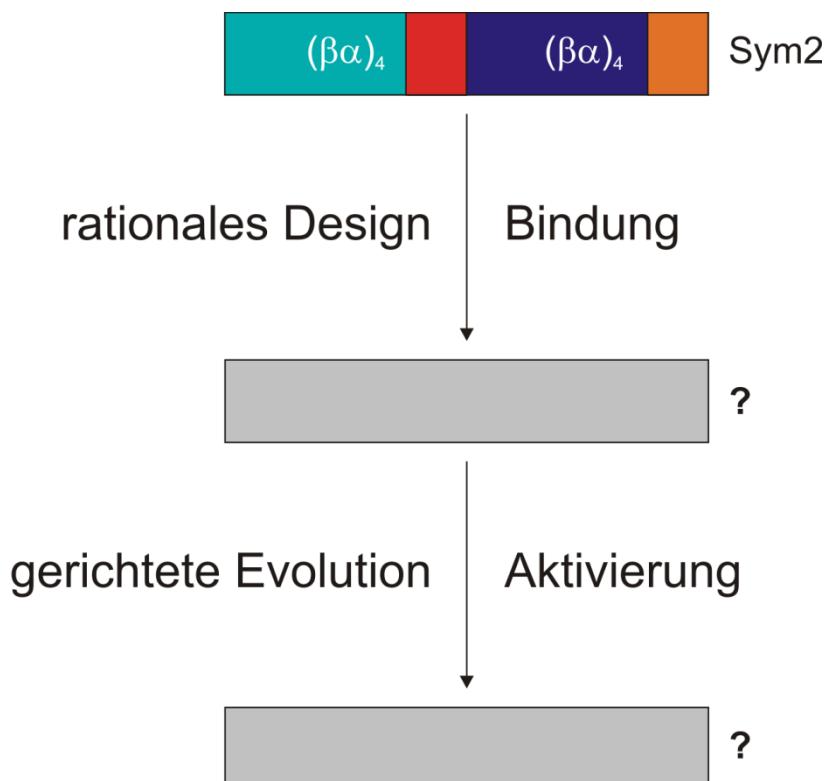


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Vervollständigung der experimentellen Rekonstruktion der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Evolution. Farbgebung wie in Abbildung 3.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten, ebenfalls auf die Struktur von Sym2 aufbauend, neuartige C2-symmetrische Hybridkatalysatoren entwickelt werden, um die aktuelle Bandbreite der über nachhaltige biokatalytische Prozesse zugänglichen Verbindungen zu

erweitern. Die Erzeugung von Enzymen, welche verschiedene Reaktionen enantioselektiv katalysieren, sollte durch chemische Modifikation des C2-symmetrischen, thermostabilen Proteins Sym2 mit Metallliganden erreicht werden. Dazu sollten die Liganden zunächst synthetisiert und an das Protein über zwei eingeführte Cysteine unter Verwendung der *double anchoring* Strategie (Carey *et al.* 2004) gekoppelt werden. Die so erzeugten Hybridproteine sollten anschließend enzymatisch charakterisiert und ihre Struktur möglichst durch Röntgenkristallographie aufgeklärt werden. Katalysatoren mit befriedigenden Umsatzraten und Stereoselektivitäten sollten dann als Startpunkte für die weitere Verbesserung durch rationales Design bzw. gelenkte Evolution (Zufallsmutagenese und Screening) dienen, um langfristig präparative Anwendungen zu ermöglichen.

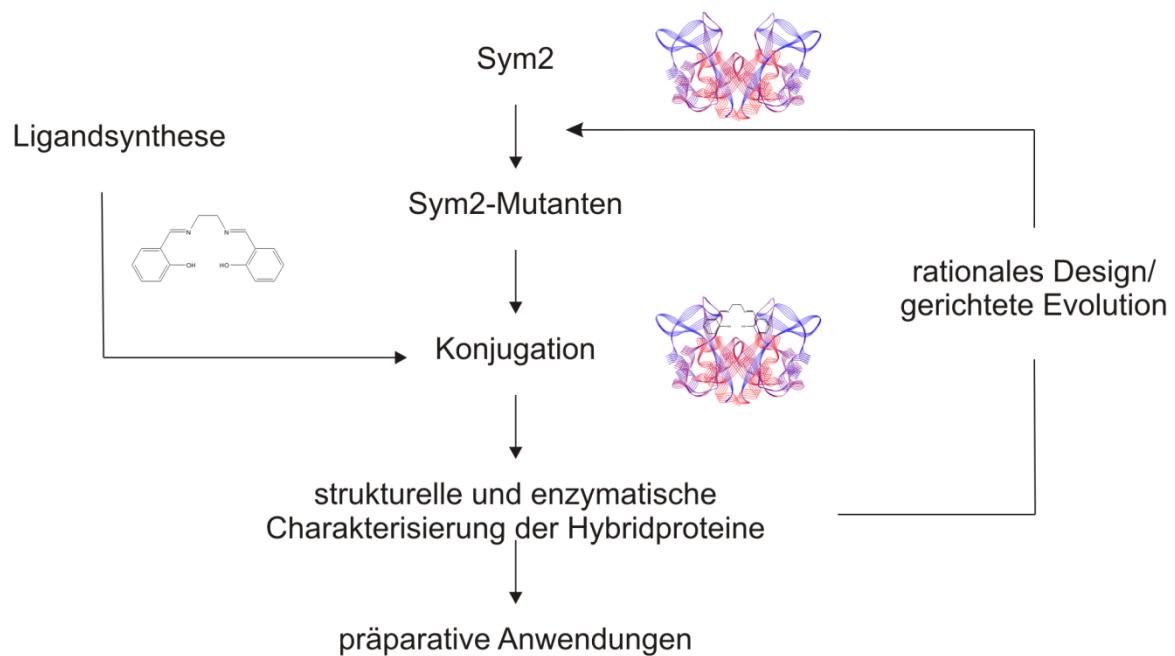


Abbildung 5: Schema für die Erzeugung von C2-symmetrischen Hybridkatalysatoren auf Basis des Sym2-Proteingerüsts.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien besaßen den höchstmöglichen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen:

ACROS ORGANICS, Geel, BE	APPLICHEM GMBH, Darmstadt
BIO101 Inc., Carlsbad, CA, USA	BIORAD LABORATORIES, München
BIOZYM, Hessisch Oldendorf	BODE CHEMIE, Hamburg
BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim	DIFCO, Dreieich
FLUKA, Neu-Ulm	GE HEALTHCARE, München
GERBU Biotechnik GmbH, Gailberg	GIBCO/BRL, Eggestein
HAMPTON RESEARCH, Aliso Viejo, CA, USA	
HARTMANN ANALYTIC, Braunschweig	MERCK, Darmstadt
MP BIOMEDICALS, Illkirch, Frankreich	
NATIONAL DIAGNOSTICS, Simerville, USA	
OXOID, Wesel	QIAGEN, Hilden
RIEDEL-DE HAEN, Seelze	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
ROTH, Karlsruhe	SERVA, Heidelberg
SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen	VWR, Leuven, Belgien

### 2.2 Kits

Clone JET™ PCR Cloning Kit	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
Gel Filtration Calibration Kit	GE HEALTHCARE, München
Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
Nucleo Spin® Extract II	MACHEREY-NAGEL, Düren
Quick Blunting™ Kit	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main

### 2.3 Enzyme

DNA-Polymerasen	
GoTaq® Flexi DNA-Polymerase	PROMEGA, Madison, USA

<i>Pwo</i> DNA-Polymerase	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	STRATAGENE, La Jolla, USA
Restriktionsendonukleasen	PROMEGA, Madison, USA
CIP alkalische Phosphatase	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main
T4 DNA-Ligase	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main
	MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot
	NEW ENGLAND BIOLABS
	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim

## 2.4 Bakterienstämme

Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Eigenschaften <sup>1</sup>	Herkunft / Referenz	Anmerkung
<i>E. coli</i> NEB Turbo	$F^i$ $proA^+$ $B^+$ $lac^A$ $\Delta$ ( $lacZ$ ) M15/ $fhuA2$ $\Delta$ ( $lac$ - $proAB$ ) $glnV$ $gal$ $R(zgb-210::Tn10)Tet^S$ $endA1$ $thi-1$ $\Delta$ ( $hsdS$ - $mcrB$ ) $5$	NEB	Klonierungsstamm, Resistenz gegen den Bacteriophagen T1, beschleunigtes Wachstum
<i>E. coli</i> NEB T7 Express $I^q$	$fhuA2$ $lacZ::T7$ gene1 $[lon]$ $ompT$ $gal$ $sulA11$ $R(mcr-73::miniTn10-$ $Tet^S)2$ [ $dcm$ ] $R(zgb-$ $210::Tn10-Tet^S)$ $endA1$ $\Delta(mcrC-mrr)$ 114::IS10 $lacI^q$ ( $Cam^R$ )	NEB	Expressionsstamm, Resistenz gegen den Bacteriophagen T1, Proteasedefizienz
<i>E. coli</i> T7 Express Rosetta	wie <i>E. coli</i> NEB T7 Express $I^q$		Diese Expressionszellen wurden am Lehrstuhl selbst hergestellt. Es handelt sich dabei um <i>E. coli</i> NEB T7 Express $I^q$ -Zellen, die zusätzlich das pRARE-Plasmid aus <i>E. coli</i> Rosetta (DE)3 pLysS enthalten

<i>E. coli</i> MG1655	F- lambda- <i>ilvG- rfb-50</i> <i>rph-1</i>	(Guyer <i>et al.</i> 1981)	Wildtyp-Stamm
<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta trpF$	F- lambda- <i>ilvG- rfb-50</i> <i>rph-1</i> $\Delta trpF$	am Lehrstuhl hergestellt durch B. Reisinger	Cam <sup>R</sup> <i>trpF</i> -defizienter Stamm für <i>in vivo</i> Komplementationstests auf PRAI Aktivität
<sup>1</sup> Genetische Nomenklatur nach Bachmann (1990).			

## 2.5 Plasmide

Tabelle 2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Name	Marker <sup>2</sup>	Herkunft/Referenz	Anmerkungen
pET24a(+)	kan	NOVAGEN	Expressionsvektor, IPTG induzierbar, 3'-terminaler (His) <sub>6</sub> -tag
pET24a(+)-sym2	kan	(Sperl 2009)	Expression von Sym2
pET24a(+)-sym2-C	kan	diese Arbeit	-
pET24a(+)-sym2C- D176VC	kan	diese Arbeit	-
pET24a(+)- sym2_bindC	kan	diese Arbeit	Expression von Sym2_bindC
pET24a(+)- sym2_bindN	kan	diese Arbeit	Expression von Sym2_bindN
pET24a(+)- sym2_bindNC	kan	diese Arbeit	Expression von Sym2_bindNC
pET24a(+)- <i>hisF</i> - D130V+D176V	kan	hergestellt durch B. Reisinger	-
pET24a(+)- cpsym2_TrpF	kan	diese Arbeit	Expression von cpSym2_TrpF
pET24a(+)- <i>hsym2</i>	kan	diese Arbeit	Expression von hSym2
pQE70	bla	QIAGEN	Expressionsvektor, IPTG- induzierbar
pQE70-cpsym2_TrpF	bla	diese Arbeit	Expression von cpSym2_TrpF in $\Delta trpF$ -Zellen
pET11c(+)- <i>hisF</i>	bla	(Reisinger <i>et al.</i> 2012)	-

pTNA	bla	(Merz <i>et al.</i> 2000; Beismann-Driemeyer & Sterner 2001)	Vektor für <i>in vivo</i> - Komplementationstests
pTNA-Bsa	bla	diese Arbeit	-
pB4	bla	diese Arbeit	-
pExp-TrpF	bla	diese Arbeit	Vektor zur Erstellung von Genbanken und für <i>in vivo</i> - Komplementationstests
pTNA- <i>trpF</i>	bla	(Claren <i>et al.</i> 2009)	Positivkontrolle für <i>in vivo</i> -Komplementationstests
pTNA- <i>cpsym2_TrpF</i>	bla	diese Arbeit	-
pANTRY	kan	(Auburger 2010)	pUC-basierter Vektor zur Insertion von <i>blunt</i> - Fragmenten
pSel_S101	bla	diese Arbeit	-
pSel2	bla	diese Arbeit	-
pSel1	bla	diese Arbeit	-

<sup>2</sup>Genetische Nomenklatur nach Novick *et al.* (1976).

## 2.6 Oligodesoxyribonukleotide

Alle aufgeführten Oligodesoxyribonukleotide wurden entweder von der Firma METABION, Martinsried oder von der Firma Biomers, Ulm bezogen. Schnittstellen und Mutationen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

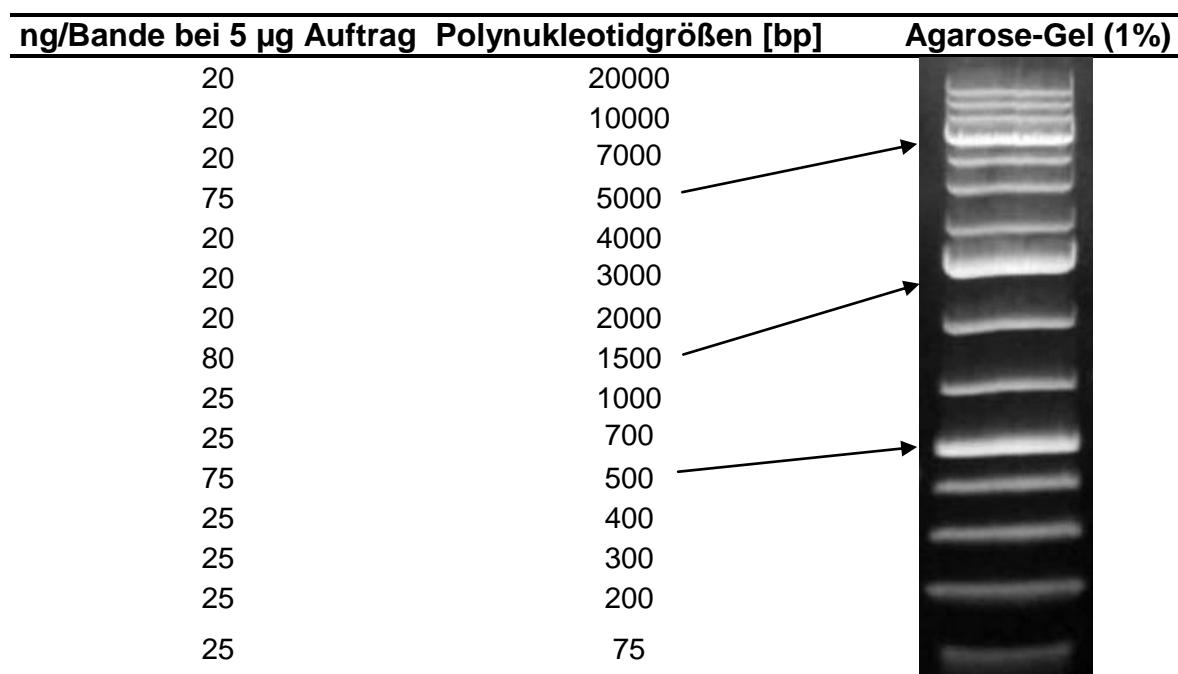
**Tabelle 3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonukleotide.**

Name	Sequenz	Verwendung
A	5'-CCAGTATCGACAGAGTCGGCACAAATCGGG-3'	QuikChange™
B	5'-CCCGATTTGTGCCGACTCTGTCGATACTGG-3'	QuikChange™
C	5'-GGTCGCGGATCCCAGGCCGTTGTCGTGGCGATAGTTGCAA AAGAGTGGATGGAGAG-3'	PCR
E	5'-ATACATATGCAAGGCCGTTGTCGTGGC-3'	PCR
	5'-CTGGGATCCGAAGGTCTGTGCGATTGTGTGATGAGGCTCGG	
F	GTTTCGACAGCGGCAGTATTGATAGAGACCTTGTCAAGCACCTG CCAGGAAG-3'	PCR
G	5'-GCAATGATACCGCGCGACCCACGCTCACC-3'	QuikChange™
H	5'-GGTGAGCGTGGGTCGCGCGGTATCATTGC-3'	QuikChange™
I	5'-GGCCTCGCATGCAAGGATCCGGTCTCACGACAAGGTGAGCA TAAACACGGCGGC-3'	PCR
J	5'-CTCTGAAAGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCA CCTGCCAGGAAGGCTTCAAGG-3'	PCR
M	5'-CTCGCGACAAGGTGAGACCG-3'	Oligoannealing
N	5'-GATCCGGTCTCACCTGTCCCGAGCATG-3'	Oligoannealing
O	5'-TCTCCGTGGGGTCTCAAAGGTGAGCATAAACACGGCGGCTG- 3'	PCR
P	5'-AAGCCGCAAGGTCTCAGTCGGCACCTGCCAGGAAGGCTTC-3'	PCR
Q	5'-TCTCCGTGGGGTCTCAAAGG-3'	epPCR
R	5'-AAGCCGCAAGGTCTCAGTCG-3'	epPCR
	5'-TGAGCATAAACACGGCGGCTGTGGAGAACATCCTTCATTGAGCA	
X1	CACAGATCGCTCTAACTTTGGGAGTCAGGCCGTTGTCGTGGC GTTAG-3'	PCR
	5'-TGAGCATAAACACGGCGGCTGTGGAGAACATCCTTCATTGATCA	
X2	CACAGATCGCTCAAACCTTTGGGAGTCAGGCCGTTGTCGTGGC GATAG-3'	PCR
T7P	5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'	Sequenzierung
T7T	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	Sequenzierung
M13fwd	5'-GTTTCCCAGTCACGACGTTGTA-3'	Sequenzierung
M13rev	5'-TTGTGAGCGGATAACAA-3'	Sequenzierung
CyRI	5'-TCACGAGGCCCTTCGTCTT-3'	Sequenzierung
CyPstI	5'-TCGCCAAGCTAGCTGGATTCT-3'	Sequenzierung
fwV140D	5'-GATGGAGAGTTCATGGTCTACACCTACTCCGG-3'	QuikChange™
fwF141Y	5'-GGAGAGTTCATGGACTTCACCTACTCCGGAAAG-3'	QuikChange™
fwT149S	5'-CTCCGGAAAGAACACGGGCATACTCTGAG-3'	QuikChange™

fwD155G	5'-GGCATACTTCTGAGAGACTGGGTGGTTGAAGTAG-3'	QuikChange™
fwK162R	5'-GTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAG-3'	QuikChange™
fwD176Y	5'-CACCACTATCGACAGAGACGGCTAAATCGGG-3'	QuikChange™
fwT178S	5'-GTATCGACAGATACGGCACAAAATCGGTTACG-3'	QuikChange™
fwI113S	5'-GAGAACCTTCATTGATCACACAGATCGCTCTAAC-3'	QuikChange™
fwQ118L	5'-GAGCACACAGATCGCTAAACTTTGGGAGTCAG-3'	QuikChange™
fwI129L	5'-GCCGTTGTCGTGGCGATAGATGCAAAAGAG-3'	QuikChange™
fwV140A	5'-GATGGAGAGTTATGGTCTTCACCTACTCCGG-3'	QuikChange™
fwN148D	5'-CTACTCCGGGAAGAACACACGGGCACACTTC-3'	QuikChange™
fwI151T	5'-GAAGGACACGGGCATACTTCTGAGAGACTGG-3'	QuikChange™
fwT171A	5'-GGAGAGATCCTGCTCACCAAGTATCGACAGAG-3'	QuikChange™
fwD176G	5'-CCAGTATCGACAGAGACGGCACGAAATCGGG-3'	QuikChange™
fwS101I	5'-GGTCTCAAAGGTGATCATAAACACGGCGG-3'	QuikChange™

## 2.7 DNA-Längenstandard

GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (MBI FERMENTAS, St. Leon Rot)



## 2.8 Protein-Längenstandard

Unstained Protein Molecular Weight Marker (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot)

Protein	MW [kDa]	SDS-Gel (12,5 %)
β-Galaktosidase	116,0	
Albumin	66,2	
Ovalbumin	45,0	
Laktatdehydrogenase	35,0	
REase Bsp98I	25,0	
β-Laktoglobulin	18,4	
Lysozym	14,4	

## 2.9 Medien, Lösungen und Puffer

Alle Nährmedien wurden zur Sterilisation 20 min bei 121 °C autoklaviert. Antibiotika und andere hitzelabile Medienzusätze wurden nach Abkühlung der Medien aus steril filtrierten Stammlösungen zugegeben. Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Puffer filtriert (ME24 D47mm; 0,2 µm Porengröße; SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel) und bei Raumtemperatur gelagert. Es wurde gefiltertes Wasser (MilliQ Advantage A10 System, MILLIPORE GMBH, Schwalbach) verwendet.

### 2.9.1 Molekularbiologisches Arbeiten

#### PCR-dNTP-Stammlösung (100 mM bzw. 10 mM)

Je 100 mM bzw. 10 mM dNTP (N = A, C, G oder T) in Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

#### MgCl<sub>2</sub> für epPCR

50 mM MgCl<sub>2</sub> Stammlösung von Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (NEW ENGLAND BIOLABS) verwendet und bei -20 °C gelagert.

**MnCl<sub>2</sub> für epPCR**

50 mM MnCl<sub>2</sub> in Wasser gelöst.

**Agarosegelektrophorese****Agarose (1 %)**

1 % Agarose (w/v) in 0,5x TBE-Puffer aufgekocht und bei 60°C gelagert.

**Sukrose Farbmarker**

60 % (w/v) Sukrose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF in 0,5x TBE.

**Ethidiumbromid-Stammlösung**

125 µg/ml in Wasser gelöst.

**TBE (5x)**

445 mM Borsäure, 12,5 mM EDTA, 445 mM Tris-HCl, resultierender pH = 8,15.

## 2.9.2 Mikrobiologische Arbeiten mit *E. coli*

Die Lagerung von Antibiotika-Stammlösungen erfolgte bei -20 °C.

**Ampicillin-Stammlösung (1000 fach)**

150 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser gelöst und steril filtriert.

**Kanamycin-Stammlösung (1000 fach)**

50 mg/ml Kanamycinmonosulfat in Wasser gelöst und steril filtriert.

**Chloramphenicol-Stammlösung (1000 fach)**

30 mg/ml Chloramphenicol in 70 % Ethanol gelöst und steril filtriert.

**IPTG-Stammlösung**

0,5 M IPTG in Wasser gelöst, steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

**1 % Natriumchloridlösung**

10 g/l Natriumchlorid in 1 l Wasser gelöst und autoklaviert.

**Luria-Bertani (LB)-Vollmedium (Sambrook *et al.* 1989)**

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl.

**LB-Agar**

LB-Medium zuzüglich 1,5 % (w/v) Bacto-Agar.

**SOB-Medium**

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Trypton, 0,05 % (w/v) NaCl, nach dem Autoklavieren wurden 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 2,5 mM KCl (alles steril) hinzugefügt.

**SOC-Medium**

SOB-Medium plus 20 mM Glucose (steril filtriert) nach dem Autoklavieren.

**SOC-Agar**

SOC-Medium plus 1,5 % (w/v) Bacto-Agar.

**M9<sup>-</sup>-Medium**

Zu 750 ml sterilem H<sub>2</sub>O wurden zugegeben:

200 ml 5 x M9 Salze, 2 ml MgSO<sub>4</sub> (1M), 20 ml Glucose (20%), 0,1 ml CaCl<sub>2</sub> (1M)

**M9<sup>-</sup>-Agar**

M9<sup>-</sup>-Medium plus 1,5 % (w/v) Bacto-Agar.

**CaCl<sub>2</sub> (1 M)**

1 M CaCl<sub>2</sub> in Wasser gelöst.

**Glucose (20 %)**

20 % (w/v) Glucose in Wasser gelöst.

**KCl (1 M)**

1 M KCl in Wasser gelöst.

**MgCl<sub>2</sub> (1 M)**

1 M MgCl<sub>2</sub> in Wasser gelöst.

**MgSO<sub>4</sub> (1 M)**

1 M MgSO<sub>4</sub> in Wasser gelöst.

**5x M9<sup>-</sup>-Salze**

64 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 g NaCl, 5,0 g NH<sub>4</sub>Cl in Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt, autoklaviert und bei RT gelagert.

**Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen****TFB I**

100 mM KCl

50 mM MnCl<sub>2</sub>

30 mM KOAc

10 mM CaCl<sub>2</sub>

15 % (v/v) Glycerin

Stammlösungen für die einzelnen Komponenten wurden autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Der Puffer wurde stets vor der Verwendung frisch angesetzt.

**TFB II**

100 mM Tris-HCl, pH 7,0

10 mM KCl

75 mM CaCl<sub>2</sub>

15 % (v/v) Glycerin

Stammlösungen für die einzelnen Komponenten wurden autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Der Puffer wurde stets vor der Verwendung frisch angesetzt.

### 2.9.3 Arbeiten mit Proteinen

**Aufschlusspuffer für Expressionen im analytischen Maßstab**

100 mM Kaliumphosphat (KP), 2 mM EDTA, pH 7,5.

**Aufschlusspuffer für Expressionen im präparativen Maßstab**

50 mM KP / 50 mM KP, 1 mM TCEP / 50 mM Tris-HCl, pH 7,5.

**Dialyse- und Lagerungspuffer**

5 mM / 10 mM / 50 mM KP, pH 7,5.

50 mM / 100 mM Tris-HCl, pH 7,5.

**EDTA-Stammlösung**

500 mM EDTA wurden unter Zugabe von KOH-Plätzchen gelöst und der pH-Wert anschließend mit 1 M KOH auf 7,5 eingestellt.

**HEPES-Puffer für TrpF-Aktivitätsmessungen**

1 M HEPES wurde in 100 ml Wasser eingewogen und der pH-Wert 7,5 durch Titration mit 5 M NaOH eingestellt. Daraus wurde durch Verdünnung eine 50 mM HEPES, pH 7,5 Lösung hergestellt.

**Puffer für Gelfiltration****für Superdex 75- bzw. Superdex 200-Säule**

50 mM KP, 300 mM KCl oder NaCl, pH 7,5, entgast.

**für denaturierende Gelfiltration**

50 mM KP, 300 mM NaCl, 5 M GdnHCl, pH 7,5, entgast.

**Puffer zur Konjugation von Proteinen mit Mn-Salen**

50 mM KP, pH 7,5, 5 M GdnHCl.

**Konjugationsreagenz**

10 mM Mn-Salen in DMSO.

**Lösungen für Ellmans Test****Puffer**

100 mM NaP, pH 8,0.

**Ellmans Reagenz**

10 mM 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoësäure) (DTNB) in Puffer.

**Standard-Lösung Cystein**

26,34 mg Cystein-HCl Monohydrat in 100 ml Puffer (1,5 mM).

**Cystamin**

10 mM Cystamin in Puffer.

**Puffer für Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie****Laufpuffer**

50 mM KP, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, pH 7,5.

Für Cys-Varianten zusätzlich 1 mM TCEP.

**Elutionspuffer**

50 mM KP, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol, pH 7,5.

Für Cys-Varianten zusätzlich 1 mM TCEP.

**Labelpuffer**

50 mM EDTA, 1 M NaCl zum Herunterwaschen der alten Ni<sup>2+</sup>-Ionen.

250 mM NiCl<sub>2</sub> zum Beladen der Säule mit frischen Ni<sup>2+</sup>-Ionen.

500 mM NaCl zum Herunterwaschen unspezifisch gebundener Metallionen.

**Kristallisationsscreens und Puffer**

QIAGEN Classics, Classics II, PEGs, PEGs 2, pHClear 2.

HAMPTON PEGRx 1+2, PEGIon 1+2.

0,2 M Ammoniumsulfat, 18-30 % PEG 4000.

0,04 M Citronensäure/0,06 M BIS-TRIS Propan (pH 6,4), 20 % w/v Polyethylen-glycol 3350.

## 2.9.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

**Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Stammlösung (10 %)**

10 % (w/v) APS in Wasser gelöst, steril filtriert, und bei -20 °C gelagert.

**Coomassie-Färbelösung**

0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 und R250, 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig, filtriert, lichtgeschützt gelagert.

**Liqui-Gel™ 37,5:1 (40%)**

38,96 % (w/v) Acrylamid, 1,04 % (w/v) Bisacrylamid, bei 4 °C gelagert.

**SDS-PAGE Laupuffer**

0,1 % (w/v) SDS, 0,025 M Tris-HCl, 0,2 M Glycin (resultierender pH = 8,5).

**SDS-PAGE Sammelgelpuffer**

0,4 % (w/v) SDS, 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8.

**SDS-PAGE Trenngelpuffer**

0,4 % (w/v) SDS, 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8.

### SDS-PAGE Probenpuffer (5 x)

5 % (w/v) SDS, 25 % (w/v) Glycerin, 12,5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau, 1,25 M Tris-HCl, pH 6,8.

**Tabelle 4: Zusammensetzung von SDS-Trenngel (12,5 %) und Sammelgel (für 13 Gele).**

Substanzen	Sammelgel	Trenngel
Sammelgelpuffer	7,38 ml	
Trenngelpuffer		19,5 ml
Protogel™	5,9 ml	26,2 ml
Wasser	15,9 ml	31,6 ml
APS-Stammlösung	89 $\mu$ l	195 $\mu$ l
TEMED	29 $\mu$ l	89 $\mu$ l

## 2.10 Software

### 2.10.1 Lokale Anwendungen

ÄKTA Unicorn Version 5.01 (318)	© GE HEALTHCARE
Bioedit <i>Sequence Alignment Editor</i> V.7.0.9	© IBIS BIOSCIENCES, Tom Hall
Cary Eclipse Version 1.1 (175)	© VARIAN Australia Pty. Ltd. 2002
Cary Win UV Version 3.0 (182)	© VARIAN Australia Pty. Ltd. 2002
Corel Draw Version 14	© 2003 COREL Corp.
DS Visualizer 2.0	© ACCELRYS Software Inc.
DataMax Version 2.10	© 1996 JOBIN IVON/SPEX
DocIt Version 2.3.0	© 2003, UVP Inc.
EndNote Version X4.0.1	© THOMSON REUTERS, 2008
Gene Designer 1.1.4.1	© 2005 - 2007 DNA 2.0 Inc.
GeneDoc 2.6.002	© 2000 Karl Nicholas
ISIS Draw Version 2.3	© 2000 MDL Information Systems
MS Office 2003	© 2003 MICROSOFT Corporation
OptiQuant Version 02.50	© 1997 PACKARD Instrument Co.
PyMOL™ Version 0.99rc6	© 2006 DELANO SCIENTIFIC LCC.
SigmaPlot Version 10.0	© 2006 SPSS Inc.
Spectra Manager Version 2.06	© JASCO Corporation, 2007

## 2.10.2 Servergestützte Anwendungen

DaliLite (Holm & Park 2000)	<a href="http://www.ebi.ac.uk/DaliLite/">http://www.ebi.ac.uk/DaliLite/</a>
OligoAnalyzer 3.1	<a href="http://eu.idtdna.com/analyzer/">http://eu.idtdna.com/analyzer/</a>
ProtParam (Gasteiger <i>et al.</i> 2003)	<a href="http://www.expasy.org/tools/protparam.html">http://www.expasy.org/tools/protparam.html</a>
PEDEL-AA (Firth & Patrick 2005)	<a href="http://quinevere.otago.ac.nz/cgi-bin/aef/peDEL-AA.pl">http://quinevere.otago.ac.nz/cgi-bin/aef/peDEL-AA.pl</a>

# 3 Methoden

## 3.1 Mikrobiologische Methoden

### 3.1.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Glaswaren wurden zur Sterilisation vier Stunden bei 200 °C ausgebacken. Medien und hitzestabile Lösungen wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert, während hitzelabile Lösungen mit Hilfe eines Spritzenfilters (0,22 µm Porengröße) steril filtriert wurden.

### 3.1.2 Anzucht und Lagerung von *E. coli*-Stämmen

Alle verwendeten *E. coli* Stämme wurden bei 37 °C unter Schütteln bei 150 rpm (1 l Kultur) bzw. 200 rpm (5 bzw. 50 ml Kultur) angezogen. Die Anzucht erfolgte in der Regel in LB-Medium. Bei plasmidtragenden Stämmen wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum (150 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycinmonosulfat oder 30 µg/ml Chloramphenicol) aus tausendfach konzentrierten, steril filtrierten Stammlösungen zugegeben. Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) gegen das entsprechende Medium verfolgt. Einer  $OD_{600}$  von 1,0 entsprechen etwa  $3,2 \times 10^8$  Zellen/ml.

Um Einzelkolonien anzuziehen wurden die Zellsuspensionen auf entsprechenden Selektivagarplatten (gleiche Antibiotikakonzentration wie im Flüssigmedium) ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die dauerhafte Lagerung von *E. coli*-Stämmen erfolgte als Glycerinkultur bei -80 °C. Dazu wurden 750 µl einer Übernachtkultur (üN-Kultur) mit 750 µl 87 %igem Glycerin (autoklaviert) in einem Schraubdeckelgefäß (2 ml) vermischt und bei -80 °C eingefroren.

### 3.1.3 Transformation von *E. coli*

#### 3.1.3.1 Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (Inoue et al. 1990)

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde mit einer 50 ml üN-Kultur 1 l LB-Medium auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bei 150 rpm inkubiert, bis eine  $OD_{600}$  von etwa 0,6 erreicht war. Die Zellen wurden daraufhin 15 min auf Eis gestellt und zur Ernte bei 4 °C 10 min lang bei 4000 rpm (SORVALL GS3-Rotor) in einem sterilen Gefäß zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 ml eiskalten TFB I-Puffer

schonend resuspendiert und die Suspension erneut 10 min bei 4 °C und 4000 rpm in einer EPPENDORF *Centrifuge 5810 R* zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 10 ml TFB II-Puffer auf Eis aufgenommen und in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert (je 100 µl). Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Zur Transformation wurden 100 µl chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit mindestens 10 ng Plasmid-DNA (maximales Volumen 20 µl) 30 min lang auf Eis inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock von 45 s bei 42 °C und eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurden die Zellen mit 900 µl LB-Medium ohne Antibiotikum versetzt und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Durch diese Kur konnten die transformierten Zellen die Antibiotikaresistenz ausbilden. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (3 min bei 4000 rpm, EPPENDORF 5415 R), der 900 µL Überstand abgenommen, das Pellet im verbleibenden Restvolumen (ca. 100 µl) resuspendiert und ausplattiert.

### 3.1.3.2 Elektrokompetente *E.coli*-Zellen

Zur Präparation von elektrokompetenten *E.coli*-Zellen nach Dower *et al.* (1988) wurden 50 ml SOB-Medium aus einer üN Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen. Die Kultur wurde 30 min auf Eis abgekühlt und die Zellen abzentrifugiert (4000 rpm, EPPENDORF A-4-81-Rotor, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 50 ml eiskaltem, steriles Wasser resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 20 ml eiskaltem, steriles Wasser resuspendiert. Nach einem weiteren Inkubations- und Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem, steriles Wasser resuspendiert. Es wurde ein letztes Mal auf Eis inkubiert und zentrifugiert und das Pellet dann in mindestens 1 ml steriles Wasser aufgenommen.

Zur Transformation wurden Aliquots zu je 100 µl entnommen und mit maximal 20 µl salzfreier DNA-Lösung versetzt. Dazu wurde die DNA vor der Transformation mindestens 1 h gegen Wasser dialysiert indem 10-20 µl DNA-Lösung auf die glänzende Seite eines Nitrocellulosefilters (MILLIPORE) aufgebracht wurden, welcher in einer Petrischale auf MILLIPORE-Wasser aufgelegt worden war. Nach Zugabe der DNA zu den Zellen wurde der Transformationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2mm) überführt. Nach dem elektrischen Puls (2500V, 25 µF, 200 Ohm) im Elektroporator wurden die Zellen sofort in 1,5 ml SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Danach wurden Aliquots auf Selektivagar ausplattiert und üN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### 3.1.3.3 Bestimmung der Transformationseffizienz

Um die Transformationseffizienz ( $T_E$ ) zu bestimmen, wurde ein Aliquot kompetenter Zellen mit 10 ng pUC19-Plasmid-DNA transformiert (2.5). Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe in je 100  $\mu$ l LB-Medium erstellt (1:10, 1:100, 1:1000) und auf LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37°C wurden die Kolonien auf einer Platte ausgezählt und  $T_E$  nach Formel 1 berechnet.

---

#### Formel 1: Berechnung der Transformationseffizienz.

$T_E$ : Transformationseffizienz (Kolonien pro  $\mu$ g DNA),  $n_{Kol}$ : Anzahl der Kolonien,  $m_{DNA}$ : eingesetzte Masse an DNA.

### 3.1.4 In vivo Komplementationstest

*In vivo* Komplementationstests wurden im Tryptophan-auxotrophen *E.coli* MG1655  $\Delta trpF$  Stamm (2.4) durchgeführt. Die Zellen wurden durch Elektroporation (3.1.3.2) mit Plasmidkonstrukten oder plasmidbasierten Genbanken (3.2.11) transformiert. Nach Inkubation in LB- bzw. SOC-Medium wurden die Zellen dreimal mit 1 ml 1 % (w/v) NaCl-Lösung gewaschen, um das jeweilige Vollmedium vollständig zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend auf M9<sup>-</sup>-Selektionsmedium ausgestrichen. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz (3.1.3.3) wurde ein Aliquot der Zellen auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

### 3.1.5 Entsorgung von Mikroorganismen

Nicht mehr benötigte *E. coli*-Kulturen, sowie mit den Organismen in Kontakt gekommene Lösungen, wurden vor der Entsorgung autoklaviert.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration von wässrigen Lösungen wurde spektroskopisch bei 260 nm Wellenlänge bestimmt (EPPENDORF Biophotometer). Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz entspricht einer Absorption von 1,0 bei 260 nm (mit  $0,1\%A_{260} = 20 \text{ cm}^2\text{mg}^{-1}$  und einer Schichtdicke von  $d = 1 \text{ cm}$ ) eine dsDNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , eine ssDNA-Konzentration von 33  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sowie eine ssRNA-Konzentration von 35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Damit kann die DNA-Konzentration folgendermaßen berechnet werden:

**Formel 2: Berechnung der DNA-Konzentration mittels Absorptionsmessung bei 260 nm.**

$C_{dsDNA}$ : Konzentration an doppelsträngiger DNA,  $A_{260}$ : Absorption bei 260 nm.

Eine reine DNA-Lösung zeigt keine Absorption oberhalb von 300 nm und weist einen Quotienten  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  von mindestens 1,8 auf.

### 3.2.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung definierter DNA-Fragmente *in vitro* (Mullis & Faloona 1987; Saiki *et al.* 1988). Dies geschieht durch zyklische Wiederholung des Schmelzens der dsDNA (Denaturierung), gefolgt von Anlagerung (*annealing*) zweier Primer (Oligonukleotide, die das zu amplifizierende DNA-Stück flankieren) und enzymatischer DNA-Synthese (Extension). Die Amplifikation der DNA-Fragmente verläuft bei der PCR annähernd exponentiell.

Die PCR-Reaktion wurde immer in einem Reaktionsvolumen von 50 µl in einem Thermocycler (EPPENDORF) mit 105 °C Deckeltemperatur durchgeführt. Die Reaktionen wurden mit je 50 – 100 ng zu amplifizierender DNA-Matrize, jeweils 50 pmol der beiden Primer, 10 µl 5xGoTaq-Puffer, je 200 µM dNTP und 1-2 U thermostabiler DNA-Polymerase (GoTaq®-Polymerase) durchgeführt. Um die Fehleranfälligkeit der Extension zu verringern wurden zusätzlich 1-2 U *Pwo*-Polymerase, die *proof-reading*- und 3'→5' Exonuklease-Aktivität besitzt, verwendet.

Ein Standard-PCR-Programm setzte sich folgendermaßen zusammen:

1. Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
2. Denaturierung	95 °C	45 s
3. <i>Annealing</i>	$T_A$	45 s
4. Extension	72 °C	1 min/kb
5. Finale Extension	72 °C	10 min
6. Lagerung	4 °C	∞

Die Schritte 2-4 wurden 30-35x zyklisch wiederholt.

Die Schmelztemperaturen  $T_M$  von Primern und die optimale *annealing*-Temperatur  $T_A$  eines Primerpaars wurden wie folgt berechnet:

---

**Formel 3: Berechnung der Schmelztemperatur  $T_M$  eines Primers.**  
%GC: GC-Gehalt des Primers, n: Länge des Primers in Nukleotiden.

---

**Formel 4: Berechnung der Annealing-Temperatur  $T_A$  eines Primerpaars.**  
 $T_{M1/M2}$ : Schmelztemperaturen der beiden Primer.

Bei großen Unterschieden in der *Annealing*-Temperatur zwischen zwei Primern wurde eine Gradienten-PCR in einem Gradienten-Cycler (EPPENDORF) durchgeführt, um die ideale *Annealing*-Temperatur zu bestimmen.

### 3.2.3 PCR-Methoden zur gerichteten und zufälligen Mutagenese

#### 3.2.3.1 Overlap Extension-PCR (Ho et al. 1989)

Bei der *Overlap Extension* (OE)-PCR zur gerichteten Mutagenese werden zwei zueinander komplementäre Mutationsprimer von 25 bis 35 bp Länge definiert, die im zentralen Bereich den gewünschten Nukleotidaustausch tragen. Im ersten Schritt werden in getrennten PCR-Ansätzen mit diesen Primern in Kombination mit je einem genflankierenden Primer von der gleichen Matrize zwei überlappende Genfragmente amplifiziert und mittels präparativer Gelelektrophorese (3.2.8) gereinigt. Diese Fragmente überlappen im Bereich der ausgetauschten Nukleotide und dienen in einer zweiten PCR als Matrize, um in Kombination mit genflankierenden Primern das vollständige Gen mit den ausgetauschten Nukleotiden zu amplifizieren. Diese Mutagenisierungsmethode wurde gewählt, wenn die zu mutagenisierende Position relativ mittig im Gen lag, sodass die beiden überlappenden Fragmente eine vergleichbare Länge aufwiesen. Die Amplifikation erfolgte mittels Standard-Protokoll wie in (3.2.2) beschrieben.

#### 3.2.3.2 QuikChange-PCR™

Diese Methode erlaubt die effiziente positionsspezifische Mutagenese einzelner Nukleotide eines Gens oder einer Vektorposition in doppelsträngigen Plasmiden. Die von Stratagene (La Jolla, CA) entwickelte Mutagenisierungsmethode wurde nach einem veränderten Protokoll durchgeführt (Wang & Malcolm 1999). Nach diesem Protokoll werden zwei separate PCRs mit je 50 µl angesetzt. Dabei enthält der erste Ansatz nur den 5'-Primer, der zweite Ansatz enthält nur den 3'-Primer. Nach vier Zyklen wurden je 25 µl aus jedem Ansatz entnommen, vereint und für weitere 18 Zyklen amplifiziert. Die zu mutagenisierende Position liegt in der Mitte der beiden komplementären Primer. Das Produkt der PCR ist

schließlich ein Vektor, welcher das mutierte Gen enthält, aber noch zwei Einzelstrangbrüche an den 3'-Enden der Primer. Nach Transformation werden diese Einzelstrangbrüche durch *E.coli*-eigene Enzyme repariert. Für die QuikChange-PCR wurde die *Pfu* DNA-Polymerase verwendet, da diese eine 3' → 5'-Proofreading-Aktivität besitzt. Die Reaktionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit je 50 ng der als Ganzes zu amplifizierende DNA-Matrize, 3 U *Pfu* DNA-Polymerase, 5 µl 10x *Pfu* Puffer, 1 µl dNTPs (je 10 mM) und jeweils 8 µl der beiden Primer (10 mM). Ein QuikChange™-PCR Programm setzte sich folgendermaßen zusammen:

1. Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
2. Denaturierung	95 °C	45 s
3. Annealing T <sub>A</sub>	55 °C	1 min
4. Extension	72 °C	1 min/kb
5. Lagerung	4 °C	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden in den beiden ersten PCRs 4-mal wiederholt. Nach Vereinigung von je 25 µl der beiden Ansätze wurden weitere 3 U *Pfu*-Polymerase zugegeben und das Programm nochmals gestartet, wobei die Schritte 2 bis 4 18-mal wiederholt wurden. Anschließend wurde das Ursprungsplasmid durch Zugabe von 20 U *DpnI* (spaltet nur methylierte DNA) für 1,5 h bei 37 °C im PCR-Ansatz verdaut. Von dem neu amplifizierten Vektor wurden 10 µl zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* NEB Turbo-Zellen eingesetzt.

### 3.2.3.3 Zufallsmutagenese durch *error-prone* PCR

Zur Einführung zufälliger Punktmutationen in ein Gen wurde die Methode der *error-prone* PCR (epPCR) benutzt (Leung *et al.* 1989). Hierbei wird die GoTaq® DNA-Polymerase verwendet. Diese besitzt keine 3'→5'-Proofreading-Aktivität, wodurch es im Schnitt zu 8x10<sup>-6</sup> bis 2x10<sup>-4</sup> Fehlern pro Nukleotid kommt (Eckert & Kunkel 1990; Cline *et al.* 1996). Diese Fehlerrate kann durch Verwendung ungleicher Konzentrationen der verschiedenen Desoxynukleotide (Fromant *et al.* 1995; Vanhercke *et al.* 2005), erhöhte Konzentrationen an MgCl<sub>2</sub>, sowie durch den Zusatz von MnCl<sub>2</sub> weiter gesteigert werden (Beckman *et al.* 1985; Leung *et al.* 1989). Ein Standardansatz für eine epPCR ist in Tabelle 5 gezeigt.

**Tabelle 5: Komponenten, Volumina und Konzentrationen von Bestandteilen der epPCR in 200 µl Gesamtvolumen.**

Komponente	Volumen [µl]	Konzentration bzw. Menge im epPCR-Ansatz
DNA-Matrize (91 ng/µl)	1	91 ng
5'-Primer (10 µM)	20 µl	1 µM
3'-Primer (10 µM)	20 µl	1 µM
dNTP-Mix		
dATP (1,52 mM)		0,35 mM dATP
dCTP (1,74 mM)	46 µl	0,4 mM dCTP
dGTP (0,87 mM)		0,2 mM dGTP
dTTP (5,87 mM)		1,35 mM dTTP
MnCl <sub>2</sub> (50 mM)	3 µl	0,75 mM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	4 µl	1 mM
5 x Green GoTaq® Puffer	40 µl	enthält 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
GoTaq® DNA-Polymerase (5U/µl)	4 µl	20 U
H <sub>2</sub> O	62 µl	

Die angegebenen Mengen der dNTPs wurden in (Fromant *et al.* 1995) beschrieben und am Lehrstuhl Sterner mehrfach erfolgreich zur Erstellung von Genbanken verwendet. Das Gesamtvolumen von 200 µl wurde auf vier Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nach Reinigung der Amplifikationsprodukte über Agarosegelektrophorese (3.2.7) wurden die Ansätze vereinigt und die DNA-Konzentration bestimmt (3.2.1).

Um die Effizienz der epPCR zu überprüfen, wurden von jeder Genbank (3.2.12) 10 Klone vollständig sequenziert und hinsichtlich der Zahl der Mutationen und des Verhältnisses von Transitionen zu Transversionen (Ts/Tv) analysiert. Durch die Wahl des oben beschriebenen epPCR-Ansatzes sollte das Verhältnis von Ts/Tv deutlich ausgeglichen sein als bei einer epPCR, in der nur MnCl<sub>2</sub> zur Mutagenese zugesetzt wird (Fromant *et al.* 1995). Die Genbank wurde zusätzlich mithilfe des Webservers PEDEL-AA hinsichtlich der Aminosäurediversität und das Auftreten von Stopp-Codons analysiert (Firth & Patrick 2005).

### 3.2.3.4 Zufallsmutagenese durch epPCR nach (McCullum *et al.* 2010)

Die Mutationsrate bei einer epPCR hängt unter anderem von der Anzahl der effektiven Verdopplungen des Templaats ab und kann durch eine Erhöhung oder Erniedrigung der Zahl an PCR Zyklen oder durch Änderung der anfänglichen Templatkonzentration variiert werden. Eine anfänglich niedrige Templatkonzentration ermöglicht eine größere Zahl an

Verdopplungen bis die Substrate verbraucht sind und die PCR Sättigung eintritt. Dennoch wird durch diese Sättigung die Vielfalt der entstehenden Produkte eingeschränkt und die Zahl der Mutationen limitiert. McCullum *et al.* (2010) entwickelten aus diesem Grund ein modifiziertes Verfahren, bei dem die Sättigung durch sukzessive Verdünnung verzögert und eine Mutationsrate bis 112 Nukleotidaustausche / kb möglich wird. Bei diesem Verfahren wurde der PCR-Mix ohne Templat erstellt und auf 16 Reaktionsgefäß aufgeteilt, wobei das erste 96 µl enthielt und alle weiteren 88 µl. Anschließend wurde das Templat dem ersten Gefäß zugesetzt und es wurden vier Amplifikationszyklen durchgeführt, nach denen 10 µl entnommen und dem zweiten Gefäß zugefügt wurden. Es folgten wieder 4 Amplifikationszyklen und ein Transfer ins dritte Gefäß. Dies wurde solange wiederholt, bis das letzte Reaktionsgefäß erreicht war. Anschließend wurden die Produkte der Reaktionen 7 bis 16 vereinigt und mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Vor Verwendung zur Erstellung der Genbank wurden die Produkte dann nochmals mittels Standard PCR amplifiziert, um eine ausreichende Menge Produkt zur Verfügung zu haben.

### 3.2.4 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung des Erfolgs einer Klonierung wurde ein Insert-screening mittels Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden auf Selektiv-Agar gewachsene Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, einem 20 µl-PCR-Ansatz mit GoTaq®-Polymerase zugegeben und eine PCR (siehe 3.2.2; 10 min initiale Denaturierung) durchgeführt. Die *annealing*-Temperatur betrug standardmäßig 52 °C und es wurden vektorspezifische Primer (T7P/T7T, CyRI/CyPstI, M13fwd/M13rev) zur Amplifikation verwendet. Als Matrize diente die durch das Erhitzen aus den Zellen freigesetzte Vektor-DNA.

Die Länge des PCR-Produkts wurde über Agarosegelelektrophorese (3.2.7) überprüft.

### 3.2.5 Anlagerung von Oligonukleotiden

Sollten kurze Bereiche doppelsträngiger DNA in einen Vektor eingeführt werden, um z.B. neue Restriktionsschnittstellen einzufügen, wurden zwei Oligonukleotide derart angelagert, dass an den Enden des Doppelstrangs kompatible Überhänge entstanden, die anschließend mit den Überhängen eines durch Restriktionsenzyme geschnittenen Vektors ligiert werden konnten (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Beispiel der Integration von annealten Oligonukleotiden in einen Vektor.**

Schematische Darstellung des doppelsträngigen Vektors pB4 nach Verdau mit *SphI* und *BamH*I und der doppelsträngigen annealten Oligonukleotide M und N mit kompatiblen Überhängen.

Dazu wurden je 10 µl der Oligonukleotide (10 µM) gemischt, im Wasserbad auf 95 °C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Von der so behandelten Lösung wurden dann 2 µl als Insert in einer Ligationsreaktion eingesetzt.

### 3.2.6 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA

Die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (MBI FERMENTAS). Dazu wurde eine 5 ml üN Kultur 10 min bei 4000 rpm in einem 15 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5810 R). Die Isolierung der DNA aus dem Zellpellet erfolgte nach Angaben des Herstellers. Eluiert wurde die gebundene DNA mit 50 µl H<sub>2</sub>O (MILLIPORE). Die Lagerung der Plasmidpräparation erfolgte bei -20 °C.

### 3.2.7 Agarosegelektrophorese

Um DNA-Fragmente nach einer PCR oder nach einem Restriktionsverdau zu trennen und gegebenenfalls zu isolieren, wurde eine Agarosegelektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung des Gels wurde 1% (w/v) Agarose in 0,5x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf 50 - 60 °C wurden 0,2 ml Ethidiumbromid-Stammlösung je 20 ml Agaroselösung zugegeben. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert in den DNA-Doppelstrang und macht die DNA-Stücke unter UV-Licht sichtbar (Sharp et al. 1973). Nach dem Gießen des Gels in die Kammer, dem Einsetzen des Kamms und 10 min Abkühlung zum Erstarren, wurde das Gel mit 0,5x TBE-Puffer überschichtet, die DNA-Proben mit Sukrose-Farbmarker aufgetragen und die Elektrophorese 20 min bei 170 V durchgeführt. Die negativ geladene DNA wandert durch die angelegte Spannung zur Anode. Durch das konstante Ladung/Masse-Verhältnis der DNA erfolgt eine Auftrennung unterschiedlicher DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Dabei werden lange DNA-Stücke durch das Agarose-Netz stärker zurückgehalten als kurze und wandern langsamer.

Nach erfolgter Elektrophorese konnten die DNA-Stücke im Gel mit UV-Licht sichtbar gemacht und ihre Längen anhand des Längenstandards *GeneRuler™ (2.7)* abgeschätzt

werden. Mit Hilfe des *Multi-Doc-It Digital Imaging System* (UVP Inc.) wurde das Ergebnis der Elektrophorese dokumentiert.

### 3.2.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Unter UV-Licht wurden die gewünschten Fragmentbanden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und gemäß Herstellerangabe mit dem *Nucleo Spin® Extract II Kit* (MACHEREY-NAGEL) aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 20-50 µl H<sub>2</sub>O abhängig von der im Gel sichtbaren DNA-Menge und der weiteren Verwendung.

### 3.2.9 Spaltung von dsDNA durch Restriktionsendonukleasen

Die spezifische Spaltung von dsDNA erfolgte mit Typ II bzw. Typ II<sub>S</sub> Restriktionsendonukleasen (Sambrook *et al.* 1989; Wilson & Murray 1991), die die DNA an einer palindromischen Erkennungssequenz bzw. außerhalb ihrer Erkennungssequenz spalten und Einzelstrang-Überhänge mit 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppe erzeugen.

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurde etwa 1 µg DNA mit je 10 U der beiden Restriktionsenzyme in einem Volumen von 10 µl mit entsprechendem Puffer für 2-3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für präparative Restriktionsverdaue wurden 2 µg DNA und je 20 U Enzym eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten 2-3 h bei 37 °C im empfohlenen Puffer bei einem Gesamtvolume von 50 µl. Der Anteil der Restriktionsenzyme im Reaktionsansatz sollte nicht mehr als 10 % des Volumens betragen, da die glycerinhaltige Lösung, in der die Enzyme gelagert werden, deren Aktivität beeinflussen kann. Der Erfolg der Spaltungen wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft und die entstandenen Fragmente bei präparativen Spaltungen für eine anschließende Ligation aus dem Gel aufgereinigt.

### 3.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wurden mit gleichen Restriktionsenzymen gespaltener Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von etwa 1:6 gemischt. Es erfolgte die Zugabe von 1 U T4 DNA-Ligase (MBI FERMENTAS) mit entsprechendem Puffer. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolume von 20 µl entweder 1 h bei RT, oder üN bei 16 °C. Der Ligationsansatz wurde direkt zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt.

### 3.2.11 Restriktions-Ligationen

Zur Klonierung von mutierten *cpSym2selN*-Genen in pExp-TrpF wurde die Methode der Restriktions-Ligation angewendet. Bei dieser Methode wird ein Gen von einem Vektor in einen anderen Vektor transferiert, unter Verwendung von *Bsal* als Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet. Durch diese Eigenschaft können Restriktion und Ligation simultan in einem Ansatz durchgeführt werden. Zunächst wurden zu transferierende Gene mittels PCR (3.2.2) amplifiziert, mithilfe des QuickBlunting Kits (NEB) nach Herstellerangaben *geblunted* und in den mit *Smal* verdauten Vektor pANTRY inseriert. Nach entsprechender Mutation des Gens im Vektor erfolgte eine Restriktions-Ligation, wobei ein Ansatz standardmäßig 75 ng des Empfängervektors pExp-TrpF und 75 ng des jeweiligen Spendervektors z.B. pSel1, sowie 2 µl T4 DNA-Ligase Puffer, 2 µl BSA (10x), 1 µl T4 DNA-Ligase und 1 µl *Bsal* enthielt. Es wurde mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und folgendes Programm durchgeführt, wodurch abwechselnd entweder die Restriktion oder die Ligation begünstigt wurden:

1. Initialer Verdau	37 °C	10 min
2. Verdau	37 °C	5 min
3. Ligation	16 °C	5 min
4. Finaler Verdau	37 °C	10 min
5. Lagerung	4 °C	∞

Die Schritte 2 und 3 wurden 50-mal zyklisch wiederholt. Anschließend wurden chemisch kompetente Zellen mit 10 µl des Ansatzes transformiert.

### 3.2.12 Herstellung von Genbanken

Zunächst wurden 6 µg durch *ep*PCR (3.2.3.3) bzw. *mc*PCR (3.2.3.4) randomisiertes Gen und 2 µg des Zielvektors pExp-TrpF (2.5) mit dem Restriktionsenzym *Bsal* geschnitten (3.2.9). Die Produkte des Restriktionsverdaus wurden über Agarosegelektrophorese (3.2.7) aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt (3.2.8), wobei die DNA mit 50 °C warmem Wasser eluiert wurde, um eine optimale Ausbeute zu gewährleisten. Die Ligation (3.2.10) erfolgte in 10 Ansätzen à 20 µl bei 16 °C üN. Anschließend wurden 4 ml elektrokompetente *E.coli* NEB Turbo-Zellen mit den vereinigten, dialysierten Ligationsansätzen in Aliquots zu je 100 µl transformiert, d.h. es wurden pro Genbank etwa 42 Transformationen durchgeführt. Je 10-11 Transformationsansätze wurden nach der Elektroporation auf vier

Kölbchen mit je 50 ml SOC-Medium aufgeteilt und 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 rpm, EPPENDORF A-4-81-Rotor, 10 min, 25 °C) und in je 2 ml SOC-Medium resuspendiert. Die resultierende Zellsuspension wurde in Aliquots à 200 µl auf großen SOC-Agarplatten mit Ampicillin (Ø 14,5 cm, 40 Stück) ausgestrichen.

Nach dem Anwachsen der Zellen bei 37 °C üN im Brutschrank wurden die SOC-Platten mit einem sterilen Spatel und LB-Medium abgeschabt und die dabei entstehende Bakteriensuspension vereinigt und homogenisiert. Die Plasmidgenbank wurde von 4 Aliquots à 100 µl über Mini-Präparationen (3.3.7.2) isoliert.

Um die Anzahl der Transformanten zu bestimmen, wurden 100 µl Aliquots der in SOC-Medium resuspendierten Zellen 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-8</sup> fach verdünnt und auf kleinen SOC-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert. Nach Inkubation bei 37 °C üN wurden die Kolonien ausgezählt und die Anzahl der transformierten Zellen durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor und dem Volumenfaktor (Volumen der gesamten Zellsuspension geteilt durch ausplattiertes Volumen) bestimmt. Anschließend wurden 60 Einzelkolonien zufällig ausgewählt und über eine Kolonie-PCR (3.3.2) die Ligationseffizienz ermittelt. Die Größe der Genbank berechnet sich dann als Produkt der Anzahl an transformierten Zellen und der Ligationseffizienz. Zur Ermittlung der effektiven Größe der Genbank (ohne Insertionen, Deletionen, Stopp-Codons und doppelten Varianten) wurde der Webserver PEDEL-AA verwendet (Firth & Patrick 2005).

### 3.2.13 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen klonierter und mutagenisierter Gene erfolgte über Auftragssequenzierung bei der Firma GENEART, Regensburg (<http://www.geneart.com>). Ein Sequenzieransatz (8 µl) enthielt standardmäßig 150-300 ng Plasmid-DNA und 1,25 µM Primer in H<sub>2</sub>O gelöst.

## 3.3 Proteinchemische Methoden

### 3.3.1 Proteinexpression im analytischen Maßstab

Um zu überprüfen, ob sich klonierte Gene überexprimieren lassen und in welcher Fraktion des Zellextraktes sich das rekombinante Protein befindet, wurde eine Expression in analytischem Maßstab durchgeführt. Dazu wurden zweimal 50 ml LB-Medium mit

entsprechenden Antibiotika versetzt, aus einer frischen üN-Kultur einer Einzelkolonie auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 angeimpft und bei 37 °C mit 200 rpm geschüttelt. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,4-0,6 wurde jeweils die Expression in einer Kultur mit 0,5 mM IPTG induziert, während die zweite uninduziert blieb. Nach Inkubation für 3-4 h bzw. üN wurden jeweils 5 ml Aliquots der Zellen abgenommen. Sofort nach Entnahme erfolgte die Ernte der Zellen (EPPENDORF Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4 °C, 10 min). Die Zellpellets wurden in 1 ml Aufschlusspuffer (100 mM KP, 2 mM EDTA, pH 7,5) resuspendiert und durch Sonikation (BRANSON Sonifier, 20 % Leistung, 2x 30 s, 2 s Puls/2 s Pause) aufgeschlossen. Zur Abtrennung der löslichen von der unlöslichen Zellfraktion wurde 3 min bei 13200 rpm und 4 °C (EPPENDORF Centrifuge 5415 R) abzentrifugiert, die Überstände abgenommen und die Pellets in 1 ml Puffer resuspendiert. Von beiden Fraktionen wurden 40 µl Aliquots mit 10 µl 5x SDS-Probenpuffer gemischt, 5-10 min auf 95 °C erhitzt und mittels SDS-PAGE (3.6.2) analysiert. Dadurch war es möglich, die Gesamtmenge an rekombinantem Protein, sowie den löslichen Anteil abzuschätzen.

### 3.3.2 Proteinexpression im präparativen Maßstab

Zur Reinigung der Proteine wurde 1 l LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt, aus einer frischen Vorkultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 angeimpft und bei 37 °C mit 150 rpm geschüttelt. Bei einer  $OD_{600}$  von etwa 0,4-0,6 erfolgte die Induktion der Expression mit 0,5 mM IPTG. Nach weiterer Inkubation für 3-4 h bei 37 °C oder üN bei 30 °C wurde bei 4 °C geerntet (Sorvall GS3, 4000 rpm, 20 min). Das Zellpellet wurde mit etwa 45 ml 50 mM KP, pH 7,5 gewaschen und konnte dann falls nötig bei -20 °C gelagert werden. Zum Zellaufschluss wurden die Zellen in 35 ml des obigen Puffers aufgenommen und auf Eis durch Sonikation (BRANSON Sonifier, 45 % Leistung, 2x 2 min, 2 s Puls/2 s Pause) aufgeschlossen. Zur Abtrennung der Zellreste wurde 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Sorvall SS34). Da alle in dieser Arbeit gereinigten Proteine aus der löslichen Fraktion gewonnen werden konnten, wurde stets mit dem Überstand der Zentrifugation weitergearbeitet.

### 3.3.3 Metallchelat-Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie basiert auf der spezifischen, reversiblen Wechselwirkung von Proteinen mit einem bestimmten, an die Säulenmatrix gebundenen, Liganden. Die Elution des Proteins von der Säulenmatrix beruht auf der kompetitiven Verdrängung vom immobilisierten Liganden. In dieser Arbeit wurde Nickelchelat-Affinitätschromatographie

unter Benutzung der Chromatographieanlagen Äkta *basic better* oder ÄKTA *Purifier* 10 (beide GE HEALTHCARE) durchgeführt, um rekombinante Proteine mit C-terminalem (His)<sub>6</sub>-tag zu reinigen. Bei der verwendeten Säule HisTrap Crude FF 5 ml (GE HEALTHCARE) stellen an die Sepharose-Säulenmatrix gebundene Ni<sup>2+</sup>-Ionen Koordinationsstellen für die Histidine des (His)<sub>6</sub>-tags eines Proteins zur Verfügung. Die Elution erfolgte durch einen Imidazolgradienten, wobei Imidazol mit dem (His)<sub>6</sub>-tag um die besetzten Bindestellen der Säule konkurriert. Die hier verwendete Säule kann mit einem Druck von maximal 0,3 MPa und einer Flussrate von 5 ml/min betrieben werden. Die verwendeten Puffer müssen frei von EDTA und DTT sein, da EDTA die gebundenen Nickelionen komplexieren und somit von der Säule entfernen würde. DTT hingegen würde diese zu elementarem Nickel reduzieren.

Die Säule wurde in regelmäßigen Abständen, nach etwa acht Reinigungen, nach folgendem Schema neu mit Nickel-Ionen beladen:

1. 10-20 Säulenvolumina (SV) 50 mM EDTA, 1 M KCl
2. 5-10 SV H<sub>2</sub>O
3. 2 SV 250 mM NiCl<sub>2</sub>
4. 5-10 SV H<sub>2</sub>O
5. 5-10 SV 100 mM KP, 300 mM KCl, pH 7,5

Die Affinitätschromatographie erfolgte nach folgender Methode:

Äquilibrierung der Säule	5 SV Laupuffer (2.9.3); Flussrate: 5 ml/min
Beladen über die Auftragspumpe	ca. 40 ml Proteinlösung; Flussrate: 3,5 ml/min
Waschen der Säule	10-20 SV Laupuffer; Flussrate: 5 ml/min;
Elution	20 SV Gradient von 5-1000 mM Imidazol in 50 mM KP, 300 mM NaCl; Flussrate: 5 ml/min; Fraktions- volumen: 2 ml
Spülen	5 SV mit 100 % Elutionspuffer (2.9.3), Flussrate: 5 ml/min
Reäquilibrierung	5 SV Laupuffer, Flussrate: 5 ml/min

Die Elution der Proteine wurde über die Messung der Absorption bei 280 nm und 260 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE (3.6.2). Im

Anschluss daran wurden die Fraktionen, die das gewünschte Protein in ausreichender Reinheit enthielten, vereinigt und dialysiert (3.3.7) oder anderweitig verwendet.

### 3.3.4 Präparative Gelfiltration (SEC)

Die Größenausschluss-Chromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) beruht auf dem Prinzip eines umgekehrten Molekularsiebs. Makromoleküle von unterschiedlicher Größe können in das verwendete poröse Säulenmaterial verschieden stark eindringen und verweilen daher unterschiedlich lange auf der Säule. Die Trennung erfolgt nach Größe und Form der Makromoleküle. Große Proteine, die kaum oder gar nicht eindringen können, werden zuerst eluiert, da das für sie nutzbare Säulenvolumen kleiner ist als für kleinere Proteine.

Die hier verwendete Säule Superdex S200 26/60 *Prep Grade* (GE HEALTHCARE) besteht aus quervernetzter Agarose und Dextran, das Säulenvolumen beträgt 320 ml. Makromoleküle und Komplexe, die größer als etwa 200 kDa sind, dringen nicht in die Säulenmatrix ein und werden im Ausschlussvolumen eluiert. Die Proben wurden über einen 10 ml Auftragsloop aufgetragen. Der Betrieb der Säule erfolgte an einer LCC-501 plus FPLC-Anlage (GE HEALTHCARE) mit 50 mM KP, 300 mM NaCl, pH 7,5 als Laupuffer und einer Flussrate von 1,5 ml/min bei 4 °C. Es wurden über den gesamten Lauf Fraktionen von 4,5 ml gesammelt und auf ihren Proteingehalt mittels SDS-PAGE (3.6.2) untersucht.

### 3.3.5 Ellmans Test (Ellman 1959)

Zur Quantifizierung der Konzentration reaktiver Cysteine in hSym2-Proteinvarianten wurde der Ellmans Test verwendet. Da in der Literatur unterschiedliche Extinktionskoeffizienten für das Produkt des Tests 2-Nitro-5-thiobenzoësäure existieren (Ellman 1959; Riddles *et al.* 1983), wurde zunächst eine Standardkurve mit Cystein erstellt. Dazu wurden in einer Küvette 50 µl Ellmans Reagenz (DTNB) mit 2,5 ml Puffer gemischt und jeweils 250 µl Cystein-Lösungen bekannter Konzentration (0-1,5 mM) zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 405 nm gemessen und gegen die Konzentration an Cystein aufgetragen. Zur Analyse der hSym2-Proteinvarianten wurde analog vorgegangen, wobei anstatt einer Cystein-Lösung 250 µl Proteinlösung im Konzentrationsbereich zwischen 250-1000 µM zugegeben wurde. Zur Analyse von eventuell sterisch schlecht zugänglichen Cystein-Positionen wurden 50 µl Ellmans Reagenz mit 50 µl Cystamin (10 mM) und 2,45 ml Puffer gemischt und anschließend 250 µl Proteinlösung zugegeben. Die Analyse erfolgte wie beim Standard Ellmans Test.

### 3.3.6 Konjugation von Proteinen mit Mn-Salen

Zur Herstellung von Hybridkatalysatoren wurden in der vorliegenden Arbeit hSym2-Proteinvarianten mit Mn-Salen (3.4) konjugiert. Die Thiosulfonat-Gruppen des Mn-Salen reagieren spezifisch mit Sulfhydrylgruppen von reaktiven Cysteinen und bilden dabei Disulfidbrücken aus. Die zu konjugierenden Proteine wurden jeweils frisch in Anwesenheit von 1 mM TCEP aufgereinigt und direkt verwendet. Vor Zugabe des reaktiven Mn-Salen-Liganden musste das TCEP entfernt werden, da dieses als Reduktionsmittel die während der Reaktion entstehenden Disulfidbrücken wieder spalten würde. Dazu wurden 5 ml Proteinlösung in einem Konzentrator (Amicon) 3-mal auf 500 µl eingeengt und mit frischem, TCEP-freiem Puffer (50 mM KP, pH 7,5, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 oder 50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 5,1) wieder auf 5 ml aufgefüllt. Nach einem letzten Konzentrationsschritt auf ca. 2,5 ml wurde die Proteinlösung unter Verwendung von PD-10 Säulen (3.3.9) in 50 mM KP, pH 7,5, 5 M GdnHCl umgepuffert. Zur umgepufferten Proteinlösung wurde noch festes GdnHCl bis zur Sättigung zugegeben, um eine vollständige Denaturierung zu erreichen. Nicht gelöstes GdnHCl wurde anschließend über einen Spritzenvorsatzfilter abgetrennt. Die so erhaltene Lösung an denaturiertem Protein (3 ml mit einer Konzentration von 200 bis 300 µM) wurde bezogen auf reaktive Gruppen mit einer äquimolaren Menge des Mn-Salen-Komplexes (Stammlösung 10 mM in DMSO, bei -20 °C gelagert) unter Stickstoffatmosphäre versetzt und üN bei RT gerührt. Nach der Reaktion wurde zur Analyse der Konjugation ein Aliquot entnommen und die restliche Proteinlösung mit 50 mM KP, pH 7,5 auf eine GdnHCl Konzentration von 2 M verdünnt, um die Rückfaltung zu induzieren. Anschließend wurde das GdnHCl durch Dialyse gegen 3 mal 5 l 50 mM KP, pH 7,5 Puffer entfernt. Die Effizienz der Konjugation wurde durch Gelfiltration unter denaturierenden Bedingungen bestimmt.

### 3.3.7 Dialyse von Proteinlösungen

Falls bei einer Proteinlösung der Puffer gewechselt oder Salze entfernt werden mussten (z.B. nach Reinigungen), wurde gegen einen mindestens 100-fachen Volumenüberschuss des Puffers bei 4 °C im Kühlraum dialysiert. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch (Visking) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 14 kDa verwendet, der das Protein zurückhält, während niedermolekulare Substanzen frei diffundieren können.

Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung 30 min bei 4 °C abzentrifugiert (15000 rpm, Sorvall SS34), um ausgefallenes Protein zu entfernen.

### 3.3.8 Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Bei Bedarf wurden die Proteinlösungen mit Hilfe von AMICON Ultra (4 bzw. 15) Konzentratoren  $mwco = 10$  kDa (MILLIPORE) über eine semipermeable Membran durch Ultrafiltration (EPPENDORF Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4 °C) einkonzentriert. Die Dauer der Zentrifugation hing vom Ausgangsvolumen und der Ausgangskonzentration, sowie der gewünschten Endkonzentration der Proteinlösung ab.

### 3.3.9 Umpuffern von Proteinen

Wurden Proteine nicht im jeweiligen Lagerungspuffer eingesetzt, mussten sie vor der Verwendung umgepuffert werden. Dies geschah mit Hilfe von NAP™-Säulen NAP-5, NAP-10 und NAP-25 (GE HEALTHCARE) bzw. PD-10-Säulen (GE HEALTHCARE), die nach dem Prinzip einer Gelfiltration (3.3.4) funktionieren. Das Protein verteilt sich auf der Säulenmatrix, während der Puffer durchfließt. Die Säulen wurden nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.3.10 Lagerung von gereinigten Proteinen

Die Proteine wurden über eine Peristaltikpumpe in flüssigen Stickstoff getropft und als feste Kugelchen bei -80 °C gelagert.

## 3.4 Synthese von Mn-Salen

Die Synthese von Mn-Salen wurde in leicht modifizierter Form nach Ma (2001) und Carey (2006) durchgeführt.

### 3.4.1 Synthese von Natriummethylthiosulfonat (1)

12,5 g (110 mmol) Methansulfonylchlorid wurden in 20 ml absolutem Ethanol gelöst und vorsichtig zu einer gekühlten (-15 °C) Lösung von 25,0 g (104 mmol) Natriumsulfid-nonahydrat in 60 ml abs. Ethanol getropft. Die Reaktionsmischung wurde anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Danach wurde sie heiß filtriert, um Natriumchlorid, welches bei der Reaktion als Nebenprodukt auftritt, zu entfernen. Um kristalline Flocken zu erhalten wurde aus verschiedenen Mischungen von Ethanol und Hexan bzw. Pentan umkristallisiert. Dabei zeigte sich, dass das Produkt umso schöner kristallisiert, je größer der Anteil an Hexan ist. Allerdings verringert sich mit steigendem

Hexan-Anteil die Löslichkeit, und man benötigt sehr große Mengen an Lösungsmittel um genügend Produkt zu erhalten. Es wurden daher verschiedene Fraktionen erstellt, von denen diejenige mit dem saubersten Produkt (600 mg) weiterverwendet wurde. Die Ausbeute betrug insgesamt 7,87 g (56 %) an Natriummethylthiosulfonat. Die Reinheit wurde über  $^1\text{H-NMR}$  bestätigt ( $^1\text{H-NMR}$  300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 22 °C)  $\delta$ =3.2 (s, 3H).

### 3.4.2 Synthese von 4-[(2-Bromoethyl)oxy]salicylaldehyd (2)

400 mg (2,90 mmol) 2,4-Dihydroxybenzaldehyd und 0,5 ml g (5,80 mmol) 1,2-Dibromethan wurden in 60 ml Aceton gelöst. Unter Kühlung im Eisbad wurden dann 436 mg (4,36 mmol) Kaliumhydrogencarbonat zugegeben. Es wurde anschließend 3 Stunden bei Kühlung und dann 66 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Endpunkt der Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. Danach wurde das Aceton abrotiert und der eingetrocknete Reaktionsansatz in 10 ml Wasser aufgenommen. Die entstandene Lösung wurde dreimal mit 10 ml Chloroform extrahiert und die vereinigten Extrakte mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Das Rohprodukt wurde anschließend über eine Kieselgel-Säule mit dem Laufmittelgemisch PE:EE 4:1 gereinigt. Es wurden 156,7 mg (22 %) reines Produkt erhalten. Die Reinheit wurde über  $^1\text{H-NMR}$  bestätigt ( $^1\text{H-NMR}$  300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C)  $\delta$ = 3.65 (t,  $J$ =6.30, 2H), 4.34 (t,  $J$ =6.30, 2H), 6.42 (d,  $J$ =2.22, 1H), 6.57 (dd,  $J$ =8.52, 2.46 1H), 7.46 (d,  $J$ =8.76, 1H), 9.73 (s, 1H), 11.46 (s, 1H) ppm.

### 3.4.3 Synthese von 4-[(methylthiosulfonylethyl)oxy]salicylaldehyd (3)

Zu einer Lösung von 156 mg (0,64 mmol) 4-[(2-Bromoethyl)oxy]salicylaldehyd (2) in 30 ml Acetonitrol wurden 131 mg (0,98 mmol) Natriummethylthiosulfonat (1) in 0,7 ml Wasser zugegeben und über Nacht refluxiert. Anschließend wurde filtriert, um überschüssiges Natriummethylthiosulfonat und Natriumbromid, welches während der Reaktion als Nebenprodukt gebildet wird, zu entfernen. Nach der Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und das Rohprodukt auf eine Kieselgel-Säule mit dem Laufmittelgemisch PE:EE 3:2 geladen. Es konnten 98 mg (55 %) Produkt erhalten werden. Die Reinheit wurde über  $^1\text{H-NMR}$  bestätigt ( $^1\text{H-NMR}$  300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C)  $\delta$ = 3.40 (s, 3H), 3.55 (t,  $J$ =6.25, 2H), 4.33 (t,  $J$ =6.32, 2H), 6.42 (d,  $J$ =2.04, 1H), 6.54 (dd,  $J$ =8.80, 2.14, 1H), 7.45 (d,  $J$ =8.79, 1H), 9.72 (s, 1H), 11.43 (s, 1H) ppm.

### 3.4.4 Synthese von Di[methylthiosulfonylethyl]oxy]salen (4)

Zu einer Lösung von 68,6 mg (0,25 mmol) 4-[(methylthiosulfonylethyl)oxy]salicylaldehyd (3) in 1,5 ml Ethanol und 1,5 ml Dichlormethan wurden innerhalb von 20 Minuten 0,686 ml einer 0,18 M Ethylen diamin (8,58  $\mu$ l, 0,13 mmol) Lösung in Ethanol zugetropft. Die zunächst klare, farblose Lösung wurde gelb und ein Niederschlag bildete sich. Nach etwa einer Stunde konnte das Ende der Reaktion über Dünnschichtchromatographie bestimmt werden. Das Produkt wurde abfiltriert und lag laut  $^1$ H-NMR bereits in einer Reinheit von über 99 % vor. ( $^1$ H-NMR 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 22 °C)  $\delta$  = 3.40 (s, 3H), 3.55 (t,  $J$ =5.55, 2H), 3.87 (s, 2H), 4.28 (t,  $J$ =5.43, 2H), 6.37 (d,  $J$ =2.34, 1H), 6.40 (dd,  $J$ =8.45, 2.40, 1H), 7.12 (d,  $J$ =8.51, 1H), 8.22 (s, 1H) ppm.

### 3.4.5 Synthese von Mn-di[methylthiosulfonylethyl]oxy]salen (Mn-Salen) (5)

31,5 mg (0,055 mmol) Di[methylthiosulfonylethyl]oxy]salen (4) und 26,6 mg (0,109 mmol) Mangan(II)-acetat-tetrahydrat wurden in 5 ml Ethanol unter Rückfluss eine Stunde lang erhitzt. Es wurden 14,1 mg (0,162 mmol) Lithiumbromid zugegeben und die Mischung für weitere zwei Stunden refluxiert. Anschließend wurde das Produkt durch Vakuumfiltration abgetrennt und ausgiebig, zuerst mit Wasser und dann mit Dichlormethan gewaschen. Nach Trocknung an der Hochvakumpumpe über Nacht konnten 30 mg (76 %) eines braunen Feststoffs erhalten werden.

## 3.5 Oxidation von Thioanisol

Die katalytische Oxidation von Thioanisol durch artifizielle Metalloproteine wird durch verschiedene Literaturstellen beschrieben (Ozaki & Demontellano 1995; Ohashi *et al.* 2003; Carey *et al.* 2004). Zur Etablierung eines Verfahrens zur Oxidation von Thioanisol durch Sym2-Metalloproteine und anschließender Analyse des Produktgemisches, wurde in abgewandelter Form nach Ozaki & Demontellano (1995) und Carey *et al.* (2004) vorgegangen. Die Sulfoxidation von Thioanisol wurde in 50 mM KP, pH 7,5, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 oder 50 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH 5,1 durchgeführt. Dazu wurden zunächst Substrat (Thioanisol), Katalysator (hSym2\_Mn-Salen-Varianten) und Puffer für 30 Minuten bei 4 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des Oxidationsmittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Puffer gestartet. Die Reaktionen mit einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l, enthielten 0,13 mM Katalysator, 5 mM Substrat und 5 mM Oxidationsmittel. Nach 10 Minuten Rühren bei 4 °C

wurden die Reaktionen durch Zugabe von 250 µl Dichlormethan gestoppt und Acetophenon als interner Standard zugegeben. Das Produktgemisch wurde viermal mit 250 µl Dichlormethan extrahiert, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> getrocknet und im Stickstoffstrom eingeengt. Der Rückstand wurde in Hexan:Isopropanol (90:10) aufgenommen und mittels einer chiralen HPLC-Säule (Chiralcel OD) (3.6.4) analysiert.

## 3.6 Analytische Methoden

### 3.6.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

#### 3.6.1.1 Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektroskopie

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sowie Disulfidbrücken (Cystine) absorbieren im Wellenlängenbereich von 250-300 nm. Aus der Aminosäuresequenz kann man die Konzentration des Proteins in Lösung bestimmen. Dazu wird der molare Absorptionskoeffizient bei 280 nm Wellenlänge und daraus unter Einbeziehung des Molekulargewichts der spezifische Absorptionskoeffizient wie folgt berechnet:

**Formel 5: Berechnung des molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon_{280}$  bei 280 nm [M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>].**

---

**Formel 6: Berechnung des spezifischen Absorptionskoeffizienten  $^{0.1\%}A_{280}$  bei 280 nm [cm<sup>2</sup>mg<sup>-1</sup>].**  
MW: Molekulargewicht des Proteins [g mol<sup>-1</sup>].

Daraus kann die Proteinkonzentration der Probe nach Lambert-Beer bestimmt werden:

---

**Formel 7: Berechnung der Proteinkonzentration c [mg/ml] unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes.**

$A_{280}$ : Absorption bei 280 nm,  $^{0.1\%}A_{280}$ : spezifischer Absorptionskoeffizient bei 280 nm [cm<sup>2</sup>mg<sup>-1</sup>], d: Schichtdicke der Küvette [cm].

Es wurden Spektren von 220-350 nm aufgenommen, wobei sich das Absorptionsmaximum des Proteins bei 278 nm befinden sollte. Der Quotient  $A_{280}/A_{250}$  sollte mindestens 1,8 betragen und es sollte keine Absorption oberhalb von 300 nm auftreten, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch Lichtstreuung ausschließen zu können.

Für Proteine, welche mit Mn-Salen konjugiert wurden, besitzt der berechnete Extinktionskoeffizient keine Gültigkeit mehr, da Mn-Salen bei 280 nm ebenfalls Licht

absorbiert. Da die Absorption von Mn-Salen bei 280 nm genauso groß ist wie bei 305 nm, wurde zur Bestimmung der Konzentration von konjugierten Proteinen die Absorption bei 280 nm um die Absorption bei 305 nm korrigiert.

### 3.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient zur Auftrennung von Proteinen nach deren Größe (Laemmli 1970). Die Proteine werden durch das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgefaltet und erhalten durch SDS-Anlagerung (etwa 1,4 g SDS pro 1 g Protein) eine negative Gesamtladung. Die Eigenladung des Proteins kann neben der SDS-vermittelten Negativladung vernachlässigt werden, sodass das Verhältnis Masse zu Ladung bei verschiedenen Proteinen gleich ist und die elektrophoretische Auftrennung alleine der Proteingröße entsprechend erfolgt. Das Molekulargewicht konnte durch Vergleich mit Größenstandards (2.8) abgeschätzt werden.

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden die Proben mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und mindestens 5 min lang bei 95 °C inkubiert, um die Proteine vollständig aufzufalten. Für die SDS-PAGE wurden standardmäßig Gele mit 12,5 % Acrylamidanteil verwendet (Zusammensetzung siehe 2.9.4). Die Elektrophorese wurde bei 45 mA und 300 V durchgeführt, bis das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau nach ca. 30 bis 35 min die Gelfront an der Anode verließ.

Proteine können in SDS-Gelen mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 bis zu einer unteren Nachweisgrenze von 0,2-0,5 µg/mm<sup>2</sup> (Bradford 1976) gefärbt werden. Die Gele wurden 15-20 min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend die unspezifische Färbung des Polyacrylamidgels durch Aufkochen in Wasser wieder entfernt. Die Dokumentation erfolgte über das *Multi-Doc-It Digital Imaging System* (UVP Inc.).

### 3.6.3 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie die präparative Gelfiltration (3.3.4), der einzige Unterschied besteht in der Größe der verwendeten Säulen. Mit dieser Methode kann das apparente Molekulargewicht und somit auch der Oligomerisierungszustand von Proteinen bestimmt werden.

Hier wurde die Säule Superdex S75 (Säulenvolumen 24 ml, GE HEALTHCARE) an einer Chromatographieanlage ÄKTA *basic better* (GE HEALTHCARE) betrieben. Auf die mit Laupuffer (2.9.3) äquilibrierte Säule wurden 100-500 µl Proteinlösung einer Konzentration

von 0,2-3 mg über einen Auftrags/*loop* geladen. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Die Elution wurde über die Absorption bei 280 und 260 nm verfolgt. Die Kalibrierungsgerade wurde mit Proteinen bekannter Größe aus dem Gel Filtration Calibration Kit (GE HEALTHCARE) erstellt. Anhand der Geraden wurde das apparente Molekulargewicht der Proteine bzw. Komplexe abgeschätzt, da ein linearer Zusammenhang zwischen dem dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts und dem Elutionsvolumen besteht.

Zur Untersuchung der Verlinkung von zwei hSym2-Proteinketten durch Mn-Salen wurde analytische Gelfiltration unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde die Säule mit dem Laufpuffer für denaturierende Gelfiltration äquilibriert und die Proteine wie oben beschrieben aufgetragen. Um eine Abschätzung der Größe der denaturierten Proteine zu ermöglichen, wurden die Retentionszeiten mit denen definierter denaturierter Proteine verglichen.

### 3.6.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die HPLC ist ein Flüssigchromatographie-Verfahren bei dem verschiedene Komponenten eines Reaktionsansatzes oder eines Substanzgemisches nicht nur getrennt, sondern auch identifiziert und quantifiziert werden können. Durch unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial resultieren für die einzelnen Komponenten unterschiedliche Retentionszeiten. Die Detektion erfolgt meist mittels Absorption und Fluoreszenz, kann aber auch mittels eines Röntgendetektors erfolgen. Die Identifikation erfolgt dabei durch Vergleich der erhaltenen Retentionszeiten mit denen von Standardsubstanzen. Je nach Art der Analyten und des Trennproblems werden verschiedene Typen von Säulen und mobilen Phasen eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Enantiomerengemisch analysiert werden. Aus diesem Grund wurde eine Chiralcel OD Säule, bei der es sich um eine chirale *reversed phase* Säule handelt, eingesetzt. Diese Säule besteht aus Silica-Gel, welches mit Tris-(3,5-dimethylphenylcarbamat)-Cellulose beschichtet ist. Man erhält dadurch eine sehr unpolare Oberfläche, an die Substanzen über hydrophobe Wechselwirkungen binden. Zur Elution wird eine Mischung aus Hexan und Isopropanol verwendet. Durch die chirale Umgebung ergeben sich für die beiden Moleküle eines Enantimerenpaar unterschiedlich starke Wechselwirkungen und deshalb unterschiedliche Retentionszeiten.

Zur Analyse der katalytischen Oxidation von Thioanisol wurden die Rückstände im Laufmittel (90 % Hexan, 10 % Isopropanol) aufgenommen und isokratisch mit einer Flußrate von 1 ml/min bei 25 °C eluiert. Die Elution wurde bei einer Wellenlänge von 210 nm verfolgt. Durch Vergleich mit den Elutionsprofilen der reinen Substanzen konnten

die erhaltenen Peaks dem Edukt und den Produkten zugeordnet und die relativen Mengen durch die Methode des internen Standards ermittelt werden.

### 3.6.5 Fluoreszenzspektroskopie

Absorbiert ein Molekül Licht bestimmter Wellenlänge, so wird es von einem energetischen Grundzustand in einen angeregten Zustand transferiert. Die Rückkehr in den Grundzustand kann unter anderem durch die Emission eines Photons geschehen. Dieser Vorgang ist als Fluoreszenz messbar. Die Energie eines emittierten Photons ist geringer als die eines absorbierten, was einer Verschiebung zu größerer Wellenlänge, also einer Rotverschiebung, entspricht. Die Fluoreszenz von Proteinen beruht im Wesentlichen auf den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, wobei das Tryptophan eine größere Rolle spielt. Aromatische Seitenketten absorbieren maximal bei einer Wellenlänge von etwa 280 nm. Nach Anregung bei 295 nm ist die Fluoreszenzemission ausschließlich auf Tryptophane zurückzuführen. Die Fluoreszenz von Tryptophan zeigt eine Abhängigkeit von der Polarität der Umgebung. Eine stark polare Umgebung bewirkt eine Rotverschiebung der Emission zu einem Maximum bei ca. 350 nm gegenüber einem Maximum bei 320-330 nm in unpolarer Umgebung. Über die Messung von Fluoreszenzspektren kann also eine Aussage über den Grad der Lösungsmittlexposition eines Tryptophans in einem Protein gemacht werden. Bei Bindung von Liganden oder anderen Proteinen kann es darüber hinaus zu einer Änderung der Tryptophanfluoreszenz durch Abschirmung oder Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) kommen, welche zur Analyse der Bindung verwendet werden kann.

#### 3.6.5.1 Aufnahme von Fluoreszenzspektren

Die Messungen wurden an einem Fluoreszenzspektrometer Cary Eclipse (VARIAN, Darmstadt) in Quarzküvetten, Schichtdicke 1cm (HELLMA, Müllheim), durchgeführt. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass die photometrische Extinktion unter 0,1 lag, damit ein innerer Filtereffekt ausgeschlossen werden konnte. Die Emission wurde von 300-400 nm gemessen. Die Spaltbreite betrug bei Anregung 2,5 nm und bei Emission 5 nm. Es wurden jeweils 10 Einzelspektren akkumuliert und gemittelt.

#### 3.6.5.2 Steady-state-Enzymkinetik von TrpF

Bei diesem Test wurde die Fähigkeit von Sym2-Varianten das Substrat Phosphoribosylanthranilat (PRA) in das Produkt 2-Carboxyphenylamino-1-desoxy-ribulose-5-phosphat (CdRP) umzusetzen, gemessen. In der Tryptophanbiosynthese wird diese Reaktion von dem Enzym PRA-Isomerase (TrpF) katalysiert. Da PRA sehr instabil ist,

wurde es *in situ* durch das Hilfsenzym Anthranilat-Phosphoribosyltransferase aus *S. cerevisiae* (yPRT), ausgehend von Anthranilsäure (AA) und Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) synthetisiert. Dabei wurde mit einem 30-fachen molaren Überschuss an PRPP gearbeitet, um in AA (und Ribose-5-Phosphat) zerfallenes PRA zu regenerieren (Hommel *et al.* 1995). Zusätzlich wurde zur Verhinderung von Produktinhibition durch sich anhäufendes CdRP ein Überschuss des Enzyms Indolglycerolphosphat-Synthase aus *T. maritima* (tmTrpC) zugesetzt, welches CdRP zu Indolglycerolphosphat (IGP) umsetzt: Die Messungen wurden in 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA, 2 mM DTT und 4 mM MgCl<sub>2</sub> bei 25 °C an einem Fluoreszenzspektrometer Cary Eclipse (VARIAN), in einer vierseitig geschliffenen Küvette durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde bei 350 nm angeregt und die Emission bei 400 nm aufgenommen (PMT: 600–700 Volt; Spaltbreite bei Exzitation und Emission jeweils 5 nm). Zunächst wurde AA, zusammen mit einem 30-fachen molaren Überschuss an PRPP und 2,5 µM tmTrpC, in Konzentrationen zwischen 1 und 50 µM vorgelegt. Durch Zugabe von 1 µM yPRT wurde PRA aus AA und PRPP synthetisiert, was zu einer Abnahme der gemessenen Fluoreszenzintensität führte. Nachdem sich eine konstante Basislinie eingestellt hatte, wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µM der jeweiligen Variante ([E<sub>0</sub>]) gestartet. Der Fortschritt der Reaktion, d. h. die Umwandlung von PRA zu CdRP bzw. IGP, konnte durch eine weitere Abnahme der Fluoreszenzintensität verfolgt werden. Um diejenige Fluoreszenzintensität zu ermitteln, die 0 µM PRA entspricht, wurde die Reaktion falls nötig nach einem geeigneten Zeitpunkt durch die Zugabe von PRAI aus *T. maritima* (tmTrpF) abgeschlossen. Aus der Analyse der Anfangssteigungen wurden die Anfangsgeschwindigkeiten v<sub>i</sub> bei den verschiedenen PRA-Konzentrationen bestimmt. Von der Variante cpSym2\_TrpF wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt. Um Verunreinigungen mit TrpF aus *E. coli* auszuschließen, wurde das Protein zusätzlich im  $\Delta$ trpF *E. coli* Stamm (2.4) exprimiert und über eine neue Nickel-Chelat-Affinitätssäule gereinigt. Die aus den hyperbolischen Fits ermittelten Werte für k<sub>cat</sub> (V<sub>max</sub>/[E<sub>0</sub>]) und K<sub>M</sub><sup>PRA</sup> wurden jeweils gemittelt und davon die Standardabweichungen bestimmt. Aus den Parametern k<sub>cat</sub> und K<sub>M</sub><sup>PRA</sup> wurde die katalytische Effizienz k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub><sup>PRA</sup> bestimmt und ebenfalls Mittelwert und Standardabweichung ermittelt.

### 3.6.5.3 Ligandenbindung von rCdRP

Reduziertes CdRP (rCdRP) ist ein Substratanalogon von TrpC und ein Produktanalogon von TrpF, dessen Bindung über FRET von intrinsischer Tryptophanfluoreszenz auf das aromatische Ringsystem von rCdRP verfolgt werden kann (Bisswanger *et al.* 1979). Durch Titration von TrpF aus *E. coli* und *T. maritima* mit rCdRP konnte die thermodynamische Bindungskonstante K<sub>d</sub> ermittelt werden (Hommel *et al.* 1995; Sterner *et al.* 1996; Henn-Sax

et al. 2002). Analog wurden Titrationen von Sym2-Varianten mit rCdRP durchgeführt. Die Konzentration von rCdRP wurde durch Absorptionsmessung mit  $\epsilon_{327}(\text{rCdRP}) = 3,42 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ermittelt. Der Quotient  $A_{252}/A_{278}$  gibt Auskunft über die Reinheit von rCdRP. Für sauberes rCdRP liegt er bei 25 (Bisswanger et al. 1979). Die Messungen wurden in einem Volumen von 1 ml bei RT in 50 mM HEPES, pH 7,5 in einer vierseitig geschliffenen Quarzküvette an einem Cary ECLIPSE Fluoreszenz-Spektrometer (Varian) durchgeführt. Es wurden 5  $\mu\text{M}$  der jeweiligen Sym2-Variante vorgelegt und mit rCdRP in Schritten von 1–40  $\mu\text{M}$  titriert. Mit zunehmender rCdRP-Konzentration nahm die Tryptophanfluoreszenz der Sym2-Varianten bei 320 nm ab. Die Fluoreszenzintensität bei 320 nm wurde über 1 min gemittelt. Der Betrag der Fluoreszenz nach Abzug des Nullwerts (Enzym in Puffer) wurde schließlich gegen die rCdRP-Konzentration aufgetragen. Durch einen Computerfit der resultierenden hyperbolischen Bindungskurve (Sigma Plot) wurde  $K_d^{\text{rCdRP}}$  berechnet.

### 3.6.6 Kristallisation, Datenaufnahme und Strukturlösung

Für Kristallisationsansätze wurden einkonzentrierte Proteine in variablen Konzentrationen und Verhältnissen mit der Reservoirlösung nach der Dampfdiffusionsmethode mit hängendem Tropfen (McPherson 1982) angesetzt. Es wurden 15- bzw. 24-well-Platten (QIAGEN, Hilden, GREINER, Nürtingen) mit 1 mL Reservoirlösung bei 19 °C verwendet. Die Tropfengröße betrug 2-3  $\mu\text{l}$ , wobei jeweils 1 bzw. 2  $\mu\text{l}$  Proteinlösung und 1 bzw. 2  $\mu\text{l}$  Reservoirlösung auf ein silikonisiertes Deckglas pipettiert, das Deckglas umgedreht und auf den gefetteten Rand der Vertiefung gelegt wurden, sodass ein geschlossenes System entstand. Zusätzlich wurden auch Platten verwendet bei denen der Deckel mit einer Gummidichtung versehen war und die auf die Platte geschraubt wurden. Die Platten wurden regelmäßig mit Hilfe eines Mikroskops (ZEISS) auf Kristallbildung untersucht.

Es erfolgten auch Ansätze in 96-well-Platten mit Hilfe eines Pipettierroboters an der *High Throughput-Screening facility* am EMBL in Hamburg (Mueller-Dieckmann 2006) bzw. am MPI für Biophysik in Frankfurt.

Die Kristalle wurden in Nylon-Loops in flüssigem Stickstoff gefroren. Röntgenbeugungsdaten wurden durch Dr. Felix List und Dr. Marco Bocula am Oxford Diffraction Gemini R Ultra Diffraktometer der Universität Regensburg mit einem Cryojet und CuK $\alpha$ -Strahlung ( $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$ ) mit einem KM4CCD/sapphire-Detektor sowie durch Dr. Chitra Rajendran mithilfe eines PILATUS-Detektors an der PXIII-Röntgenquelle der SLS aufgenommen und analysiert.

Die Datenprozessierung erfolgte durch Dr. Marco Bocola und Dr. Chitra Rajendran mittels XDS (Kabsch 1993) und die Analyse der Datenqualität mittels phenix.xtriage (Adams *et al.* 2002). Die Struktur wurde über *molecular replacement* unter Verwendung von PHASER (McCoy 2007) bzw. MOLREP aus dem CCP4i Programmpaket (Potterton *et al.* 2004) gelöst. Das erhaltene Modell wurde zunächst mit REFMAC (Murshudov *et al.* 1997) verfeinert und dann durch mehrere Runden automatisiertes *Refinement* mit dem Programm PHENIX (Adams *et al.* 2002) und interaktive Modellierung mit Coot (Emsley & Cowtan 2004) verbessert. Das endgültige Modell wurde schließlich mit dem Programm MolProbity (Davis *et al.* 2007) analysiert.

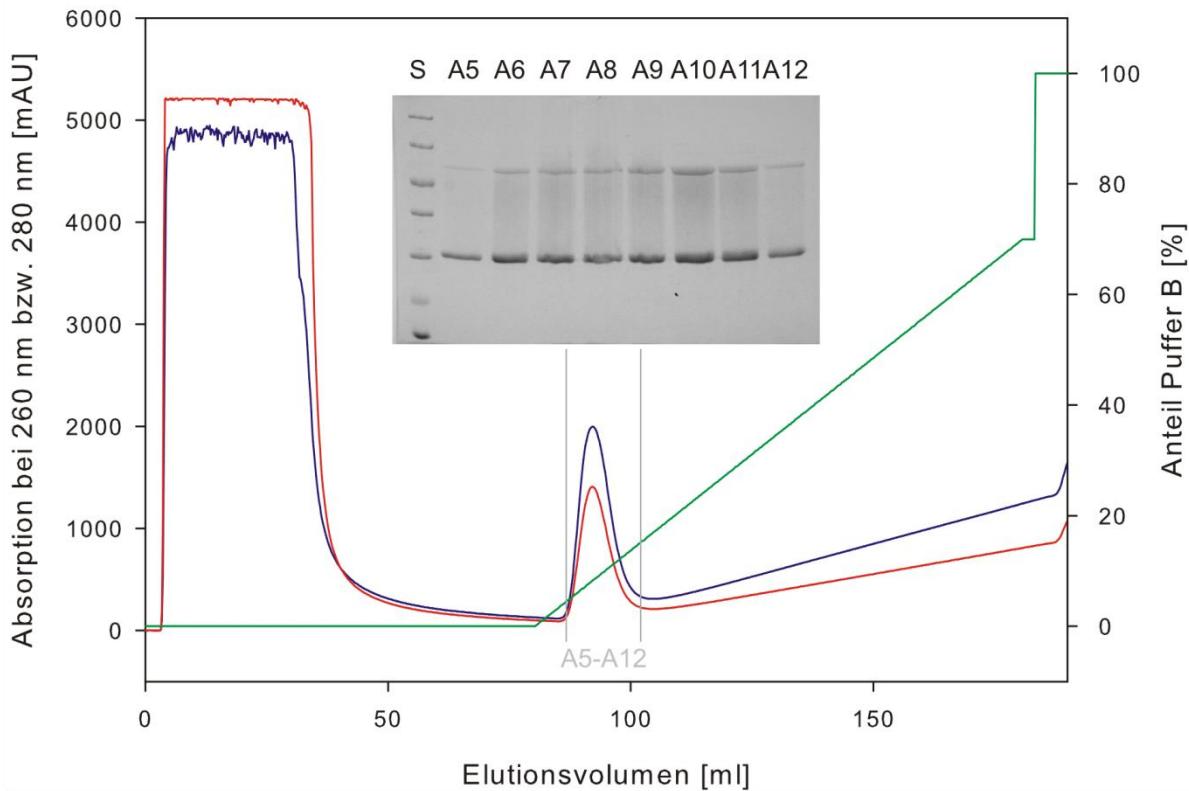
## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die auffallende zweifache Symmetrie der Imidazolglycerinphosphat-Synthase (HisF) aus *T. maritima* lässt vermuten, dass sich dieses  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Enzym durch Genduplikation und Fusion aus einem  $(\beta\alpha)_4$ -Halbbarrel entwickelt hat (Sterner & Höcker 2005). Diese Evolution wurde im Labor nachgestellt, was zu den artifiziellen Proteinen HisF-C\* $\beta$ C, HisF-C\*\* $\beta$ C, Sym1 und Sym2 führte (Seitz *et al.* 2007; Höcker *et al.* 2009). Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst Sym2 kristallisiert und eine hochauflöste Röntgenstruktur erhalten werden. Diese Struktur sollte Informationen über den enormen Stabilitätsunterschied zwischen Sym1 und Sym2, sowie über die katalytische Inaktivität von Sym2 liefern. Zudem sollte sie als Ausgangspunkt für enzymatische Aktivierung mittels rationalen Designs und für die Erzeugung von C2-symmetrischen Hybridproteinen durch Konjugation mit organischen Liganden dienen.

### 4.1 Kristallisation und Strukturanalyse von Sym2

#### 4.1.1 Heterologe Expression und Reinigung von Sym2

Zu Beginn dieser Arbeit stand das plasmidkodierte Gen für Sym2 bereits zur Verfügung (Sperl 2009). Zur Kristallisation wurde Sym2 wie unter 3.3.2 beschrieben präparativ exprimiert und über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (3.3.3) aus dem löslichen Zellextrakt gereinigt. Die Ausbeute an Sym2 betrug 100 mg pro Liter Zellkultur. Die Reinheit des Proteins wurde nach der Dialyse gegen 50 mM KP, pH 7,5 anhand eines SDS-Geles abgeschätzt und war größer 95 %. Das Ergebnis der Reinigung ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Reinigung von rekombinantem Sym2 über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie.**  
Elutionsprofil der Reinigung, aufgenommen über die Messung der Absorption bei 260 nm (rot) bzw. 280 nm (blau). Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 10-1000 mM Imidazol (grün). Insert: SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) der Elutionsfraktionen A5-A12. S: Standard LMW.

#### 4.1.2 Kristallisation von Sym2

Zunächst wurde das gereinigte und dialysierte Protein Sym2 auf 25 mg/ml einkonzentriert und für Kristallisationsansätze nach dem *hanging-drop*-Verfahren in 24-well-Platten verwendet (3.6.6). Als Kristallisationsbedingungen wurden zunächst diejenigen gewählt, die bei Sym1 erfolgreich waren (Höcker *et al.* 2009). Es wurden zwei verschiedene Proteinkonzentrationen (25 mg/ml und 15 mg/ml) und 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 mit variablen Konzentrationen an PEG 8000 (8-16 %) bzw. PEG 3350 (21-29 %) verwendet. Diese Ansätze führten jedoch nicht zu Kristallwachstum. Aus diesem Grund wurden anschließend neue Kristallisationsbedingungen für Sym2 an der *high-throughput crystallization facility* am EMBL Hamburg wie in (3.6.6) beschrieben gesucht (Mueller-Dieckmann 2006). Dazu wurde Sym2 erneut hergestellt und wie oben beschrieben gereinigt. Fraktionen mit größeren Mengen an sauberem Protein wurden gemeinsam mittels präparativer Gelfiltration weiter aufgereinigt. Die laut SDS-PAGE zu mehr als 95 % reinen Fraktionen wurden vereinigt und zweimal gegen 10 mM KP, pH 7,5 dialysiert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf

17 mg/ml einkonzentriert und auf Eis nach Hamburg verschickt. Dort wurden mit Hilfe eines Pipettierroboters fünf 96-well-Platten angesetzt (Qiagen-Screens Classics, Classics II, PEGs, PEGs2, pH-Clear2). Bereits nach 4 Tagen waren in 0,2 M Ammoniumsulfat, 0,1 M Natriumacetat pH 4,6 und 30 % PEG 2000 MME Kristalle zu erkennen (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Kristalle von Sym2 in 0,2 M Ammoniumsulfat, 0,1 M Natriumacetat pH 4,6 und 30% PEG 2000 MME.**

Nach einer Woche konnten in 0,2 M Ammoniumsulfat, 20 % PEG 4000 und nach zwei Wochen in 0,1 M MES, pH 6,5 ebenfalls Kristalle beobachtet werden. Die augenscheinlich besten Kristalle wurden in 0,2 M Ammoniumsulfat, 20 % PEG 4000 erhalten und anschließend durch Variation der ursprünglichen Bedingung verfeinert. Dazu wurde Sym2 wiederum frisch über Metallchelat-Affinitätschromatographie und präparative Gelfiltration gereinigt und nach Dialyse gegen 10 mM KP, pH 7,5 zur Kristallisation in 24-well-Platten (Qiagen) nach dem *hanging-drop*-Verfahren (3.6.6) angesetzt. Kristallisationstropfen enthielten 1  $\mu$ l Sym2 Proteinlösung der Konzentration 10 mg/ml, welche mit 2  $\mu$ l Reservoirlösung (0,2 M Ammoniumsulfat, 18-30 % PEG 4000) gemischt und gegen 1 ml Reservoirpuffer äquilibriert wurden. Nach wenigen Tagen waren in der Bedingung 0,2 M Ammoniumsulfat und 18 % PEG 4000 mehrere Kristalle gewachsen von denen einer für die Aufnahme von Beugungsdaten verwendet wurde.

#### 4.1.3 Datenaufnahme und Strukturlösung

Die folgenden Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Felix List und Dr. Marco Bocola erhalten.

Zur Aufnahme von Beugungsdaten wurde ein Sym2 Kristall aus der Bedingung 0,2 M Ammoniumsulfat und 18 % PEG 4000 mit 25 % (v/v) Glycerin gefriergeschützt und dann direkt im Kühlstrom gefroren (Abbildung 9). Es wurde bei 123 K ein Datensatz am Oxford

Diffraction Gemini R Ultra Diffraktometer der Universität Regensburg mit einem Cryojet und CuK $\alpha$ -Strahlung ( $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$ ) mit einem KM4CCD/sapphire Detektor aufgenommen (3.6.6). Der Kristall streute bis maximal 2,08  $\text{\AA}$ .

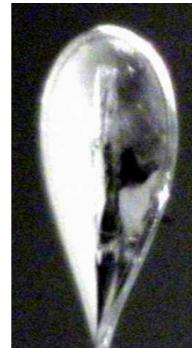


Abbildung 9: Kristall von Sym2 in Mutterlösung mit 25 % (v/v) Glycerin.

Die Raumgruppe der Einheitszelle wurde als C121 bestimmt. Die Statistiken der Datenprozessierung und der Verfeinerung sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

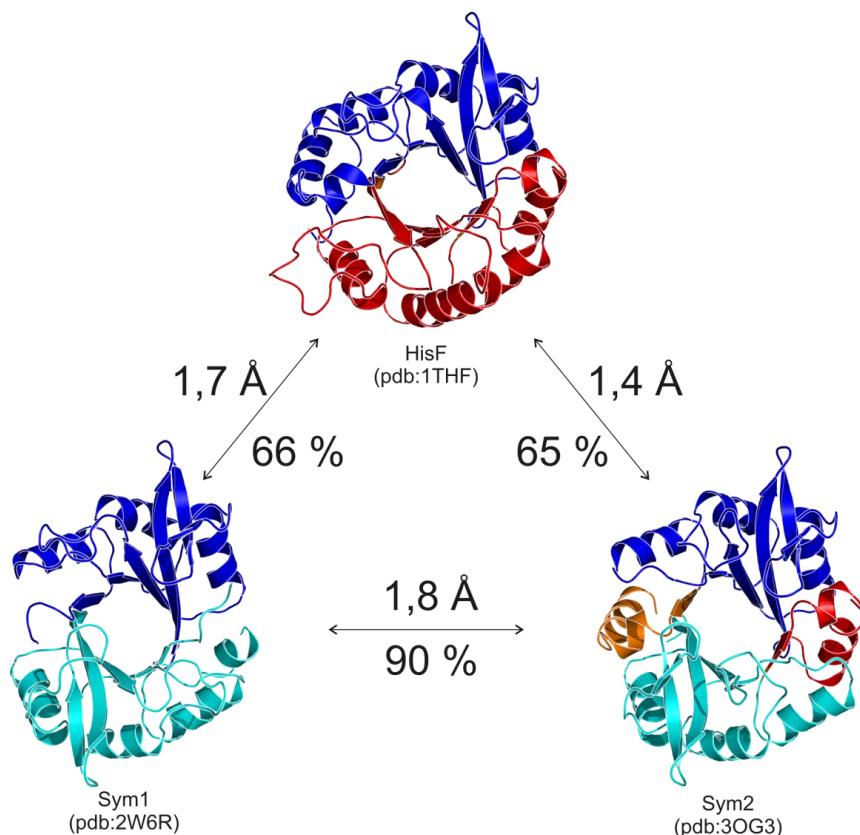
**Tabelle 6: Datenprozessierung und Verfeinerungsstatistik von Sym2. Schale mit der höchsten Auflösung in Klammern.**

Sym2 (3og3.pdb)	
Datenprozessierung	
Raumgruppe	C 1 2 1
Elementarzelle	
a, b, c ( $\text{\AA}$ )	31,37; 82,09; 74,51
a, b, c ( $^\circ$ )	90; 90,11; 90
Auflösung ( $\text{\AA}$ )	2,08 (2,08-2,133)
$R_{\text{sym}}$ bzw. $R_{\text{merge}}$	0,052 (0,168)
$I / \sigma I$	18,58 (3,8)
Vollständigkeit (%)	99,6 (98,38)
Verfeinerungsstatistik	
Auflösung ( $\text{\AA}$ )	2.08
Zahl der Reflexe	10719 (791)
R-Faktor (%) / $R_{\text{free}}$ (%)	0,152 (0,139) / 0,196 (0,190)
Anzahl Atome	
Protein	2021
Wasser	173
B-Faktoren	17,48
<i>rmsd</i>	
Bindungslängen ( $\text{\AA}$ )	0,025
Bindungswinkel ( $^\circ$ )	2,006

Die Struktur von Sym2 wurde über *molecular replacement* mit Hilfe des Programms PHASER (McCoy 2007) gelöst (3.6.6). Hierzu wurde als Suchmodell ein Halbbarrel-Fragment der HisF-Struktur aus *T. maritima* (pdb: 1thf) verwendet. Nach mehreren Runden aus manuellem Modellbau mit dem Programm COOT (Emsley & Cowtan 2004) und Verfeinerung mit dem Programm Refmac5 (Murshudov *et al.* 1997) konvergierte der R-Faktor bei 15,2 % (Rfree = 19,6 %).

#### 4.1.4 Strukturbeschreibung und Diskussion

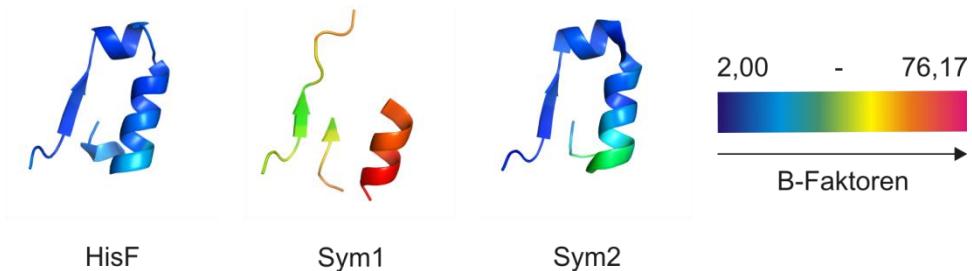
Die Kristallstruktur von Sym2 zeigte bei einer Auflösung von 2,08 Å, dass das Protein eine  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Struktur besitzt, welche eine sehr große Ähnlichkeit zu den Strukturen von HisF und Sym1 aufweist. Die  $C\alpha$  Atome der drei Proteine, die Sequenzidentitäten von 65 - 90 % untereinander aufweisen, können mit einem *rmsd*-Wert von 1,4-1,8 Å superpositioniert werden (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Cartoon-Darstellung der Röntgenstrukturen von Sym1 (pdb: 2w6r), HisF (pdb: 1thf) und Sym2 (pdb: 3og3).**

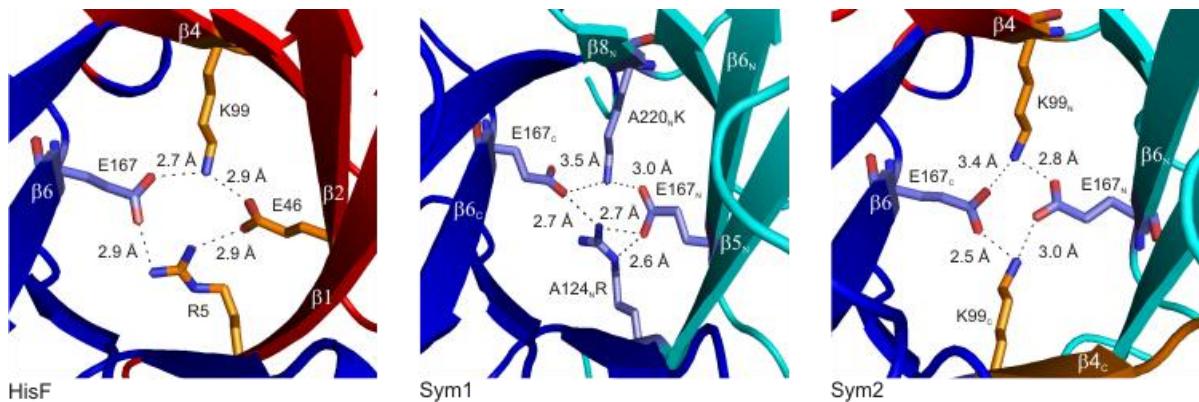
Farben repräsentieren die Herkunft und Lage der Sekundärstrukturelemente wie in Abbildung 3 beschrieben. Die nicht aufgelösten Bereiche der Struktur von Sym1 sind in Sym2 komplett sichtbar. Sequenzidentitäten (%) und *rmsd*-Werte (Å) der korrespondierenden  $C\alpha$ -Atome aus paarweise strukturbasierten Sequenzalignments sind angegeben (HisF-Sym1: 184 superpositionierte  $C\alpha$ -Atome; HisF-Sym2: 198 superpositionierte  $C\alpha$ -Atome; Sym1-Sym2: 191 superpositionierte  $C\alpha$ -Atome).

Interessanterweise sind die putativ labilen Regionen an den Termini von HisF- $C_N$  und HisF- $C_C$  ( $\beta\alpha$ -Module 4 und 8), welche in Sym1 nicht aufgelöst waren, jetzt klar sichtbar, was sich an niedrigeren B-Faktoren festmachen lässt (Abbildung 11). Diese Beobachtung liefert bereits eine erste Erklärung für die Stabilitätserhöhung von Sym1 zu Sym2. In Sym2 ist das komplette *Barrel*, einschließlich der gerade erwähnten Termini dicht gepackt. In Sym1 hingegen waren die Termini der Halbbarrels nicht aufgelöst, was auf eine strukturelle Unordnung, welche das gesamte *Barrel* Sym1 destabilisiert, hindeutet.



**Abbildung 11: B-Faktoren des in Sym1 nicht aufgelösten ( $\beta\alpha$ )-Moduls 4 im Vergleich mit HisF und Sym2.**  
Die Farbkodierung entspricht der Größe der B-Faktoren wie angegeben.

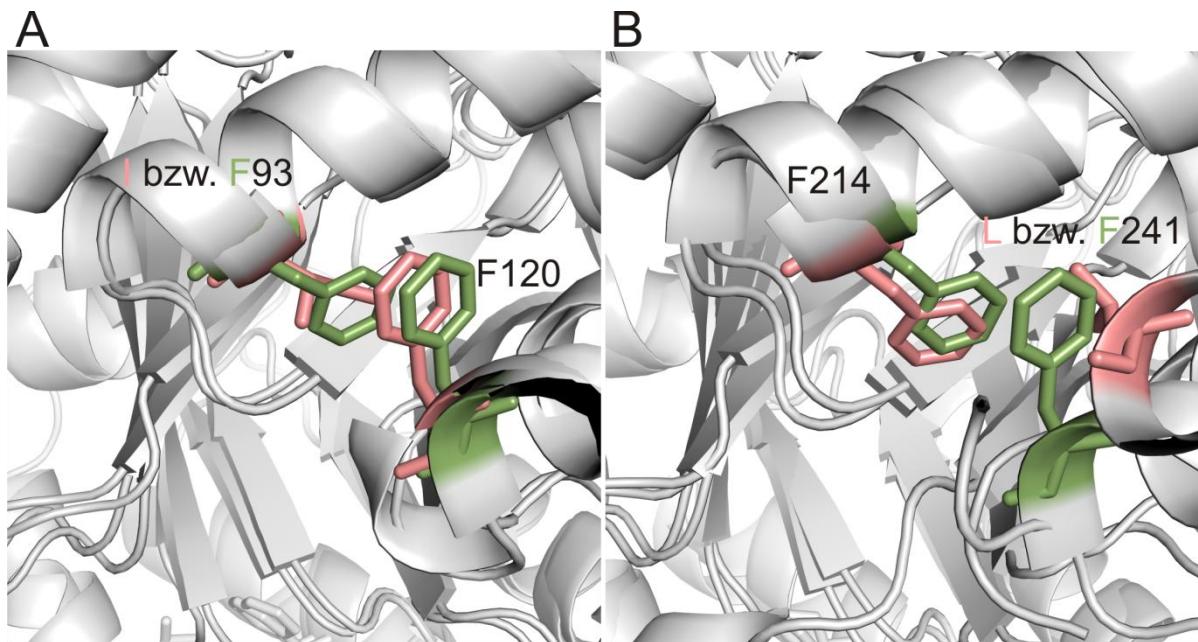
Bei Betrachtung des aus HisF bekannten Salzbrückenclusters erkennt man, dass es in HisF Abweichungen von einer idealen Symmetrie gibt. HisF interagiert über seinen Stabilitätspol mit der Glutaminase HisH, welche den für die HisF-Reaktion benötigten Ammoniak freisetzt, der dann durch einen molekularen Tunnel zum aktiven Zentrum von HisF gelangt (Douangamath *et al.* 2002). In Analogie zu HisF wurde bei der Stabilisierung des primären Duplikationsproduktes HisF-CC zu Sym1 die native Anordnung nachgeahmt und so ein Salzbrückencluster erstellt welches einen Beitrag zur Stabilität von Sym1 leistete (Höcker *et al.* 2009). Das Sym2 Design enthält dagegen ein komplett symmetrisches Salzbrückencluster. Diese Symmetrie führt zu einer weiteren Stabilisierung (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Vergleich der Salzbrückencluster durch Ansicht von „unten“ auf die zentralen *Barrel* von Sym1, HisF und Sym2.**

Das stabilisierende Salzbrückencluster am N-terminalen Ende des zentralen  $\beta$ -Barrels von HisF wird in Sym1 durch analoge Mutationen A124<sub>N</sub>R und A220<sub>N</sub>K gebildet. Das Salzbrückencluster in Sym2 ist hochsymmetrisch, da durch das  $\beta\alpha$ -Modul 4 die Reste K99<sub>N</sub> und K99<sub>C</sub> eingeführt werden. Die Farbkodierung gibt erneut Lage bzw. Herkunft der Reste wieder. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen involvierten Seitenketten, welche als Stäbe gezeigt werden, sind bis zu einem Abstand von 3,5 Å als gestrichelte Linien angegeben.

Dieses symmetrische Salzbrückencluster liefert somit eine Erklärung für die höhere Stabilität von Sym2 im Vergleich mit dem thermostabilen Elternprotein HisF und bestätigt auch die Theorie der Evolution von HisF ausgehend von der Duplikation zweier Halbbarrel. Parallel dazu verbesserte sich womöglich auch die Packung im Inneren des Proteins.  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Proteine besitzen im zentralen *Barrel* typischerweise vier *Layer*, welche entweder von Aminosäureresten der geradzahligen oder der ungeradzahligen Module gebildet werden (Stern & Höcker 2005). Untersucht man die Packungsdichte in HisF, erkennt man, dass die Aminosäurereste der Module 4 bis 7, welche das Layer bilden, sehr dicht gepackt sind, während diejenigen der Module 8 bis 3 weniger dicht gepackt sind. Bei Duplikation eben dieser dicht gepackten Module 4 bis 7 ergibt sich somit ein  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel, welches in seinem Inneren gänzlich dicht gepackte Aminosäuren aufweist und somit eine höhere Stabilität als ein *Barrel* mit einer teilweise weniger dicht gepackten Hälfte. Ein weiterer Grund für die höhere Stabilität von Sym2 ist schließlich ein  $\pi$ -stacking, welches zwischen den Phenylalaninresten F214<sub>N</sub> der Helix  $\alpha$ 7<sub>N</sub> und F120<sub>N</sub> der Helix  $\alpha$ 4<sub>N</sub> bzw. F214<sub>C</sub> ( $\alpha$ 7<sub>C</sub>) und F120<sub>C</sub> ( $\alpha$ 4<sub>C</sub>) von Sym2 auftritt. In HisF existieren hier nur Wechselwirkungen zwischen I93 und F120 bzw. zwischen F214 und L241. Durch die Duplikation der  $\beta\alpha$ -Module 4 bis 7 werden die Aminosäuren F120 und F214 dupliziert, woraus an den Grenzen der fusionierten Halbbarrels in Sym2 ein  $\pi$ -stacking durch insgesamt vier Phenylalanin-Reste entsteht (Abbildung 13).



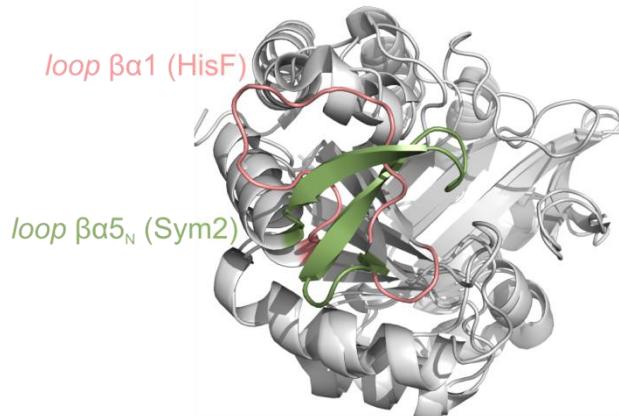
**Abbildung 13:**  $\pi$ -Stacking zwischen den Resten F93 und F120 (A), sowie zwischen F214 und F241 (B) von Sym2 (grün) im Vergleich zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen I93 und F120, sowie F214 und F241 in HisF (lachsfarben).

Die Sekundärstrukturelemente beider Proteine sind als Cartoon in grau dargestellt.

Diese starke hydrophobe Wechselwirkung befindet sich vorteilhafterweise genau am Schnittpunkt zwischen den beiden Hälften, sodass eventuelle negative Wechselwirkungen mindestens ausgeglichen, wenn nicht sogar überkompensiert werden.

Die Röntgenstruktur von Sym2 sollte nicht nur die Ursachen für die erhöhte Stabilität aufdecken, sondern auch Aussagen über die Lage von katalytisch wichtigen Aminosäuren und Ligandenbindestellen ermöglichen, um so die Aussichten für gerichtete Evolutionsexperimente und Aktivierungsstudien abzuschätzen. Der Abstand der beiden Phosphatbindestellen in Sym2 ist mit 15,3 Å kleiner als in HisF mit 16,9 Å. Vernachlässigt man eventuelle *loop*-Bewegungen bei der Anlagerung von PRFAR, welches mit seinen beiden Phosphatgruppen gebunden wird, so erscheint Sym2 durch diese Verkürzung des Abstandes nicht in der Lage das Substrat zu binden. Weiterhin besitzt HisF zwei katalytisch essentielle Aspartat-Reste (D11 und D130), welche sich an den oberen Enden der  $\beta$ -Stränge 1 und 5 befinden. Der Abstand dieser beiden Reste beträgt in HisF 12,7 Å, während die beiden Reste in Sym2 13,7 Å voneinander entfernt sind. Diese Befunde, sowie eine Verringerung der Zugänglichkeit des aktiven Zentrums, die durch die Duplikation des sehr langen  $\beta\alpha$ -loops 5 erfolgte, lassen die Etablierung von HisF-Aktivität sehr schwierig erscheinen. Zudem unterscheidet sich die Konformation dieses  $\beta\alpha$ -loops 5 sehr stark von der des katalytisch wichtigen  $\beta\alpha$ -loops 1 in HisF (Abbildung 14). Dieser  $\beta\alpha$ -loop 1 ändert bei Bindung des Substrates PRFAR seine Konformation von der offenen zur

geschlossenen Form (List 2009). Der  $\beta\alpha$ -loop 5 von Sym2 liegt auch ohne gebundenen Liganden bereits in einer eher geschlossenen Form vor und scheint deshalb nicht in der Lage die katalytisch wichtige *loop*-Bewegung in einer äquivalenten Art durchführen zu können.



**Abbildung 14:** Strukturelle Unterschiede zwischen dem katalytisch wichtigen *loop*  $\beta\alpha$ 1 aus HisF (lachsfarben) und dem N-terminalen *loop*  $\beta\alpha$ 5 aus Sym2 (grün) anhand einer Superpositionierung der beiden Proteinstrukturen.

Ansicht von „oben“ auf das zentrale *Barrel*.

Alle oben aufgeführten Gründe stellen eine mögliche Erklärung für die katalytische Inaktivität von Sym2 dar. Für gerichtete Evolutionsexperimente erscheint die HisF-Reaktion ebenfalls zu schwierig, da weder Phosphatgruppenabstände, noch die Entfernung der Aspartat-Reste im Bereich des katalytisch aktiven HisF liegen.

Da die Struktur von Sym2 allerdings, wie durch die hohe Symmetrie auf Sequenzebene erwartet, hoch C2-symmetrisch ist, sollte sich das Protein zur Erzeugung von C2-symmetrischen Hybridkatalysatoren eignen. Das aktive Zentrum ist zwar relativ kompakt, was den Einbau von organischen Liganden erschweren könnte, andererseits sollte dadurch aber eine gute Stereoinduktion möglich werden. Weiterhin sind am Katalysepol einige aussichtsreiche Positionen vorhanden, deren Abstände in etwa denen von möglichen Liganden entsprechen.

#### 4.1.5 Resümee und Ausblick

Das Ziel, die Struktur von Sym2 in hoher Auflösung zu erhalten, um Aussagen über Stabilität und katalytische Aktivität treffen zu können, konnte zu Beginn dieser Arbeit erreicht werden. Als wichtige Merkmale für die Stabilität konnten ein symmetrisches Salzbrückencluster, eine dichtere Packung des *Barrels* und stabilisierende Wechselwirkungen durch ein  $\pi$ -stacking zwischen zwei  $\alpha$ -Helices im Schnittbereich der

Hälften identifiziert werden. Weiterhin konnten mit abweichenden Phosphat- und Aspartatabständen im Vergleich mit HisF und der Größe und Lage des N-terminalen katalytisch wichtigen *loops*  $\beta\alpha 5$  mögliche Ursachen für fehlende katalytische Aktivität ausgemacht werden. Die Bindung des HisF-Substrates PRFAR mit zwei Phosphatgruppen erscheint schwierig. Der Entropieverlust bei Bindung ist relativ hoch (Gilson & Zhou 2007), sodass eine suboptimale Anordnung der Bindestellen durch weitere Erhöhung des Entropieverlusts fatal für die Stärke der Bindung ist. Da eine effiziente Katalyse aber nur dann erfolgen kann, wenn das Substrat optimal auf die katalytischen Reste des Proteins ausgerichtet ist, sind die Aussichten für eine erfolgreiche Etablierung der HisF-Reaktion sehr schlecht. Zum anderen erscheint das aktive Zentrum als zu kompakt für eine so komplexe Reaktion wie die Synthese von Imidazolglycerinphosphat, welche von HisF katalysiert wird.

Die Erzeugung eines Hybridkatalysators erscheint plausibel. Die Struktur ist hoch C2-symmetrisch und am Katalysepol befinden sich einige aussichtsreiche Positionen, an die, nach Mutation gegen Cystein, Liganden gekoppelt werden könnten.

## 4.2 Enzymatische Aktivierung von Sym2

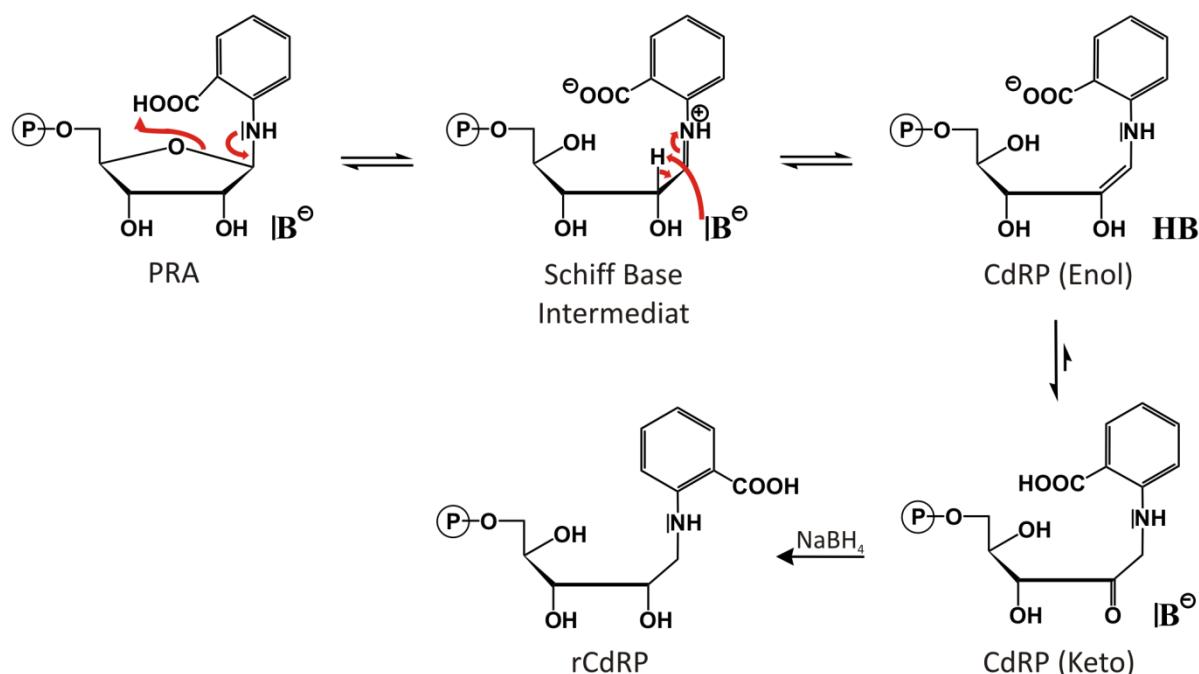
Die Evolution stellte uns mit einer Myriade von Enzymen aus, die eine beeindruckende Zahl unterschiedlicher Reaktionen mit erstaunlicher Selektivität und Spezifität katalysieren. Genduplikation ist dabei eine der wichtigsten natürlichen Strategien um neue Enzyme zu erzeugen: Es wurde abgeschätzt, dass in etwa die Hälfte aller Gene von einem Genduplikationsereignis abstammen (Fani *et al.* 1998; Lynch & Conery 2000). Diese neuen Gene können nach der Duplikation für neue Funktionen rekrutiert, oder mit anderen Genen sowie Nukleotidfragmenten fusioniert werden. Vor allem Proteine, die einen hohen Grad an innerer Symmetrie aufweisen, lassen die Duplikation und Fusion von identischen Genkopien, einhergehend mit einer Umwandlung von symmetrischen Oligomeren zu symmetrischen Monomeren plausibel erscheinen (Yadid & Tawfik 2007; Richter *et al.* 2010). Dennoch können wir erst dann davon ausgehen, dass wir die zugrundeliegenden Mechanismen verstanden haben, wenn wir auch in der Lage sind die vorgeschlagenen Duplikationen und Fusionen im Labor nachzuvollziehen. Neuere Fortschritte in computergestütztem und rationalem Design machten es möglich stabile chimäre Proteine durch die Kombination von Fragmenten unterschiedlicher Proteine zu erzeugen (Höcker *et al.* 2009; Eisenbeis *et al.* 2012; Shanmugaratnam *et al.* 2012). Daneben wurden auch stabil gefaltete, komplett artifizielle Proteine (Kuhlman *et al.* 2003) geschaffen. Diese künstlichen Proteine zeigten allerdings keine enzymatische Aktivität. Im Gegensatz dazu konnten durch computergestützte Ansätze völlig neue, wenngleich schwache Enzymaktivitäten geschaffen werden (Jiang *et al.* 2008; Röthlisberger *et al.* 2008; Siegel *et al.* 2010). Diese geringen Aktivitäten konnten aber durch die Kombination von gerichteter Mutagenese mit ausgefeilten Selektionsverfahren signifikant verbessert werden (Khersonsky *et al.* 2011; Althoff *et al.* 2012; Khersonsky *et al.* 2012).

Bei der Betrachtung der Evolution der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrels im Labor erkennt man, dass seit der Duplikation von zwei Halbbarrels schon sehr viele Verbesserungen des ursprünglichen Duplikationsproduktes erzielt werden konnten. Optimierung durch Design und Zufallsmutagenese in Verbindung mit Selektion lieferten schließlich die Röntgenstruktur eines thermostabilen artifiziellen Barrels aus zwei identischen Hälften. Trotz dieses Erfolges fehlt für eine vollständige Rekonstruktion der Evolution noch eine Funktion dieses künstlichen  $(\beta\alpha)_8$ -Barrels. Der Vergleich der Röntgenstrukturen des artifiziellen Proteins Sym2 und des wildtypischen HisF-Enzyms liefert eine Erklärung für die fehlende katalytische Aktivität von Sym2: Die Phosphatgruppenabstände sind reduziert und die Lage der katalytisch aktiven Aspartat-Reste ungünstig (4.1.4). Da die Bindung eines Liganden

mit zwei Phosphatgruppen als zu schwierig eingeschätzt wurde, wurde als Modellreaktion die Isomerisierung von PRA zu CdRP verwendet, da beide Moleküle jeweils nur eine Phosphatgruppe enthalten. Die Isomerisierung von PRA, welche in der Biosynthese von Tryptophan durch die PRA-Isomerase (TrpF) katalysiert wird, ist mechanistisch betrachtet relativ einfach (Henn-Sax *et al.* 2002; Reisinger *et al.* 2012) (Abbildung 15) und wurde bereits auf verschiedenen  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Enzymen, wie auf HisA und HisF (Jürgens *et al.* 2000; Leopoldseder *et al.* 2004), einer HisAF Chimäre (Claren *et al.* 2009), sowie auf der  $\alpha$ -Untereinheit der Tryptophan-Synthase (TrpA) (Evran *et al.* 2012) etabliert.

#### 4.2.1 Bindung von rCdRP

Zur Erzeugung der TrpF-Aktivität auf dem Sym2-Proteingerüst sollte zunächst eine Bindestelle für das Substrat PRA eingeführt werden. Da PRA sehr labil ist, wurde beschlossen eine Bindetasche für rCdRP, welches ein strukturell ähnliches, aber stabiles Produktanalogon ist, zu schaffen (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Mechanismus für die Isomerisierung von PRA zu CdRP durch HisF-D130V+D176V aus *T. maritima*.**

Das Sauerstoffatom des Furanose-Rings von PRA wird durch die Carbonsäure-Gruppe des Anthranilats protoniert (Substratvermittelte Katalyse). Das Proton wird dabei höchstwahrscheinlich über ein Wassermolekül übertragen (nicht gezeigt) (Reisinger *et al.* 2012). Das C2'-Atom wird anschließend durch die allgemeine Base D11 deprotoniert, was durch das Schiff Base Intermediat, welches als Elektronenfalle fungiert, erleichtert wird. Die Keto-Form von CdRP wird schließlich durch spontane Tautomerisierung seiner Enol-Form gebildet. Die Reduktion von CdRP zu rCdRP durch Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) ist ebenfalls gezeigt.

Aus älteren Arbeiten wusste man, dass Varianten von *T. maritima* HisF mit den Austauschen D130V und D176V hohe Affinitäten für rCdRP mit Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) von etwa 0,2  $\mu$ M (Reisinger *et al.* 2012) zeigen. Aus diesem Grund wurden drei Varianten erzeugt, welche die Aminosäureaustausche in der N- oder C-terminalen Hälfte, oder in beiden enthielten (Abbildung 16).

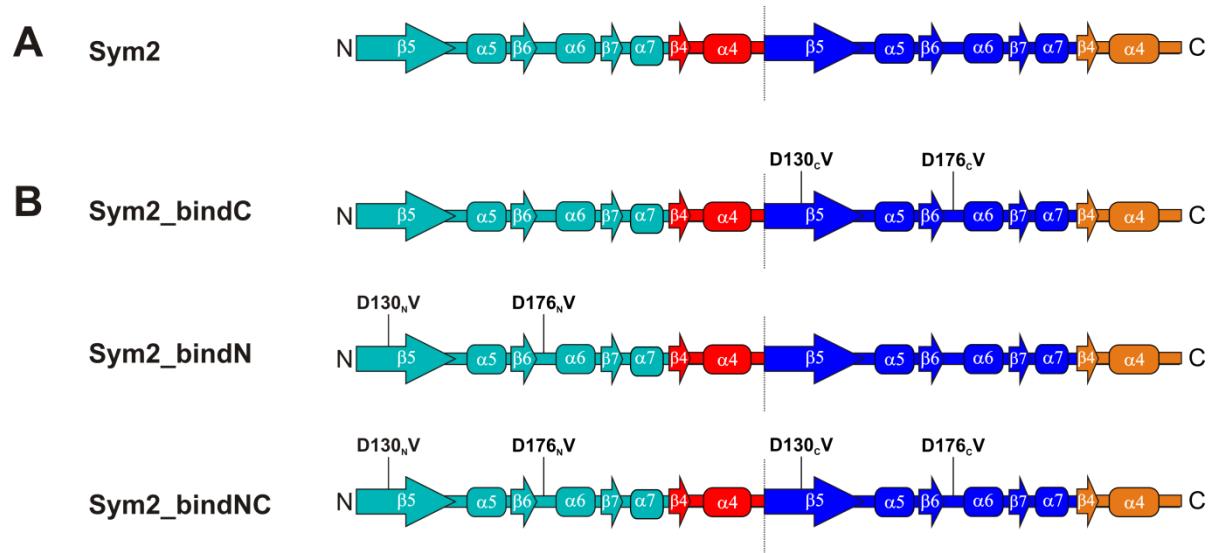


Abbildung 16: Aufbau des artifiziellen  $(\beta\alpha)_5$ -Barrel-Proteins Sym2 und von Varianten mit der Fähigkeit zur Bindung von rCdRP.

(A) Sekundärstrukturelemente von Sym2; (B) Sym2-Varianten mit Mutationen, welche zur Bindung von rCdRP befähigen. Farbcodierung wie in Abbildung 3.

#### 4.2.1.1 Klonierung der Varianten

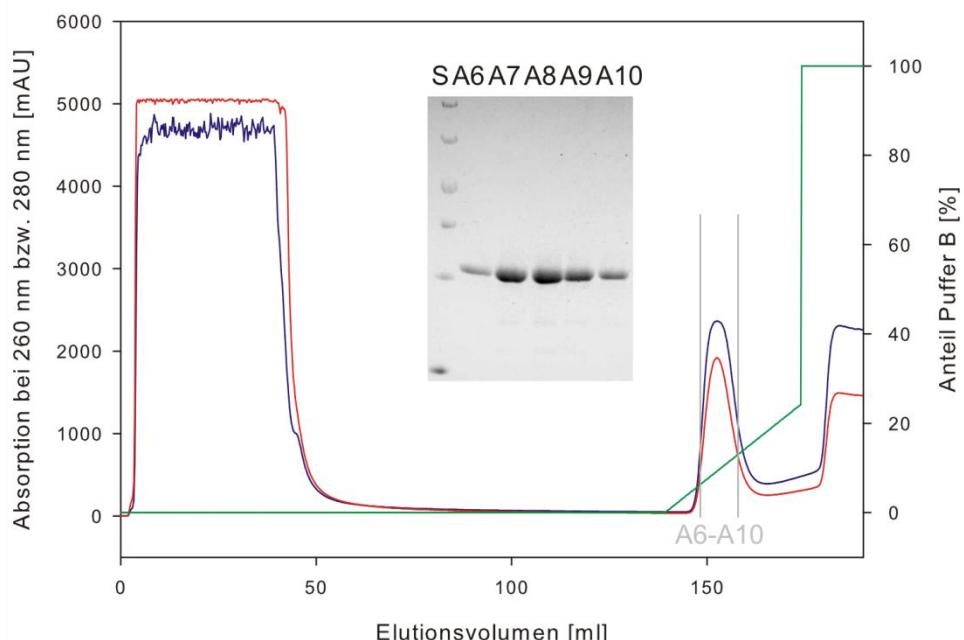
Zu Beginn dieser Arbeit lag das vollständige Konstrukt *sym2* über die Restriktionsschnittstellen *NdeI*, *BamHI* und *Xhol* im pET24a(+-)Vektor kloniert vor (Carstensen *et al.* 2012). Aufgrund des geringen Sequenzunterschieds zwischen den kodierenden Sequenzen für die beiden Hälften war es notwendig diese in PCR-Ansätzen einzeln zu amplifizieren und danach im Vektor zu ligieren. Aus diesem Grund wurde die für die C-terminale Hälfte kodierende Sequenz *sym2-C* zunächst mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *Xhol* in einen leeren pET24a(+-)Vektor kloniert und an Position D176<sub>C</sub> durch QuikChange<sup>TM</sup> PCR (3.2.3.2) (Wang & Malcolm 1999) mit den Oligonukleotiden A und B als überlappende Primer mutiert und so *sym2C-D176V<sub>C</sub>* erhalten. Anschließend wurde die Sequenz *sym2C-D130V<sub>C</sub>+D176V<sub>C</sub>* mittels PCR amplifiziert unter Verwendung von *sym2C-D176V<sub>C</sub>* als Templat. Die Oligonukleotide C und T7T wurden als 5' bzw. 3' Primer verwendet. Das amplifizierte Fragment *sym2C-D130V<sub>C</sub>+D176V<sub>C</sub>* wurde mittels *BamHI* und *Xhol* in pET24a(+-)*sym2N* (Carstensen *et al.* 2012) kloniert und so pET24a(+-)*sym2\_bindC* erhalten. Für die Herstellung der Gene *sym2\_bindN* und *sym2\_bindNC* wurde die Sequenz *sym2N-D130V<sub>N</sub>+D176V<sub>N</sub>* unter Verwendung von *sym2C-D130V<sub>C</sub>+D176V<sub>C</sub>* als Templat

mittels PCR amplifiziert. Die Oligonukleotide E und F wurden als Primer verwendet. Das amplifizierte Fragment *sym2N-D130V<sub>N</sub>+D176V<sub>N</sub>* wurde mittels *NdeI* und *BamHI* in einen leeren pET24a(+) -Vektor kloniert. Anschließend wurden *sym2-C* bzw. *sym2C-D130V<sub>C</sub>+D176V<sub>C</sub>* in pET24a(+) -*sym2N-D130V<sub>N</sub>+D176V<sub>N</sub>* kloniert, um pET24a(+) -*sym2\_bindN* und pET24a(+) -*sym2\_bindNC* zu erhalten.

Bei allen Klonierungsschritten wurden stets NEB Turbo *E. coli*-Zellen (2.4) transformiert und nach Ausplattierung auf LB<sub>Kan</sub>-Platten wurden positive Klone für die jeweiligen Konstrukte durch Kolonie-PCR mit vektorspezifischen Primern ermittelt.

#### 4.2.1.2 Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine

Chemisch kompetente NEB T7 Express-Zellen wurden mit den Konstrukten transformiert und dann 50 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft. Am nächsten Tag wurden jeweils 2 l LB<sub>Kan</sub> bei 37 °C für 3 h für eine préparative Proteinexpression angeimpft (3.3.2). Die Proteine wurden aus der löslichen Zellfraktion über den C-terminalen (His)<sub>6</sub>-tag mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie wie in 3.3.3 beschrieben gereinigt. In Abbildung 17 ist exemplarisch die Reinigung von Sym2\_bindN dargestellt, die als repräsentativ für die der anderen Varianten angesehen werden kann.



**Abbildung 17: Reinigung von rekombinantem Sym2\_bindN über Metallchelat-Affinitätschromatographie.** Elutionsprofil der Reinigung, aufgenommen über die Messung der Absorption bei 260 nm (rot) und 280 nm (blau). Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 10-1000 mM Imidazol (grün). Insert: SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) der Elutionsfraktionen A6-A10. S: Standard LMW.

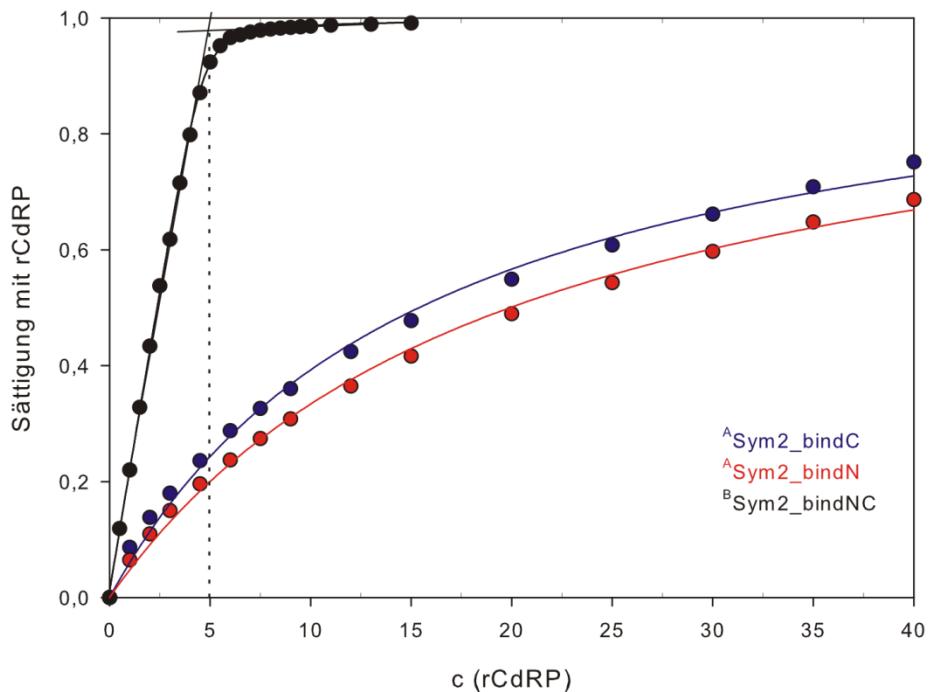
Die Ausbeuten an gereinigtem Protein nach der Dialyse betragen etwa 100 mg pro Liter Zellkultur. Die berechneten Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten bei 280 nm sind für alle Sym2\_bind-Varianten in Tabelle 7 zusammengestellt.

**Tabelle 7: Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten bei 280 nm der in Abbildung 16 dargestellten Sym2\_bind-Varianten.**

Parameter	Sym2_bindN	Sym2_bindC	Sym2_bindNC
<b>MW [g/mol]</b>	27247,3	27247,3	27215,4
<b>Anzahl W+Y</b>	2+2	2+2	2+2
<b><math>\epsilon_{280} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]</math></b>	13980	13980	13980
<b>0,1% <math>A_{280} [\text{cm}^2/\text{mg}]</math></b>	0,513	0,513	0,514

#### 4.2.1.3 Analyse der rCdRP-Bindung

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurden die erstellten Varianten mit rCdRP titriert und die Bindung über Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) verfolgt (3.6.5.3). Es wurde die Abnahme der Intensität der Tryptophanfluoreszenz der Proteine bei 320 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Während Sym2 kaum in der Lage ist rCdRP zu binden, zeigen beide Varianten Sym2\_bindN und Sym2\_bindC eine gute Affinität für rCdRP mit  $K_D$ -Werten von 16  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$ . Bemerkenswerterweise steigt die Affinität bei simultaner Einführung der Austausche D130V und D176V in beiden Hälften etwa 250-fach an im Vergleich zu den Einzelmutanten, was in einer stöchiometrischen Titrationskurve mit einem extrem niedrigen  $K_D$ -Wert von 70 nM resultiert (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Analyse der rCdRP-Bindung.**

Der Ligand rCdRP wurde in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 zu 5  $\mu$ M Sym2\_bindC, Sym2\_bindN und Sym2\_bindNC titriert und die Änderung der Fluoreszenzemission bei 320 nm nach Anregung bei 280 nm analysiert. Die Daten wurden hyperbolisch (A) bzw. quadratisch gefittet und die Dissoziationskonstanten bestimmt.

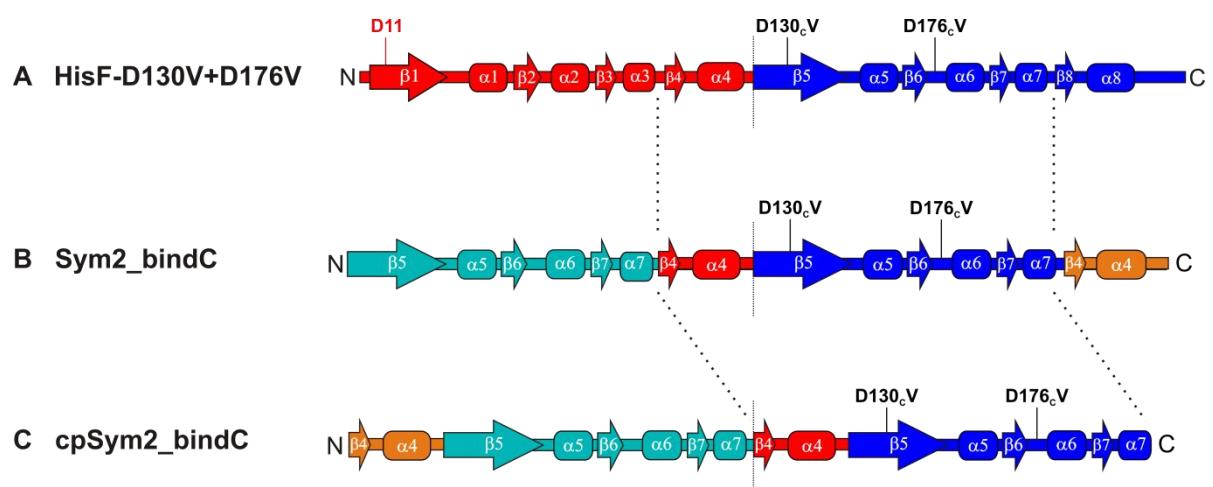
Aufgrund der Symmetrie und der beiden Phosphatbindestellen stellte sich die Frage, ob nur ein Molekül rCdRP binden kann oder ob zwei Moleküle gebunden werden. Die stöchiometrische Titration gibt darauf die Antwort mit einem Faktor von 1:1, was bedeutet, dass jedes Sym2\_bindNC nur ein rCdRP binden kann, obwohl prinzipiell zwei Phosphatbindestellen vorhanden wären. Die Verdopplung der Austausche führt durch die Wegnahme von zwei weiteren negativen Ladungen im aktiven Zentrum zu einer Verstärkung der Bindung. Ermutigt durch diese Erfolge wurden alle Varianten auf ihre Fähigkeit die TrpF-Reaktion zu katalysieren sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht. Es zeigte jedoch keine der Varianten messbare katalytische Aktivität (Daten nicht gezeigt). Dennoch konnte erfolgreich eine Bindestelle mit hoher Affinität für rCdRP, dem Produktanalogon der TrpF-Reaktion, etabliert werden, welche nachfolgend als Startpunkt für Zufallsmutagenese dienen sollte.

#### 4.2.2 Erstellung einer Sym2-Genbank

Durch eingeführte Aminosäureaustausche konnte eine mittlere bis sehr starke Bindung von rCdRP auf dem Sym2-Gerüst erzeugt werden. Jedoch war trotz der rCdRP-Bindung weder

*in vitro*, noch *in vivo* PRA-Isomerase Aktivität nachweisbar. Die Möglichkeiten des rationalen Designs waren an dieser Stelle ausgeschöpft, da die korrespondierenden Austausche, die auf anderen Gerüsten bereits zu Aktivität führten, schon eingeführt worden waren. Deswegen sollte die Aktivierung über Zufallsmutagenese und Selektion *in vivo* erreicht werden.

Eine Totalrandomisierung der drei rCdRP-bindenden Varianten von Sym2 schied aus kloniertechnischen Gründen aus. Die Gene für Sym2 und seine Varianten können nicht als Ganzes über PCR amplifiziert werden, da durch die innere Symmetrie auch die Bindestellen der Primer dupliziert vorliegen. Da bei einer PCR stets kürzere Fragmente bevorzugt amplifiziert werden, ist das Hauptprodukt einer PCR auf *sym2* das Genfragment für ein Halbbarrel. Neben diesem erhält man eine leiterartige Verteilung von Fragmenten mit Größen, die einem Vielfachen eines Halbbarrel-Gens entsprechen, da bereits amplifizierte Gene erneut anlagern und verlängert werden können. Aus diesem Grund sollte nur eine Hälfte über epPCR randomisiert werden. Um dafür eine geeignete Klonierungsstrategie zu entwickeln, wurden die rCdRP-bindenden Varianten auf Basis der Sequenz und Sekundärstruktur mit der Variante HisF-D130V+D176V verglichen. Diese Variante bindet nicht nur rCdRP, sie vermittelt auch die PRA Isomerisierung mittels substratvermittelter Katalyse (Abbildung 15). Abbildung 19 zeigt, dass sich nur Sym2\_bindC eine komplette  $(\beta\alpha)_4$ -Einheit mit HisF-D130V+D176V teilt. Aus diesem Grund wurde beschlossen Mutationen in *sym2\_bindC* einzuführen, allerdings nur in den vier  $(\beta\alpha)$ -Einheiten, die sich von HisF-D130V+D176V unterscheiden.



**Abbildung 19: Design des Ausgangskonstrukts cpSym2\_bindC für Zufallsmutagenese.**

(A) TrpF-aktive Variante HisF-D130V+D176V. Das N-terminale Halbbarrel und Rest D11, der katalytisch als allgemeine Base fungiert, sind rot dargestellt. Das C-terminale Halbbarrel ist blau dargestellt. (B) Die rCdRP-bindende Variante Sym2\_bindC teilt sich mit HisF-D130V+D176V ein komplettes Halbbarrel, was durch die gestrichelten Linien verdeutlicht wird. (C) Variante cpSym2\_bindC wurde circulär permuiert, um die Zufallsmutagenese von einer Hälfte unter Konstanthaltung des geteilten Halbbarrels zu ermöglichen.

Dabei ergibt sich aber ein weiteres Problem. Es müssten zwei Sequenzabschnitte getrennt voneinander randomisiert werden und dann nacheinander zum Gen für die konstanten vier ( $\beta\alpha$ )-Einheiten kloniert werden. Die Erstellung von zwei Genbanken nacheinander führt aber aus statistischen Gründen zu einer Verringerung der Variabilität der resultierenden Genbank. Eine Lösung dieses Problems ergibt sich durch eine circuläre Permutation zur Variante cpSym2\_bindC (Abbildung 19). Circuläre Permutationen sind seit längerer Zeit bekannt und treten auch in der natürlichen Evolution auf (Vogel & Morea 2006). Dadurch kann nun die erste Hälfte von cpSym2\_bindC randomisiert und zur zweiten, konstanten Hälfte kloniert werden. Allerdings wird von diesem Gen dann eine circulär permutierte Variante von Sym2 exprimiert, was prinzipiell zu veränderten Expressions- und Stabilitätseigenschaften führen kann. Diese Variante wurde in leicht modifizierter Form allerdings schon proteinbiochemisch charakterisiert und ihre Stabilität ist zwar etwas geringer als die von Sym2 aber ähnlich groß wie die des thermostabilen HisF (Sperl 2009) durch die Genbank erstellten Varianten von cpSym2\_bindC sollten also eine ausreichende Stabilität aufweisen, um die Selektion von aktivierenden Mutationen zu ermöglichen.

#### 4.2.2.1 Klonierung des Ausgangsvektors für die Genbank pExp-TrpF

Für die spätere Selektion auf PRAI-aktive Varianten *in vivo* sollte das Gen *cpSym2\_bindC* in einen modifizierten pTNA (Merz *et al.* 2000; Beismann-Driemeyer & Sterner 2001) Vektor kloniert werden, welcher konstitutive Expression in *E.coli* erlaubt. Dafür wurde zunächst eine *BsaI* Schnittstelle, welche sich in der Ampicillin Resistenz des pTNA-Vektors befand über QuikChange™ Mutagenese (3.2.3.2) mit den komplementären Primern G und H entfernt. Anschließend wurde das Plasmid pET24a(+)-*hisF-D130V+D176V* (Reisinger *et al.* 2012) als Templat für die Amplifikation der 3'-terminalen Halbsequenz von cpSym2\_bindC mit den Primern I und J verwendet. Das resultierende PCR Produkt wurde dann über *SphI* und *HindIII* in den modifizierten pTNA kloniert um pB4 zu erhalten. Anschließend wurden die Oligonukleotide M und N gemischt und durch Aufheizen im Wasserbad auf 95 °C und dann langsames Abkühlen auf Raumtemperatur angelagert (3.2.5). Die Oligonukleotide wurden über *SphI* und *BamHI* in pB4 kloniert und so pExp-TrpF erhalten.

#### 4.2.2.2 Erstellung der Genbank

Die 5'-terminale Sequenz von cpSym2\_bindC wurde mittels *epPCR* (3.2.3.4) in 16 Reaktionen mutagenisiert. Dabei enthielt nur das erste PCR Reaktionsgefäß das Templat, welches das Amplifikationsprodukt einer PCR mit den Oligonukleotiden O und P und dem Templat pET11c(+)-*hisF* (Reisinger *et al.* 2012) war. Die PCR Reaktionen mit den Oligonukleotiden Q und R als Primer enthielten unausgeglichenen Konzentrationen an

dNTPs (0.2 mM ATP, 0.2 mM GTP, 1 mM CTP, 1 mM TTP), 0.5 mM MnCl<sub>2</sub> und 5.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Nach jeweils 4 Amplifikationszyklen wurden 10 µl aus dem jeweiligen PCR Gefäß entfernt und in das nächste Gefäß als Templat gegeben. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt bis Gefäß 16 erreicht war. Sinn dieser Prozedur ist es, eine Sättigung der PCR zu vermeiden und so schrittweise weitere Mutationen anzuhäufen (McCullum *et al.* 2010). Da eine sehr hohe Mutationsrate angestrebt wurde, wurden nur die Produkte der Reaktionen 7 bis 16 in Dreiergruppen gereinigt (3.2.8). Da die Ausbeute nach dem Reinigungsschritt zu gering war um damit eine Genbank herzustellen, wurden die PCR Produkte der vier Gruppen in Standard PCR-Ansätzen erneut amplifiziert. Die Amplifikationsprodukte wurden aus einem 1%igen Agarose Gel gereinigt und für die Erstellung der Genbank (3.2.11) mit *BsaI* in den Vektor pExp-TrpF kloniert. Nach Transformation von  $\Delta trpF$ -Zellen (2.4) mit der erzeugten Genbank und Ausplattierung auf 40 großen SOC-Agarplatten mit Ampicillin wurden ca.  $5 \times 10^6$  Kolonien erhalten. Die Kolonie-PCR (3.2.4) von 60 Klonen ergab, dass die Ligationseffizienz bei 96 % lag. Damit bleibt die Genbank-Größe bei etwa  $5 \times 10^6$  unabhängigen Mutanten. Zur Bestimmung der Anzahl und Verteilung der Mutationen wurde bei zehn Klonen das Insert sequenziert und mit der Ausgangssequenz verglichen (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Anzahl und Verteilung der Nukleotidaustausche bei 10 zufällig ausgewählten Klonen der cpSym2\_bindC-Genbank.**

cpSym2_bindC-Genbank	
Größe der Genbank (G)	$\sim 5 \times 10^6$
Transitionen (Ts)	36,3%
T/C	16,1%
C/T	4,0%
A/G	15,3%
G/A	0,8%
Transversionen (Tv)	63,7%
A/T	29,8%
T/A	21,0%
G/T	3,2%
T/G	3,2%
A/C	3,2%
C/A	2,4%
G/C	0,8%
C/G	0,0%
Ts/Tv	0,57
AT-Austausche	88,7%
GC-Austausche	11,3%
Mutationen/Gen (Mittelwert)	$12,4 \pm 4,4$
Mutationen/Gen (Medianwert)	12,5 (5-19)
P(Stopp/Gen)	42%
Korrigierte Größe der Genbank	$3 \times 10^6$

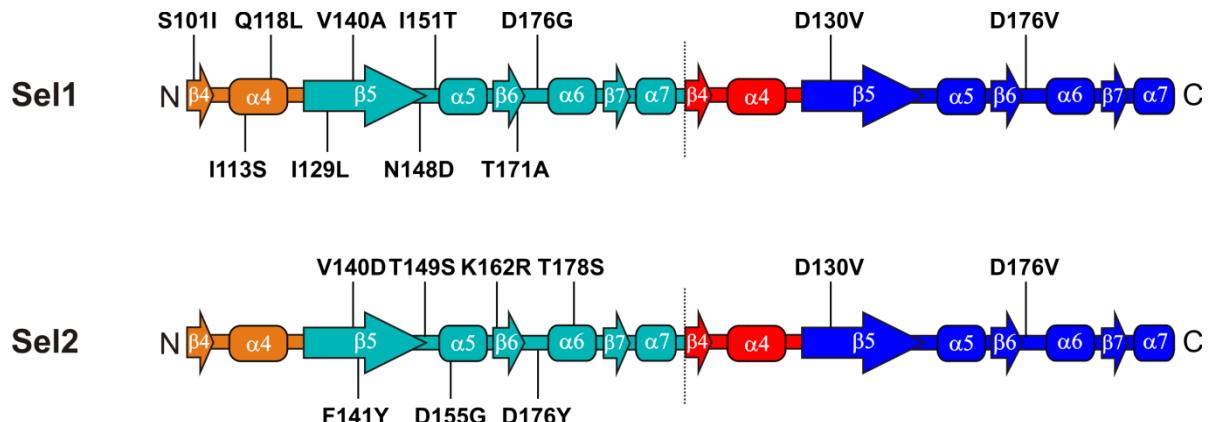
Die Verteilung von Transitionen zu Transversionen war mit 0,57 relativ ausgeglichen und das Verhältnis von AT- zu GC-Austauschen lag wie erwartet (Vanhercke *et al.* 2005) auf der Seite der AT-Austausche. Es wurde wie beabsichtigt eine hohe Mutationsrate von 12 Nukleotidaustauschen pro Halbbarrel-Gen erhalten, um möglichst viele Kombinationen von Aminosäureaustauschen zu bekommen. Normalerweise würde eine so hohe Mutationsrate die Struktur eines Proteins zerstören (Drummond *et al.* 2005). Da das Gerüst cpSym2 aber eine sehr hohe Stabilität aufweist (Sperl 2009) wurden die Aussichten, bei hoher Mutationsrate aktivierende Aminosäureaustausche zu finden, größer eingeschätzt als das Risiko die Proteinstruktur zu denaturieren. Allerdings häuft sich bedingt durch die hohe Mutationsrate das Auftreten von Mutationen, die zu einem Stopp-Codon führen. Nach der mit dem Webserver PEDEL-AA ermittelten Wahrscheinlichkeit werden ca. 42% aller Gene

durch ein Stopp-Codon unterbrochen werden (Tabelle 8). Berücksichtigt man diese Tatsache ergibt sich eine korrigierte Genbank-Größe von  $3 \times 10^6$  unabhängigen Varianten.

### 4.2.3 Selektion auf TrpF-aktive Varianten *in vivo*

Zur Selektion von funktionellen *cpSym2\_bindC*-Varianten, welche durch Aminosäureaustausche die PRAI-Defizienz der  $\Delta trpF$ -Zellen komplementieren können, wurden 16 mal 100  $\mu$ l kompetente  $\Delta trpF$ -Zellen (2.4) durch Elektroporation mit insgesamt 1,5  $\mu$ g der pTNA-*cpSym2bindC*-Genbank transformiert. Als Negativkontrolle wurden pTNA und pExp-TrpF, sowie als Positivkontrolle pTNA-*trpF* eingesetzt. Nach der Kur in SOC-Medium wurden die Zellen in 1 % NaCl-Lösung gewaschen und dann auf M9<sup>-Amp</sup>-Medium (Selektionsbedingungen) und zusätzlich auf LB<sup>-Amp</sup>-Medium (Nichtselektionsbedingungen) ausplattiert. Alle Platten wurden bei 37 °C inkubiert und nach verschiedenen Zeiten analysiert. Aus der Anzahl der unter nicht selektiven Bedingungen gewachsenen Kolonien konnte eine Transformationseffizienz von  $1 \times 10^9$  /  $\mu$ g für die Genbank ermittelt werden. Die Anzahl transformierter Zellen liegt damit um den Faktor 10<sup>3</sup> über der Größe der Genbank, sodass davon ausgegangen werden kann, dass durch die Transformation kein Verlust an Variabilität der Genbank eingetreten ist. Nach 152 h waren auf den Selektionsplatten mit der Genbank tausende Kolonien sichtbar. Die Negativkontrollen zeigten zu diesem Zeitpunkt kein Wachstum. Von den gewachsenen Kolonien wurden die 5 größten neu auf M9<sup>-Amp</sup>-Selektionsplatten ausgestrichen, und der Selektionstest beendet. Da alle Klone erneut zum Wachstum unter Selektionsbedingungen fähig waren, wurden mit den Kolonien jeweils 5 ml LB<sup>-Amp</sup>-Medium angeimpft. Die resultierenden üN-Kulturen wurden zur Plasmid-Präparation verwendet und anschließend die DNA-Sequenz des *cpSym2\_bindC*-Genbereichs vollständig bestimmt. Es zeigte sich, dass von den fünf isolierten Plasmiden jeweils zwei und drei identisch waren, und somit nur zwei unterschiedliche Sequenzen erhalten wurden.

Um sicherzustellen, dass die isolierten Plasmide wirklich die *trpF*-Defizienz komplementieren können wurden kompetente  $\Delta trpF$ -Zellen einzeln mit den isolierten Plasmiden transformiert und auf M9<sup>-Amp</sup>-Selektionsmedium ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Nach 68 h konnten bei beiden Varianten sichtbare Kolonien beobachtet werden, wobei die mit dem Gen *sel1* schon etwas größer waren und in der Folge auch etwas schneller wuchsen. Die Ergebnisse der Retransformationen zeigten, dass beide Varianten die *trpF*-Defizienz der *E. coli*-Zellen komplementieren können. Abbildung 20 zeigt die Lage der gefundenen Mutationen anhand der Struktur von Sym2.



**Abbildung 20: Ergebnis der Komplementation von  $\Delta trpF$ -Zellen mit der cpSym2\_bindC-Genbank.**

Lage der Aminosäureaustausche der gefundenen Varianten Sel1 und Sel2 anhand der Sekundärstrukturelemente von Sym2.

Beide selektierte Varianten von cpSym2\_bindC zeigen eine Vielzahl von Mutationen, die rein statistisch betrachtet nicht alle essentiell für die Aktivität sein können. Zudem befinden sich einige in relativ weiter Entfernung vom aktiven Zentrum, sowie an den Außenseiten der Helices und tragen deshalb höchstwahrscheinlich nicht zur Aktivierung bei.

#### 4.2.4 Reduktion der Mutationen von cpSym2-sel

Um herauszufinden, welche Mutationen wirklich notwendig sind, um TrpF-Aktivität zu erhalten, wurden die gefundenen Mutationen einzeln zur wildtypischen Aminosäure zurückmutiert und anschließend ein Komplementationstest durchgeführt. Für die Klonierung dieser Varianten musste allerdings aufgrund des symmetrischen Gens analog zur Erstellung der Genbank vorgegangen und die Mutationen zunächst im Halbarrel-Gen zurückmutiert werden. Anschließend konnte die mutierte Hälfte dann wieder zur konstanten, zweiten Hälfte, welche auch während der Genbankerstellung unmutiert geblieben war, kloniert werden. Da die Mutationen über QuikChange™ zurückgenommen werden sollten, war es nötig zunächst einen Ausgangsvektor mit dem Gen *cpSym2sel/N*, flankierend von entsprechenden Restriktionsschnittstellen, herzustellen. Aus diesem Grund wurden die Gene *cpSym2sel1/N* und *cpSym2sel2/N* von Geneart teilsynthetisiert und mit den Oligonukleotiden X1 und P bzw. X2 und P amplifiziert. Die Amplifikationsprodukte wurden dann mit den Oligonukleotiden O und R erneut amplifiziert, *geblunted*, mittels *Sma*I in den Vektor pANTRY kloniert und so pSel\_S101 und pSel2 erhalten. Der Vektor pSel1\_S101 enthielt noch nicht die Mutation S101I. Daher wurde zunächst S101I eingeführt und der resultierende Vektor pSel1 gemeinsam mit pSel2 anschließend mittels

QuikChange<sup>TM</sup> (3.2.3.2) mutiert. Tabelle 9 zeigt die verwendeten Oligonukleotide und die resultierenden Mutationen.

**Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide zur Erstellung von Varianten von Sel1 und Sel2.**

Name	Austausch
fwS101I	pSel1_S101 > pSel1
<b>pSel1</b>	
fwl113S	pSel1 > pSel1_I113
fwQ118L	pSel1 > pSel1_Q118
fwI129L	pSel1 > pSel1_I129
fwV140A	pSel1 > pSel1_V140
fwN148D	pSel1 > pSel1_N148
fwI151T	pSel1 > pSel1_I151
fwT171A	pSel1 > pSel1_T171
fwD176G	pSel1 > pSel1_D176
<b>pSel2</b>	
fwV140D	pSel2 > pSel2_V140
fwF141Y	pSel2 > pSel2_F141
fwT149S	pSel2 > pSel2_T149
fwD155G	pSel2 > pSel2_D155
fwK162R	pSel2 > pSel2_K162
fwD176Y	pSel2 > pSel2_D176
fwT178S	pSel2 > pSel2_T178

Das erhaltene Set an pSel-Vektoren wurde dann in Restriktions-Ligations-Reaktionen (3.2.11) eingesetzt, um die veränderten *cpSymsel/N*-Gene in pExp zu übertragen. Die resultierenden Vektoren enthielten jeweils *sel1* bzw. *sel2* Gene mit einzelnen Mutationen und wurden in der Folge für *in vivo* Komplementationstests (3.1.4) verwendet. Tabelle 10 zeigt die entsprechenden Mutationen und die Ergebnisse der Komplementationstests.

**Tabelle 10: Ergebnisse der *in vivo* Komplementationstests der Sel1 und Sel2 Varianten.**

Variante	Wachstum
pSel1_S101	-
pSel1_I113	+
pSel1_Q118	+
pSel1_I129	+
pSel1_V140	-
pSel1_N148	+
pSel1_I151	+
pSel1_T171	-
pSel1_D176	-
pSel2_V140	-
pSel2_F141	-
pSel2_T149	-
pSel2_D155	-
pSel2_K162	-
pSel2_D176	-
pSel2_T178	-

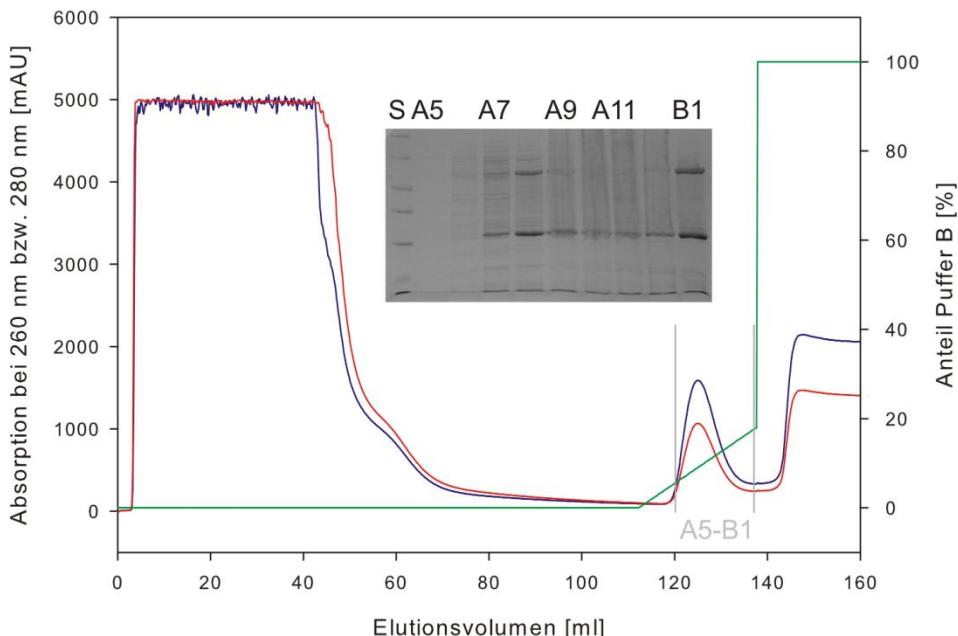
+ bedeutet Wachstum auf Minimalmedium ohne Tryptophan, während - kein Wachstum bedeutet. Mutationen, die zu keinem Wachstum der Zellen führen sind essentiell für die PRAI-Aktivität.

Keine der Varianten von Sel2 konnte  $\Delta trpF$ -Zellen zum Wachstum auf M9<sup>-Amp</sup>-Medium verhelfen. Sogar die Ausgangsvariante Sel2 selbst war bei erneuter Klonierung nicht mehr dazu in der Lage. Die ursprüngliche Selektion von Sel2 wurde deshalb auf einen evtl. zusätzlichen sekundären Effekt, wie z. B. eine Mutation des Promoters, was eine Vergrößerung der Proteinmenge in den Zellen zur Folge hat, zurückgeführt und nicht weiter verfolgt. Für Sel1 zeigte sich, dass es vier Mutationen gibt, die ein Wachstum der  $\Delta trpF$ -Zellen verhindern. Im Umkehrschluss müssen also diese vier Mutationen essentiell für TrpF-Aktivität im cpSym2\_bindC Hintergrund sein. Um dies zu bestätigen, wurden die überflüssigen Mutationen nacheinander im pSel1-Vektor eliminiert und das resultierende Gen schließlich mittels Restriktions-Ligation (3.2.11) in pExp-TrpF kloniert, um pTNA-cpSym2\_TrpF zu erhalten. Das erhaltene Konstrukt wurde wiederum einem Komplementationstest unterzogen und konnte wie erwartet die trpF-Defizienz der  $\Delta trpF$  *E. coli*-Zellen komplementieren. Anschließend wurde das Gen cpSym2\_TrpF über die Restriktionsenzyme *SphI* und *HindIII* in einen modifizierten pET24a(+) -Vektor kloniert und ein Expressionstest durchgeführt. Es wurde erwartet, dass durch die Entfernung von nicht-essentiellen Mutationen die lösliche Expression und die Stabilität des Proteins im Vergleich zur 9-fach Mutante, welche fast ausschließlich im unlöslichen Zellextrakt zu finden war

(Daten nicht gezeigt), wieder etwas gesteigert sein könnte. Die analytische Expression von cpSym2\_TrpF (3.3.1) zeigte, dass das Protein, wie erwartet, größtenteils im löslichen Zellextrakt zu finden ist.

#### 4.2.4.1 Expression und Reinigung von cpSym2\_TrpF

Es wurden chemisch kompetente *E. coli* T7 Rosetta Express-Zellen mit pET24a(+)-cpSym2\_TrpF transformiert und aus dem Transformationsansatz jeweils zwei 50 ml Vorkulturen inkuliert. Das Protein wurde aus der löslichen Zellfraktion über den C-terminalen (His)<sub>6</sub>-tag mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie wie in 3.3.3 beschrieben gereinigt. In Abbildung 21 ist die Reinigung von cpSym2\_TrpF dargestellt.



**Abbildung 21: Reinigung von rekombinantem cpSym2\_TrpF über Nickelchelat-Affinitätschromatographie.**

Elutionsprofil der Reinigung, aufgenommen über die Messung der Absorption bei 260 nm (rot) und 280 nm (blau). Die Elution erfolgte durch einen Gradienten von 10-1000 mM Imidazol (grün). Insert: SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) der Elutionsfraktionen A5-B1. S: Standard LMW.

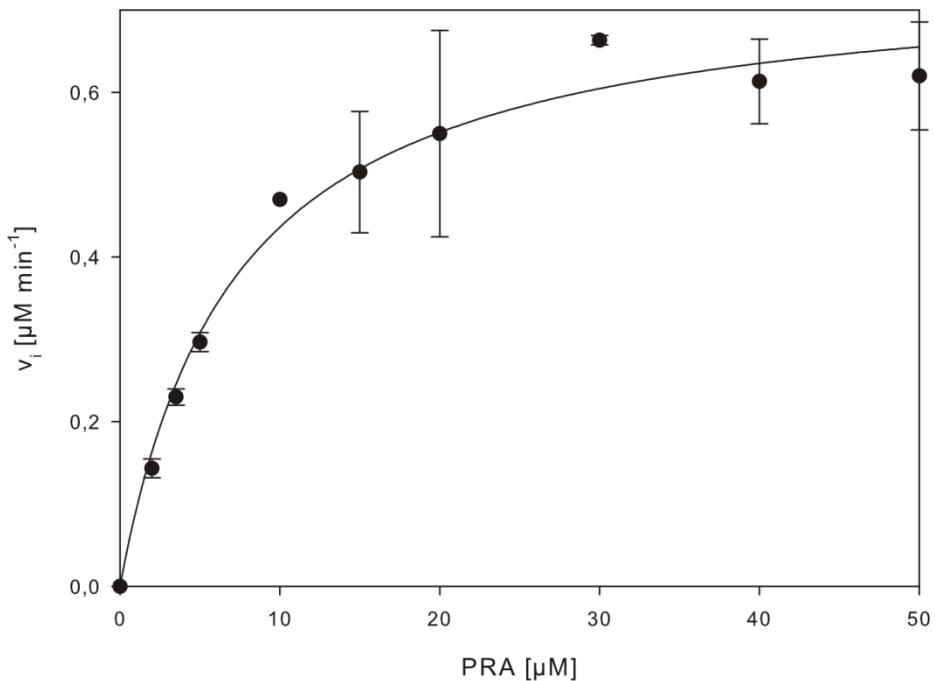
Die Ausbeuten an gereinigtem Protein nach der Dialyse betrugen etwa 60 mg pro Liter Zellkultur. Tabelle 11 zeigt das berechnete Molekulargewicht und die Extinktionskoeffizienten bei 280 nm.

**Tabelle 11: Molekulargewicht und Extinktionskoeffizienten bei 280 nm von cpSym2\_TrpF.**

Parameter	cpSym2_TrpF
<b>MW [g/mol]</b>	27252
<b>Anzahl W+Y</b>	2+4
<b><math>\epsilon_{280} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]</math></b>	16960
<b><math>0,1\% A_{280} [\text{cm}^2/\text{mg}]</math></b>	0.622

#### 4.2.4.2 Funktionelle Charakterisierung von cpSym2\_TrpF

Zur funktionellen Charakterisierung von cpSym2\_TrpF wurde zunächst die TrpF-Aktivität *in vitro* gemessen. Die Messungen der *steady-state*-Enzymkinetik wurde wie in 3.6.5.2 beschrieben durchgeführt. Die Analyse der PRA-Sättigungskurve (Abbildung 22) mit der Michaelis-Menten-Gleichung ergab eine Umsatzrate ( $k_{\text{cat}}$ ) von  $0,07 \text{ min}^{-1}$  und eine Michaelis-Konstante ( $K_M^{\text{PRA}}$ ) von  $7 \mu\text{M}$ .

**Abbildung 22: PRA-Sättigungskurve von cpSym2\_TrpF.**

Die Reaktionen wurden in 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA, 4 mM MgCl<sub>2</sub> und 2 mM DTT mit PRA-Konzentrationen von 2 – 50 μM bei 25 °C durchgeführt und durch Zugabe von 10 μM cpSym2\_TrpF gestartet. Die Werte stellen den Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen dar. Die durchgezogene Linie gibt das Ergebnis eines hyperbolischen Fits wieder, mit dessen Hilfe Werte von  $0,7 \mu\text{M min}^{-1}$  für  $v_{\text{max}}$  und  $7 \mu\text{M}$  für  $K_M^{\text{PRA}}$  ermittelt wurden.

Die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ ) von  $174 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , die für das artifizielle Gerüst cpSym2\_TrpF erhalten wurde, übertrifft den  $K_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRA}}$ -Wert von  $69 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für das Gerüst

HisF-D130V+D176V. Dennoch bleibt die katalytische Effizienz von beiden Konstrukten etwa 4-5 Größenordnungen hinter den natürlichen Enzymen TrpF aus *E. coli* und *T. maritima* zurück (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Steady-state-Enzymparameter für die Isomerisierung von PRA.**

Enzyme	$k_{cat}$ [min <sup>-1</sup> ]	$K_M^{PRA}$ [μM]	$k_{cat}/K_M^{PRA}$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
CpSym2_TrpF	0,07 ± 0,008	7 ± 1,3	174 ± 22
<sup>1</sup> HisF-D130V+D176V	0,073	18	69
<sup>2</sup> eTrpF	2070	12,2	2,8 x 10 <sup>6</sup>
<sup>3</sup> tTrpF	222	0,28	1,3 x 10 <sup>7</sup>

Reaktionsbedingungen: 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 25 °C. Die Werte für cpSym2\_TrpF sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen. <sup>1</sup> Reisinger *et al.* 2012; <sup>2</sup> Hommel *et al.* 1995; <sup>3</sup> Sterner *et al.* 1996

Schließlich wurde noch der  $K_D$ -Wert für die Bindung von rCdRP bestimmt. Dieser stimmt mit 4 μM sehr gut mit dem  $K_M^{PRA}$ -Wert überein.

Um eventuelle Kontaminationen mit wildtypischem TrpF aus *E. coli* bei den *in vitro* Messungen ausschließen zu können, wurde das Gen für cpSym2\_TrpF in den pQE70-Vektor (2.5) umkloniert, welcher eine Expression aus  $\Delta trpF$ -Zellen ermöglicht. Die Reinigung wurde, bis auf die Transformation von  $\Delta trpF$ -Zellen, wie oben beschrieben durchgeführt. Zur Reinigung wurde zudem eine neue Nickel-Chelat-Affinitätsäule, auf die noch kein Zellextrakt geladen wurde, verwendet, um auch hier Verunreinigungen mit *E. coli* TrpF ausschließen zu können. Mit dem so gereinigten cpSym2\_TrpF konnten die Enzymparameter reproduziert werden. Somit kann die gemessene Aktivität eindeutig cpSym2\_TrpF zugeschrieben werden und eine Verunreinigung ausgeschlossen werden.

#### 4.2.5 Kristallisation von cpSym2\_TrpF

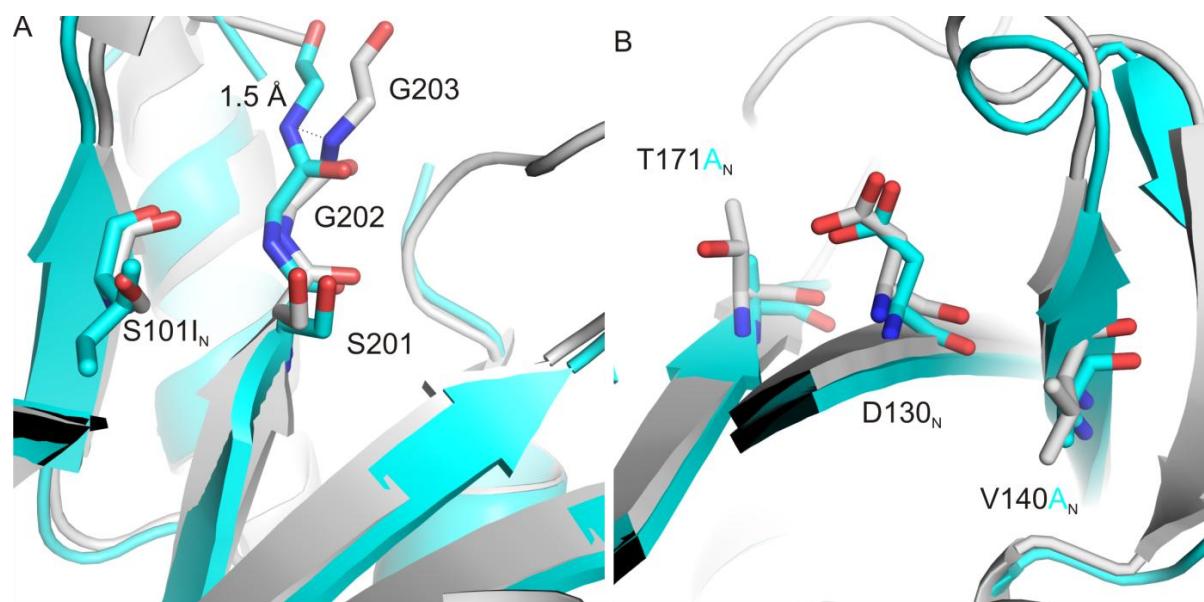
Um die strukturellen Grundlagen der enzymatischen Aktivität von cpSym2\_TrpF herauszufinden, sollte das Protein kristallisiert und seine Struktur in hoher Auflösung aufgeklärt werden. Zur Kristallisation wurde die Variante cpSym2\_TrpF nochmals wie in (4.2.3) beschrieben hergestellt und durch Metallchelat-Affinitätschromatographie gereinigt. Fraktionen mit größeren Mengen an sauberem Protein wurden vereinigt und mittels präparativer Gelfiltration weiter aufgereinigt. Die laut SDS-PAGE zu mehr als 95 % reinen Fraktionen wurden vereinigt und zweimal gegen 5 mM KP, pH 7,5 dialysiert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf 17,9 mg/ml einkonzentriert und auf Eis nach Frankfurt transportiert. Dort wurden mit Hilfe eines Pipettierroboters zwei 96-well-Platten angesetzt (PEGRx und PEGlon Screens, Hampton Research) (3.6.6). Nach acht Tagen waren in

einem Tropfen aus 0,3 µl 0,2 M Calciumacetat-Hydrat und 20 % (w/v) PEG 3350 gemischt mit 0,3 µl Proteinlösung (cpSym2\_TrpF, 17,9 mg/ml), der 1 mM rCdRP zugesetzt worden war, Kristalle der Raumgruppe P 1 21 1 gewachsen. Die Kristalle wurden in Nylon-Loops in flüssigem Stickstoff gefroren. Röntgenbeugungsdaten wurden durch Dr. Chitra Rajendran mithilfe eines PILATUS Detektors an der PXIII Röntgenquelle am SLS aufgenommen und analysiert. Die Datenprozessierung erfolgte mittels XDS (Kabsch 1993) und die Analyse der Datenqualität mittels phenix.xtriage (Adams *et al.* 2002). Die Struktur wurde über *molecular replacement* mit der Struktur von Sym2 (PDB: 3og3) als Modell unter Verwendung von MOLREP aus dem CCP4i Programm Paket (Potterton *et al.* 2004) gelöst. Das erhaltene Modell wurde zunächst mit REFMAC (Murshudov *et al.* 1997) verfeinert und dann durch mehrere Runden automatisiertes Refinement mit dem Programm PHENIX (Adams *et al.* 2002) und interaktive Modellierung mit Coot (Emsley & Cowtan 2004) verbessert. Das endgültige Modell wurde schließlich mit dem Programm MolProbity (Davis *et al.* 2007) analysiert. Tabelle 13 zeigt die Statistiken der Datenprozessierung und Verfeinerung.

**Tabelle 13: Datenprozessierung und Verfeinerungsstatistik von cpSym2\_TrpF.**  
cpSym2\_TrpF (4J9J.pdb)

Datenprozessierung	
Raumgruppe	P 1 21 1
Elementarzelle	
a, b, c (Å)	35,212; 63,142; 56,26
a, b, c (°)	90; 99,03; 90
Auflösung (Å)	2,3 – 41,71
R <sub>sym</sub> bzw. R <sub>merge</sub>	0,064
I / σI	8,78
Vollständigkeit (%)	99,2
Verfeinerungsstatistik	
Auflösung (Å)	2,3
Zahl der Reflexe	17096
R-Faktor (%) / Rfree (%)	0,2190 / 0,2838
Anzahl Atome	
Protein	1866
Wasser	143
<i>rmsd</i>	
Bindungslängen (Å)	0,013
Bindungswinkel (°)	1,29

Die Struktur von cpSym2\_TrpF konnte mit einer Auflösung von 2,3 Å gelöst werden. Leider konnte trotz der hohen Affinität für rCdRP (4.2.4.2) keine Struktur mit gebundenem Ligand erhalten werden. Aus der Struktur von HisF-D130V+D176V mit gebundenem rCdRP kann aber geschlossen werden, dass die Isomerisierung von PRA durch die Anthranilsäure-Gruppe des Substrates, die als allgemeine Säure wirkt und das Sauerstoffatom ihres eigenen Furanose-Rings protoniert (Substrat-vermittelte Katalyse), initiiert wird. Weiter wirkt die Aminosäure D11 als allgemeine Base, die ein Proton vom C2'-Atom des Schiff-Base-Intermediats abstrahiert (Reisinger *et al.* 2012) (Abbildung 15). Nimmt man für cpSym2\_TrpF einen ähnlichen Mechanismus an, dann sollte der Rest D130<sub>N</sub>, welcher analog zu D11 von HisF-D130V+D176V ist, als allgemeine Base wirken. Eine Superpositionierung der Struktur des aktiven cpSym2\_TrpF mit der des inaktiven Sym2 zeigt, dass die C-terminale Phosphatbindestelle (Aminosäuren S201, G202 und G203, Abbildung 23A), welche höchstwahrscheinlich das Substrat PRA verankert (Claren *et al.* 2009; Reisinger *et al.* 2012), durch den benachbarten Austausch S101I<sub>N</sub> um 1,5 Å verschoben wird. Dieser aktivierende Aminosäureaustausch führt vermutlich zu einer Verlagerung des Substrates im aktiven Zentrum und ermöglicht so die Deprotonierung des Schiff-Base-Intermediats durch die allgemeine Base D130<sub>N</sub>. Darüber hinaus liegen die Austausche V140A<sub>N</sub> und T171A<sub>N</sub> in direkter Nachbarschaft zu D130<sub>N</sub>, wodurch sie seine elektrostatische Umgebung verändern und seine konformationelle Flexibilität erhöhen (Abbildung 23B).



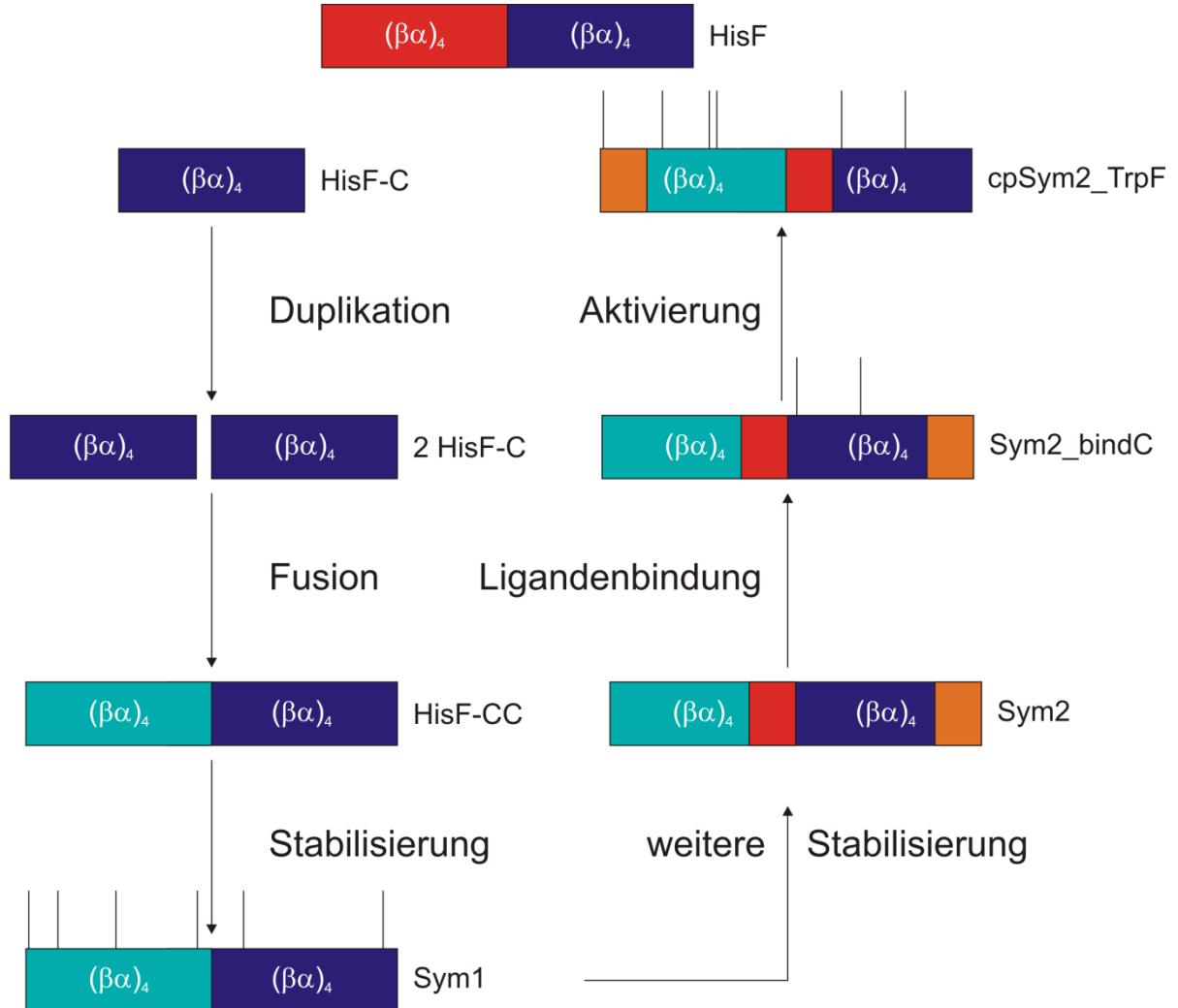
**Abbildung 23: Strukturelle Superpositionierung von cpSym2\_TrpF (cyan) mit Sym2 (grau).**

Die Strukturen sind als Cartoons dargestellt, wobei die wichtigen Aminosäuren hervorgehoben sind. (A) Austausch S101I<sub>N</sub> verdringt die C-terminale Phosphatbindestelle (Reste S201-G203) um 1,5 Å. (B) Die Austausche V140A<sub>N</sub> und T171A<sub>N</sub> befinden sich in direkter Nachbarschaft zum katalytischen Rest D130<sub>N</sub>, wodurch sie seine elektrostatische Umgebung verändern.

Die nicht-aufgelösten Aminosäureaustausche D176G<sub>N</sub> und D176V<sub>C</sub> ermöglichen ebenso wie D130V<sub>C</sub> durch eine Verringerung der negativen Ladungen im aktiven Zentrum die Bindung von rCdRP (Reisinger *et al.* 2012).

#### 4.2.6 Resümee

Die oben dargestellten Ergebnisse stellen den letzten Schritt in der Nachahmung der Evolution der  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Enzyme im Labor dar. Durch eine Kombination von rationalem Design mit gerichteter Evolution konnten alle Schritte von der Duplikation einer Halb*barrel* Sequenz, über Stabilisierung des erhaltenen symmetrischen Proteins, die Einführung einer Ligandenbindestelle bis zur Erzeugung eines enzymatisch aktiven  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrels*, welches *E. coli*-Zellen einen Wachstumsvorteil verschafft, vollzogen werden (Abbildung 24). Der Erfolg dieser Simulation hat Auswirkungen für das Design und die Evolution von Enzymen und insbesondere für das Design von  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrels*. Die Duplikation von bestehenden Proteinsequenzen kann zur Entstehung von neuen stabilen Proteinen führen. Die Erhöhung der Stabilität dieser resultierenden Proteine kann einerseits durch gerichtete Evolution und Screening, andererseits aber auch durch eine Optimierung der Schnittstellen, an denen die Sequenz aus der Ursprungssequenz ausgeschnitten wurde, erfolgen. Sobald ein gewisses Stabilitätsniveau erreicht wurde, kann die Sequenz eine hohe Zahl an Mutationen tolerieren ohne die Struktur zu verlieren, wodurch die Selektion von aktivierenden Mutationen ermöglicht wird.



**Abbildung 24: Schematischer Überblick über die Simulation der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Evolution im Labor.**  
Es sind alle Schritte vom rezenten HisF bis hin zum TrpF-aktiven cpSym2\_TrpF gezeigt. Farbcodierung wie in Abbildung 3.

Ist die natürliche Evolution der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Struktur einem ähnlichen Weg gefolgt? Das genaue Repertoire an Sequenzen aus dem die Natur wählen konnte, und ob Halbbarrels, Viertelbarrels, oder noch kleinere Einheiten (Lupas *et al.* 2001; Söding & Lupas 2003) in der natürlichen Evolution der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Faltung verwendet wurden, ist leider unklar. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass das Zusammenfügen von zwei identischen Halbbarrels eine plausible Strategie für die Evolution der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Faltung mit ihren vielfältigen Funktionen darstellt.

## 4.3 Studien zur Erzeugung eines C2-symmetrischen Hybridkatalysators

Ein Ziel der synthetischen Chemie ist es, die Vielfalt der durch metall-vermittelte homogene Katalyse möglichen Reaktionen mit der Effizienz und Selektivität von Enzymen zu koppeln (Mihovilovic 2007). In den letzten Jahren wurden einige Arbeiten über artifizielle Metalloproteine veröffentlicht, die bezeugen, dass das von Wilson & Whitesides 1978 erstmals beschriebene Konzept momentan eine Renaissance erlebt (Kramer 2006; Letondor & Ward 2006). Die eben beschriebenen Arbeiten zeigen aber auch, dass die erzeugten Hybridkatalysatoren bezüglich ihrer Umsatzraten und Stereoselektivitäten noch weit hinter den klassischen Biokatalysatoren zurückbleiben.

Das Konzept, die C2-Symmetrie von Liganden für eine Reduktion der Übergangszustände zu verwenden, um die Selektivität von katalysierten Reaktionen zu erhöhen, ist in der organischen Chemie weit verbreitet. Interessanterweise sind in der Literatur aber keine Hybridkatalysatoren beschrieben, welche die Vorteile von C2-symmetrischen organischen Liganden mit der Spezifität und Selektivität von enzymbasiertter Katalyse vereinen. Ziel dieses Abschnitts war es, basierend auf dem thermostabilen und C2-symmetrischen Gerüst von Sym2, Hybridkatalysatoren herzustellen. Dazu sollten auf Basis der Röntgenstruktur von Sym2 geeignete Positionen für die Aufnahme eines Liganden ausgewählt werden. Ein entsprechender Ligand sollte synthetisiert und dann über Kopplungsstrategien derart eingebaut werden, dass das entstehende Konjugat C2-Symmetrie aufweist. Um dies zu ermöglichen sollte der Ligand an zwei symmetriäquivalenten Aminosäurepositionen gleichzeitig gebunden und diese doppelte Verankerung mittels geeigneter Techniken analysiert werden. Schließlich sollte mittels einer Testreaktion herausgefunden werden, ob das Protein Stereoinformation induziert.

### 4.3.1 Auswahl des Liganden und der Reaktion

Zur Auswahl eines geeigneten Liganden für eine doppelte und C2-symmetrische Kopplung an das Protein wurde zunächst die Literatur nach erfolgreichen Hybridkatalysatoren durchsucht. Carey *et al.* (2004) beschrieben bereits eine doppelte kovalente Verankerung eines Salen-Liganden an Myoglobin. Durch die doppelte Verankerung konnte im Gegensatz zu früheren Arbeiten (Ma & Lu 1999; Ohashi *et al.* 2003; Ueno *et al.* 2007) die Stereoselektivität der Sulfoxidation von Thioanisol gesteigert werden. Entscheidend ist dabei die Blockierung einer Seite des Katalysators durch das proximale Histidin des Myoglobins, wodurch die Anzahl der möglichen Übergangszustände reduziert wird. Da in

dieser Arbeit sowohl die doppelte Verankerung, als auch eine Reduktion der Übergangszustände für eine Verbesserung der Enantioselektivität verwendet wird, erschien der Salen-Ligand und die Sulfoxidation von Thioanisol ideal um zu untersuchen, ob die C2-Symmetrie von Sym2 eine hohe Stereoselektivität der Reaktion zur Folge hat. Abbildung 25 zeigt den Liganden, der an Sym2 gekoppelt werden sollte, und die vom resultierenden Hybridkatalysator zu katalysierende Reaktion.

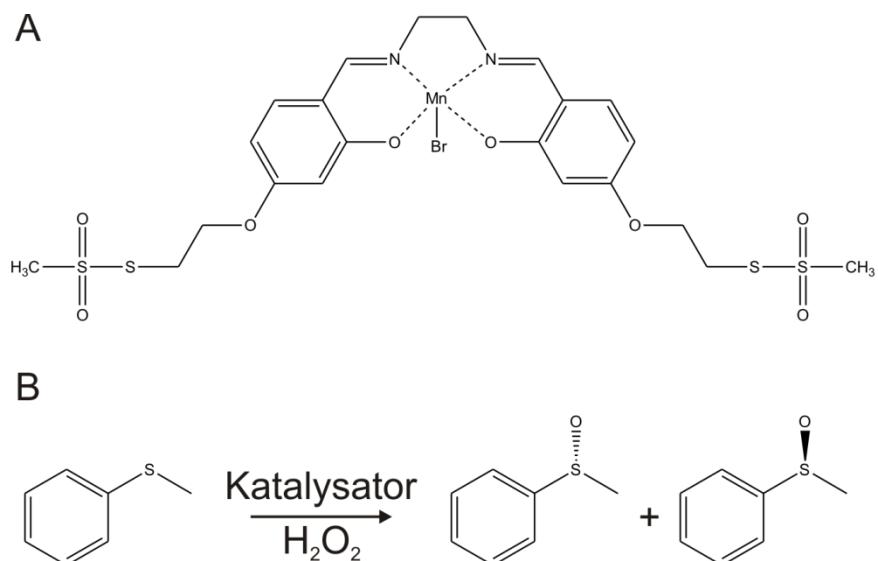


Abbildung 25: Mn-Salen-Ligand Mn-di[methylthiosulfonylethyl]oxy]salen (im Folgenden als Mn-Salen bezeichnet) zur Erzeugung von Sym2-Hybridkatalysatoren (A) und Testreaktion, die von Sym2-Hybridkatalysatoren stereoselektiv katalysiert werden soll (B).

#### 4.3.2 Synthese des Liganden Mn-Salen

Nachdem die Wahl auf den Mn-Salen-Komplex Mn-di[methylthiosulfonylethyl]oxy]salen (Abbildung 25) als Ligand für die Erzeugung von Sym2-Hybridkatalysatoren gefallen war, wurde die Synthese von Mn-Salen in 4 Stufen mit kleineren Modifikationen nach Ma (2001) und Carey (2006) durchgeführt (Abbildung 26).

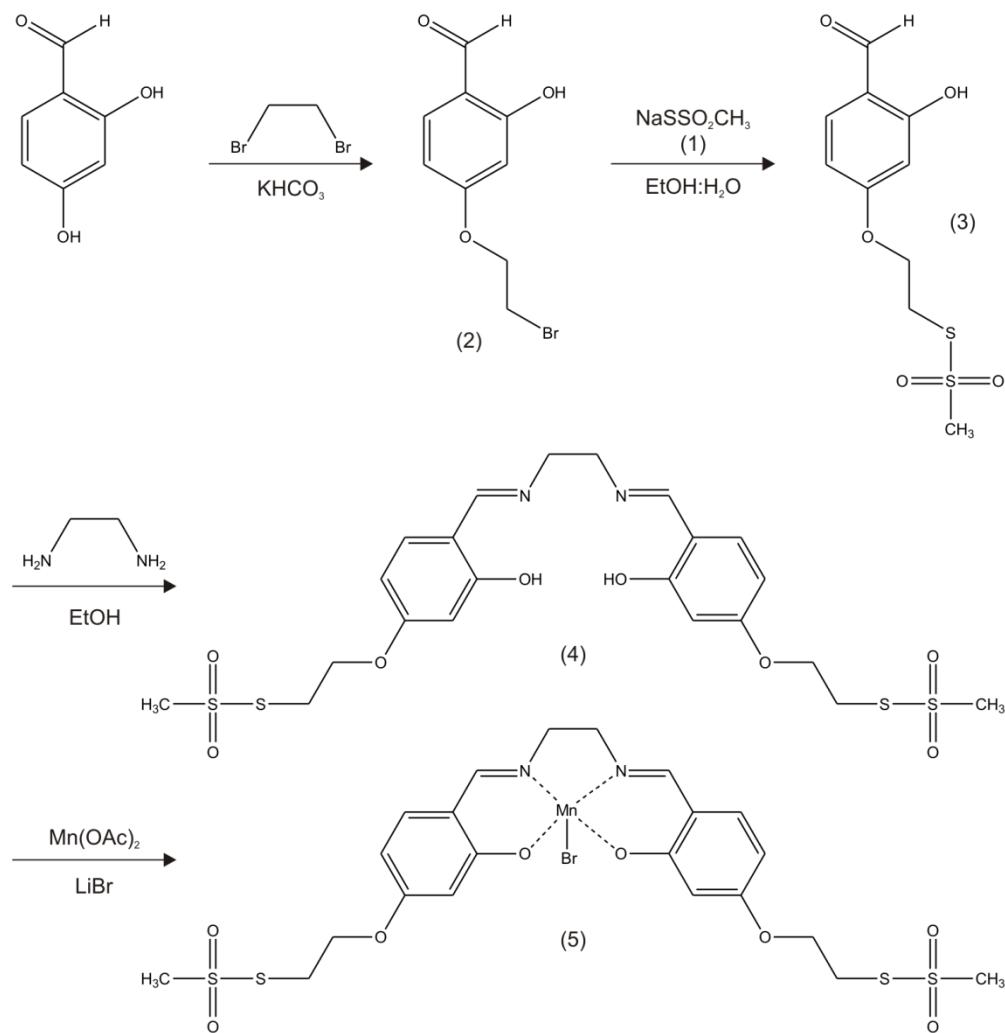
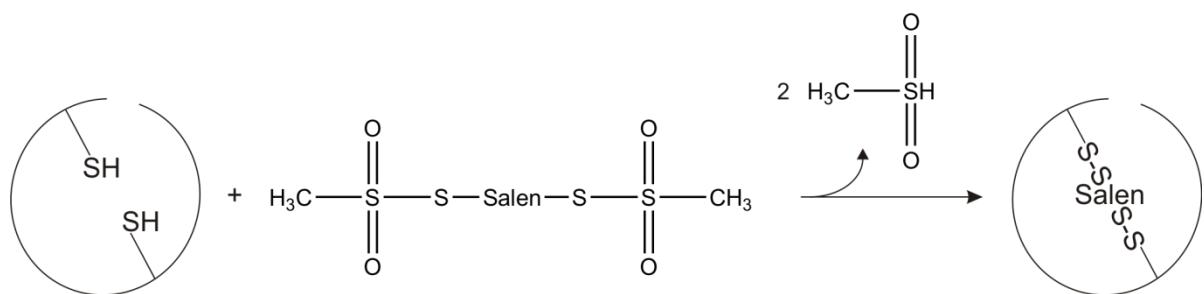


Abbildung 26. Synthese von Mn-Salen nach Ma (2001) und Carey (2006).

Dabei wurde zunächst aus Methylsulfonylchlorid und Natriumsulfid Natriummethylthiosulfonat (1) hergestellt, welches dann in der zweiten Stufe als Edukt benötigt wurde. Die Synthese selbst ging von 2,4-Dihydroxybenzaldehyd aus, das mit 1,2-Dibromethan unter Zusatz von Kaliumhydrogencarbonat als Base in einer Substitutionsreaktion zu 4-[(2-Bromoethyl)oxy]salicylaldehyd (2) umgesetzt wurde. Letzteres wurde anschließend eingesetzt, um mit dem vorab hergestellten Natriummethylthiosulfonat (1) in einer weiteren Substitutionsreaktion zu 4-[(methylthiosulfonylethyl)oxy]salicylaldehyd (3) zu reagieren. In der dritten Stufe erfolgte die Umsetzung mit Ethylenediamin zum Salen (4). Durch Komplexierung von Mangan (II) wurde schließlich das Endprodukt Mn-Salen (5) als brauner Feststoff hergestellt.

### 4.3.3 Erstellung der Proteinvarianten

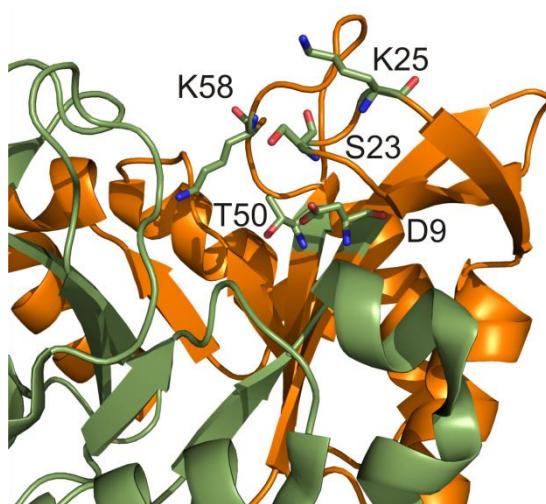
Zur Herstellung der Hybridkatalysatoren durch Konjugation mit dem fertigen Liganden Mn-Salen, mussten Aufnahmepunkte im Protein geschaffen werden. Der Ligand Mn-Salen besitzt Methylthiosulfonat-Gruppen, welche mit reaktiven Cysteinen zu Disulfidbrücken reagieren können. Für die doppelte Anbindungsstrategie unter Beibehaltung der C2-Symmetrie wurden deshalb Varianten von Sym2 benötigt, welche an zwei äquivalenten Positionen Cysteine besitzen (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Schema für den Einbau des Liganden Mn-Salen in das Sym2-Proteingerüst.**

Sym2-Varianten sind als Kreis dargestellt und Cysteine an symmetriäquivalenten Positionen mit Strichen angedeutet; die Sulfhydrylgruppen sind angegeben.

Die Positionen wurden anhand der Röntgenstruktur von Sym2 so ausgewählt, dass der Ligand gut in die Proteinstruktur eingebettet wird, damit diese Stereoinformation induzieren kann. Abbildung 28 zeigt die Lage der für die Anbindung ausgewählten Positionen in der Sym2-Struktur.



**Abbildung 28. Aminosäurereste in Sym2, welche für die Anbindung von Mn-Salen zu Cystein mutiert werden sollten.**

Ausgewählte Aminosäurereste sind in der N-terminalen Hälfte (orange) als Stäbe (grün) dargestellt; die C-terminale Hälfte ist grün eingefärbt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die korrespondierenden Aminosäurereste in der C-terminalen Hälfte nicht gezeigt.

Da bei einer Konjugation einer Sym2-Variante mit dem Mn-Salen-Liganden zwei Reaktanden mit jeweils zwei reaktiven Gruppen zusammentreffen, besteht neben einer doppelten Verlinkung, vor allem bei sterisch anspruchsvoller Positionen, auch die Möglichkeit der Bildung von Dimeren oder höheren Oligomeren (Abbildung 29A). Auch eine Polymerisation ist denkbar. Aus diesem Grund wurde beschlossen die beiden Hälften der jeweiligen Sym2-Varianten einzeln zu exprimieren (hSym2) und die Konjugation unter denaturierenden Bedingungen durchzuführen (Abbildung 29B).

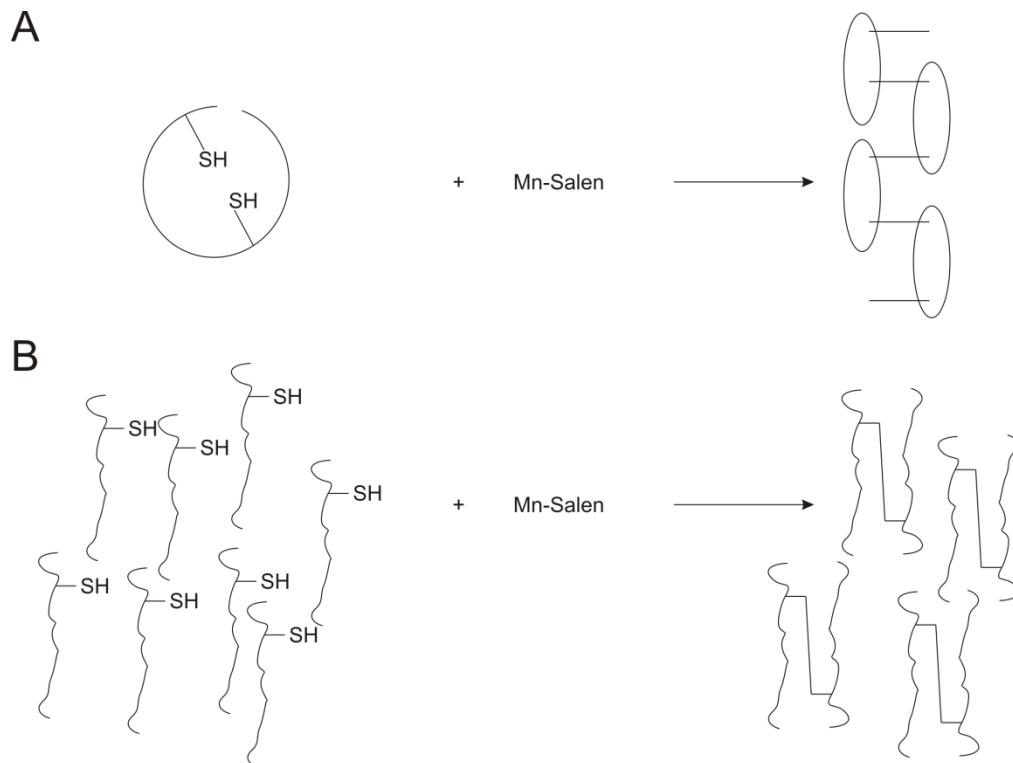


Abbildung 29: Vergleich der Konjugation von Sym2-Varianten im nativen (A) und hSym2-Varianten im denaturierten Zustand (B).

#### 4.3.3.1 Klonierung der Varianten

Der Beschluss, die einzelnen Varianten in Hälften zu exprimieren, erleichtert auch die Klonierung, da die jeweiligen Mutationen durch die Verwendung eines *Halbarrel*-Gens nur einmal eingefügt werden müssen. Das zur Klonierung der Varianten benötigte *Halbarrel*-Gen *hsym2* lag zu Beginn dieser Arbeit bereits im pET24a(+) -Vektor vor (Sperl 2009). Dieser Vektor pET24a(+) -*hsym2* wurde verwendet, um die gewünschten Mutationen über konventionelle Amplifikation (3.2.2), OE-PCR (3.2.3.1) oder mittels QuikChange<sup>TM</sup>-Mutagenese (3.2.3.2) einzuführen. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 14 aufgeführt.

**Tabelle 14: Primer zur Klonierung der hSym2-Varianten im pET24a(+) -Vektor durch konventionelle PCR, QuikChange™ -Mutagenese oder OE-PCR.**

hSym2-Variante	5'-Primer	3'-Primer
D9C (Amplifikation)	5'HisFC_D9C	T7T
	1.PCR: T7P	3'HisFC_T50C
T50C (OE-PCR)	2.PCR: 5'HisFC_T50C	T7T
	OE-PCR: T7P	T7T
S23C	fwdS23C	revS23C
K25C	fwdK25C	revK25C
K58C	fwdK58C	revK58C

Die Basenabfolge der Vektoren wurde über Sequenzierung (3.2.13) mit dem vektorspezifischen Primer T7P bestätigt.

#### 4.3.3.2 Expression und Reinigung

Zur Herstellung der Cys-Varianten von hSym2 wurden NEB T7 Express Rosetta-Zellen (2.4) mit den entsprechenden Konstrukten transformiert (3.1.3), in LB-Medium mit Kanamycin bei 37 °C angezogen und die Genexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert (3.3.2).

Um einer Oxidation der Cysteine durch Luftsauerstoff vorzubeugen, wurden alle Cystein-Varianten von hSym2 durch Metallchelat-Affinitätschromatographie (3.3.3) in Anwesenheit von 1 mM TCEP gereinigt. Fraktionen, die das Protein in reiner Form enthielten, wurden vereinigt und sofort weiterverwendet.

#### 4.3.4 Ellmans Test auf reaktive Cysteine

Um zu überprüfen, ob die Cysteine der erstellten Proteinvarianten reaktiv und sterisch zugänglich sind, wurde nach der Reinigung ein Ellmans Test (3.3.5) durchgeführt. Dieser Test beruht auf der Reaktion von DTNB mit reduzierten Cysteinen in einer Sulfhydrylaustauschreaktion, wodurch ein gelbes Thiophenolat freigesetzt wird (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Ellmans Reaktion zum Nachweis reaktiver Cysteine.**

Da für den Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  des Thiophenolations in der Literatur unterschiedliche Werte existieren (Ellman 1959; Riddles *et al.* 1983) wurde zunächst mit Cystein eine Eichgerade erstellt. Anschließend wurden die Proteinvarianten hSym2-D9C, hSym2-S23C, hSym2-K25C, hSym2-T50C und hSym2-K58C analysiert. Die Proteine wurden zur Analyse mittels PD-10 Säulen in 0,1 M NaP, pH 8,0, umgepuffert (3.3.9), um das TCEP aus der Reinigung, welches den Ellmans Test stören würde, zu entfernen. Anschließend wurden die Proteine einkonzentriert (3.3.8), wobei die Konzentrationen zwischen 100 und 1000  $\mu\text{M}$  eingestellt wurden, um sicherzustellen, dass die erhaltenen Werte in der Eichkurve liegen. Tabelle 15 zeigt die mittels Absorptionsspektroskopie bestimmten Proteinkonzentrationen und die Ergebnisse der Ellmans Tests.

**Tabelle 15: Anteil reaktiver Cysteine von verschiedenen hSym2-Varianten.**

Proteinvariante	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]		Anteil reaktiver Cysteine
	Protein	reaktive Cysteine	
hSym2-D9C	489	206	42 %
hSym2-K25C	290	230	79 %
hSym2-T50C	434	68	16 %
hSym2-K58C	308	189	61 %
hSym2-S23C	275	237	86 %

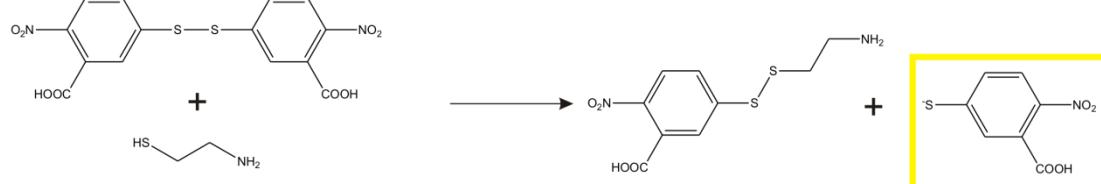
Zur Bestimmung wurde die Konzentration der reaktiven Cysteine mittels Ellmans Test ermittelt und mit der photometrisch bestimmten Proteinkonzentration verglichen.

Die Variante hSym2-S23C zeigt mit 86 % die beste Reaktivität, die Varianten hSym2-D9C und hSym2-T50C sind mit nur 16 bzw. 42 % reaktiven Cysteinen auf den ersten Blick jedoch für eine Konjugation mit dem Mn-Salen Liganden ungeeignet. Der hohe Anteil an reaktiven Cysteinen von hSym2-S23C zeigt jedoch, dass eine etwaige Oxidation der Cysteine während der Expression und Reinigung der Proteine ausgeschlossen werden kann. Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Cysteine bei den Varianten hSym2-D9C und hSym2-T50C nicht für das Ellmans Reagenz zugänglich sind. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden die Proteine hSym2-D9C und hSym2-T50C zusätzlich mit einem modifizierten Ellmans Test mit Cystamin als Sulhydrylgruppenübertragungsreagenz analysiert (Abbildung 31).

A



B

**Abbildung 31: Ellmans Test unter Zugabe von Cystamin.**

A: Reaktion von Cystamin mit reaktiven Cysteinen unter Freisetzung von Thioethanolamin.

B: Thioethanolamin reagiert mit DTNB in Lösung und setzt das gelbe Thiophenolat frei.

Bei diesem Test reagieren die reaktiven Cysteine der Proteine zunächst mit Cystamin, wodurch Thioethanolamin freigesetzt wird. Cystamin ist kleiner und nicht negativ geladen wie DTNB und besitzt dadurch vor allem für Cysteine in der Nähe von negativ geladenen Gruppen eine verbesserte Zugänglichkeit. Das entstehende Thioethanolamin reagiert anschließend in Lösung mit dem DTNB, wodurch wiederum das gelbe Thiophenolat entsteht. Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse des modifizierten Ellmans Tests im Vergleich zum Standard Ellmans Test.

**Tabelle 16: Vergleich der Ellmans Tests mit und ohne Cystamin der Varianten hSym2-D9C und hSym2-T50C.**

Proteinvariante	-Cystamin	+Cystamin
hSym2_D9C	42 %	81 %
hSym2_T50C	16 %	56 %

Die Ergebnisse der Ellmans Tests mit Cystamin zeigen, dass die Cysteine derjenigen Proteinvarianten, welche im normalen Ellmans Test einen geringen Anteil an reaktiven Cysteinen zeigten, durchaus reaktive Cysteine besitzen. Sie zeigen aber auch dass die Zugänglichkeit, je nach Variante, sehr unterschiedlich sein kann. Da die Konjugation jedoch ohnehin unter denaturierenden Bedingungen stattfinden soll, stellt die Zugänglichkeit kein Problem dar und alle Varianten können für eine Konjugation verwendet werden.

#### 4.3.5 Konjugation der Varianten mit Mn-Salen

Zur Konjugation mit Mn-Salen wurden die einzelnen Varianten frisch gereinigt und direkt weiterverwendet, um eine Oxidation der reaktiven Cysteine durch Luftsauerstoff weitgehend zu vermeiden. Zunächst musste wie schon vor dem Ellmans Test das noch im Reinigungspuffer enthaltene TCEP entfernt werden, da dieses die während der

Konjugationsreaktion gebildeten Disulfidbrücken reduzieren und so den Liganden wieder freisetzen würde. Dazu wurden die Proteine über eine PD-10 Säule in 50 mM KP, 5 M GdnHCl umgepuffert (3.3.9) und anschließend durch Zugabe von festem GdnHCl vollständig denaturiert. Die denaturierten Proteine wurden dann unter Stickstoffatmosphäre mit Mn-Salen konjugiert (3.3.6). Anschließend wurde ein Aliquot für die Analyse der Konjugationsreaktion entnommen. Um die Verlinkung der beiden Hälften durch den Mn-Salen Liganden nachzuweisen, wurden die Produkte der Konjugationsreaktionen mittels analytischer Gelfiltration unter denaturierenden Bedingungen (3.6.3) analysiert. Da sich bei der denaturierenden Gelfiltration im Vergleich zur Gelfiltration unter Standardbedingungen die Retentionszeiten aber sehr stark verändern, wurde zunächst mit bekannten Proben eine Kalibrierung durchgeführt. Dazu wurden Sym2 und hSym2 durch Zugabe von festem GdnHCl bis zur Sättigung denaturiert und ihre Retention auf der Gelfiltrationssäule im denaturierenden Puffer analysiert. Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der Kalibrierung mit denaturiertem Sym2 und hSym2.

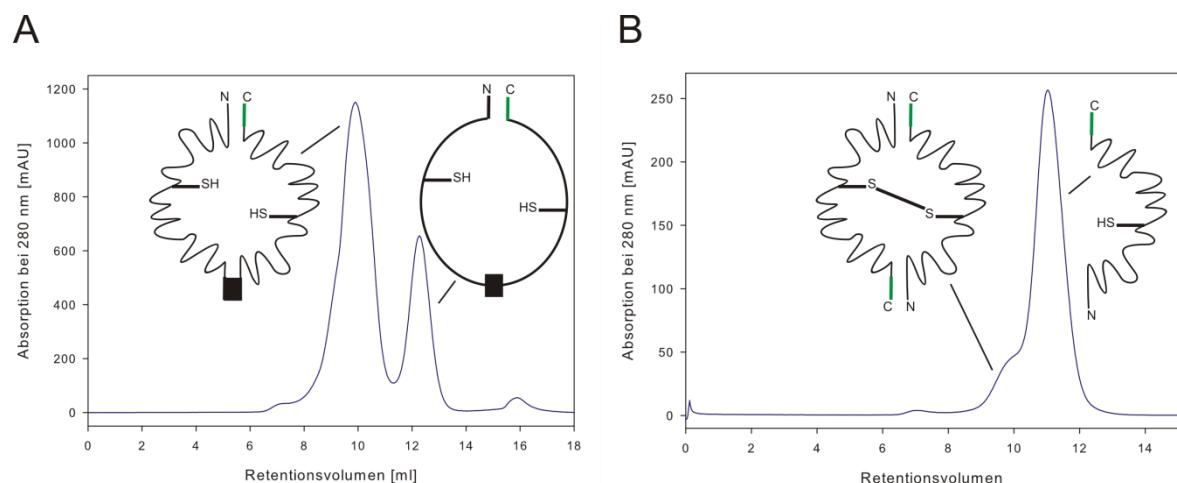
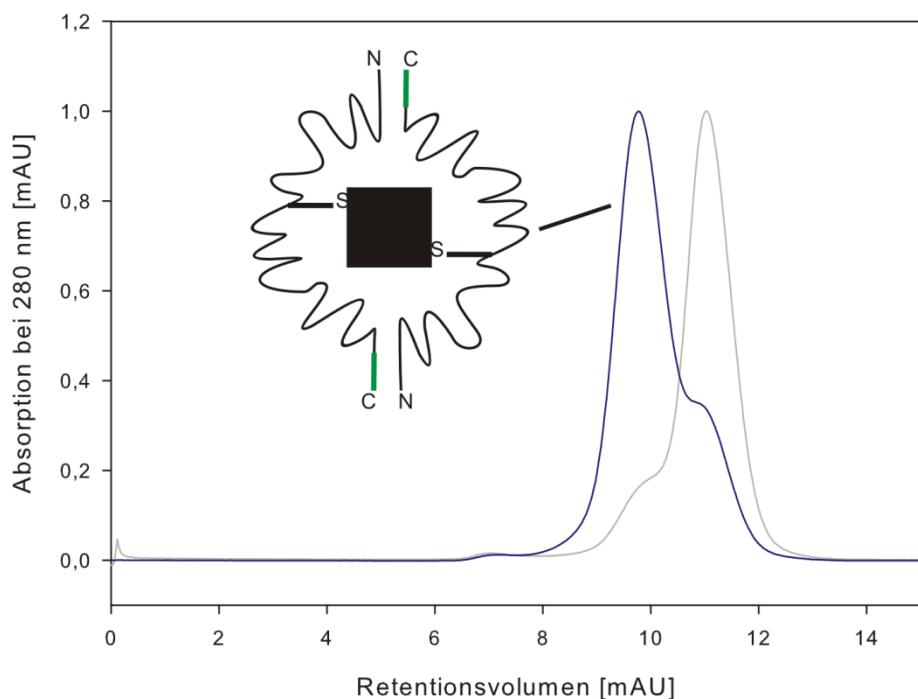


Abbildung 32: Kalibrierung der Gelfiltrationssäule S75 unter denaturierenden Bedingungen mit Sym2-(S23C)<sub>2</sub> (A) und hSym2-S23C (B).

Durch seine enorme kinetische Stabilität (Carstensen *et al.* 2012) ist im Chromatogramm von Sym2-(S23C)<sub>2</sub> neben dem Peak für das denaturierte Protein bei 10 ml auch noch ein zweiter Peak für das gefaltete Protein bei 12,5 ml vorhanden (Abbildung 32A). Das Chromatogramm des entfalteten Halbbarrel Proteins hSym2-S23C weist einen symmetrischen Peak mit einer leichten Schulter auf, deren Retentionsvolumen dem des denaturierten Barrels Sym2-S23C<sub>2</sub> entspricht. Dies ist vermutlich auf die Bildung von Disulfidbrücken zwischen zwei denaturierten Halbbarrels zurückzuführen, da nicht-kovalente Assoziationen durch GdnHCl solubilisiert werden sollten. Die Bildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Hälften vermindert zwar den Anteil an konjugierbaren Hälften, aufgrund des

geringen Anteils an der Gesamtmenge stellt dies aber kein Problem dar. Nach der Kalibrierung wurden die jeweils direkt nach der Konjugation der verschiedenen hSym2-Varianten entnommenen Aliquots auf die S75 Gelfiltrationssäule aufgetragen und unter denaturierenden Bedingungen analysiert (3.6.3). Anschließend wurden die Retentionszeiten mit denen der Kalibrierung verglichen. Abbildung 33 zeigt exemplarisch das Chromatogramm der Probe hSym2-S23C\_Mn-Salen.



**Abbildung 33: Gelfiltrationslauf unter denaturierenden Bedingungen von hSym2-S23C nach Konjugation mit Mn-Salen (blau).**

Als Vergleich ist in grau das Elutionsprofil von nicht-konjugiertem hSym2-S23C gezeigt. Die Absorption wurde normiert.

Der Vergleich der Gelfiltrationsläufe von konjugiertem hSym2-S23C\_Mn-Salen mit nicht-konjugiertem hSym2-S23C zeigt eindeutig eine überwiegende doppelte Verlinkung. Das Retentionsvolumen verschiebt sich durch die Reaktion mit Mn-Salen von 12 ml auf 10 ml, was dem Retentionsvolumen des denaturierten *Barrels* Sym2-S23C<sub>2</sub> entspricht. Diese Verschiebung kann nur durch Verlinkung der beiden Hälften zustande kommen. Prinzipiell wäre dazu ebenfalls eine katalytische Oxidation der Cysteine durch den Mn-Salen-Liganden zu Disulfidbrücken denkbar. Dies kann aber ausgeschlossen werden, da das Konjugationsprodukt die Absorptionseigenschaften des Mn-Salen-Liganden aufweist. Ein Teil der Proteine wurde nicht verlinkt, was an der leichten Schulter hin zu höheren Retentionszeiten erkennbar ist. Hierfür gibt es mehrere Erklärungen: Zum einen kann ein

Teil der Cysteine oxidiert worden sein, wodurch keine Reaktivität mehr vorhanden war. Zum anderen wurde Mn-Salen in stöchiometrischer Menge eingesetzt, wodurch sich bei kleineren Ungenauigkeiten in der Konzentrationsbestimmung des Proteins ein Unterschuss ergeben kann. Um dies zu verhindern wurde in folgenden Konjugationsreaktionen zunächst eine stöchiometrische Menge, und nach einer Stunde weitere 10% an Konjugationsreagenz zugegeben, um sicherzustellen, dass vollständig konjugierte Proteine erhalten werden. Es zeigte sich, dass alle Varianten im denaturierten Zustand sehr gut mit Mn-Salen konjugiert werden können. Das Hauptprodukt der Konjugationsreaktion bilden in jedem Fall zwei über Mn-Salen verlinkte hSym2-Hälften.

Anschließend wurden die verlinkten Halbbarrels rückgefaltet. Dazu wurde die Proteinlösung zunächst mit 50 mM KP, pH 7,5 auf etwa 2 M GdnHCl verdünnt, wodurch einerseits die Rückfaltung einsetzen sollte, andererseits aber die Konzentration an GdnHCl noch so groß sein sollte, dass eine Aggregation verhindert wird. Nach Inkubation bei RT für 30 min wurde das restliche GdnHCl durch extensive Dialyse gegen 3 mal 5 Liter 50 mM KP, pH 7,5 entfernt. Trotz schrittweiser Rückfaltung der konjugierten Proteine entstanden teilweise Aggregate, was durch eine Trübung der Proteinlösung erkennbar war. Insgesamt stellte die Bildung von Aggregaten kein großes Problem dar, da sie einerseits in geringen Mengen anfielen und andererseits durch Zentrifugation entfernt werden konnten, sodass eine homogene Lösung von gefalteten, mit Mn-Salen verknüpften hSym2-Hälften erhalten werden konnte (Abbildung 34).

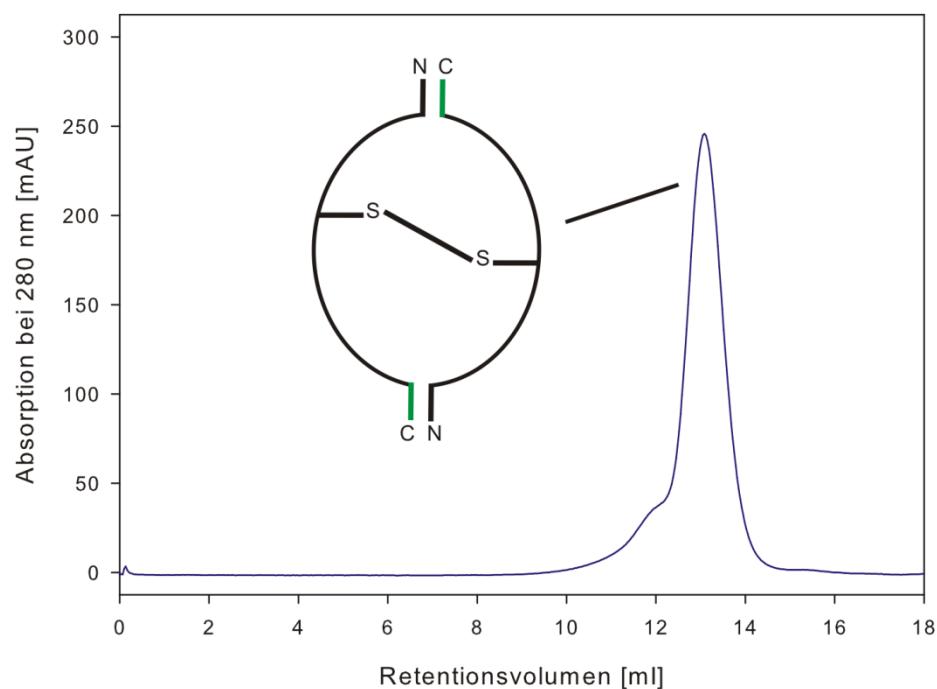
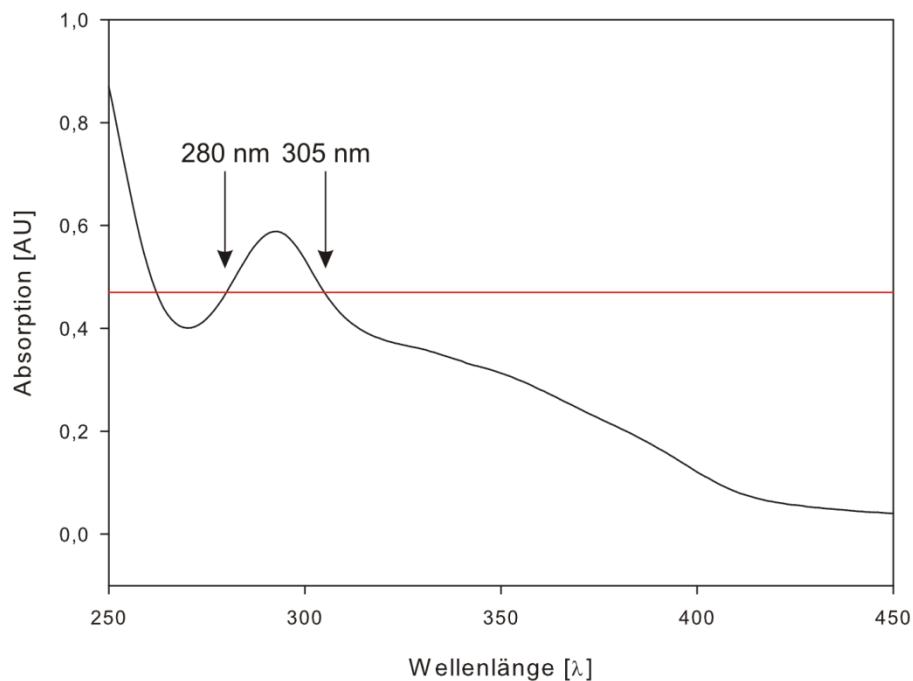


Abbildung 34: Gelfiltrationslauf von rückgefaltetem hSym2-S23C\_Mn-Salen unter nativen Bedingungen.

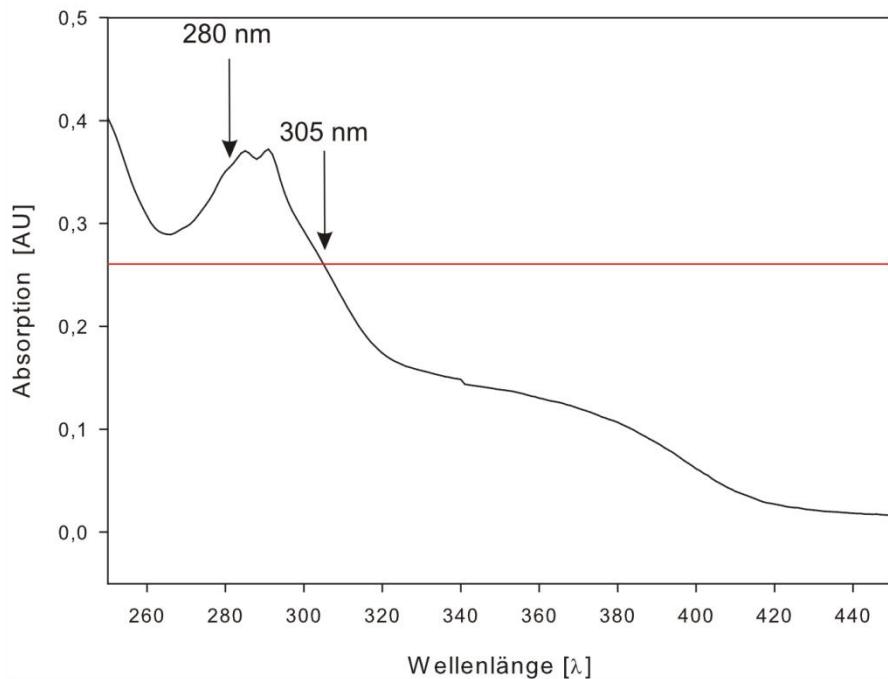
Für den Einsatz in der Oxidation von Thioanisol musste anschließend noch die Konzentration der jeweiligen Varianten bestimmt werden. Typischerweise wird die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Da der Mn-Salen-Ligand allerdings ebenfalls eine Absorption bei 280 nm aufweist (Abbildung 35) muss dieser Anteil an der Absorption berücksichtigt werden.



**Abbildung 35: Absorptionsspektrum des Liganden Mn-Salen.**

Der Ligand weist mit einem schmäleren Peak bei 295 nm zwischen 270 und 450 nm eine breite Absorptionsschulter auf. Die Absorption besitzt bei 280 nm den gleichen Betrag wie bei 305 nm, was durch die durchgezogene rote Linie verdeutlicht wird.

Wie Abbildung 35 zeigt, weist der Mn-Salen-Ligand bei 305 nm dieselbe Absorption auf wie bei 280 nm. Da Proteine normalerweise bei 305 nm nicht absorbieren, wurde zur Korrektur um die Absorption des Mn-Salen-Liganden der Wert bei 305 nm von der Absorption des Konjugats bei 280 nm abgezogen. Der verbleibende Anteil wurde alleine dem Protein zugerechnet und mit dem jeweiligen Extinktionskoeffizienten des reinen Proteins bei 280 nm wurde daraus schließlich die Konzentration an Konjugat bestimmt. Abbildung 36 zeigt das Spektrum des Konjugats hSym2-D9C\_Mn-Salen.



**Abbildung 36: Absorptionsspektrum des Konjugats hSym2-D9C\_Mn-Salen.**

Das Spektrum weist bei hohen Wellenlängen das Spektrum des Liganden Mn-Salen auf. Unter 300 nm kommt es zu einer Überlagerung der Spektren des Proteins und des Liganden. Zur Konzentrationsbestimmung wird die Absorption bei 305 nm, die durch die durchgezogene rote Linie verdeutlicht wird, von der Absorption bei 280 nm subtrahiert.

Zur Überprüfung des Ergebnisses aus der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde zusätzlich ein Bradford-Test durchgeführt. Die erhaltenen Werte stimmten sehr gut mit denen aus der photometrischen Bestimmung überein (Daten nicht gezeigt).

#### 4.3.6 Oxidation von Thioanisol

Die katalytische Oxidation von Thioanisol durch artifizielle Metalloproteine wird durch verschiedene Literaturstellen beschrieben (Ozaki & Demontellano 1995; Ma & Lu 1999; Ohashi *et al.* 2003; Carey *et al.* 2004; Ueno *et al.* 2007). Zur Etablierung eines Verfahrens zur Oxidation von Thioanisol durch Sym2-Metalloproteine und anschließender Analyse des Produktgemisches wurde in abgewandelter Form nach Ozaki & Demontellano (1995) und Carey *et al.* (2004) vorgegangen. Die Sulfoxidation von Thioanisol wurde in 50 mM KP, pH 7,5 durchgeführt. Dazu wurden zunächst Substrat (Thioanisol), Katalysator (hSym2\_Mn-Salen-Varianten) und Puffer für 30 Minuten bei 4 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des Oxidationsmittels in Puffer gestartet. Die Reaktionen mit einem Gesamtvolumen von 200 µl enthielten 0,13 mM Katalysator, 5 mM Substrat und 5 mM Oxidationsmittel. Nach 10 Minuten Rühren bei 4 °C wurden die Reaktionen durch Zugabe

von 250 µl Dichlormethan gestoppt und Acetophenon als interner Standard zugegeben. Das Produktgemisch wurde viermal mit 250 µl Dichlormethan extrahiert, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> getrocknet und im Stickstoffstrom eingeengt. Aufgrund der Flüchtigkeit des Substrates und der Produkte war es wichtig gerade soweit einzuhängen, dass das Dichlormethan entfernt war. Der Rückstand wurde in Hexan:Isopropanol (90:10) aufgenommen und mittels einer chiralen HPLC-Säule (Chiralcel OD) (3.6.4) analysiert.

#### 4.3.6.1 Oxidation ohne Katalysator

Um die Trennleistung der Säule zu überprüfen wurde zunächst Thioanisol ohne Katalysator unter Verwendung von NaIO<sub>4</sub> als Oxidationsmittel zum racemischen Produktgemisch oxidiert. Die Produkte wurden anschließend gemeinsam mit Edukt und dem internen Standard Acetophenon auf die Säule aufgetragen. Abbildung 37 zeigt das Chromatogramm des Gemisches.

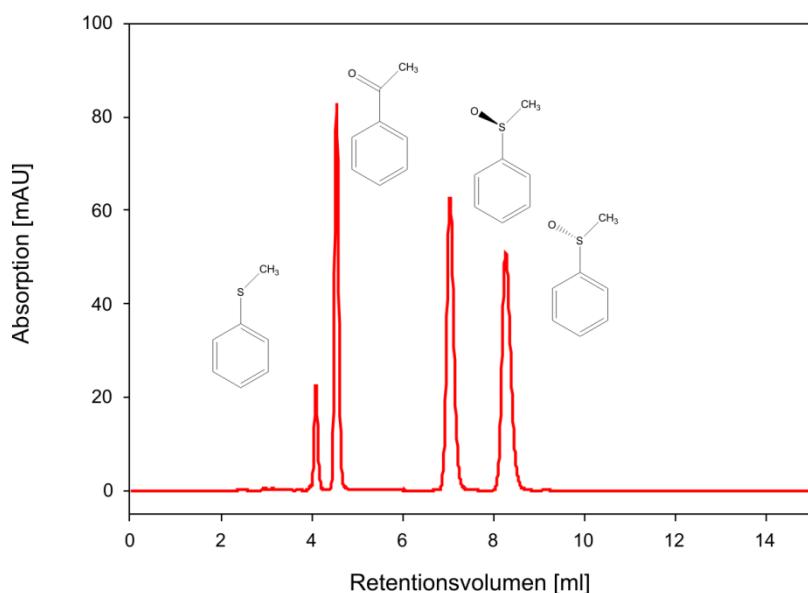


Abbildung 37: Chromatogramm eines Gemisches aus Thioanisol, Acetophenon und racemischem Methylphenylsulfoxid zur Analyse der Trennleistung der Chiralcel OD Säule.

Der interne Standard Acetophenon wurde verwendet, um Aussagen über die Umsatzrate der Katalysatoren zu ermöglichen. Dazu wurden bekannte Verhältnisse von Thioanisol, Acetophenon und Methylphenylsulfoxid (racemisch) wie oben extrahiert und nach Abblasen des Dichlormethans analysiert. Die erhaltenen Korrekturfaktoren wurden nachfolgend verwendet, um die jeweiligen Peakflächen zu korrigieren und so die Umsatzraten zu bestimmen. Tabelle 17 zeigt die bestimmten Korrekturfaktoren.

**Tabelle 17: Korrekturfaktoren zur Bestimmung der Reaktionsrate mittels internem Standard.**

Verhältnis	Korrekturfaktor
Thioanisol : Acetophenon	1,98
Methylphenylsulfoxid : Acetophenon	1,04

#### 4.3.6.2 Katalytische Oxidation durch Mn-Salen und hSym2-MnSalen-Hybridproteine

Zunächst wurde die Oxidation von Thioanisol wie oben beschrieben, mit dem Unterschied, dass Mn-Salen als Katalysator eingesetzt wurde, durchgeführt. Anschließend wurden die mit Mn-Salen konjugierten hSym2-Varianten auf ihre Fähigkeit zur enantioselektiven Katalyse der Oxidation von Thioanisol analysiert. Abbildung 38 zeigt exemplarisch das Chromatogramm der erhaltenen Reaktionsprodukte unter Verwendung von hSym2-D9C\_Mn-Salen als Katalysator.

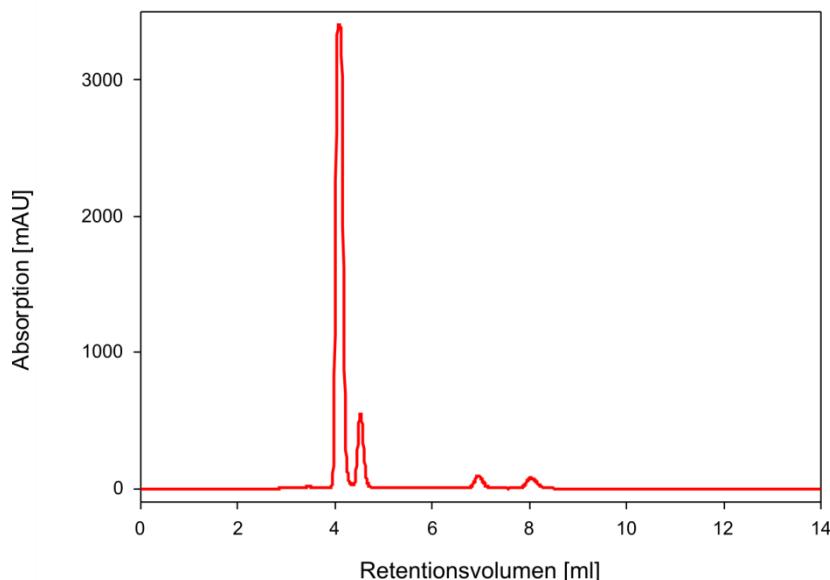


Abbildung 38: Chromatogramm des Produktgemisches der Sulfoxidation von Thioanisol unter Verwendung von hSym2-D9C\_Mn-Salen als Katalysator.

Tabelle 18 fasst die Ergebnisse der Reaktionen mit den Katalysatoren Mn-Salen, apo-hSym2-D9C, hSym2-D9C\_Mn-Salen, hSym2-S23C\_Mn-Salen, hSym2-K25C\_Mn-Salen, hSym2-T50C\_Mn-Salen und hSym2-K58C\_Mn-Salen zusammen.

**Tabelle 18: Katalysergebnate und Enantioselektivität verschiedener hSym2\_Mn-Salen-Varianten.**

Katalysator	Rate [10 <sup>-3</sup> min <sup>-1</sup> ]	ee [%]
Mn-Salen (Tris pH 7.5)	51	0
apo-hSym2-D9C (Tris pH 7.5)	6	nicht ermittelt
hSym2-D9C_Mn-Salen (Tris pH 7.5)	104	2,2 (S)
hSym2-S23C_Mn-Salen (KP pH 7.5)	nicht ermittelt	0,4 (R)
hSym2-K25C_Mn-Salen (KP pH 7.5)	nicht ermittelt	1,2 (S)
hSym2-T50C_Mn-Salen (KP pH 7.5)	nicht ermittelt	0,6 (S)
hSym2-K58C_Mn-Salen (KP pH 7.5)	nicht ermittelt	0,8 (S)

Alle analysierten Katalysatoren weisen niedrige Katalyseraten und sehr geringe Enantioselektivitäten auf, was darauf schließen lässt, dass die Proteinumgebung bei den getesteten Varianten nicht in der Lage ist Stereoinformation zu induzieren. Da Carey *et al.* (2004) bei Durchführung der Reaktion in Ammoniumacetat (AmOAc), pH 5,1, bessere Enantioselektivitäten erhielten, könnte aber auch die Wahl des Lösungsmittels entscheidend sein. Aus diesem Grund wurde beschlossen die Variante hSym2-D9C\_Mn-Salen in AmOAc, pH 5,1 bzw. unter Zusatz von anderen Lösungsmitteln zu testen. Tabelle 19 zeigt die Resultate der Katalyse unter Verwendung von verschiedenen Lösungsmitteln und Puffern. Bei den organischen Lösungsmitteln wurde vor der Verwendung kontrolliert ob die Proteine in Lösung bleiben.

**Tabelle 19: Katalysergebnate und Enantioselektivität von hSym2-D9C\_Mn-Salen in verschiedenen Lösungsmitteln.**

Katalysator hSym2-D9C_Mn-Salen	Rate [10 <sup>-3</sup> min <sup>-1</sup> ]	ee [%]
Tris pH 7.5	104	2,2 (S)
AmOAc pH 5.1	38	3,4 (S)
Tris pH 7.5, 11 % i-Butanol	79	3,6 (S)
Tris pH 7.5, 9 % 1-Butanol	92	4,0 (S)
Tris pH 7.5, 13 % 2-Butanol	86	3,4 (S)
Tris pH 7.5, 50 % Ethanol	22	0

Durch die Verwendung von AmOAc, pH 5,1 und Zusatz von Lösungsmitteln konnten die ee-Werte zwar etwas verbessert werden, die Umsatzraten des Katalysator brachen dagegen relativ stark ein, sodass insgesamt keine zufriedenstellende Verbesserung erreicht werden konnte. Die Reduktion des pH-Wertes und die Zugabe von Lösungsmitteln reduzieren die Aktivität des Oxidationsmittels Wasserstoffperoxid. Dies führt zu einer Verlangsamung der Reaktion und zu einer leichten Erhöhung der Selektivität. Da die Grundselektivität aber zu

niedrig war, reicht dies nicht aus um einen guten Katalysator zu erhalten. Aus diesem Grund wurden weitere Varianten hergestellt und analysiert. Einerseits wurden, um die Stereodifferenzierung zu verbessern, in der putativen Umgebung des Liganden große, hydrophobe Reste eingeführt, andererseits wurden ausgewählte Reste zu Histidin mutiert, welche als Base das Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid selektiv aktivieren und so sowohl Umsatzraten als auch Selektivität verbessern sollten. Tabelle 20 gibt einen Überblick über die weiteren Varianten und fasst die zur Erstellung verwendeten Oligonukleotide zusammen.

**Tabelle 20: hSym2-D9C-Varianten zur Verbesserung der Enantioselektivität.**

hSym2-Variante	5'-Primer	3'-Primer
S23Y	fwd S23Y	rev S23Y
L48F	fwd L48F	rev L48F
T50Y	fwd T50Y	rev T50Y
D55V	fwd D55V	rev D55V
K58Y	fwd K58Y	rev K58Y
S101Y	fwd S101Y	rev S101Y
D55H	fwd D55H	rev D55H
K58H	fwd K58H	rev K58H
L48H	fwd L48H	rev L48H
S101H	fwd S101H	rev S101H
S23H	fwd S23H	rev S23H
T50H	fwd T50H	rev T50H

Die Varianten wurden wie oben beschrieben (4.3.3) kloniert, gereinigt und konjugiert. Anschließend wurde sie auf ihre Katalyseigenschaften getestet (Tabelle 21).

**Tabelle 21: Katalysergebnate von hSym2-D9C\_Mn-Salen-Varianten mit Tyr/Phe/Val- bzw. His-Austauschen zur Verbesserung der Enantioselektivität.**

<b>hSym2-D9C_Mn-Salen-Varianten (Tris)</b>	<b>Rate [10<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>]</b>	<b>ee [%]</b>
S23Y	69	4,0 (S)
L48F	238	3,0 (S)
T50Y	104	4,4 (S)
D55V	24	1,2 (S)
K58Y	78	3,4 (S)
S101Y	64	4,2 (S)
D55H	40	4,6 (S)
K58H	53	3,7 (S)
L48H	34	5,0 (S)
S101H	38	4,8 (S)
S23H	94	3,2 (S)
T50H	32	3,4 (S)

Auch durch diese Varianten konnte keine signifikante Verbesserung der ee-Werte und der Umsatzraten erreicht werden. Da das Ziel dieses Abschnitts war, die C2-Symmetrie von Sym2 zur Reduktion der Übergangszustände auszunutzen, um hohe Enantioselektivitäten zu erreichbaren, müssen die Katalysatoren an der besten Variante von Carey *et al.* (2004) gemessen werden. Tabelle 22 vergleicht die Literaturergebnisse mit denen ausgewählter hSym2-D9C\_Mn-Salen-Varianten.

**Tabelle 22: Vergleich der Katalyseeigenschaften ausgewählter hSym2-D9C\_Mn-Salen-Varianten mit Mn 1 apo-Mb(Y103C) und Mn 1 apo-Mb(L72C/Y103C).**

<b>Katalysator</b>	<b>Rate [10<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>]</b>	<b>ee [%]</b>
hSym2-D9C_Mn-Salen (Tris pH 7.5)	104	2,2 (S)
hSym2-D9C_Mn-Salen (AmOAc pH 5.1)	38	3,4 (S)
L48F	238	3,0 (S)
L48H	34	5,0 (S)
<b>Mn 1 apo-Mb(Y103C)</b>	<b>51</b>	<b>12 (S)</b>
<b>Mn 1 apo-Mb(L72C/Y103C)</b>	<b>390</b>	<b>51 (S)</b>

Der Katalysator Mn 1 apo-Mb(L72C/Y103C) übertrifft selbst die besten hSym2-D9C\_Mn-Salen-Varianten bei weitem. Somit konnte das Ziel, die C2-Symmetrie von Sym2 zur Erzeugung von enantioselektiven Hybridkatalysatoren auszunutzen, nicht erreicht werden.

### 4.3.7 Kristallstruktur von hSym2-D9C\_Mn-Salen

Zur Aufklärung der Ursachen für die fehlende Enantioselektivität der durch Mn-Salen-Hybridproteine katalysierten Reaktionen sollte hSym2-D9C\_Mn-Salen kristallisiert und seine Struktur gelöst werden. Dazu wurde hSym2-D9C erneut frisch in Anwesenheit von TCEP (3.3.2) gereinigt. Anschließend wurde das Protein wie unter (3.3.6) beschrieben umgepuffert, denaturiert und mit Mn-Salen-Ligand konjugiert. Nach Rückfaltung durch Mischung mit 50 mM KP, pH 7,5 und Dialyse gegen 50 mM KP wurden Aggregate durch Zentrifugation abgetrennt und das konjugierte Protein über präparative Gelfiltration (3.3.4) weiter gereinigt. Fraktionen, welche das Protein in hoher Konzentration enthielten, wurden vereinigt und gegen 10 mM KP, pH 7,5 dialysiert. Die Proteinlösung wurde auf 17,9 mg/ml konzentriert und damit Kristallisierungsansätze pipettiert. Es wurden die Screens PEGION 1+2 und PEGRx 1+2 (Hampton Research) in 96-well-Platten nach dem *hanging-drop*-Verfahren angesetzt, indem mithilfe eines Pipettierroboters 0,3 µl Proteinlösung mit 0,3 µl Pufferlösung gemischt wurden. Das Volumen der Reservoirlösung betrug 100 µl. Nach einer Woche waren in der Bedingung 0,04 M Citronensäure/0,06 M BIS-TRIS Propan (pH 6,4), 20 % w/v Polyethylenglycol 3350 Kristalle gewachsen, die an der PXIII Beamlne der SLS bis 2,3 Å streuten. Die Struktur wurde durch Dr. Chitra Rajendran unter Verwendung der Struktur von Sym2 als Modell gelöst (3.6.6). Tabelle 23 zeigt die Statistiken der Datenprozessierung und Verfeinerung.

**Tabelle 23: Datenprozessierung und Verfeinerungsstatistik von hSym2-D9C\_Mn-Salen.**  
hSym2-D9C\_Mn-Salen

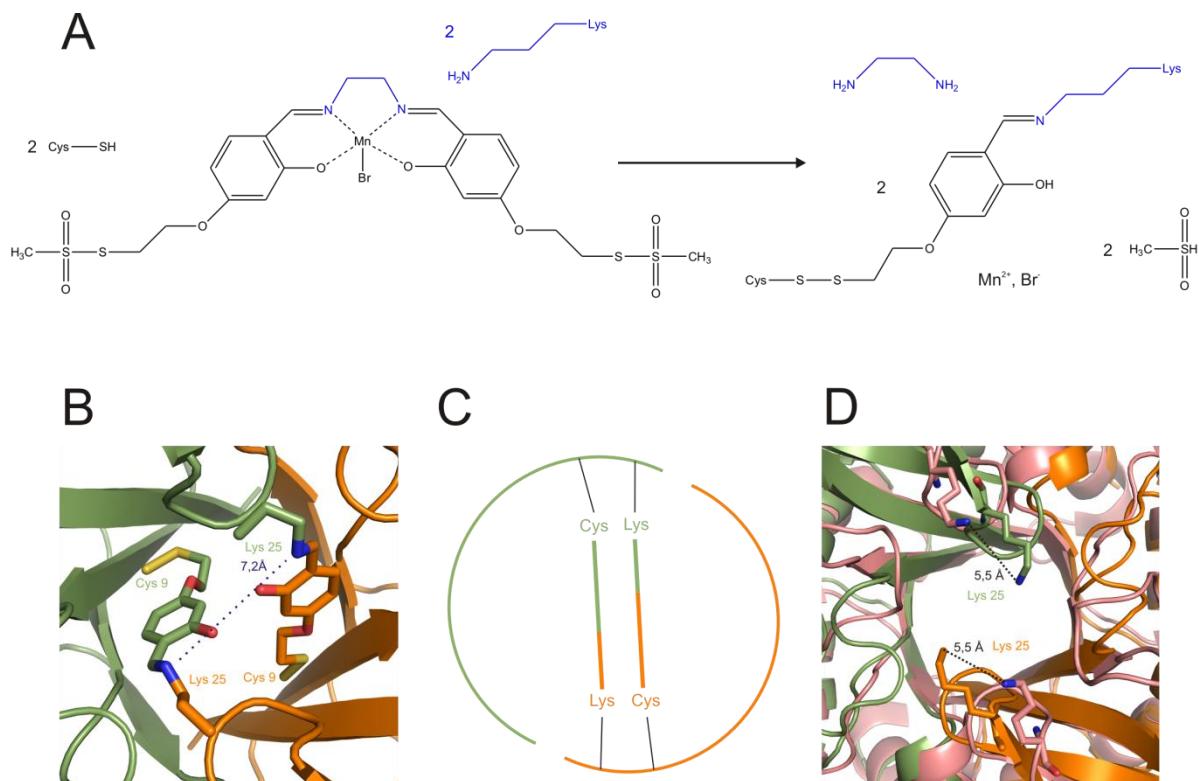
Datenprozessierung	
Raumgruppe	P212121
Elementarzelle	
a, b, c (Å)	49,99; 64,47; 74,76
a, b, c (°)	90; 90; 90
Auflösung (Å)	2,324 – 41,56
R <sub>sym</sub> bzw. R <sub>merge</sub>	0,128
I / σI	10,00
Vollständigkeit (%)	99,2

---

Verfeinerungsstatistik	
Auflösung (Å)	2.3
Zahl der Reflexe	63024
R-Faktor (%) / Rfree (%)	0,2165 / 0,2851
Anzahl Atome	
Protein	1741
Wasser	39
<i>rmsd</i>	
Bindungslängen (Å)	0,009
Bindungswinkel (°)	1,37

---

Die Struktur von hSym2-D9C\_Mn-Salen zeigt zwei zu einem  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel zusammengelagerte Proteinketten, deren Cysteine jeweils eine Disulfidbrücke zu einem Liganden aufweisen. Überraschenderweise werden die beiden Cysteine aber nicht miteinander verknüpft, da der Mn-Salen-Ligand in der Struktur nicht intakt vorliegt. Ein intakter Mn-Salen-Ligand würde aus zwei Benzaldehyd-Einheiten, die durch Ethylendiamin mittels Schiff-Base-Bindungen zum Salen verbrückt werden, bestehen. Statt den verbrückenden Schiff-Base-Bindungen liegen in der Struktur jedoch Schiff-Base-Bindungen zwischen den  $\varepsilon$ -Aminogruppen der Lysinreste K25 und einzelnen Benzaldehyd-Untereinheiten vor. Die beiden Proteinketten sind, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der analytischen Gelfiltration unter denaturierenden Bedingungen (3.6.3), miteinander verbunden, da jeweils der Cysteinrest 9 der einen Kette mit dem Lysinrest 25 der anderen Kette durch eine Benzaldehydgruppe verlinkt wird (Abbildung 39A).



**Abbildung 39: Analyse der Struktur von hSym2-D9C\_Mn-Salen.**

(A) Reaktion von Mn-Salen mit Aminosäureresten von hSym2-D9C. (B) Struktur von hSym2-D9C\_Mn-Salen; die beiden Proteinketten sind orange und grün, die Benzaldehydgruppen nach der Farbe ihres Cysteinteils eingefärbt; der Abstand zwischen den N-Atomen der Schiff-Base Bindungen ist angegeben. (C) Schematische Darstellung der Verlinkung der beiden hSym2-D9C-Proteinketten durch Benzaldehydliganden. (D) Überlagerung der Struktur von hSym2-D9C\_Mn-Salen (orange und grün) mit der Struktur von Sym2 (lachsfarben). Die Verschiebungen der N-Atome der Lysinreste K25 sind angegeben.

Das Mn-Ion, welches normalerweise durch die N- und O-Atome des Mn-Salen-Liganden komplexiert wird, ist in der Struktur nicht aufgelöst. Bei Betrachtung der Lage der entsprechenden N- und O-Atome in der Struktur von hSym2-D9C\_Mn-Salen erkennt man, dass ihre räumliche Anordnung sehr stark von einer für die Komplexierung von Mn idealen Konformation abweicht. Der Abstand zwischen den Schiff-Base-N-Atomen der beiden Lysine ist mit 7,2 Å so groß, dass keine Komplexierung von Mn mehr möglich ist (Abbildung 39A). Die Spaltung des Salen-Liganden führt somit zu einem Verlust der Mn-Bindung. Dies erklärt die schwache katalytische Aktivität, sowie die fehlende Enantioselektivität der Sulfoxidation von Thioanisol.

Es stellte sich die Frage, ob ein Platzmangel im Protein die Ursache für die unerwartete Reaktion der Lysinreste von hSym2-D9C mit Mn-Salen sein könnte. Aufgrund der Tatsache, dass beide Benzaldehydeinheiten des Liganden in das Protein inkorporiert werden konnten, sollte allerdings auch genügend Platz für die Aufnahme von Mn-Salen sein. Es ist jedoch möglich, dass der intakte Ligand zu starr ist, um sich in die Proteinumgebung einzufügen. Der Rest K25 ist sehr flexibel, da er sich in einem *loop*

befindet und kann so den Halbliganden sehr gut einpassen. Der Vergleich der Strukturen von hSym2-D9C\_Mn-Salen und Sym2 zeigt, dass die Konjugation zu einer Verschiebung der Lysinreste um 5,5 Å führt. Diese hohe Flexibilität der Lysine ist auf ihre Lage in einem strukturell flexiblen *Loop* zurückzuführen und lässt analog zur Variante D9C auch Verlinkungen der Varianten hSym2-T50C und hSym2-K58C plausibel erscheinen. Mit K11 und K58 befinden sich zudem zwei weitere Lysinreste im Konjugationsbereich, die ebenfalls mit dem Mn-Salen Liganden reagieren könnten. Aufgrund der fehlenden Reaktivität und Enantioselektivität kann man anhand der vorhandenen Lysine davon ausgehen, dass keine der konjugierten hSym2-Varianten einen intakten Mn-Salen-Liganden enthält.

### 4.3.8 Resümee und Ausblick

In diesem Abschnitt der Arbeit konnten verschiedene Varianten von hSym2 erfolgreich mit reaktiven Cysteinen exprimiert und anschließend mit dem Liganden Mn-Salen konjugiert werden. Die durchgeführte Analyse der Verlinkung von jeweils zwei hSym2-Proteinketten durch Mn-Salen schien die beabsichtigte doppelte Verankerung des Liganden unter Beibehaltung der C2-Symmetrie zu bestätigen. Die darauffolgenden katalytischen Tests zeigten jedoch, dass nur Hybridproteine mit schwacher Aktivität und sehr geringer Enantioselektivität erzeugt werden konnten. Auch die Einführung von Mutationen im putativ aktiven Zentrum der Hybridproteine, die die Umgebung des Liganden so verändern sollten, dass die Katalyse effizienter wird, sowie Veränderungen in der Wahl des Lösungsmittels während der Reaktion, konnten keine Verbesserungen bringen. Die Röntgenstruktur zeigte schließlich, dass der Ligand nicht wie beabsichtigt und nach den Ergebnissen der analytischen Gelfiltration unter denaturierenden Bedingungen angenommen C2-symmetrisch im Proteinkomplex eingebunden vorliegt. Er wird durch die Reaktion mit den  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysinreste K25 in zwei Hälften gespalten, sodass jeweils ein Cystein der einen Hälfte über eine Benzaldehyd-Gruppe mit einem Lysin der zweiten Hälfte verknüpft wird. Durch diese Art des Einbaus zweier Benzaldehydgruppen anstatt eines intakten Salen-Liganden ändert sich die Lage der Mn-koordinierenden O- und N-Atome derart, dass keine Komplexierung des Mn-Ions mehr möglich ist. Die gefundene geringe Aktivität der Hybridproteine kann entweder auf einen Restanteil intaktes Mn-Salen zurückgehen, oder auf eine unspezifische Bindung des Mn-Ions z.B. an den (His)<sub>6</sub>-tags der hSym2-Proteinketten. Der Rest Lysin 25 liegt in einem flexiblen Bereich der Struktur, wodurch auch eine Reaktion mit anderen Cystein Varianten plausibel erscheint. Zudem konnten anhand der Struktur im Konjugationsbereich zwei weitere Lysinreste, welche

möglicherweise zur Reaktion mit Mn-Salen fähig sind, identifiziert werden, sodass mit hoher Wahrscheinlichkeit keines der untersuchten Hybridproteine einen intakten Mn-Salen-Liganden enthält.

Um auf dem hSym2-Proteingerüst erfolgreich enantioselektive Hybridkatalysatoren zu erzeugen, sollten alle Lysinreste im Bereich der Konjugationspositionen mutiert und ausgehend von diesem Gerüst neue Hybridproteine erstellt werden. Aufgrund der hohen Stabilität und der guten Kristallisierbarkeit von hSym2-Proteinen sollte durch eine Kristallstruktur die Integrität des Liganden bestätigt und seine Lage bestimmt werden. Darauf aufbauend könnten dann gezielt rationale Mutationen, sowie Positionen für Zufallsmutagenese ermittelt werden, um schließlich eine hohe Enantioselektivität zu erhalten.

## 5 Abschließende Diskussion

Trotz intensiver Bemühungen konnte auf HisF-C\*\*\*C (= Sym1) durch Zufallsmutagenese und Selektion in einer früheren Arbeit keine katalytische Aktivität etabliert werden (Lochner 2008). Aufgrund der nicht aufgelösten Phosphatbindestellen in der Röntgenstruktur war ein rationales Design von Enzymaktivität ebenfalls nicht möglich. Im Anschluss an die Stabilisierung von Sym1 durch den Austausch der Module ( $\beta\alpha$ ) 4 zum thermostabilen Protein Sym2 (Sperl 2009) konnten im Rahmen dieser Arbeit Kristalle von Sym2 erhalten werden. In der daraus resultierenden Röntgenstruktur waren bisher nicht aufgelöste Bereiche des putativen aktiven Zentrums sichtbar, wodurch sich neue Möglichkeiten für rationales Design ergaben und die Ursachen für die erhöhte Stabilität von Sym2 festgestellt werden konnten. Durch den Vergleich von Sym2 mit früheren Proteinvarianten mit PRA-Isomerase-Aktivität konnte durch die rationale Einführung von zwei Mutationen rCdRP-Bindung erzeugt werden. Die Ergebnisse dieses Abschnitts stellen den letzten Schritt in der Laborrekonstruktion der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Evolution dar. Ausgehend von einem rezenten Halbbarrel-Protein wurde ein kompletter hypothetischer Evolutionspfad von der Duplikation des Halbbarrels, über die Stabilisierung bis hin zu einem enzymatisch aktiven Barrel beschritten. Der Erfolg dieser Simulation hat Auswirkungen auf das Design und die Evolution von Enzymen und im Besonderen von  $(\beta\alpha)_8$ -Barrels. Es ist möglich stabile Proteine durch die Duplikation von existierenden rezenten Sequenzen, welche für stabile Proteine kodieren, zu erhalten. Ebenso ist es möglich diese Stabilität durch gerichtete Evolution und Screening zu erhöhen. Sobald Thermostabilität erreicht wurde, kann man die

Sequenz, ohne die Struktur zu zerstören, extrem mutieren und aktivierende Mutationen finden.

Ist dieser Pfad mit der natürlichen Evolution vergleichbar? Wir kennen leider nicht das genaue Repertoire an Sequenzen aus dem die Natur wählen konnte und ob *Halbbarrel*, *Viertelbarrel* oder sogar kleinere Einheiten rekrutiert wurden. Die Zusammenlagerung von zwei identischen *Halbbarrels* erscheint aber definitiv eine plausible Hypothese für die Evolution der  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Faltung und enzymatischer Aktivität zu sein.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten Hybridkatalysatoren für die enantioselektive Katalyse auf Basis des C2-symmetrischen Proteins Sym2 erstellt werden. Dazu sollte der Mn-Salen-Ligand unter Beibehaltung der C2-Symmetrie in entsprechende Proteinvarianten eingebaut werden. Dies erschien ursprünglich erfolgreich. Die Struktur von hSym2-D9C\_Mn-Salen zeigte aber, dass der Ligand während des Einbaus durch Lysinreste der Proteinketten gespalten wurde und so kein Mn mehr komplexieren konnte. Aus diesem Grund ist noch nicht endgültig geklärt, ob sich die C2-Symmetrie eines Proteins für die enantioselektive Katalyse eignet. Um dies zu erreichen sollten alle Lysine im Konjugationsbereich entfernt werden, die Varianten konjugiert und erneut kristallisiert werden. Ist diese Strategie nicht erfolgreich, könnten auch andere Liganden synthetisiert werden, die sich zum doppelten Einbau ins Protein eignen. Insgesamt kann man sagen, dass sich das Gerüst Sym2 sehr gut für den Einbau von organischen Liganden über Konjugation von Cysteinresten eignet. Durch seine hohe Stabilität toleriert das Gerüst viele Mutationen und die hohe Kristallisierbarkeit ermöglicht eine strukturelle Analyse von Konjugaten. Deshalb bietet sich Sym2, obwohl das Ziel in dieser Arbeit nicht erreicht werden konnte, weiter zur Erzeugung von C2-symmetrischen Hybridkatalysatoren an.

## 6 Zusammenfassung

Die Grundlage dieser Arbeit bildete das artifizielle  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Protein Sym2. Sym2 ist ein thermostabiles Protein und entstand im Rahmen einer experimentellen Rekonstruktion der  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Evolution im Labor. Dieser lag die Hypothese zugrunde, dass heutige  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel* Enzyme aus einem gemeinsamen Vorfahren halber Länge – dem  $(\beta\alpha)_4$ -Halb*barrel* – durch Duplikation, Fusion und Diversifikation entstanden sind. Um diesen postulierten Evolutionsweg im Labor nachzustellen, wurde das C-terminale  $(\beta\alpha)_4$ -Halb*barrel* der Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus dem hyperthermophilen Bakterium *T. maritima* (HisF) HisF-C dupliziert und *in tandem* fusioniert. Das resultierende HisF-CC-Konstrukt wurde anschließend durch Proteindesign über HisF-C\*C und HisF-C\*\*C zu HisF-C\*\*\*C (=Sym1) sukzessive stabilisiert. Obwohl die Röntgenstruktur des artifiziellen und katalytisch inaktiven  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Proteins Sym1 aufgeklärt werden konnte, waren Bereiche an der Kontaktstelle der beiden Hälften und am C-terminalen Ende nicht sichtbar. Aus diesem Grund wurde Sym1 durch einen Austausch der terminalen  $(\beta\alpha)$ -Module gegen die entsprechenden  $(\beta\alpha)$ -Module 4 aus HisF weiter stabilisiert und so das thermostabile Protein Sym2 erhalten.

Um die Grundlagen der erhöhten Stabilität von Sym2 aufzuklären und die strukturelle Basis zur enzymatischen Aktivierung von Sym2 zu legen, wurde das Protein im ersten Teil der Arbeit kristallisiert und seine Struktur gelöst. Die Analyse der Struktur zeigte, dass ein symmetrisches Salzbrückencluster, sowie hydrophobe Wechselwirkungen durch  $\pi$ -stacking die Erhöhung der Stabilität bewirken. Zudem zeigte sich, dass die Etablierung von HisF-Aktivität aufgrund der Abstände der Phosphatbindestellen und katalytisch wichtiger Aspartat-Reste sehr schwierig erscheint. Die hohe C2-Symmetrie der Proteinstruktur in Verbindung mit interessanten Aminosäurepositionen am katalytischen Pol des  $(\beta\alpha)_8$ -*Barrel*-Proteins ließen jedoch die Aussichten für die Erzeugung von C2-symmetrischen Hybridkatalysatoren günstig erscheinen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte Sym2 enzymatisch aktiviert werden. Dazu wurde zunächst die Bindung von rCdRP, einem Produktanalogon der PRA-Isomerase-Reaktion, durch rationales Design etabliert. Der folgende Vergleich mit der PRAI-aktiven Variante HisF-D130V+D176V zeigte, dass sich die rCdRP-bindende Variante Sym2\_bindC nur in vier  $(\beta\alpha)$ -Einheiten von HisF-D130V+D176V unterschied. Zur Aktivierung sollten deshalb diese vier Einheiten einer Zufallsmutagenese unterzogen werden. Um die Erstellung der Genbank zu erleichtern, wurde Sym2\_bindC circulär permutiert und das Gen für das

resultierende Protein cpSym2\_bindC zufällig mutiert. Die erstellte Genbank wurde anschließend *in vivo* auf PRAI-aktive Varianten selektiert. Durch eine Reduktion von überflüssigen Mutationen erhielt man schließlich mit cpSym2\_TrpF ein hoch symmetrisches Protein, welches *in vitro* PRAI-Aktivität zeigt. Das Protein konnte kristallisiert und Ursachen für die katalytische Aktivität festgestellt werden. Die enzymatische Aktivierung stellt damit den Abschluss der experimentellen Rekonstruktion der  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Evolution im Labor dar.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte das Konzept, ein C2-symmetrisches Protein zur Erzeugung von enantioselektiven Hybridkatalysatoren zu verwenden, getestet werden. Dazu sollten auf Basis des Sym2-Proteingerüsts durch Konjugation mit einem organischen Liganden Hybridproteine erstellt werden. Um die C2-Symmetrie zu erhalten wurde die Strategie der doppelten Verankerung gewählt. Da diese zu unerwünschten Oligomerisierungen führen kann, wurde als Proteingerüst nur eine Hälfte von Sym2 (hSym2) verwendet und die Konjugation unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Es wurde ein Mn-Salen-Ligand mit Methylthiosulfonat-Gruppen zur Kopplung an Cysteine synthetisiert und mit verschiedenen Cystein-Varianten des Halbbarrel-Proteins hSym2 konjugiert. Die Konjugation wurde mittels Gelfiltration unter denaturierenden Bedingungen analysiert. Bei der anschließenden Rückfaltung lagerten sich die beiden Halbbarrel-Proteinketten zusammen und inkorporierten den Liganden in der Struktur. Mit den erhaltenen Hybridkatalysatoren wurde anschließend die Sulfoxidation von Thioanisol katalysiert und mittels HPLC analysiert. Dabei zeigte sich, dass keine der erstellten Varianten zufriedenstellende Reaktionsraten und Enantioselektivitäten erzielen konnte. Auch die Erstellung weiterer Varianten und die Verwendung von verschiedenen Lösungsmitteln und Puffern brachte keine signifikante Verbesserung. Schließlich konnte das Hybridprotein hSym2-D9C\_Mn-Salen kristallisiert werden. Die Struktur des Proteins zeigte, dass der Mn-Salen-Ligand überraschenderweise unter Freisetzung von Ethylendiamin und Spaltung des Liganden in zwei Hälften mit dem Protein reagierte. Das resultierende Hybridprotein konnte kein Mn binden, wodurch sich die schlechten katalytischen Eigenschaften erklären ließen. Eine Eliminierung aller Lysinreste im Umfeld der zur Konjugation verwendeten Cysteinreste lässt darauf hoffen, dass der Mn-Salen-Ligand intakt eingebaut werden kann und so eine enantioselektive Katalyse möglich wird.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adamczyk, A. J., J. Cao, S. C. Kamerlin & A. Warshel (2011). "Catalysis by dihydrofolate reductase and other enzymes arises from electrostatic preorganization, not conformational motions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(34): 14115-20.
- Adams, P. D., R. W. Grosse-Kunstleve, L. W. Hung, T. R. Ioerger, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. J. Read, J. C. Sacchettini, N. K. Sauter & T. C. Terwilliger (2002). "PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination." *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **58**: 1948-54.
- Althoff, E. A., L. Wang, L. Jiang, L. Giger, J. K. Lassila, Z. Wang, M. Smith, S. Hari, P. Kast, D. Herschlag, D. Hilvert & D. Baker (2012). "Robust design and optimization of retroaldol enzymes." *Protein Sci* **21**(5): 717-26.
- Auburger, J. (2010). Kombinatorische Verknüpfung von Genfragmenten zur Erzeugung katalytisch aktiver Proteinchimären, Universität Regensburg.
- Bachmann, B. J. (1990). "Linkage Map of Escherichia-Coli K-12, Edition-8." *Microbiological Reviews* **54**(2): 130-97.
- Beckman, R. A., A. S. Mildvan & L. A. Loeb (1985). "On the Fidelity of DNA-Replication - Manganese Mutagenesis Invitro." *Biochemistry* **24**(21): 5810-17.
- Beismann-Driemeyer, S. & R. Sterner (2001). "Imidazole glycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima* - Quaternary structure, steady-state kinetics, and reaction mechanism of the bienzyme complex." *Journal of Biological Chemistry* **276**(23): 20387-96.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko & L. Stryer (2002). *Biochemistry*. New York, W.H. Freeman.
- Bhabha, G., J. Lee, D. C. Ekiert, J. Gam, I. A. Wilson, H. J. Dyson, S. J. Benkovic & P. E. Wright (2011). "A dynamic knockout reveals that conformational fluctuations influence the chemical step of enzyme catalysis." *Science* **332**(6026): 234-8.
- Bisswanger, H., K. Kirschner, W. Cohn, V. Hager & E. Hansson (1979). "N-(5-Phosphoribosyl)Anthraniolate Isomerase-Indoleglycerol-Phosphate Synthase .1. Substrate-Analog Binds to 2 Different Binding-Sites on the Bifunctional Enzyme from Escherichia-Coli." *Biochemistry* **18**(26): 5946-53.
- Blake, C. C., D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. North, D. C. Phillips & V. R. Sarma (1965). "Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution." *Nature* **206**(4986): 757-61.
- Bornscheuer, U. T. & M. Pohl (2001). "Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design." *Curr Opin Chem Biol* **5**(2): 137-43.
- 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**: 248-54.
- Buchner, E. (1897). "Alkoholische Gährung ohne Hefezellen." *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft zu Berlin* **30**: 117-24.
- Caetano-Anolles, G., H. S. Kim & J. E. Mittenthal (2007). "The origin of modern metabolic networks inferred from phylogenomic analysis of protein architecture." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(22): 9358-63.
- Carey, J. R. (2006). University of Illinois, Urbana-Champaign.
- Carey, J. R., S. K. Ma, T. D. Pfister, D. K. Garner, H. K. Kim, J. A. Abramite, Z. Wang, Z. Guo & Y. Lu (2004). "A site-selective dual anchoring strategy for artificial metalloprotein design." *Journal of the American Chemical Society* **126**(35): 10812-3.
- Carstensen, L., J. M. Sperl, M. Bocola, F. List, F. X. Schmid & R. Sterner (2012). "Conservation of the folding mechanism between designed primordial (betaalpha)8-barrel proteins and their modern descendant." *J Am Chem Soc* **134**(30): 12786-91.

- Chen, R. (2001). "Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution." *Trends Biotechnol* **19**(1): 13-4.
- Claren, J., C. Malisi, B. Höcker & R. Sterner (2009). "Establishing wild-type levels of catalytic activity on natural and artificial (beta alpha)(8)-barrel protein scaffolds." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(10): 3704-09.
- Cline, J., J. C. Braman & H. H. Hogrefe (1996). "PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases." *Nucleic Acids Research* **24**(18): 3546-51.
- Davis, I. W., A. Leaver-Fay, V. B. Chen, J. N. Block, G. J. Kapral, X. Wang, L. W. Murray, W. B. Arendall, J. Snoeyink, J. S. Richardson & D. C. Richardson (2007). "MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids." *Nucleic Acids Research* **35**: W375-W83.
- Douangamath, A., M. Walker, S. Beismann-Driemeyer, M. C. Vega-Fernandez, R. Sterner & M. Wilmanns (2002). "Structural evidence for ammonia tunneling across the (beta alpha)(8) barrel of the imidazole glycerol phosphate synthase bienzyme complex." *Structure* **10**(2): 185-93.
- Dower, W. J., J. F. Miller & C. W. Ragsdale (1988). "High-Efficiency Transformation of Escherichia-Coli by High-Voltage Electroporation." *Nucleic Acids Research* **16**(13): 6127-45.
- Drummond, D. A., B. L. Iverson, G. Georgiou & F. H. Arnold (2005). "Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins." *Journal of Molecular Biology* **350**(4): 806-16.
- Eckert, K. A. & T. A. Kunkel (1990). "High Fidelity DNA-Synthesis by the Thermus-Aquaticus DNA-Polymerase." *Nucleic Acids Research* **18**(13): 3739-44.
- Eisenbeis, S., W. Proffitt, M. Coles, V. Truffault, S. Shanmugaratnam, J. Meiler & B. Höcker (2012). "Potential of fragment recombination for rational design of proteins." *J Am Chem Soc* **134**(9): 4019-22.
- Ellman, G. L. (1959). "Tissue sulfhydryl groups." *Arch Biochem Biophys* **82**(1): 70-7.
- Emsley, P. & K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **60**: 2126-32.
- Evran, S., A. Telefoncu & R. Sterner (2012). "Directed evolution of (betaalpha)(8)-barrel enzymes: establishing phosphoribosylanthranilate isomerisation activity on the scaffold of the tryptophan synthase alpha-subunit." *Protein Eng Des Sel* **25**(6): 285-93.
- Fani, R., E. Mori, E. Tamburini & A. Lazcano (1998). "Evolution of the structure and chromosomal distribution of histidine biosynthetic genes." *Orig Life Evol Biosph* **28**(4-6): 555-70.
- Firth, A. E. & W. M. Patrick (2005). "Statistics of protein library construction." *Bioinformatics* **21**(15): 3314-15.
- Fromant, M., S. Blanquet & P. Plateau (1995). "Direct Random Mutagenesis of Gene-Sized DNA Fragments Using Polymerase Chain-Reaction." *Analytical Biochemistry* **224**(1): 347-53.
- Gasteiger, E., A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel & A. Bairoch (2003). "ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis." *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3784-8.
- Gilson, M. K. & H. X. Zhou (2007). "Calculation of protein-ligand binding affinities." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **36**: 21-42.
- Grishin, N. V. (2001). "Fold change in evolution of protein structures." *J Struct Biol* **134**(2-3): 167-85.
- Guyer, M. S., R. R. Reed, J. A. Steitz & K. B. Low (1981). "Identification of a sex-factor-affinity site in E. coli as gamma delta." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **45 Pt 1**: 135-40.

- Heinisch, T. & T. R. Ward (2010). "Design strategies for the creation of artificial metalloenzymes." *Curr Opin Chem Biol* **14**(2): 184-99.
- Henn-Sax, M., B. Höcker, M. Wilmanns & R. Sterner (2001). "Divergent evolution of (betaalpha)8-barrel enzymes." *Biol Chem* **382**(9): 1315-20.
- Henn-Sax, M., R. Thoma, S. Schmidt, M. Hennig, K. Kirschner & R. Sterner (2002). "Two (beta alpha)(8)-barrel enzymes of histidine and tryptophan biosynthesis have similar reaction mechanisms and common strategies for protecting their labile substrates." *Biochemistry* **41**(40): 12032-42.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen & L. R. Pease (1989). "Site-Directed Mutagenesis by Overlap Extension Using the Polymerase Chain-Reaction." *Gene* **77**(1): 51-59.
- Höcker, B., J. Claren & R. Sterner (2004). "Mimicking enzyme evolution by generating new (betaalpha)8-barrels from (betaalpha)4-half-barrels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16448-53.
- Höcker, B., A. Lochner, T. Seitz, J. Claren & R. Sterner (2009). "High-resolution crystal structure of an artificial (betaalpha)(8)-barrel protein designed from identical half-barrels." *Biochemistry* **48**(6): 1145-7.
- Holm, L. & J. Park (2000). "DaliLite workbench for protein structure comparison." *Bioinformatics* **16**(6): 566-7.
- Hommel, U., M. Eberhard & K. Kirschner (1995). "Phosphoribosyl Anthranilate Isomerase Catalyzes a Reversible Amadori Reaction." *Biochemistry* **34**(16): 5429-39.
- Inoue, H., H. Nojima & H. Okayama (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-8.
- Jiang, L., E. A. Althoff, F. R. Clemente, L. Doyle, D. Röthlisberger, A. Zanghellini, J. L. Gallaher, J. L. Betker, F. Tanaka, C. F. Barbas, 3rd, D. Hilvert, K. N. Houk, B. L. Stoddard & D. Baker (2008). "De novo computational design of retro-aldol enzymes." *Science* **319**(5868): 1387-91.
- Jürgens, C., A. Strom, D. Wegener, S. Hettwer, M. Wilmanns & R. Sterner (2000). "Directed evolution of a (beta alpha)8-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 9925-30.
- Kabsch, W. (1993). "Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants." *Journal of Applied Crystallography* **26**: 795-800.
- Kaplan, J. & W. F. DeGrado (2004). "De novo design of catalytic proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(32): 11566-70.
- Khare, S. D., Y. Kipnis, P. Greisen, Jr., R. Takeuchi, Y. Ashani, M. Goldsmith, Y. Song, J. L. Gallaher, I. Silman, H. Leader, J. L. Sussman, B. L. Stoddard, D. S. Tawfik & D. Baker (2012). "Computational redesign of a mononuclear zinc metalloenzyme for organophosphate hydrolysis." *Nat Chem Biol* **8**(3): 294-300.
- Khersonsky, O., G. Kiss, D. Röthlisberger, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. Baker & D. S. Tawfik (2012). "Bridging the gaps in design methodologies by evolutionary optimization of the stability and proficiency of designed Kemp eliminase KE59." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(26): 10358-63.
- Khersonsky, O., D. Röthlisberger, A. M. Wollacott, P. Murphy, O. Dym, S. Albeck, G. Kiss, K. N. Houk, D. Baker & D. S. Tawfik (2011). "Optimization of the in-silico-designed kemp eliminase KE70 by computational design and directed evolution." *J Mol Biol* **407**(3): 391-412.
- Knowles, J. R. (1991). "Enzyme catalysis: not different, just better." *Nature* **350**(6314): 121-4.
- Koonin, E. V., Y. I. Wolf & G. P. Karev (2002). "The structure of the protein universe and genome evolution." *Nature* **420**(6912): 218-23.
- Kramer, R. (2006). "Supramolecular bioinorganic hybrid catalysts for enantioselective transformations." *Angewandte Chemie-International Edition* **45**(6): 858-60.

- Kuhlman, B. & D. Baker (2000). "Native protein sequences are close to optimal for their structures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(19): 10383-8.
- Kuhlman, B., G. Dantas, G. C. Ireton, G. Varani, B. L. Stoddard & D. Baker (2003). "Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy." *Science* **302**(5649): 1364-68.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lang, D., R. Thoma, M. Henn-Sax, R. Sterner & M. Wilmanns (2000). "Structural evidence for evolution of the beta/alpha barrel scaffold by gene duplication and fusion." *Science* **289**(5484): 1546-50.
- Leopoldseder, S., J. Claren, C. Jürgens & R. Sterner (2004). "Interconverting the catalytic activities of (beta alpha)(8)-barrel enzymes from different metabolic pathways: Sequence requirements and molecular analysis." *Journal of Molecular Biology* **337**(4): 871-79.
- Letondor, C., N. Humbert & T. R. Ward (2005). "Artificial metalloenzymes based on biotin-avidin technology for the enantioselective reduction of ketones by transfer hydrogenation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(13): 4683-87.
- Letondor, C. & T. R. Ward (2006). "Artificial metalloenzymes for enantioselective catalysis: recent advances." *Chembiochem* **7**(12): 1845-52.
- Leung, D. W., E. Chen & D. V. Goeddel (1989). "A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction." *Technique* **1**: 11-15.
- Li, C. J. & B. M. Trost (2008). "Green chemistry for chemical synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(36): 13197-202.
- List, F. (2009). Die Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus *Thermotoga maritima*: Struktur, Regulation und Evolution einer Glutaminamidotransferase, Universität Regensburg.
- Lochner, A. (2008). Stabilisierung und Aktivierung eines künstlichen  $(\beta\alpha)_8$  Fass Proteins. Regensburg, Universität Regensburg.
- Lupas, A. N., C. P. Ponting & R. B. Russell (2001). "On the evolution of protein folds: are similar motifs in different protein folds the result of convergence, insertion, or relics of an ancient peptide world?" *J Struct Biol* **134**(2-3): 191-203.
- Lynch, M. & J. S. Conery (2000). "The evolutionary fate and consequences of duplicate genes." *Science* **290**(5494): 1151-5.
- Ma, S. K. (2001). University of Illinois, Urbana-Champaign.
- Ma, S. K. & Y. Lu (1999). "Artificial metalloenzymes as asymmetric catalysts." *Journal of Inorganic Biochemistry* **74**(1-4): 217-17.
- McCoy, A. J. (2007). "Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser." *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **63**: 32-41.
- McCullum, E. O., B. A. Williams, J. Zhang & J. C. Chaput (2010). "Random mutagenesis by error-prone PCR." *Methods Mol Biol* **634**: 103-9.
- McPherson, A. (1982). Preparation and analysis of protein crystals. New York, John Wiley and Sons.
- Merz, A., M. C. Yee, H. Szadkowski, G. Pappenberger, A. Cramer, W. P. C. Stemmer, C. Yanofsky & K. Kirschner (2000). "Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures." *Biochemistry* **39**(5): 880-89.
- Mihovilovic, M. D. (2007). "Stereoselective hybrid catalysts: new opportunities." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **82**(12): 1067-71.
- Mueller-Dieckmann, J. (2006). "The open-access high-throughput crystallization facility at EMBL Hamburg." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**(Pt 12): 1446-52.
- Mullis, K. B. & F. A. Falloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-50.

- Murshudov, G. N., A. A. Vagin & E. J. Dodson (1997). "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method." *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **53**: 240-55.
- Nicolaou, K. C. S., S.A., Ed. (2003). *Classics in Total Synthesis* II. Weinheim, Wiley-VCH.
- Nikkhah, M., Z. Jawad-Alami, M. Demydchuk, D. Ribbons & M. Paoli (2006). "Engineering of beta-propeller protein scaffolds by multiple gene duplication and fusion of an idealized WD repeat." *Biomol Eng* **23**(4): 185-94.
- Novick, R. P., R. C. Clowes, S. N. Cohen, R. Curtiss, N. Datta & S. Falkow (1976). "Uniform Nomenclature for Bacterial Plasmids - Proposal." *Bacteriological Reviews* **40**(1): 168-89.
- Ohashi, M., T. Koshiyama, T. Ueno, M. Yanase, H. Fujii & Y. Watanabe (2003). "Preparation of artificial metalloenzymes by insertion of chromium(III) Schiff base complexes into apomyoglobin mutants." *Angewandte Chemie-International Edition* **42**(9): 1005-+.
- Ostermeier, M., A. E. Nixon & S. J. Benkovic (1999). "Incremental truncation as a strategy in the engineering of novel biocatalysts." *Bioorg Med Chem* **7**(10): 2139-44.
- Ozaki, S. & P. R. O. Demontellano (1995). "Molecular Engineering of Horseradish-Peroxidase - Thioether Sulfoxidation and Styrene Epoxidation by Phe-41 Leucine and Threonine Mutants." *Journal of the American Chemical Society* **117**(27): 7056-64.
- Park, H. S., S. H. Nam, J. K. Lee, C. N. Yoon, B. Mannervik, S. J. Benkovic & H. S. Kim (2006). "Design and evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold." *Science* **311**(5760): 535-8.
- Park, S. & H. Sugiyama (2010). "DNA-Based Hybrid Catalysts for Asymmetric Organic Synthesis." *Angewandte Chemie-International Edition* **49**(23): 3870-78.
- Ponstingl, H., T. Kabir, D. Gorse & J. M. Thornton (2005). "Morphological aspects of oligomeric protein structures." *Prog Biophys Mol Biol* **89**(1): 9-35.
- Potterton, L., S. McNicholas, E. Krissinel, J. Gruber, K. Cowtan, P. Emsley, G. N. Murshudov, S. Cohen, A. Perrakis & M. Noble (2004). "Developments in the CCP4 molecular-graphics project." *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **60**: 2288-94.
- Reetz, M. T. & N. Jiao (2006). "Copper-phthalocyanine conjugates of serum albumins as enantioselective catalysts in Diels-Alder reactions." *Angewandte Chemie-International Edition* **45**(15): 2416-19.
- Reetz, M. T., M. Rentzsch, A. Pletsch, A. Taglieber, F. Hollmann, R. J. G. Mondiere, N. Dickmann, B. Hocker, S. Cerrone, M. C. Haeger & R. Sterner (2008). "A robust protein host for anchoring chelating ligands and organocatalysts." *Chembiochem* **9**(4): 552-64.
- Reisinger, B., M. Bocola, F. List, J. Claren, C. Rajendran & R. Sterner (2012). "A sugar isomerization reaction established on various (betaalpha)(8)-barrel scaffolds is based on substrate-assisted catalysis." *Protein Eng Des Sel* **25**(11): 751-60.
- Richter, M., M. Bosnali, L. Carstensen, T. Seitz, H. Durchschlag, S. Blanquart, R. Merkl & R. Sterner (2010). "Computational and experimental evidence for the evolution of a (beta alpha)8-barrel protein from an ancestral quarter-barrel stabilised by disulfide bonds." *J Mol Biol* **398**(5): 763-73.
- Riddles, P. W., R. L. Blakeley & B. Zerner (1983). "Reassessment of Ellman Reagent." *Methods in Enzymology* **91**: 49-60.
- Riechmann, L. & G. Winter (2006). "Early protein evolution: building domains from ligand-binding polypeptide segments." *J Mol Biol* **363**(2): 460-8.
- Roelfes, G., A. J. Boersma & B. L. Feringa (2006). "Highly enantioselective DNA-based catalysis." *Chemical Communications*(6): 635-37.
- Röthlisberger, D., O. Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. S. Tawfik &

- D. Baker (2008). "Kemp elimination catalysts by computational enzyme design." *Nature* **453**(7192): 190-5.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis & H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-91.
- Sambrook, J., E. E. Fritsch & T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbour.
- Seelig, B. & J. W. Szostak (2007). "Selection and evolution of enzymes from a partially randomized non-catalytic scaffold." *Nature* **448**(7155): 828-31.
- Seitz, T. (2006). Stabilisierung eines künstlich erzeugten  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Proteins durch gelenkte Evolution, Universität Regensburg.
- Seitz, T., M. Bocola, J. Claren & R. Sterner (2007). "Stabilisation of a (betaalpha)8-barrel protein designed from identical half barrels." *J Mol Biol* **372**(1): 114-29.
- Shanmugaratnam, S., S. Eisenbeis & B. Höcker (2012). "A highly stable protein chimera built from fragments of different folds." *Protein Engineering Design & Selection* **25**(11): 699-703.
- Siegel, J. B., A. Zanghellini, H. M. Lovick, G. Kiss, A. R. Lambert, J. L. St Clair, J. L. Gallaher, D. Hilvert, M. H. Gelb, B. L. Stoddard, K. N. Houk, F. E. Michael & D. Baker (2010). "Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction." *Science* **329**(5989): 309-13.
- Söding, J. & A. N. Lupas (2003). "More than the sum of their parts: on the evolution of proteins from peptides." *Bioessays* **25**(9): 837-46.
- Sperl, J. M. (2009). Analyse der Faltung und Erhöhung der Stabilität künstlich erzeugter  $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Proteine, Universität Regensburg.
- Sterner, R. & B. Höcker (2005). "Catalytic versatility, stability, and evolution of the (betaalpha)8-barrel enzyme fold." *Chem Rev* **105**(11): 4038-55.
- Sterner, R., G. R. Kleemann, H. Szadkowski, A. Lustig, M. Hennig & K. Kirschner (1996). "Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer." *Protein Science* **5**(10): 2000-08.
- Sterner, R., R. Merkl & F. M. Raushel (2008). "Computational design of enzymes." *Chem Biol* **15**(5): 421-3.
- Sumner, J. B. (1926). "The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease: preliminary paper." *J. Biol. Chem.* **69**: 435-41.
- Toscano, M. D., K. J. Woycechowsky & D. Hilvert (2007). "Minimalist active-site redesign: teaching old enzymes new tricks." *Angew Chem Int Ed Engl* **46**(18): 3212-36.
- Ueno, T., T. Koshiyama, S. Abe, N. Yokoi, M. Ohashi, H. Nakajima & Y. Watanabe (2007). "Design of artificial metalloenzymes using non-covalent insertion of a metal complex into a protein scaffold." *Journal of Organometallic Chemistry* **692**(1-3): 142-47.
- Vanhercke, T., C. Ampe, L. Tirry & P. Denolf (2005). "Reducing mutational bias in random protein libraries." *Analytical Biochemistry* **339**(1): 9-14.
- Voet, D., J. G. Voet & C. W. Pratt (1999). *Fundamentals of biochemistry*. New York, Wiley.
- Vogel, C. & V. Morea (2006). "Duplication, divergence and formation of novel protein topologies." *Bioessays* **28**(10): 973-78.
- Wang, L., E. A. Althoff, J. Bolduc, L. Jiang, J. Moody, J. K. Lassila, L. Giger, D. Hilvert, B. Stoddard & D. Baker (2012). "Structural analyses of covalent enzyme-substrate analog complexes reveal strengths and limitations of de novo enzyme design." *J Mol Biol* **415**(3): 615-25.
- Wang, W. Y. & B. A. Malcolm (1999). "Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange (TM) site-directed mutagenesis." *Biotechniques* **26**(4): 680-82.
- Ward, T. R. (2008). "Artificial enzymes made to order: combination of computational design and directed evolution." *Angew Chem Int Ed Engl* **47**(41): 7802-3.

- Wierenga, R. K. (2001). "The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes." *FEBS Lett* **492**(3): 193-8.
- Wilson, G. G. & N. E. Murray (1991). "Restriction and modification systems." *Annu Rev Genet* **25**: 585-627.
- Wilson, M. E. & G. M. Whitesides (1978). "Conversion of a Protein to a Homogeneous Asymmetric Hydrogenation Catalyst by Site-Specific Modification with a Diphosphinierhodium(I) Moiety." *Journal of the American Chemical Society* **100**(1): 306-07.
- Woycechowsky, K. J., K. Vamvaca & D. Hilvert (2007). "Novel enzymes through design and evolution." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **75**: 241-94, xiii.
- Yadid, I. & D. S. Tawfik (2007). "Reconstruction of functional beta-propeller lectins via homo-oligomeric assembly of shorter fragments." *J Mol Biol* **365**(1): 10-7.
- Zanghellini, A., L. Jiang, A. M. Wollacott, G. Cheng, J. Meiler, E. A. Althoff, D. Rothlisberger & D. Baker (2006). "New algorithms and an in silico benchmark for computational enzyme design." *Protein Sci* **15**(12): 2785-94.
- Zhang, J. L., D. K. Garner, L. Liang, D. A. Barrios & Y. Lu (2009). "Noncovalent modulation of pH-dependent reactivity of a Mn-salen cofactor in myoglobin with hydrogen peroxide." *Chemistry* **15**(30): 7481-9.
- Zhao, H., L. Giver, Z. Shao, J. A. Affholter & F. H. Arnold (1998). "Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination." *Nat Biotechnol* **16**(3): 258-61.

## 8 Anhang

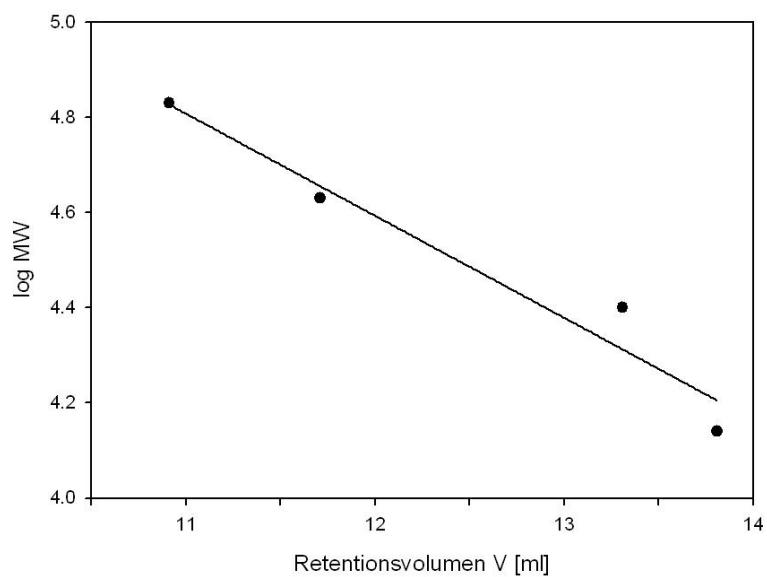
### 8.1 Kalibrierungsgeraden für die Auswertung von analytischer Gelfiltrationschromatographie

Die Erstellung von Kalibrierungsgeraden für die verwendete Gelfiltrationssäule Superdex 75 (GE HEALTHCARE) erfolgte mit dem *Gel Filtration Calibration Kit* (GE HEALTHCARE) nach Anleitung des Herstellers. Bei Auftragung des Retentionsvolumens gegen den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts bekannter Markerproteine kann eine lineare Funktion abgeleitet werden, anhand derer das apparetive Molekulargewicht von Proteinkomplexen abgeschätzt werden kann.

Die Kalibrierungsgerade (Abbildung 40) wurde mit den Markerproteinen in Tabelle 24 erstellt.

**Tabelle 24: Proteine für die Kalibrierung der Superdex 75-Gelfiltrationssäule mit gemessenem Retentionsvolumen, bekanntem Molekulargewicht und dessen dekadischem Logarithmus.**

Protein	Retentions- volumen / ml	MW / kDa	log MW
Ribonuclease A	13,81	13,7	4,14
Chymotrypsin	13,31	25	4,40
Ovalbumin	11,71	43	4,63
Albumin	10,91	67	4,83



**Abbildung 40: Kalibrierungsgerade der Superdex 75-Gelfiltrationssäule.**

Proteine mit bekanntem Molekulargewicht (Tabelle 24) wurden auf die Säule aufgetragen und bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in 50 mM KP, 300 mM KCl, pH 7,5 eluiert. Der dekadische Logarithmus des Molekulargewichts wurde gegen das Retentionsvolumen aufgetragen, die berechnete lineare Funktion ist:  $\log MW = 7,16 - 0,21 * V$ .

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Reinhard Sterner herzlich für seine Unterstützung und sein Vertrauen danken.

Prof. Volker Sieber danke ich für die Begleitung dieser Arbeit als Mentor, sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Prof. Kirsten Zeitler möchte ich mich ebenfalls für die Begleitung als Mentorin bedanken. Ihr und ihrer Arbeitsgruppe danke ich zudem für die zeitweise Überlassung eines organisch-chemischen Arbeitsplatzes, sowie für die entgegengebrachte Gastfreundschaft und Hilfsbereitschaft.

Prof. Christine Ziegler danke ich für die Übernahme des Amtes als Drittprüferin.

Dr. Marco Bocola, Dr. Felix List und Dr. Chitra Rajendran danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Aufnahme von Beugungsdaten und Strukturlösung.

Ein großes Dankeschön für die immer nette und hilfsbereite Zusammenarbeit gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Sterner.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Christiane Endres, Sonja Fuchs, Barbara Kellerer, Hermine Reisner und Jeanette Ueckert für die vielen großen und kleinen Hilfestellungen im Labor, sowie bei Claudia Pauer für die Unterstützung in administrativen Belangen.

Bei meinen Praktikanten und Bachelorstudenten Josef Auburger, Regina Falgenhauer, Felix Graßmann und Nadine Klein möchte ich mich an dieser Stelle für Ihre Motivation und die geleistete Arbeit bedanken.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und dafür, dass sie mir das alles ermöglicht haben.

Ganz besonders danke ich Nadine für ihre Unterstützung und Geduld.