



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Strukturelle Untersuchungen zur Aktivität und Stabilität in Acetaldehyd-abhängigen Aldolasen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Markus Dick

aus Warendorf

Düsseldorf, Februar 2016

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Univ.-Prof. Dr. Jörg Pietruszka
Korreferent: Prof. Dr. Holger Gohlke
Tag der mdl. Prüfung: 29.06.2016
Herausgeber: Prof. Jörg Pietruszka
Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH
Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH
Copyright: Forschungszentrum Jülich 2016

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
im Forschungszentrum Jülich, Band 24

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2016)

ISBN 978-3-95806-165-1

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965 in der jeweils gültigen Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

„In Wirklichkeit ist jede Art von magischer Handlung ungeheuer kompliziert; man braucht dazu ein enormes Wissen, eine Unmenge von Zubehör, Material, das meist sehr schwer zu beschaffen ist, und tagelange, manchmal monatelange Vorbereitung. Dazu kommt noch, dass die Sache immer höchst gefährlich ist, denn schon der kleinste Fehler kann völlig unabsehbare Folgen haben kann.“

Michael Ende

Der satanarchäolügenialkohölische Wunschkuss

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Fachartikel:

Markus Dick, Oliver H. Weiergräber, Thomas Classen, Carolin Bisterfeld, Julia Bramski, Holger Gohlke, Jörg Pietruszka, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 17908; 'Trading off stability against activity in extremophilic aldolases'.

Carolin Bisterfeld, Irene Küberl née Kullartz, Markus Dick, Jörg Pietruszka, *Synlett* **2016**, *27*, 11-16; 'A Fluorogenic Screening for Enantio- and Diastereoselectivity of 2-Deoxy-D-ribose-5-phosphate Aldolases'.

Markus Dick, Rudolf Hartmann, Oliver H. Weiergräber, Carolin Bisterfeld, Thomas Classen, Melanie Schwarten, Philipp Neudecker, Dieter Willbold and Jörg Pietruszka, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 4492-4502; 'Mechanism-based inhibition of an aldolase at high concentrations of its natural substrate acetaldehyde: structural insights and protective strategies'.

Posterpräsentationen:

Molecular Life Science 2013, Frankfurt, Deutschland, 3.-6. Mai, **2013**, Markus Dick, Carolin Bisterfeld, Irene Kullartz, Daniel Ciupka, Holger Gohlke, Jörg Pietruszka, 'Tailoring acetaldehyde dependent aldolases for organic synthesis'.

10th International Conference on Protein Stabilisation, Stresa, Italien, 7-9. Mai, **2014**, Markus Dick, Carolin Bisterfeld, Daniel Ciupka, Holger Gohlke, Jörg Pietruszka, 'Stabilizing acetaldehyde dependent aldolases for organic synthesis'.

12th Biotrans, Wien, Österreich, 26.-30. Juli, **2015**, Markus Dick, Oliver H. Weiergräber, Thomas Classen, Julia Bramski, Holger Gohlke, Jörg Pietruszka, 'Trading off stability against activity in extremophilic aldolases'.

Vortrag:

6th Symposium „From Gene to Protein and Beyond“, HHU Düsseldorf, Deutschland, 20. August, **2015**, 'Tailoring stability of acetaldehyde dependent aldolases'.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung	11
Abstract	16
1 Einleitung	21
1.1 Einführung in die Thematik	21
1.2 Zielsetzung der Arbeit	23
2 Kenntnisstand	26
2.1 Enzyme und Enzymstabilität	26
2.1.1 Enzyme aus extremophilen Organismen	26
2.1.2 Verbesserung der Eigenschaften von Enzymen	28
2.1.3 <i>In-silico</i> -Methoden und <i>constraint network analysis</i> (CNA)	30
2.2 Acetaldehyd abhängige Aldolasen	33
2.2.1 Aldolasen	33
2.2.2 Die 2-Desoxy-D-ribose-5-phosphat Aldolase (DERA)	37
2.2.3 Angepasste Enzymeigenschaften durch DERAs unterschiedlicher Organismen	42
2.3 Strukturanalytik in der biochemischen Forschung	44
2.3.1 Röntgenkristallstrukturanalytik	45
2.3.2 NMR-Spektroskopie von biologischen Makromolekülen	46
3 Ergebnisse und Diskussion	51
3.1 Projekt A: Erhöhung der Thermostabilität der DERA _{EC}	51
3.1.1 <i>In-silico</i> -Vorhersagen (Daniel B. Ciupka)	51
3.1.2 Herstellung der Mutanten	54
3.1.3 Biochemische Charakterisierung der Mutanten	56
3.1.4 Vergleich der berechneten mit den experimentellen T_m -Werten	59
3.2 Projekt B: Vergleich extremophiler DERAs	62
3.2.1 Identifikation, Klonierung psychrophiler DERAs	62
3.2.2 Proteinexpression und Reinigung	64
3.2.3 Vergleichende biochemische Charakterisierung	66
3.2.4 Strukturaufklärung psychrophiler DERAs	70
3.2.5 Design von monomeren DERAs zur Analyse des Dimer-Interfaces	73
3.2.6 CNA-Berechnungen	76
3.2.7 Versuche zur Stabilisierung des Dimer-Interfaces	82
3.2.8 Strukturelle Anpassung psychrophiler DERAs	85
3.2.9 Selektivitätsscreening durch neue Fluoreszenzsubstrate.	87
3.3 Projekt C: Analyse der Deaktivierung bei hohen Acetaldehyd-Konzentrationen	91
3.3.1 Analyse der Schiff'schen Base Bildung	91
3.3.2 Untersuchung möglicher struktureller Änderungen	94
3.3.3 Rückgrat-Zuordnung des DERA-Monomers	98
3.3.4 Identifikation und Lokalisation der Reaktionsprodukte	105
3.3.5 Reaktivierung der DERA durch Erhitzen	107

3.3.6	Kristallstrukturen der DERA nach Acetaldehyd-Inkubation	111
3.3.7	Postulierter Inaktivierungsmechanismus	114
3.3.8	Acetaldehyd-Stabilität durch C47M Mutation	119
3.3.9	NMR-Kinetik	123
4	Zusammenfassung und Ausblick	125
4.1	Thermostabilität und extremophile DERAs	125
4.2	Suizid-Inhibierung der DERA _{EC} durch Crotonaldehyd	129
4.3	CNA als Werkzeug zur Beurteilung der Proteinestabilität	130
4.4	Ausblick.	133
4.4.1	Untersuchung der DERA-Stabilität bezüglich anderer Aldehyde	133
4.4.2	Eine DERA mit verbesserten Eigenschaften für die Synthese?	136
5	Materialien	140
5.1	Geräte und Software	140
5.2	Chemikalien, Enzyme und Fertigungskits	142
5.3	Stammlösungen	142
5.4	Plasmid, Primer und synthetische Gene	142
6	Methoden	146
6.1	Molekularbiologische Methoden	146
6.1.1	Ortsgerichtete Mutagenese (QuikChange® und <i>Round-the-Horn</i>)	146
6.1.2	Ligation und Restriktionsverdau	148
6.1.3	Kolonie-PCR	149
6.1.4	Genisolation aus genomischer DNA	149
6.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	149
6.1.6	DNA-Konzentrationsbestimmungen	150
6.1.7	Sequenzierungen	150
6.2	Mikrobiologisches Arbeiten.	150
6.2.1	Bakterienstämme und Wachstumsmedien	150
6.2.2	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen	152
6.2.3	Anzucht und Langzeitlagerung von Bakterien	152
6.2.4	Plasmidisolation	153
6.3	Proteinexpression und Reinigung	153
6.3.1	Homo- und heterologe Proteinexpression <i>in E. coli</i>	153
6.3.2	Proteinexpression im Minimalmedium	153
6.3.3	Zellaufschluss	154
6.3.4	Reinigung mittels Poly-Histidin-Tag: IMAC	154
6.3.5	Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen	154
6.3.6	Reinigung über die Proteingröße: SEC	155
6.3.7	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen	155
6.4	Proteinanalytik	155
6.4.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	155
6.4.2	SDS-PAGE	156
6.4.3	Massenspektrometrische Untersuchung der Proteinsequenz	157
6.4.4	Circular-Dichroismus (CD)-Spektroskopie	157
6.4.5	Bestimmung der Enzymaktivität	158
6.4.6	Aktivitäts-basierte Halbwertszeitmessungen	159

6.5 Röntgenkristallstrukturaufklärung	159
6.5.1 Proteinkristallisation	160
6.5.2 Messung des Diffraktionsmusters	160
6.5.3 Strukturbestimmung	160
6.6 <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (NMR)	160
6.6.1 Probenvorbereitung	160
6.6.2 NMR-Messungen	161
6.7 <i>In-silico</i> -Experimente	161
6.7.1 Moleküldynamik-Simulationen	161
6.7.2 <i>Constraint network analysis</i> (CNA)	162
7 Anhänge	164
7.1 DNA- und Proteinsequenzen	164
7.2 Reinigungschromatogramme	170
7.3 NMR-Spektren	171
7.3.1 NMR-Zuordnung der Reaktionsprodukte der DERA-Reaktion mit Acetaldehyd	172
7.3.2 Chemische Verschiebungen der Rückgrat-Zuordnung der DERA	174
7.4 <i>In-silico</i> -Skripte und Kontrollanalytik	179
7.4.1 MD-Simulationen: <i>Input</i> -Skripte	179
7.4.2 MD-Simulationen: RMSD, Trägheitsradius und RMSIP Diagramme	182
7.4.3 CNA-Berechnungen: Gauß-Verteilung der Übergangszustände.	183
Danksagungen	184
Erklärung	186
Literaturverzeichnis	187

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	Circulardichroismus
CNA	<i>constraint network analysis</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CP	<i>Colwellia psychrerythraea</i>
CV	chemische Verschiebung
D5P	Desoxy-D-ribose-5-phosphat
DERA	Desoxy-D-ribose-5-phosphat Aldolase
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>deoxynucleotide triphosphate</i>
DOSY	<i>diffusion-ordered spectroscopy</i>
<i>DpnI</i>	<i>Diplococcus pneumoniae</i>
DSC	<i>dynamic scanning calorimetry</i>
DTT	1,4-Dithio-D-threitol
EC	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FIRST	<i>floppy Inclusions and rigid substructure topography</i>
G3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GDH/TPI	Glycerin-3-phosphate-Dehydrogenase/Triosephosphat-Isomerase
HF-Puffer	<i>high fidelity</i> Puffer der Phusion™ Polymerase
HSQC	<i>heterologous single quantum correlation</i>
IMAC	<i>immobilized metal ion</i> affinity chromatography
INADEQUATE	<i>incredible natural abundance double quantum transfer experiment</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
KP _i	Kaliumphosphat
LB	<i>lysogeny broth</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization - time of flight</i>
MD	<i>molecular dynamics</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>

OD	optische Dichte
PA	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i> Polymerase
PLP	Pyridoxalphosphat
ppm	<i>parts per million</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RMSF	<i>root mean square fluctuation</i>
RMSIP	<i>root mean square inner product</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAXS	<i>small-angle x-ray scattering</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SH	<i>Shewanella halifaxensis</i>
T4	<i>E. coli</i> Phage
TEA	Triethanolamin
TB	<i>terrific broth</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TFB	<i>transformation buffer</i>
TIM	Triosephosphatisomerase
TM	<i>Thermotoga maritima</i>
T_m	<i>melting temperature</i>
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
T_{org}	Optimale Wachstumstemperatur des Quellorganismus
T_p	Phasenübergangspunkt
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TROSY	<i>transverse relaxation optimized spectroscopy</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
wt	Wildtyp
ee	Enantiomerenverhältnis
v/v	<i>volume per volume</i>

Einbuchstaben-Code der 20 proteinogenen Aminosäuren¹

Aminosäure	Einbuchstabencode
Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
Cystein	C
Glutamat	E
Glutamin	Q
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

¹ Selenocystein und Pyrrolysin nicht eingerechnet

Zusammenfassung

Die 2-Deoxy-D-ribose-5-phosphate Aldolase (DERA) kann in der organischen Chemie verwendet werden, um Acetaldehyd als Donor-Molekül mit anderen Aldehyden als Akzeptoren stereoselektiv zu verknüpfen. Sie ist daher ein wichtiges Werkzeug in der Synthese von chiralen Bausteinen (unter anderem zur Herstellung von Naturstoffen) geworden. Im katalytischen Mechanismus wird eine Schiff'sche Base zwischen dem aktiven Lysin K167 und dem Donor-Molekül gebildet und dieses somit für den nukleophilen Angriff auf das zweite Carbonyl-Kohlenstoffatom aktiviert. Während als Akzeptor-Molekül verschiedene Aldehyde verwendet werden können, ist die Donor-Komponente auf Acetaldehyd (und strukturell ähnliche Verbindungen wie 2-Chloracetaldehyd) beschränkt. Daher wird die DERA auch als Acetaldehyd-abhängige Aldolase bezeichnet.

Nichtsdestotrotz existieren einige Nachteile, welche die Anwendung der (auf Grund ihrer hohen Proteinausbeute bei homologer Expression verwendeten) DERA aus *E. coli* in der organischen Synthese erschweren. Um eine aus synthetischer Sicht ausreichende Menge an Reaktionsprodukt(en) zu gewinnen, werden hohe Konzentrationen von Acetaldehyd (200-300 mM) verwendet; jedoch zeigt sich unter diesen Bedingungen eine schnelle Inaktivierung des Enzyms, welche sich durch das anschließende Entfernen des Substrats nicht wiederherstellen lässt. Auch ist zwar durch die Verfügbarkeit unterschiedlicher Akzeptormoleküle die DERA-katalysierte Reaktion nicht auf ein einziges Produkt beschränkt, jedoch ist deren Anzahl stark limitiert, sodass eine Erweiterung des Substratspektrums wünschenswert wäre, um weitere Synthesewege zu ermöglichen.

Ziel der Arbeit war es, die Aldolase für die organische Synthese zu optimieren. Dabei bestanden die Schwerpunkte einerseits in der Adaption für eine konkrete Anwendung, andererseits in der strukturbasierten Untersuchung der DERA, um ein besseres Verständnis von Aktivität und Stabilität des Enzyms zu erreichen, mit möglichen Implikationen für andere Biokatalysatoren.

Die Arbeit kann in drei Projekte unterteilt werden, die relativ unabhängig voneinander durchgeführt wurden. Das erste Projekt wurde zusammen mit der Arbeitsgruppe *Computational Pharmaceutical Chemistry and Molecular Bioinformatics* von Herrn Professor Holger Gohlke (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) behandelt. Dabei stand die Anwendung von *constraint network analysis* (CNA) zur Verbesserung der Thermostabilität der DERA aus *E. coli* (DERA_{EC}) im Vordergrund. Bei diesem Programm wird das Protein in Form eines Netzwerkes beschrieben, und über eine thermische Entfaltungssimulation können Rückschlüsse über dessen Thermostabilität gewonnen werden. Da die DERA das erste System war, bei der CNA zur Vorhersage von proteindestabilisierenden Mutationen verwendet wurde, stand bei diesem Projekt die Frage im Fokus, ob solche Vorhersagen möglich sind und wie hoch die Erfolgsrate bezüglich der

getesteten Mutanten ist. Eine DERA mit verbesserter Thermostabilität wäre zudem aus synthetischer Sicht interessant, da eine solche Variante auch robuster gegenüber anderen äußeren Bedingungen wie die Präsenz organischer Lösungsmittel oder hohe Substratkonzentrationen sein könnte. Über ein multiples Sequenzalignment mit thermophilen DERAs in Kombination mit CNA-Berechnungen auf Seiten des Kooperationspartners wurden insgesamt neben vier Kontrollen sieben Mutanten vorgeschlagen. Diese wurden anschließend kloniert, exprimiert, gereinigt und abschließend über CD-Spektroskopie und einen Stabilitäts-basierten Aktivitätsassay bezüglich ihrer Thermostabilität charakterisiert. Zwei der Mutanten (V103M und F200I) zeigten eine um ca. 3K verbesserte Thermotoleranz. Durch deren Kombination wurde die Stabilität der DERA_{EC} um insgesamt 5.5K erhöht. Leider konnte die Evaluation der Daten beim Schreiben dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen werden. Trotzdem konnte schon jetzt gezeigt werden, wie durch experimentell relativ geringen Aufwand (in zwei von sieben getesteten Einzelmутanten) eine erhöhte Hitzestabilität erzielt wurde, welches einer Erfolgsquote von ca. 30% entspricht.

In dem zweiten Projekt der Arbeit lag der Schwerpunkt ebenfalls auf der Thermostabilität der DERA, jedoch wurde hier eine andere Herangehensweise gewählt. Da die natürliche DERA-Reaktion, die Spaltung von Desoxy-D-ribose-5-phosphat, als Teil des Nukleotidabbaus im primären Stoffwechsel jedes Organismus stattfindet und somit universell in allen Lebewesen vorhanden ist, wurden vergleichende Studien unterschiedlicher DERA-Orthologe durchgeführt, deren Quellorganismen an extreme äußere Bedingungen angepasst sind. Neben der mesophilen DERA_{EC} und zwei hyperthermophilen Varianten aus *T. maritima* und *P. aerophilum*, welche sich durch eine besonders hohe Hitzeresistenz auszeichnen, wurden zwei neue, bisher noch nicht charakterisierte, psychrophile (Kälte-liebende) Aldolasen aus *C. psychrerythraea* und *S. halifaxensis* verwendet. Enzyme solcher Organismen sind durch deren Anpassung an niedrige Temperaturen biotechnologisch interessante Werkzeuge, da sie auf Grund ihrer hohen Flexibilität eine bessere spezifische Aktivität und größere Substratbreite besitzen können. Nach der Klonierung und Reinigung der fünf Enzyme zeigte die biochemische Charakterisierung zwei Trends: Während die spezifische Aktivität und katalytische Effizienz mit steigender Wachstumstemperatur der entsprechenden Quellorganismen sinkt, steigt im Gegenzug die Stabilität der Enzyme. Mittels Röntgenkristallographie konnten die Strukturen beider psychrophiler DERAs aufgeklärt und mit den bereits bekannten 3D-Strukturen der anderen drei Enzyme verglichen werden. Dabei zeigte sich in den neuen Strukturen jeweils eine dimere Organisation; bezüglich ihrer Tertiär- und Quartärstrukturen unterscheiden sich beide Proteine kaum von dem Ortholog aus *E. coli*. Dagegen war in den hyperthermophilen Varianten eine andere relative Anordnung der monomeren Untereinheiten zu finden. Durch gezielte Mutationen im dimeren Interface war es möglich, vier der fünf Enzyme zu monomerisieren. Mit dieser Veränderung wurde gezeigt,

dass das native Dimer-Interface nur bei den hyperthermophilen DERAs zur Thermostabilität beiträgt. Nichtsdestotrotz konnte durch die Implementation einer intermolekularen Disulfidbrücke (A95C) die psychrophile Aldolase aus *C. psychrerythraea* um 8.4K stabilisiert werden. Durch eine Analyse der fünf DERA-Strukturen mittels CNA war es möglich, den stabilisierenden Effekt auch für das hyperthermophile Enzym aus *P. aerophilum*, welches zuvor nicht monomerisiert werden konnte, zu bestätigen und des Weiteren einen Erklärungsansatz für die höhere Aktivität der psychrophilen DERAs zu liefern. Durch die Beschreibung der Enzyme in Form eines Netzwerks wurden Unterschiede zwischen den meso- und psychrophilen Varianten aufgezeigt, da letztere weniger Wechselwirkungen zwischen der Substrat-Bindetasche und dessen umgebenden Helices besaßen. Eine unabhängige Bestätigung dieser Ergebnisse lieferte die Analyse der Temperaturfaktoren der Kristallstrukturen; in den Kälte-adaptierten Enzymen waren diese tendenziell in denjenigen Helices höher, welche die katalytische Tasche umschließen. Beide Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass in den psychrophilen DERAs ein flexibles katalytisches Zentrum den hohen Substratumsatz auch bei niedrigen Temperaturen begünstigt.

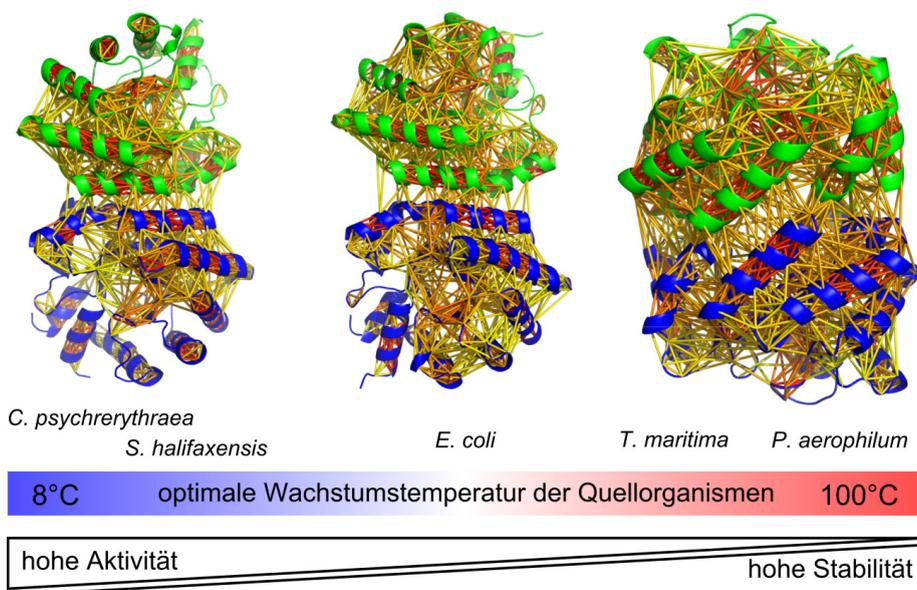


Abbildung 1: Aktivitäts-Stabilitätsbeziehung in extremophilen DERAs. Für die fünf charakterisierten Enzyme wurden im unteren Teil der Abbildung die experimentell bestimmten Aktivitäts- und Stabilitätswerte mit den Wachstumstemperaturen der entsprechenden Quellorganismen in Bezug gebracht. Oben sind die rigiden Kontakte (aus CNA-Berechnungen) zwischen Aminosäurepaaren von drei exemplarisch ausgewählten Enzymvarianten (*C. psychrerythraea* links, *E. coli* in der Mittel und *P. aerophilum* rechts) dargestellt.

Die verschiedenen DERAs wurden bezüglich der Umsätze von enantio- und diastereomeren Fluoreszenzsubstraten getestet, welche zuvor in dieser Arbeitsgruppe synthetisiert werden konnten. Dabei zeigten die hyperthermophilen Varianten keine Produktbildung, während die psychrophilen Enzyme neben dem (vom natürlichen Substrat abgeleiteten) 2-Desoxy-D-ribosemethylumbeliferon auch die L-Ribose- und D-Xylose-Verbindungen umsetzten. Dies lässt zwar auf Grund der Syntheserichtung, bei der in einer Retro-Aldolreaktion die stereogene Aldoleinheit abgebaut wird, keine direkten Aussagen bezüglich deren Enantioselektivität zu, da ein (ebenfalls in dieser Arbeitsgruppe entwickelter) Assay in Aldolrichtung der Reaktion von Acetaldehyd und Propanal für alle Enzyme einen hohen *ee*-Wert für das (*R*)-Enantiomer zeigte. Nichtsdestotrotz liefern die Ergebnisse einen ersten Hinweis für die größere Substratbreite der psychrophilen DERAs, da diese einen deutlich höheren Umsatz für bestimmte Verbindungen zeigten als das entsprechende Ortholog aus *E. coli*.

In dem dritten Hauptprojekt wurde die geringe Substrattoleranz der DERA_{EC} bezüglich hoher Konzentrationen von Acetaldehyd analysiert. Während in zahlreichen Veröffentlichungen versucht wurde, durch die Charakterisierung von neuen, Acetaldehyd-stabileren Orthologen das Problem zu umgehen, war es Ziel dieser Arbeit, die Mechanismen der Deaktivierung zu verstehen. Ausgangshypothese war die Überlegung, dass die Reaktion des Aldehyds mit den äußeren Lysinen den polaren Gradienten innerhalb der Struktur verändern und somit eine Destabilisierung bzw. Entfaltung des Proteins verursachen könnte. Zwar konnte indirekt über Massenspektrometrie eine Iminbildung in den äußeren Lysinen nach Acetaldehyd-Inkubation nachgewiesen werden, jedoch zeigte die Testung einer neuen DERA, welche im Vergleich zum aus *E. coli* stammenden Enzym anstelle von 19 äußeren Lysinen nur eines besitzt, keine Verbesserung der Substrattoleranz. Über ein TROSY-Spektrum der ¹⁵N-markierten DERA vor und nach Substratbehandlung wurden Unterschiede in den chemischen Verschiebungen aufgezeigt. Um die entsprechenden Aminosäuren zu lokalisieren, konnte durch Dreifach-Resonanz-Experimente [HNCO/HA(CA)CO und HNCA/HN(CO)CA] das vollständige Proteinrückgrat der DERA zugeordnet werden. Mit Hilfe dieser Informationen wurde abgeleitet, dass der im TROSY-Spektrum beobachtete Effekt die Aminosäurereste in der Nähe des Substrats betrifft. Eine NMR-Analyse der niedermolekularen Verbindungen, welche nach dem Entfernen des Substrats weiterhin mit dem Protein interagieren, lieferte weitere Hinweise für die Vermutung, dass Reaktionsprodukte an das Proteininnere binden und so das aktive Zentrum blockieren. Dieser Effekt konnte teilweise durch Erhitzen wieder rückgängig gemacht werden.

Die Kristallstruktur der DERA vor und nach Acetaldehyd-Inkubation wurde mit hoher Auflösung aufgeklärt. Diese zeigt im inaktiven Enzym ein kovalent gebundenes Reaktionsprodukt, welches das katalytisch aktive Lysin (K167) mit einem benachbarten Cystein (C47) verknüpft. Es wurde ein Reaktionsmechanismus postuliert, bei dem Crotonaldehyd (**1**) als das

Aldolprodukt 3-Hydroxybutanal (**2**) von zwei Acetaldehyd-Molekülen (**3**) nach einer Wassereliminierung eine Schiff'sche Base mit der Lysin-Seitenkette bildet, gefolgt von einer Michael-Addition der Thiolgruppe des Cysteins an das C β -Atom des Inhibitors. Um diesen Mechanismus einer Suizidinhibierung zu unterstützen, wurde der direkte Einfluss der vermuteten reaktiven Spezies auf das Enzym getestet. Tatsächlich zeigte Crotonaldehyd (**1**) eine im Vergleich zu Acetaldehyd (**3**) mehr als 100-fach stärkere Inhibierung der DERA. Durch einen C47M-Austausch konnte andererseits eine vollständig Acetaldehyd-stabile Enzymvariante erstellt werden, welche sogar in einer Übernachtinkubation in 1 M des Substrats keinen Aktivitätsverlust zeigte. Somit erscheint diese Mutante als vielversprechender Katalysator für synthetische Anwendungen.

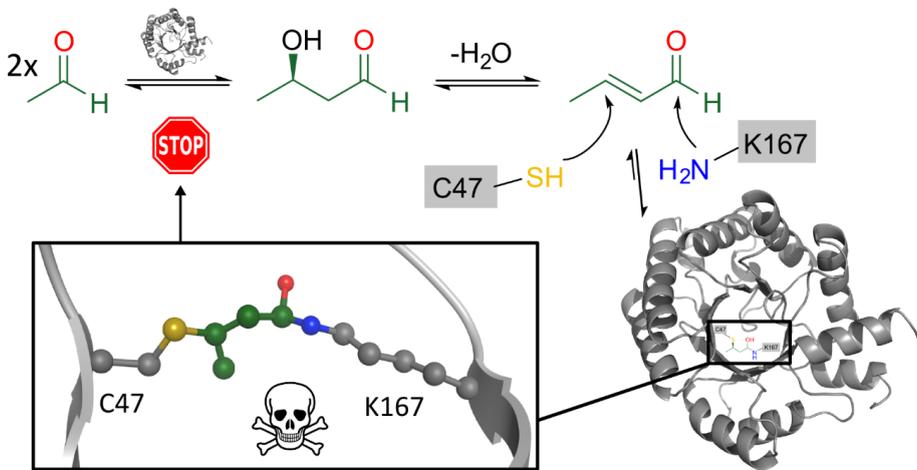


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus, welcher zur Inaktivierung der DERA führt. Das Aldolprodukt 3-Hydroxybutanal (**2**), welches durch eine DERA-katalysierte Reaktion von zwei Acetaldehyd-Molekülen (**3**) gebildet wird, kann nach einer Wassereliminierung von K167 (Iminbildung) und C47 (Michael-Addition) nukleophil angegriffen werden. Durch die kovalente Verknüpfung von Crotonaldehyd (**1**) als Suizid-Inhibitor im aktiven Zentrum verliert das Enzym seine katalytische Funktion.

Abstract

In organic synthesis, 2-desoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA) can be used for the stereoselective formation of C-C-bonds between acetaldehyde as donor molecule and other aldehydes as acceptors. Hence, it has become an important tool in the synthesis of chiral building blocks, e.g., for natural products. In its catalytic mechanism a Schiff Base is formed between the active lysine K167 and the donor aldehyde, which is thus being activated for nucleophilic attack on the second carbonyl C-atom. While different aldehydes can be used as acceptor molecules, the donor substrate is limited to acetaldehyde (and other structural similar compounds such as 2-chloroacetaldehyde). Hence, DERA is also described as acetaldehyde-dependent aldolase.

However, practical application of DERA from *E. coli* (commonly used due to its high protein yield during homologues expression) is limited by some disadvantages. In order to gain a sufficient amount of reaction product(s) from a synthetic point of view, high concentrations of acetaldehyde (200-300 mM) are needed. Unfortunately, under these conditions the enzyme is rapidly deactivated and activity cannot be restored upon removing the substrate. Moreover, the range of available acceptor molecules still restricts the number of possible synthesis products considerably. Thus, an extension of the substrate spectrum would be desirable to enable additional synthetic pathways.

The aim of this work was the optimization of this aldolase for organic synthesis. On the one hand there was a focus on adaptation to a specific application, on the other hand structural investigations were envisaged to gain a more general understanding of activity and stability in this enzyme, with possible implications for other biocatalysts.

This thesis can be divided into three parts, which were performed relatively independently of each other. The first project was realized together with the group *Computational Pharmaceutical Chemistry and Molecular Bioinformatics* of Professor Holger Gohlke (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) and focussed on the application of *constraint network analysis* (CNA) to improve the thermostability of DERA from *E. coli* (DERA_{EC}). Here a protein is described as a constraint network, from which information on its thermostability can be gained by a thermal unfolding simulation. As DERA was the first system subjected to prediction of stabilizing protein mutants by CNA, one aim of this project was to find out whether this is a viable approach yielding a reasonable rate of success. Additionally, DERA with improved thermostability would be interesting from a synthetic point of view, as such a variant might also be more tolerant against other external conditions, such as organic solvents or high substrate concentration. Using a multiple sequence alignment of thermophilic DERAs in combination with CNA calculations, our cooperation partner suggested (next to four controls) seven mutations intended to improve the

thermostability of DERA. These mutants were cloned, expressed and purified. Finally, thermostability was tested both via CD-spectroscopy and a stability-based activity assay. Two mutants (V103M and F200I) showed an increase of their melting temperatures by about 3K, compared to the wildtype. By combining both mutations, this value could be further improved to 5.5K. Unfortunately data evaluation has not been finished until now. However, it already has been shown that thermostabilized variants could be obtained without large experimental effort (in two out of seven tested single mutants, which is equivalent to a success rate of around 30%).

The second project also focussed on the thermostability of DERA, but in this case a different methodology was used. The natural DERA reaction, the cleavage of desoxy-D-ribose-5-phosphate in nucleotide degradation, is part of the primary metabolism and thus universal in all living organisms. Therefore, comparative studies were performed on DERAs derived from source organisms that are adapted to very different thermal conditions. Next to mesophilic DERA_{EC} and two hyperthermophilic variants from *Tmaritima* and *P.aerophilum*, which are highly heat-stable, two not-yet-characterized psychrophilic (cold-loving) aldolases from *C.psychrerythraea* and *S.halifaxensis* were used. Such enzymes are adapted to low temperatures and are biotechnologically interesting tools, as their higher flexibility can result in a broader substrate spectrum and a better activity. After cloning, expression and purification, biochemical characterization of all five enzymes revealed two trends: While specific activity and catalytic efficiency drop with increasing growth temperature of the hosts, enzyme stability increases.

The structures of both psychrophilic DERAs could be determined via x-ray crystallography, revealing dimeric proteins resembling their mesophilic counterparts in both tertiary and quaternary structure. In contrast, both hyperthermophilic variants feature a different relative orientation of the monomeric subunits. By site-directed mutagenesis within the dimer interface it was possible to monomerize four out of five enzymes. The characterization of these variants showed that the native dimer interface contributes to stability only in the hyperthermophilic enzymes. Nevertheless, the introduction of a disulphide bridge in the interface of the psychrophilic DERA from *C.psychrerythraea* (A95C) did confer increased thermostability (8.4K). The analysis of all five aldolases with CNA confirmed the intermolecular stabilization effect also in the second hyperthermophilic enzyme from *P.aerophilum*, which could not be monomerized by mutagenesis, and also suggested a possible explanation for the higher activity of the two psychrophilic DERAs. The description of the enzymes as constraint networks revealed particularly sparse interactions between the substrate pocket and its surrounding α -helices in the psychrophilic proteins. An independent confirmation of these results was obtained by the analysis of the temperature factors of the x-ray structures; only in the cold-adapted enzymes the distribution of B-factors revealed a tendency towards increased flexibility in those helices that surround the binding-pocket. Thus, both findings provide independent clues that in psychro-

philic DERAs a flexible catalytic centre supports a high substrate conversion rate also at low temperature.

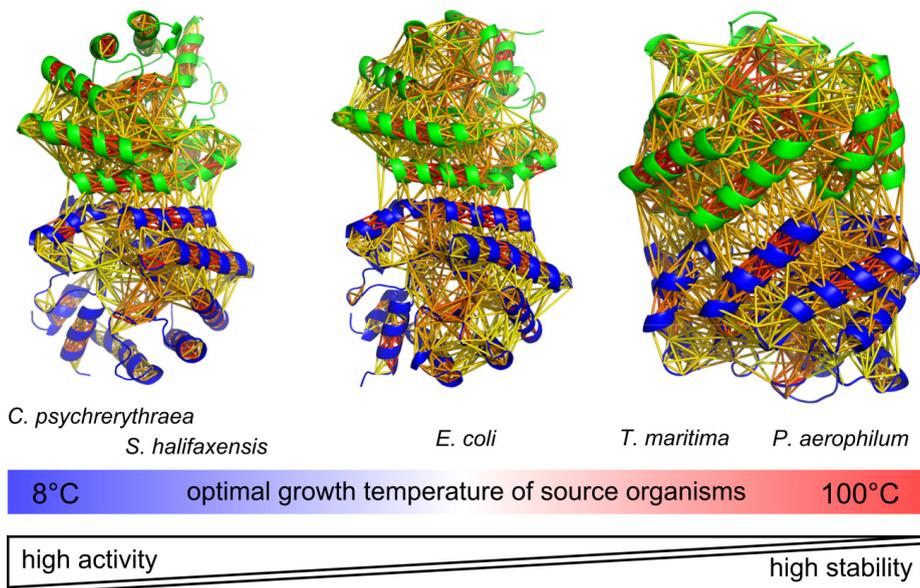


Figure 1: Activity-stability relationship in extremophilic DERAs. For the five characterized enzymes the experimentally-determined activity and stability values are related to the optimal growth temperature of the source organisms in the lower part of the figure. At the top the rigid contacts between amino acid pairs (derived from CNA calculations) are shown for three exemplary enzyme variants (left, *C. psychrerythraea*; center, *E. coli*; right, *P. aerophilum*)

These different DERAs were tested for the enantio- and diastereoselective conversion of fluorogenic substrates, which have been previously synthesized in this working group. Neither of the hyperthermophilic DERAs showed any product formation, whereas the psychrophilic enzymes converted both 2-deoxy-D-ribose methyl-umbelliferone (derived from the natural substrate) and its L-ribose and D-xylose analogues. As this reaction takes the retro-aldol direction where the stereogenic aldol moiety is degraded, no direct conclusion related to the enantioselectivity of the enzymes is possible. An assay in aldol direction using the reaction of acetaldehyde with propanal (also developed in this group) showed indeed a high *ee*-value for the (*R*)-enantiomer in all five enzymes. However, the results also give a first hint at a broader substrate spectrum of psychrophilic DERAs because these enzymes showed a higher conversion rate for certain compounds, compared to the orthologue from *E. coli*.

In the third main project the poor tolerance of DERA_{EC} towards high concentrations of acetaldehyde was analyzed. While numerous studies have been striving for new, more

acetaldehyde-resistant DERAs, this project was focussed on understanding the mechanism underlying this deactivation process. The initial hypothesis was based on the idea that the reaction of acetaldehyde with the outer lysines might decrease the polarity gradient between the hydrophobic core and the outer protein part - resulting in a destabilization or (partly) unfolding of the enzyme. Though an imine formation of the outer lysines after acetaldehyde incubation could be proven indirectly via mass spectrometry, experimental testing of a new DERA with only one exposed surface lysine (compared to 19 in DERA_{EC}) did not show improved substrate tolerance. A TROSY-spectrum of ¹⁵N-labeled DERA before and after acetaldehyde treatment revealed differences in the chemical shifts between both forms. To identify the affected residues, a complete backbone assignment of untreated DERA was performed using triple resonance HNCA/HN(CO)CA and HNCO/HN(CA)CO experiments. The information was used to localize the observed effect in the TROSY-spectrum to distinct amino acids that surround the natural substrate. By using NMR spectroscopy on a small-molecule scale further hints were obtained that reaction products bind to the inner protein part and block the active centre: even after removal of the substrate, interactions of small molecules with the protein were detected. This effect could be partly reversed via heating.

The crystal structure of DERA before and after acetaldehyde treatment was determined at high resolution, revealing a covalently bound reaction product connecting the catalytically active lysine (K167) to a nearby cysteine (C47) in the inactive enzyme. A reaction mechanism was postulated where crotonaldehyde (**1**) as the aldol product (**2**) of two acetaldehyde molecules (**3**) after the elimination of water forms a Schiff base with the lysine side chain, followed by Michael addition of the cysteine thiol group to the C_β atom of crotonaldehyde (**1**). In support of this mechanism, direct incubation of DERA with this aldehyde results in a more than 100-fold stronger inhibition, compared to acetaldehyde (**3**). A C47M mutation gave rise to a fully acetaldehyde-resistant DERA, which did not lose any activity even after over-night incubation in 1M acetaldehyde. Thus, this improved catalyst appears perfectly suited for organic synthesis.

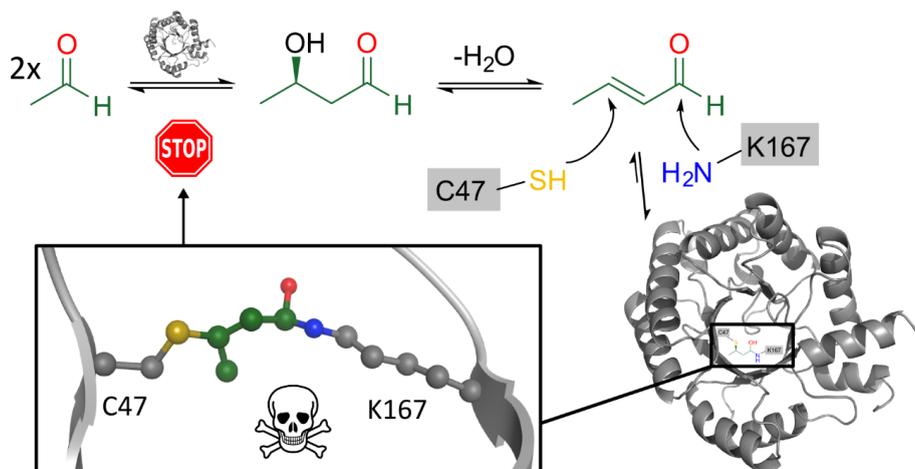


Figure 2: Schematic representation of the reaction mechanism leading to an inactive DERA. The aldol product **2** of two acetaldehyde molecules (**3**) can eliminate a water molecule; the obtained crotonaldehyde (**1**) can be attacked by nucleophilic side-chains of K167 (imine formation) and C47 (Michael addition). Due to the covalent connection, crotonaldehyde (**1**) acts as suicide inhibitor to the active centre, the enzyme loses its catalytic function.

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Wenn man an den gezielten Einsatz von Biokatalysatoren (Enzymen) für chemische Prozesse denkt, bringt man dies möglicherweise mit neuen Technologien in Verbindung, welche erst durch biochemische Forschung ab der 2. Hälfte des 20. Jahrhunderts möglich geworden sind. Dabei übersieht man jedoch, dass schon beim Bierbrauen, der Käseherstellung und bei der Zubereitung eines Hefeteigs vor über 2000 Jahren dasselbe Verfahren benutzt wurde. Damals wie heute beruht das generelle Prinzip der biokatalysierten chemischen Reaktion darauf, dass von Mikroorganismen produzierte Enzyme selektiv Substrate umsetzen. In einer enzymkatalysierten Reaktion stabilisieren diese den Übergangszustand zwischen Substrat und Produkt, sodass die Aktivierungsenergie für die chemische Reaktion gesenkt wird.^[1]

Enzyme sind faszinierende Werkzeuge der Natur. Sie steuern in jedem lebenden Organismus den Stoffwechsel, indem sie hochspezifisch Substrate umsetzen und somit z. B. den Auf- und Abbau der Nährstoffe ermöglichen. Als Untergruppe der Proteine bestehen Enzyme aus 20 (plus zwei seltenen) Bausteinen (den proteinogenen Aminosäuren), durch dessen Sequenz die dreidimensionale Struktur des Enzyms definiert wird. Diese räumliche Anordnung der Aminosäurekette ist entscheidend für die Substratspezifität und -Spezifität sowie die katalytische Effizienz. Denaturiert man sie z. B. durch Erhitzen, bleibt die Verknüpfung der Aminosäuren zwar erhalten, jedoch geht die räumliche Anordnung und somit die katalytischen Eigenschaften vollständig verloren, da sich nach der Zerstörung des katalytischen Zentrums der sog. Enzym-Substrat-Komplex nicht mehr ausbilden kann.

In der Medizin hat ein Verständnis der Wirkungsweise von Enzymen eine große Bedeutung bezüglich Stoffwechselkrankheiten, der Antibiotikaentwicklung und der Tumorforschung (um nur drei wichtige Beispiele zu nennen). Man hat jedoch früh erkannt, dass die enzymkatalysierten Reaktionen ein hohes Potential für die Anwendung in der Synthesechemie haben: Sie sind sehr schnell (bis zu 10^{14} -mal^[2] schneller als nicht-katalysierte Reaktionen), sie laufen unter milden Bedingungen bezüglich Druck, Temperatur und pH-Wert ab und sind außerdem stereo- und regioselektiv (was bedeutet, dass eine definierte räumliche Anordnung während der Bindungsknüpfung gewährleistet wird). Daher ist es nicht überraschend, dass der Einsatz von Biokatalysatoren in der chemischen und pharmazeutischen Industrie in den letzten Jahren und Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung gewonnen hat.^[3-4] Trotzdem sind viele Enzyme für biokatalytische Anwendungen nur bedingt geeignet. Dies kann daran liegen, dass die Enzyme

durch die Natur für bestimmte Zwecke, wie die Herstellung eines speziellen Produktes unter definierten Bedingungen optimiert wurden, und daher hochspezialisiert sind. Daher kann eine Anwendung außerhalb dieses biologischen Systems erschwert werden, da wichtige Voraussetzungen wie eine hohe Substratbreite oder eine gute Stabilität gegenüber Temperatur, organischen Lösungsmitteln und hohen Substratkonzentrationen nicht immer erfüllt sind. Dank der Entwicklungen innerhalb der molekularen Genetik und der Strukturbiochemie¹¹ konnten in den letzten Jahrzehnten Kenntnisse über den genauen Wirkmechanismus von Enzymen gewonnen werden. Dieses Wissen kann dazu verwendet werden, um Enzyme so zu optimieren, damit sie die oben beschriebenen Eigenschaften erhalten.

Eine wichtige Gruppe von biokatalytischen Enzymen stellen die Aldolasen dar. Diese katalysieren die Verknüpfung zweier Kohlenstoffatome und haben somit ein hohes Potential, wichtige Werkzeuge in Synthese von Naturstoffen zu sein. Die Aldolase, um welches es in dieser Arbeit geht, ist die 2-Desoxy-D-ribose-5-phosphat Aldolase (DERA), die im Stoffwechsel am Abbau von Nucleotiden in einer Retro-Aldolreaktion durch die Spaltung von 2-Desoxy-D-ribose-5-phosphat (**4**) in Acetaldehyd (**3**) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (**5**) beteiligt ist (siehe Abbildung 1-1a).^[5] Diese Reaktion läuft stereoselektiv ab, was bedeutet, dass nur die D-Ribose (bei der, wie in der Abbildung zu sehen ist, die OH-Gruppe am dritten Kohlenstoffatom nach vorne zeigt) umgesetzt werden kann. Da die DERA die einzige Aldolase mit Acetaldehyd (**3**) als Donor-Molekül ist, wird sie auch Acetaldehyd-abhängige Aldolase genannt.

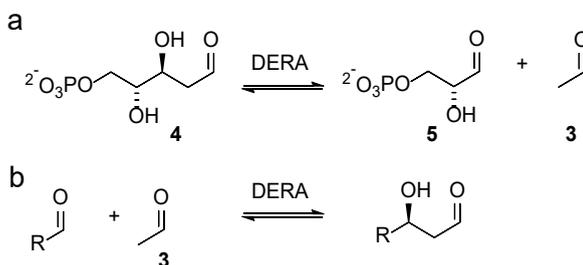


Abbildung 1-1: DERA-katalysierte Aldolreaktion (a) im Nucleotidabbau des Stoffwechsels und (b) in der organischen Synthese. Während in der ersten Reaktion ein stereogenes Zentrum abgebaut wird, wird die DERA in der organischen Chemie dazu verwendet, um ein neues Zentrum zu bilden.

In der organischen Synthese kann das Enzym zu einer Aldoladdition von zwei Aldehyd-Molekülen (**3**) verwendet werden (Abbildung 1-1b). Im Gegensatz zu der physiologischen DERA-Aldolspaltung wird also ein neues stereogenes Zentrum aufgebaut. An das Produkt kann

¹¹ Als wichtigste Methode sei hier die Röntgenkristallstrukturanalytik zu nennen, mit der es möglich ist, über die Beugung von Röntgenstrahlen an einem Kristall die 3D-Struktur von Makromolekülen zu bestimmen.

nun ein zweites Acetaldehyd-Akzeptormolekül (**3**) addiert werden. Beide Produkte können als Bausteine für eine breite Anzahl an Naturstoffen verwendet werden.^[6-10]

Obwohl die DERA bereits erfolgreich in der Naturstoffsynthese angewendet werden konnte, ist der Einsatz durch verschiedene Nachteile limitiert. Zum einen ist der Biokatalysator auf die Umsetzung des D-Enantiomers der Desoxyribose beschränkt und in der Natur ist kein Enzym bekannt, welches die L-Konfiguration des Substrats umsetzt. Für die organische Synthese bedeutet dies, dass bei der Herstellung der chiralen Verbindung nur eine Konfiguration möglich ist. Während die DERA nur Acetaldehyd (**3**) als Donor-Molekül verwenden kann, kommen zwar verschiedene Aldehyde als Akzeptor-Substrate in Frage, jedoch ist auch deren Anzahl auf wenige Moleküle beschränkt.^[6] Es besteht daher der Bedarf, das Substratspektrum der DERA zu erweitern.

Ein weiteres Problem stellt die geringe Stabilität gegenüber hohen Konzentrationen des natürlichen Substrats Acetaldehyd (**3**) dar. Bei der für die organische Synthese notwendigen Menge ist die DERA schon nach wenigen Stunden vollständig inaktiv und lässt sich auch durch Entfernen des Substrats nicht wieder reaktivieren,^[11-12] wie es in Abbildung 1-2 schematisch gezeigt ist.

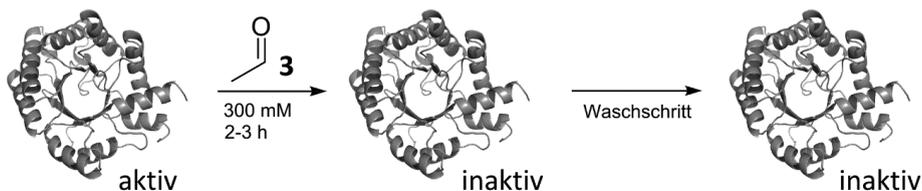


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Effekts von Acetaldehyd (3**) auf die Aktivität der DERA.** Wie hier durch die Symbole gekennzeichnet, ist das Enzym schon nach wenigen Stunden Inkubationszeit in 300 mM Substratkonzentration nicht mehr aktiv und selbst wenn das Substrat anschließend aus der Lösung entfernt wird, kann die Aktivität nicht wieder hergestellt werden.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die DERA (aus *E. coli*) für die Anwendung in der organischen Synthese zu optimieren. Während die Änderung der Stereoselektivität und die direkte Anwendung in der organischen Synthese in der Dissertation von Irene Küberl, née Kullartz, bearbeitet wurden und aktuell von Carolin Bisterfeld fortgesetzt werden, liegt hier der Fokus auf der Enzymstabilität und -aktivität. Dabei soll ein tieferes Verständnis der strukturellen Bedingungen für Stabilität und Aktivität bei hohen Temperaturen und Substratkonzentrationen erzielt werden, die dann auch auf andere Enzyme übertragen werden könnten.

Ein Schwerpunkt der Arbeit sind Untersuchungen zur geringen Toleranz der DERA gegenüber hohen Acetaldehyd-Konzentrationen. Wie in Kapitel 1.1 erwähnt, ist die irreversible Inaktivierung der DERA nach Acetaldehyd-Inkubation ein großes Problem. Um den Mechanismus hinter diesem Prozess zu verstehen, soll neben kinetischen Studien der Schwerpunkt auf strukturellen Untersuchungen insbesondere mittels NMR-Spektroskopie und Proteinkristallographie gelegt werden, welche zwar in der Vorbereitung, Messdauer und Datenauswertung deutlich aufwendiger sind als andere Methoden, dafür aber sehr detaillierte Ergebnisse bezüglich der molekularen Mechanismen und strukturellen Änderungen erlauben. Somit könnte eine Lücke geschlossen werden, da in allen Studien, in denen nach alternativen DERAs mit einer höheren Enzymstabilität gesucht wurde, die Frage nach dem Mechanismus, welcher die Inaktivierung verursacht, unbeantwortet blieb. Das Wissen um die molekularen Ursachen der geringen Acetaldehyd-Toleranz könnte dann Möglichkeiten eröffnen, diese zu verhindern bzw. den ursprünglichen aktiven Zustand wieder herzustellen.

Ein weiterer Ansatz soll gewählt werden, um das Enzym insgesamt thermostabiler zu machen. Eine hitzestabilere DERA könnte bei höheren Temperaturen eingesetzt werden und wäre vielleicht auch resistenter gegenüber anderen äußeren Einflüssen wie z. B. durch Lösungsmittel und /oder hohe Substratmengen. Der Kooperationspartner Daniel Ciupka aus der Arbeitsgruppe von Prof. Gohlke (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) soll mittels theoretischer Berechnungen (*in-silico*-Methoden) Mutationen der DERA_{EC} vorschlagen, welche dann hergestellt und bezüglich ihrer Thermostabilität getestet werden. Unabhängig von den oben genannten Vorteilen, welches das hitzestabilere Enzym hätte, dient die DERA als Modell für die erste praktische Anwendung einer von der AG Gohlke entwickelten neuen Methode (*constraint network analysis*), um die Thermostabilität von Proteinmutanten vorherzusagen.

In einem dritten Teil soll die Aktivität und Stabilität von extremophilen DERAs sowohl auf biochemischer und struktureller Ebene untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist geplant, neben den bereits bekannten DERAs aus thermo- und mesophilen Organismen, welche in besonders heißen bzw. eher gemäßigten Lebensräumen wachsen, das Spektrum durch Enzymvarianten von sog. psychrophilen Organismen zu erweitern. Diese Lebensformen sind auf Grund ihrer äußeren Umgebung an die Kälte angepasst. Da ihre Enzyme auch bei niedrigen Temperaturen genauso effizient arbeiten müssen wie die mesophilen und thermophilen Pendanten, ist deren spezifische Aktivität besonders hoch, während die Thermostabilität geringer ist. Bisher sind wenige 3D-Strukturen solcher Enzyme bekannt; deshalb ist es Ziel der Arbeit zwei neue psychrophile DERAs zu exprimieren und zu reinigen. Nach einer biochemischen Charakterisierung soll über Röntgenkristallstrukturanalytik die Struktur der Enzyme gelöst werden. Anschließend soll entweder mit Hilfe der gelösten Strukturen oder, falls dies nicht

gelingt, über Strukturmodelle untersucht werden, welches die strukturellen Gründe für die unterschiedlichen Eigenschaften von DERAs aus extremophilen Organismen sind und ob die Kenntnisse dazu genutzt werden können DERAs bezüglich Aktivität/Stabilität weiter zu optimieren. Für diese Untersuchungen sind verschiedene Methoden denkbar. Fluoreszenz- oder NMR-Messungen könnten Auskunft über die Flexibilität der verschiedenen DERAs geben, während Mutagenesestudien (der Austausch bestimmter Aminosäuren) wichtige Reste identifizieren könnten, welche für die hohe Stabilität der thermophilen DERAs bzw. Aktivität der psychophilen DERAs verantwortlich sind. Denkbar ist außerdem, mittels *in-silico*-Methoden wie Moleküldynamiksimulationen und/oder *constraint network analysis* molekulare Ursachen für die Anpassung der Enzyme an extreme Bedingungen zu finden.

2 Kenntnisstand

2.1 Enzyme und Enzymstabilität

2.1.1 Enzyme aus extremophilen Organismen

Das Leben hat sich durch die Evolution an unterschiedliche Lebensräume angepasst. Dies hat zur Folge, dass sich die Enzyme der verschiedenen Lebensformen - trotz eines einheitlichen „Baukastens“ aus 22 Aminosäuren - in ihrer Funktion stark unterscheiden, da je nach äußeren Einflüssen unterschiedliche Nährstoffe, Abwehrmechanismen oder Schutz vor extremen Umweltbedingungen (z. B. Hitze, Kälte, erhöhte Salzkonzentrationen oder besonders hohe bzw. niedrige pH-Werte) notwendig sind. Die große Vielfalt an Biokatalysatoren bietet ein hohes Potential für deren Einsatz in der Synthesechemie, da z. B. nach neuen Enzymen gesucht werden kann, die es ermöglichen, Substrate umsetzen, bei denen die bisher bekannten Biokatalysatoren keine Aktivität gezeigt haben. Demzufolge wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von (Meta)genombibliotheken in Hochdurchsatzverfahren durchsucht, um Enzyme mit neuen oder verbesserten Funktionen zu finden.^[13-14]

Eine wichtige Adaption, welche in der Biotechnologie Anwendung findet, ist die Anpassung von Mikroorganismen an hohe Temperaturen. Diese thermophilen (von altgriechisch θερμός *thermós* „warm“ sowie φίλος *philos* „liebend“) Lebensformen haben sowohl auf zellulärer als auf molekularer Ebene Schutzmechanismen entwickelt, um auch bei hohen Temperaturen (bis zu 122 °C^[15] - bei Temperaturen von über 80 °C spricht man auch von hyperthermophilen Organismen) zu überleben. Durch Vergleiche der 3D-Strukturen von (hyper)thermophilen Enzymen mit deren mesophilen Pendanten konnte eine Vielzahl von strukturellen Unterschieden festgestellt werden, welche die hohe Thermostabilität ermöglichen. Dies können z. B. hydrophobe Cluster, eine erhöhte Anzahl an Salzbrücken sowie intramolekulare Disulfidbrücken sein.^[16-18] Des Weiteren kann die Thermostabilität durch die Stärkung der intermolekularen Wechselwirkungen in oligomeren Proteinstrukturen verbessert werden.^[19-20] Diese Adaption wird, verglichen mit anderen Faktoren, deutlich weniger diskutiert und soll daher in dieser Arbeit anhand der DERA als Modellenzym ausführlich analysiert werden.

Enzyme, die bei hohen Temperaturen aktiv sind, bieten vielfältige Anwendungen in der Biotechnologie. Das wahrscheinlich bekannteste Beispiel ist die DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, welche für die Vervielfältigung von DNA-Sequenzen in der Polymerase-Kettenreaktion eine breite Anwendung in der Molekularbiologie gefunden hat.^[21] Im Laufe der

Jahre wurden neue Polymerasen charakterisiert, die oft verbesserte Eigenschaften wie eine höhere Geschwindigkeit oder Genauigkeit aufweisen, jedoch auf demselben Prinzip beruhen, dass sie bei hohen Temperaturen aktiv sind.^[22] Dies kann auch für andere Biotransformationen vorteilhaft sein, da bei höheren Temperaturen die Löslichkeit und die Diffusionsrate der Substrate steigen, sowie die Viskosität der Lösung sinken kann.^[23] Außerdem wird bei hohen Reaktionstemperaturen das Risiko von (z. B. bakteriellen) Kontaminationen vermindert.^[24] Weitere Vorteile entstehen durch die Eigenschaften thermophiler Enzyme, auch in organischen Lösungsmitteln oder bei hoher Substratkonzentration stabiler als deren mesophilen Pendanten zu sein.^[24-25]

Industriell werden thermophile Enzyme z. B. bei dem Abbau von Polymeren wie Zellulose, Xylan oder Chitin eingesetzt.^[26-27] In der Molekularbiologie sind sie oft auch attraktive Kandidaten zur gezielten Mutation von Proteinen (z. B. um die Substratspezifität zu erweitern), da sie durch ihre strukturelle Stabilität robuster gegenüber Veränderungen sind.^[28] So konnte die β -Glykosidase von *S. solfataricus* (optimale Wachstumstemperatur bei 70-75 °C)^[29] spezifisch verändert werden, sodass sie als Katalysator für die Synthese von Oligosacchariden eingesetzt werden kann.^[30] In einem anderen Fall konnte die Kofaktorspezifität der thermophilen Alkoholdehydrogenase von *P. furiosus* durch ortsgerichtete Mutagenese von NADPH zu NADH ausgetauscht werden.^[31]

Wenn man Organismen betrachtet, die sich an extreme Temperaturen angepasst haben, wird manchmal übersehen, dass solche Anpassungen auch an den unteren Teil der Temperaturskala erfolgt sind (siehe Tabelle 2-1). Dies ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass 71 % unserer Erde von Ozeanen bedeckt ist, bei denen zu 90 % eine Temperatur von $\leq 5^\circ\text{C}$ herrscht und auch auf dem Festland große Teile von Alaska, Russland, Kanada und der Antarktis permanent mit Eis bedeckt sind.^[32] Sogenannte psychrophile (von altgriechisch ψυχρός *psychrós* „kalt“, „kühl“ sowie φίλος *philos* „liebend“) Mikroorganismen haben sich an diese extremen Bedingungen angepasst. Man hat Mikrobiotope gefunden, die bei Temperaturen bis zu -60°C überleben können.^[33-34]

Tabelle 2-1: Unterteilung von Organismen bezüglich Anpassung an die Umgebungstemperatur

Anpassung	optimale Wachstums- temperatur	Beispielorganismus	
		Name	Lebensraum (Bsp.)
psychrophil	< 15 °C	<i>Corweillia psychrerythraea</i>	Antarktis
mesophil	20-45 °C	<i>Escherischia coli</i>	menschlicher Darm
thermophil	50-80 °C	<i>Thermus aquaticus</i>	heiße Quellen
hyperthermophil	> 80 °C	<i>Thermotoga maritima</i>	heiße Quellen

Während die Enzyme von thermophilen Organismen eine hohe Thermostabilität aufweisen müssen, besteht die Herausforderung von psychophilen Enzymen darin, dass eine ausreichende Reaktionsaktivierung trotz niedriger Umgebungstemperatur gegeben sein muss. Aus der Arrhenius-Gleichung (1) kann man ablesen, dass die Geschwindigkeitskonstante k einer chemischen Reaktion direkt von der Aktivierungsenergie E_A und der Temperatur T abhängt.

$$k \sim e^{-\frac{E_A}{T}} \quad (1)$$

Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass in einem psychophilen Organismus eine höhere Aktivierungsenergie durch ein Enzym notwendig ist, um die gleiche Reaktionsgeschwindigkeit wie z. B. in einem mesophilen Organismus bei 37°C zu erreichen. Dieser Effekt wird durch strukturelle Anpassungen der psychophilen Enzyme wie die Einbindung von Glycin-Clustern oder eine reduzierte Zahl von geladenen und hydrophoben Seitenketten erreicht.^[35-37] Dadurch kann die Flexibilität und somit auch die Umsatzrate der Biokatalysatoren erhöht werden. Betrachtet man jedoch die im Vergleich zu deren meso- und thermophilen Varianten geringe Anzahl von zur Verfügung stehenden 3D-Strukturen (< 100 *Protein-data-bank*-Einträge wurden gefunden, wenn man - Stand: Oktober 2015 - unter den Begriffen „*psychrophilic*“ und „*cold-adapted*“ nach psychophilen Enzymen gesucht hat), wird deutlich, dass weitere Untersuchungen erforderlich sind, um ein besseres Verständnis für die Adaption von Enzymen an niedrige Temperaturen zu gewinnen.

Die Eigenschaft von psychophilen Enzymen, durch eine hohe Flexibilität besonders hitzelabil und kälteaktiv zu sein, könnte vielfältige Einsatzmöglichkeiten im biotechnologischen Bereich bieten. Ein klassisches Beispiel ist der Einsatz in Waschmitteln, da die allgemeine Entwicklung in die Richtung geht, bei (für die Wäsche schonenderen) niedrigen Temperaturen zu waschen.^[38] Ein weiterer Vorteil könnte sein, dass auf Grund der hohen Aktivität weniger Enzym eingesetzt werden muss und außerdem durch eine Inaktivierung des Katalysators bei deutlich mildereren Bedingungen eventuelle Nebenreaktionen minimiert werden^[38] bzw. hitzelabile Substrate oder Produkte stabil bleiben.^[39] Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass psychophile Enzyme durch deren hohe Flexibilität ein breiteres Substratspektrum akzeptieren können.^[40]

2.1.2 Verbesserung der Eigenschaften von Enzymen

Die Suche nach neuen Enzymen, die spezifische Eigenschaften wie eine höhere Thermostabilität oder eine bessere Aktivität haben, ist mit Problemen verbunden, welche die Entwicklung von alternativen Methoden erfordern. Zum einen existiert nicht für jede Anwendung der entsprechende Biokatalysator bzw. wurde bisher noch nicht charakterisiert. Eine weitere Schwierigkeit

kann die Wahl des Organismus für die Expression des Zielproteins^{III} sein. Der in der Biochemie bevorzugte Organismus ist *Escherichia coli*, welcher sehr gut untersucht und deshalb relativ einfach zu manipulieren ist. Außerdem zeichnet er sich durch eine schnelle Wachstumsrate, leichte Kultivierbarkeit und eine hohe Menge an produziertem Protein während der Expression aus.^[41] Jedoch kann die Expression von heterologen (nicht zelleigenen) Proteinen zu Problemen wie einer unkorrekten Faltung oder einer geringen Proteinausbeute führen.^[42] Unabhängig vom Expressionslevel kann auch die geringe Aktivität von beispielsweise thermophilen Enzymen die Anwendung in der Biotechnologie erschweren. Alternativ ist es aber möglich, bereits etablierte Enzyme so zu verändern, dass sie die gewünschte Funktion erhalten, ohne bereits vorhandene Eigenschaften wie eine gute Ausbeute bei der Proteinexpression in *E. coli* oder eine hohe Aktivität zu senken.

Um Enzyme zu verbessern, sind zwei unterschiedliche Strategien zu unterscheiden, welche auch von *Bornscheuer et al.* als zweite und dritte Welle der Biokatalyse bezeichnet werden.^[43] Während in der ersten Welle erstmals Biokatalysatoren gezielt für die Transformation chemischer Verbindungen eingesetzt wurden (ohne die Enzyme jedoch zu verändern), wurde in der zweiten Welle der Biokatalyse versucht, Enzyme gezielt durch rationales Design zu manipulieren, damit sie die entsprechenden Anforderungen wie z. B. die Umsetzung eines bestimmten Substrats (besser) erfüllen können.^[43] In den meisten Fällen setzt ein solches Vorgehen ein möglichst genaues Verständnis der Struktur des zu verändernden Enzyms voraus. Während es sehr schwierig ist, die notwendigen Faktoren für die Aktivität eines Biokatalysators vorherzusagen, können stabilisierende Faktoren eines thermophilen Enzyms auf dessen homologes Analogon aus einem mesophilen Organismus übertragen werden, um so dessen Thermostabilität zu erhöhen. Beispiele dafür sind der Einbau von Disulfidbrücken,^[44-45] oder zusätzlichen Salz- bzw. Wasserstoffbrücken,^[46-47] durch welche die intramolekularen Wechselwirkungen im Protein verstärkt werden. Alternativ ist es auch möglich, durch die Einführung von zusätzlichen Prolin-Resten (insbesondere in den Schleifen-Regionen) die Rigidität und damit die Stabilität des entsprechenden Proteins zu erhöhen.^[48-49]

Bei der *In-vitro*-Evolution (dritte Welle) werden möglichst große Mutantenbibliotheken durch zufallsgerichtete Methoden wie *Error-Prone* PCR^[50] oder *DNA-Shuffling*^[51] erzeugt, um dann im zweiten Schritt durch ein geeignetes Screeningverfahren die funktional besten Mutanten auszuwählen. Diese beiden Schritte werden so oft wiederholt, bis eine Enzymvariante die gewünschte Veränderung enthält. Die Methodik hat den Vorteil, dass keine Kenntnisse

^{III} Der Begriff Proteinexpression ist eigentlich nicht korrekt, da nur Gene und keine Proteine exprimiert werden. Jedoch hat sich diese Bezeichnung in der naturwissenschaftlichen Sprache soweit durchgesetzt (es gibt z. B. sogar schon eine Fachzeitschrift mit dem Titel „*Protein Expression and Purification*“), dass der Begriff auch in dieser Arbeit verwenden wird, da man ihn mittlerweile gemeingültig als anerkannt betrachten kann.

bezüglich der Struktur und/oder des Wirkmechanismus des Enzyms erforderlich sind. Es sind viele Beispiele bekannt, bei denen durch dieses Vorgehen die Aktivität, Stabilität oder die Substratbreite eines Biokatalysators verbessert werden konnte.^[52-55] Allerdings erfordert diese Strategie einen hohen zeitlichen und experimentellen Aufwand, da sehr große Bibliotheken erstellt und getestet werden müssen. Nicht ganz einfach kann auch die Auswahl eines geeigneten Screeningsystems sein, da man auf der einen Seite einen hohen Durchsatz mit einer einfach zu detektierenden Testreaktion (z. B. durch einen an das Substrat gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff) erreichen will, auf der anderen Seite keine falschpositiven Mutanten erzeugen will.^[56] Diese Screeningsubstrate haben zwar im Screeningsystem den gewünschten Effekt, jedoch kann dieser nicht direkt auf das eigentliche Substrat übertragen werden. In einem Artikel von Schmidt-Dannert und Arnold heißt es daher auch passend „*You get, what you screen for*“.^[57]

Möglich sind auch sogenannte semiempirische Methoden, bei denen z. B. strukturelle Kenntnisse in der Suche mit einbezogen, jedoch trotzdem große Bibliotheken von Enzymvarianten getestet werden. Damit werden beide oben vorgestellten Ansätze miteinander kombiniert. Ein Beispiel dafür wurde 2006 von *Reetz et al.* gezeigt. In einer iterativen Sättigungsmutagenese an denjenigen Stellen im Protein, bei denen ein hoher B-Faktor in der Kristallstruktur zu finden war, konnte die Thermostabilität einer Lipase nach insgesamt sechs Selektionsschritten um mehr als 50 °C gesteigert werden.^[58]

2.1.3 *In-silico*-Methoden und *constraint network analysis* (CNA)

Wenn man die beiden oben vorgestellten Konzepte der gerichteten Evolution und des rationalen Designs direkt miteinander vergleicht, werden die Vor- und Nachteile beider Methoden deutlich. Während im ersteren Ansatz keine Kenntnisse über den Mechanismus der Enzymreaktion erforderlich sind, kann bei der zweiten Methode der zu verbessernde Biokatalysator gezielt verändert werden, ohne große Mutantenbibliotheken testen zu müssen. Dies setzt jedoch voraus, dass man genau weiß, an welchen Positionen man das Enzym mutieren muss. Durch die rasante Verbesserung der Computerrechenleistung innerhalb der letzten Jahre und Jahrzehnte wurde eine Vielzahl von Programmen entwickelt und optimiert, die es ermöglichen, das Verständnis für die Wirksamkeit eines Enzyms zu verbessern und mögliche Mutationsstrategien vorherzusagen.^[59] Die im Folgenden beschriebenen Methoden beschränken sich dabei zum größten Teil auf die Bereiche der Thermostabilität bzw. Flexibilität von Proteinen, da dies auch den Schwerpunkt dieser Arbeit darstellt. Um einen noch tieferen Einblick in die aktuelle Forschung in der Computerbiochemie zur Verbesserung von Enzymaktivität, -spezifität, -selektivität und -stabilität zu bekommen, sei an dieser Stelle auf einen sehr guten Übersichtsarti-

kel von Damborsky und Berzovsky verwiesen, bei denen eine große Anzahl von unterschiedlichen Konzepten und den daraus entwickelten Methoden miteinander verglichen werden.^[60]

Eine weit verbreitete Methode, um die Dynamik von Proteinen oder anderen Molekülen zu verstehen, ist die Moleküldynamik-(MD-)Simulation. Dadurch kann man in einem System wie z. B. einem Enzym die Bewegung der Atome in einem bestimmten Zeitraum vorhersagen.^[61] Dazu fügt man dem System kinetische Energie zu, indem man den Atomen Bewegungsimpulse bei einer bestimmten Temperatur zuweist. Diese sind zufällig, entsprechen aber in der Summe der Maxwell-Verteilung. Trotz der sich stetig verbessernden Computertechnologie ist es heute immer noch nicht möglich, große Moleküle und deren Bewegung als quantenmechanische Objekte exakt zu berechnen. Deswegen setzt man systemspezifische Kraftfelder ein, durch die beispielsweise die Bindungslängen, -energien und -winkel in einem Protein definiert werden.^[61] Die Anwendungen von MD-Simulationen sind sehr vielfältig und reichen von Untersuchungen bezüglich Konformationsänderungen und Flexibilität von Proteinen, Protein-Ligand-Wechselwirkungen, Proteinfaltung bis hin zur Vorhersage von Enzymkinetik und Substratspezifität.^[62-63] In Bezug auf die Charakterisierung von extremophilen Proteinen konnten in zahlreichen Untersuchungen neue strukturelle Erkenntnisse gewonnen werden. Es wurde u. a. gezeigt, dass thermophile Proteine im Vergleich mit deren mesophilen Homologen eine deutlich rigidere Struktur aufweisen, welche für die Stabilität bei hohen Temperaturen verantwortlich ist.^[64] Auf der anderen Seite konnten Untersuchungen mit psychrophilen Enzymen veranschaulichen, dass bestimmte besonders flexible Proteinbereiche möglicherweise zu der hohen Aktivität bei niedrigen Temperaturen führen.^[65-66]

Eine weitere Anwendung von *In-silico*-Methoden ist neben dem Verständnis der Funktion von Makromolekülen die Vorhersage von Mutationen, welche z. B. zu einer höheren Thermostabilität führen können. In einem bioinformatischen Ansatz werden evolutionäre Informationen benutzt, indem die Sequenzen von meso- und thermophilen Enzymen verglichen werden.^[60] Die Grundidee dieser Methode basiert darauf, dass Aminosäure-Positionen, welche nur in den thermophilen Enzymen konserviert sind, zur allgemeinen Stabilität des Proteins beitragen. Mit dieser Methodik konnte beispielsweise die Stabilität einer α -Aminoester-Hydrolase um 7°C gesteigert werden.^[67] Ein alternativer Ansatz ist die Mutation einzelner Aminosäuren, um die Kompaktheit des Proteins zu erhöhen. Das Programm RosettaDesign berechnet dies mittels geometrischer „*Scoringfunktionen*“ und kann die Stabilität bezüglich Temperatur oder Lösungsmittel erhöhen.^[68]

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, ein Protein als ein Netzwerk verschiedener Interaktionen zu betrachten, durch welches dessen Flexibilität bzw. Rigidität charakterisiert wird. Da bei dieser Methodik keine zeitliche Bewegung der Atome im System simuliert wird, verlangt sie eine verhältnismäßig geringe Rechenleistung. Es wurden daher in den letzten Jahren eine

Vielzahl von Programmen entwickelt, bei denen flexible und rigide Regionen innerhalb eines Proteins entweder durch die Bestimmung von Variationen in den räumlichen Abständen innerhalb lokaler Packungsdichten ermittelt^[69] oder die Struktur als ein Netzwerk von Interaktionen zwischen Atomen beschrieben wird.^[70-75] Ein ähnliches Konzept wurde von *Jacobs et al.* verwendet, bei dem die Atome dieses Netzwerkes durch Körper (engl. *bodies*) mit einer bestimmten Anzahl von Freiheitsgraden beschrieben werden.^[76-78] Um die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Körpern zu beschreiben, werden Verbindungen für jeden Freiheitsgrad eingefügt. Diese entsprechen den Energien der kovalenten und nicht-kovalenten Interaktionen, welche im letzteren Fall Wasserstoff- und Salzbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen sowie π -*Stacking* sein können. Je mehr und je stärker diese Interaktionen vorhanden sind, desto stabiler ist auch das Netzwerk, welches die Proteinstabilität beschreibt. Nun kann der *Pebble Game Algorithmus* als Teil der FIRST (*floppy inclusions and rigid substructure topography*) Software verwendet werden, um dieses Netzwerk in rigide Cluster zu unterteilen, welche durch flexible Regionen miteinander verknüpft sind.^[79]

In dem von *Pfleger et al.* entwickelten Programm CNA (*constraint network analysis*) wird diese Beschreibung in Form eines Netzwerkes dazu verwendet, um eine Entfaltungssimulation des Proteins durchzuführen.^[80] Dabei wird der Energieterm E_{cut} linear gesenkt, sodass die Wasserstoffbrücken, deren Energiewerte oberhalb von E_{cut} liegen, aus dem Netzwerk entfernt werden. Während der Entfaltungssimulation kann der Phasenübergangspunkt T_p bestimmt werden, bei dem der größte rigide Cluster zerfällt. Da E_{cut} direkt mit der Temperatur korreliert, ist T_p ein Maß für thermodynamische Stabilität des Systems und kann auch als berechneter Schmelzpunkt bezeichnet werden.^[81-82] In einer ersten Anwendung, bei der 20 Proteinorthologe von meso- und thermophilen Organismen verglichen wurden, konnten Radestock und Gohlke zeigen, dass die hitzestabilen Proteine im initialen Netzwerk (also ohne Temperatureinfluss) eine höhere Rigidität aufweisen. Wenn man in der Entfaltungssimulation den Temperaturbereich erreicht hat, welcher der optimalen Wachstumstemperatur des entsprechenden Quellorganismus entspricht, sind die Netzwerke der meso- und thermophilen Pendants hingegen ähnlich stark ausgeprägt.^[81] 2012 haben Rathi, Radestock und Gohlke das System an fünf Citrat-Synthasen aus meso-, thermo-, und hyperthermophilen Organismen (Wachstumstemperaturen im Bereich von 37-100 °C) getestet. Dabei verwendeten sie ein Ensemble an Konformationen aus MD-Simulationen für die Berechnung der T_p -Werte und verglichen diese mit den berechneten T_p -Werten aus den Kristallstrukturen. Sie konnten feststellen, dass damit die Korrelation zwischen den ermittelten Schmelzpunkten und den optimalen Wachstumsbedingungen der Quellorganismen von $R^2=0.27$ auf $R^2=0.88$ verbessert werden konnte. In dieser Studie wurden außerdem mögliche Gründe für die unterschiedliche Thermostabilität der einzelnen Enzyme gefunden, welche u. a. in einem ausgeprägteren Wasserstoffbrückennetzwerk im Falle der

thermophilen Citrat-Synthase liegt, während die hyperthermophile Variante eine erhöhte Anzahl von hydrophoben Kontakten besitzt.^[83] Während bisher Proteine unterschiedlicher Organismen verglichen wurden, haben Rathi, Jäger und Gohke 2015 die Thermostabilität verschiedener LipA-Mutanten mittels CNA getestet und konnten eine signifikante ($p = 0.004$) und akzeptable ($R^2=0.46$) Korrelation zwischen experimentellen und berechneten Stabilitätswerten zeigen. Dies bedeutet, dass das System auch für die Vorhersage und Evaluation von Einzelmutanten zur Verbesserung der Thermostabilität geeignet ist.^[84]

2.2 Acetaldehyd-abhängige Aldolasen

2.2.1 Aldolasen

Die Aldolreaktion als kovalente Verknüpfung von Aldehyden und Ketonen zu einer β -Hydroxycarbonylverbindung stellt eine wichtige Reaktion sowohl in der Natur als auch in der synthetischen Chemie dar.^[85] Diese Reaktion wird in der Natur von den Aldolasen durchgeführt. Als Lyasen (C-C-verbundene Enzyme) gehören sie nach der E.C. (*Enzyme Commission*) - Nomenklatur zu der vierten von insgesamt sechs Hauptgruppen und werden dort der ersten Untergruppe (EC 4.1.) zugeordnet.

Bei dieser Reaktion findet eine (stereoselektive) Verknüpfung eines zuvor aktivierten Aldehyds oder Ketons als nukleophiler Donor mit einem Aldehyd als elektrophiler Akzeptor statt. Je nachdem, wie das Donor-Molekül aktiviert wird, unterscheidet man zwei verschiedene Typen von Aldolasen. Bei Typ I befindet sich im katalytischen Zentrum des Enzyms ein aktives Lysin. Dieses bildet im ersten Schritt des Reaktionsmechanismus mit dem Carbonylgruppe des Donor-Aldehyds in einer Kondensationsreaktion eine Schiff'sche Base (Imin) aus. Durch diese intermediäre Form wird die Abstraktion eines Protons des C_α -Kohlenstoffatoms des Aldehyds durch eine Base im Enzym (z. B. ein Aspartat-Rest) begünstigt. Dies hat zur Folge, dass die Elektronendichte am C_α -Kohlenstoffatom erhöht und der nukleophile Angriff auf das Kohlenstoffatom des Akzeptor-Aldehyds (oder Keton) erleichtert wird. Vereinfacht ausgedrückt wird also durch das Enzym die Bildung des Imin-Enamin-Gleichgewicht beschleunigt eingestellt.^[86-87] Ein ähnlicher Effekt wird bei den Typ II Aldolasen durch einen metallischen Cofaktor (in der Regel Zink) als Lewis-Säure erzielt. Dabei wird das Zn^{2+} -Ion von den freien Elektronenpaaren der Sauerstoffatome im Donor-Molekül koordiniert und so die Elektronendichte reduziert. Ähnlich wie im Typ I Mechanismus ermöglicht dies die Abstraktion eines Protons durch eine Base, welches zur Bildung eines Enolats führt. Jetzt kann das Donor-Molekül den Akzeptor

nukleophil angreifen.^[88-89] Beide Reaktionsmechanismen sind in Abbildung 2-1 miteinander verglichen.

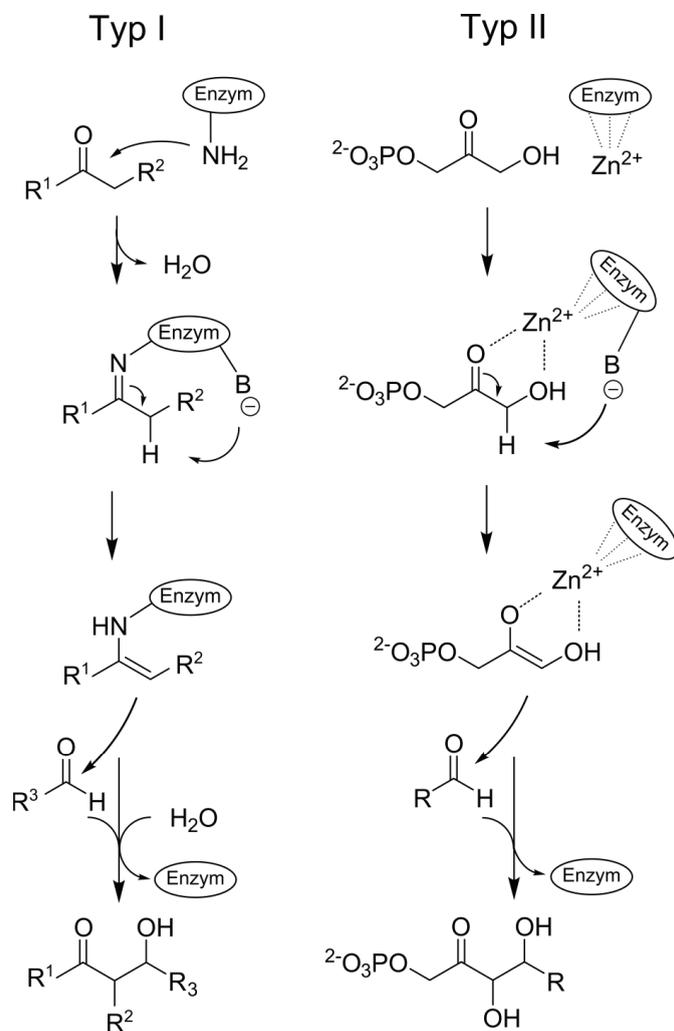


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus von Typ I und Typ II Aldolasen.

Während in beiden Typen von Aldolasen eine Vielzahl von Akzeptor-Molekülen umgesetzt wird, ist die Anzahl der Donor-Substrate stark limitiert. Daher teilt man sie auch bezüglich dieser Donor-Substrate in vier verschiedene Klassen ein, welche im Einzelnen kurz vorgestellt und in Tabelle 2-2 gegenübergestellt werden.

Die Klasse I Aldolasen katalysieren die Aldoladdition mit Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) als Donor-Molekül. Dabei werden zwei neue Stereozentren aufgebaut. Für jedes der vier Stereoisomere konnte ein passendes Enzym in der Natur gefunden werden.^[90] Mit der Fruktose-1,6-biphosphat Aldolase beinhalten die Klasse I Aldolasen den wohl bekanntesten und am meisten studierten Vertreter der Aldolasen. Als Teilschritt der Glykolyse ist sie an dem zentralen Stoffwechsel zum Abbau von Glukose für die Energiegewinnung beteiligt.

In der zweiten Klasse der Aldolasen wird Pyruvat oder Phosphoenolpyruvat (PEP) als Donor-Substrat benötigt. In beiden Varianten entsteht α -Oxosäure als Produkt, da bei PEP die Phosphatgruppe während der Reaktion hydrolytisch abgespalten wird. Bei der Reaktion wird ein neues stereogenes Zentrum aufgebaut, wobei auch hier für die (*R*)- und (*S*)-Form Enzyme aus der Natur bekannt sind. Die KDPG Aldolase spaltet 2-Keto-3-desoxy-6-phospho-D-gluconat in Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und kommt im bakteriellen Entner-Doudoroff-Weg als Teil des Kohlenhydrat-Stoffwechsels vor.^[91] Das stereokomplementäre Pendant ist die KDPGal Aldolase. Hier wird 2-Keto-3-desoxy-6-phospho-D-galactonat umgesetzt, bei dem die γ -Hydroxygruppe (*R*)-konfiguriert ist.^[92]

Tabelle 2-2: Einteilung der Aldolasen in vier Klassen bezüglich der Donor-Substrate

Klasse	Donor-Molekül	Produkt
1. DHAP Aldolase		
2. Pyruvat/PEP Aldolase		
3. Acetaldehyd Aldolase		
4. Glycin Aldolase		

Die dritte Klasse sind die sog. Acetaldehyd-abhängigen Aldolasen, welche wie Klasse II Aldolasen genau ein neues stereogenes Zentrum erzeugen. Mit der 2-Desoxy-D-ribose-5-phosphat Aldolase (DERA) ist bisher nur ein Vertreter bekannt. Da der Fokus dieser Arbeit in der Untersuchung dieses Enzyms liegt, wird im nächsten Kapitel ausführlich auf dessen Funktion in der Natur sowie dessen Einsatz in der Biotechnologie eingegangen.

Die vierte und letzte Klasse der Glycin-abhängigen Aldolasen unterscheidet sich von den anderen Klassen, da deren beide Vertreter weder Typ I noch Typ II zugeordnet werden können. Für den katalytischen Mechanismus wird Pyridoxalphosphat (PLP) benötigt, welches über einen Lysinrest kovalent als Imin mit dem Enzym verknüpft wird. Nun wird in einer Art Umpolungsreaktion das Glycin über eine Schiff'sche Base an das PLP gebunden und das Enzym freigelassen. Es findet also ein Austausch statt, bei dem das Substrat das Enzym als Bindungspartner des PLP ersetzt. Glycin ist jetzt als Donor-Molekül aktiviert und kann nukleophil angreifen. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 2-2 dargestellt. Das Besondere an dieser Reaktion ist, dass das Enzym an diesem Übergangszustand nicht beteiligt ist und somit das PLP als Organokatalysator fungiert.^[93] Es sind zwei Vertreter der Glycin-abhängigen Aldolasen bekannt: Die Serin-Hydroxymethyl Transferase (SHMT) wird in der Biosynthese verwendet, während die Threonin Aldolasen beim Abbau von Threonin beteiligt sind.^[94]

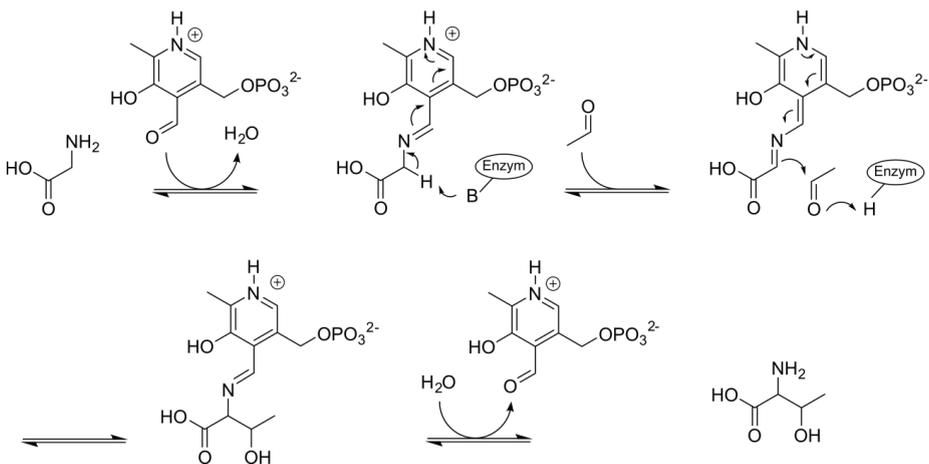


Abbildung 2-2: Reaktionsmechanismus von Glycin-abhängigen Aldolasen nach Florio *et al.*^[93]

2.2.2 Die 2-Desoxy-D-ribose-5-phosphat Aldolase (DERA)

Die Klasse 3 Aldolasen benötigen als Donor-Molekül Acetaldehyd (3). Dabei ist mit der DERA (E.C. 4.1.2.4.) nur ein Vertreter bekannt. Somit ist sie die einzige Aldolase, die eine Aldoladdition von zwei Aldehyd-Molekülen katalysiert. Im Stoffwechsel ist sie beim Abbau von Nukleotiden beteiligt und spaltet Desoxy-D-ribose-5-phosphat (4) in D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (5) und Acetaldehyd (3), welche anschließend in die zentralen Stoffwechselwege (Citratzyklus, Glykolyse) eingeschleust werden (siehe Abbildung 2-2). Bisher konnte noch kein Organismus gefunden werden, welcher kein *deoC*-Gen (kodiert für die DERA) enthält. Dies deutet darauf hin, dass das Enzym universell in allen Lebewesen vorhanden ist.

Das Enzym wurde erstmals 1952 von *Racker* beschrieben. Dieser konnte zeigen, dass *E. coli* Extrakte die DERA-Reaktion katalysieren.^[95] Zwölf Jahre später identifizierten *Rosen et al.* indirekt die Schiff'sche Base als Intermediat des katalytischen Mechanismus, indem sie ¹⁴C-radioaktiv markiertes Substrat verwendeten und es während der Reaktion mit Natriumborhydrid reduzierten.^[96] Die vollständige Primärsequenz der DERA_{EC} wurde 1982 von *Valentin-Hansen et al.* aufgeklärt und somit die exakte Größe von 259 Aminosäuren und 27.7kDa bestimmt.^[97] Der große Durchbruch gelangen jedoch 2001 *Heine et al.*, welche die Proteinkristallstruktur mit einer hervorragenden Auflösung von 0.99Å bestimmen konnten (welches auch nach etwa fünfzehn Jahren in den seltensten Fällen bei einem knapp 30kDa großen Protein gelingt).^[87] Strukturell gehört die DERA zu der Familie der TIM-barrels. Dieses Strukturmotiv ist benannt nach dem ersten bekannten Vertreter, der Triose-3-phosphat-Isomerase und ist ein sehr verbreitetes Strukturmotiv, welches in ca. 10% aller Proteine zu finden ist.^[98] Wie in Abbildung 2-3 gezeigt, enthält es das typische (α,β)₈-barrel Motiv: Im Inneren des Enzyms befinden sich in einer zyklischen Anordnung die acht β -Faltblätter, welche mit den äußeren Helices über *Loops* (Schleifen) bzw. *Random Coils* (Zufallsknäuel, Strukturelemente ohne definierte Sekundärstruktur) verbunden sind.

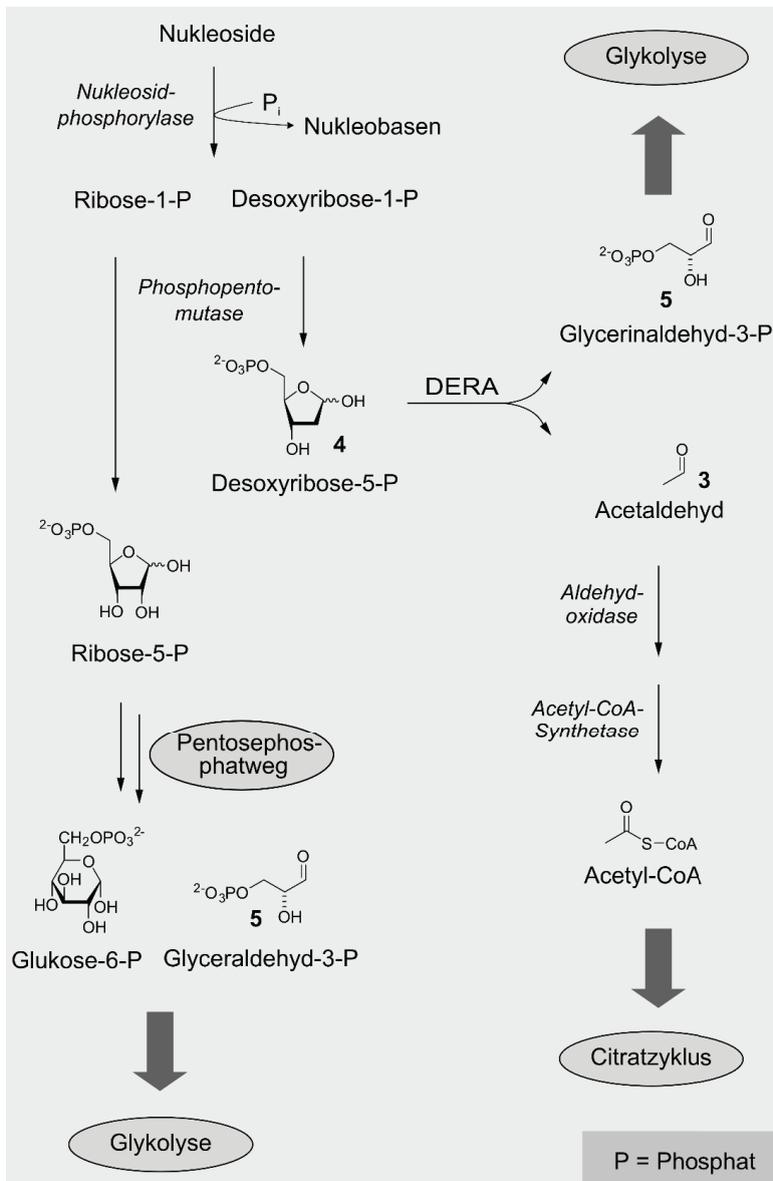


Abbildung 2-3: Übersicht über die Rolle der DERA im Stoffwechsel nach Tozzi et al.^[5]

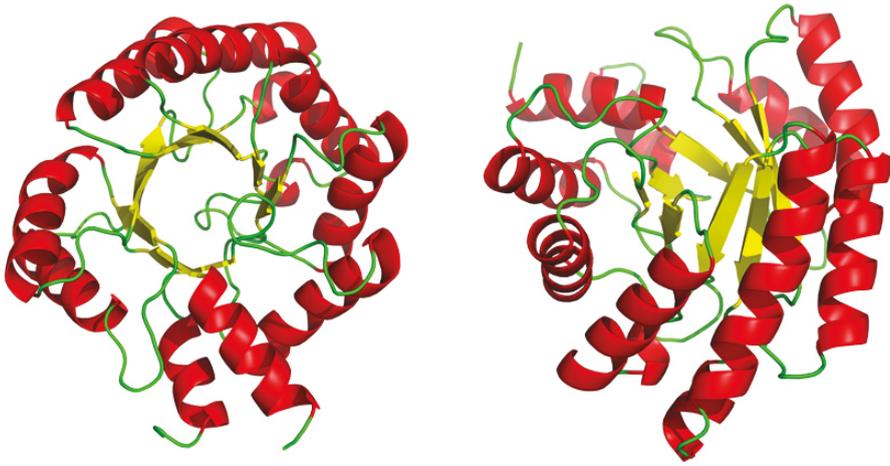


Abbildung 2-4: Tertiärstruktur der DERA_{EC}. Die Darstellung wurde mit *Pymol* von der PDB-Struktur 1JCL erstellt.^[87]

Das Enzym ist ein funktionelles Monomer, die DERA_{EC} weist jedoch strukturell eine C₂-symmetrische, dimere Form auf.^[99] Die DERA gehört zu den Typ I Aldolasen (vgl. Kapitel 2.2.1) und folgt dementsprechend dem in Abbildung 2-1 schematisch dargestellten Mechanismus. Wie in Abbildung 2-4 gezeigt, erfolgt die Bindung des Substrats überwiegend über polare Wechselwirkung der Phosphatgruppe mit den Aminosäuren G205 und S238.

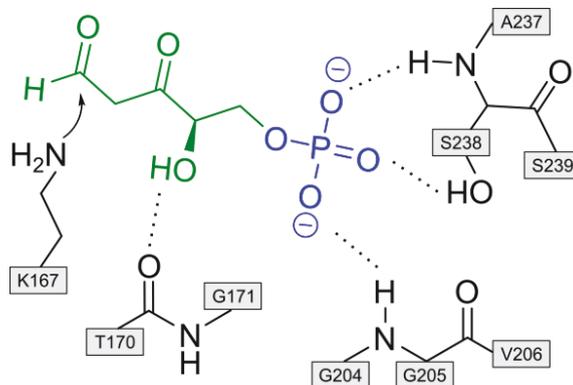


Abbildung 2-5: Wechselwirkung des Enzyms mit dem natürlichen Substrat 2-Desoxy-D-ribose-5-phosphat. Die Darstellung basiert auf der Kristallstruktur 1JCL. Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Neben dem katalytisch aktiven K167, welches die Schiff'sche Base bildet, ermöglicht Asp102 die Abstraktion des Protons zur Bildung des Imins. Durch K201 wird der pK_s -Wert reduziert und somit die Bildung der Schiff'schen Base unterstützt. Eine Mutation von einer der drei Aminosäuren führt zu einem Aktivitätsverlust auf 2% (K167R) bis 0.01% (D102L).^[87] In Abbildung 2-5 ist der von *Heine et al.* postulierte katalytische Mechanismus dargestellt.

Eine vielseitige Anwendung bietet die DERA als Biokatalysator in der chemischen Synthese, indem aus einfachen, achiralen Verbindungen chirale Substanzen (z. B. als Bausteine für die Naturstoffsynthese) hergestellt werden können. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Optimierung des Enzyms für die Synthese liegt, soll im Folgenden nur ein kurzer Überblick über diese Thematik erfolgen.

Erstmals wurde 1990 die DERA als Biokatalysator in der organischen Chemie von *Barbas et al.* beschrieben.^[6] Während das Donor-Molekül auf Acetaldehyd (**3**) (und strukturell ähnliche Substrate wie 2-Chloracetaldehyd) beschränkt ist, bietet das Akzeptor-Molekül eine größere Substratbreite. Jedoch zeigt das Enzym bei der Umsetzung nicht-natürlicher Substrate eine deutlich geringere Aktivität. Eine mögliche Ursache ist das Fehlen einer Phosphatgruppe, wodurch die Substratbindung erschwert wird (vgl. Abbildung 2-4). 2003 konnten *DeSantis et al.* durch eine S238D-Mutation die Aktivität für das unphosphorylierte Substrat 2-Desoxy-D-ribose um das 2.5-fache erhöhen.^[100] 1994 zeigten Gijzen und Wong, dass die DERA eine Tandemaddition von zwei Acetaldehyd-Molekülen (**3**) an einen elektrophilen Akzeptor wie 2-Hydroxyacetaldehyd katalysiert. Nach dem zweiten Schritt findet eine spontane Zyklisierung des Doppelaldolprodukts zu einem Hemiacetal statt, welches durch eine Oxidation zu dem stabilen Lacton weiter umgesetzt werden kann (siehe Abbildung 2-6).^[101]

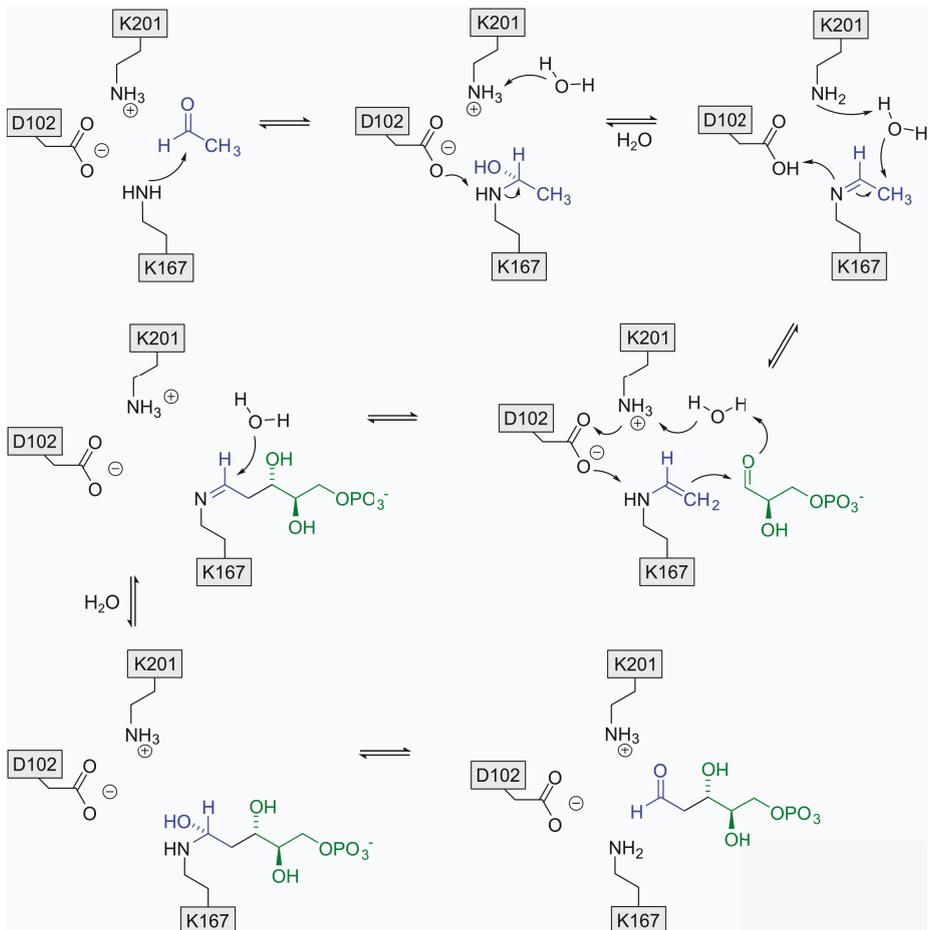


Abbildung 2-6: Der von Heine *et al.* postulierte Mechanismus der DERA-katalysierten Reaktion.^[87]

Das Lacton stellt einen Baustein für die Synthese von wichtigen Naturstoffen wie das Statin dar, welches zu der Klasse der Cholesterin-senkenden Medikamenten gehört.^[102] Neben der Oxidation des Hemiacetals ermöglicht die Eliminierung der β -Hydroxygruppe mit anschließender elektrophiler Addition an der β -Position eine Vielzahl von β -substituierten Lactonen.^[9] Eine weitere Anwendung wurde wiederum in der Arbeitsgruppe von Professor Wong gezeigt: Durch eine einfache DERA-katalysierte Aldolreaktion konnten sie - ausgehend vom Acetaldehyd (3) und 2-Hydroxypropanal - in einer siebenstufigen Reaktion einen Baustein für Epothilone darstellen, welche als Wirkstoff gegen Tumorzellen eingesetzt werden.^[103]

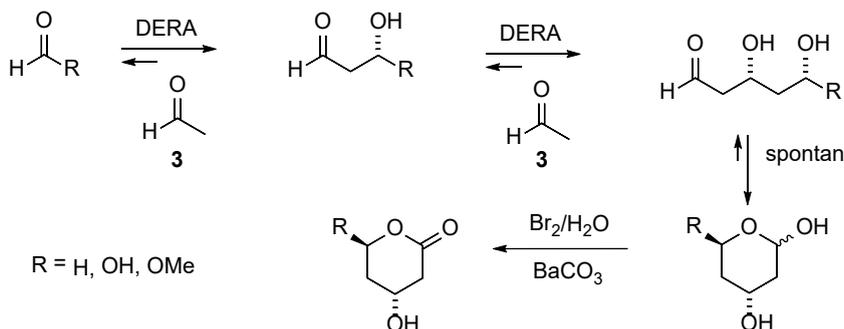


Abbildung 2-7: DERA-katalysierte Tandem-Aldoladdition nach Gijzen und Wong. Nach der Addition von zwei Acetaldehyden (**3**) wird nach einer spontanen Zyklisierung das Zwischenprodukt chemisch zum Lacton oxidiert.^[101]

2.2.3 Angepasste Enzymeigenschaften durch DERAs unterschiedlicher Organismen

Aus den im vorherigen Kapitel gezeigten Beispielen wird deutlich, dass die DERA zu einem wichtigen Werkzeug in der Biokatalyse geworden ist, jedoch gibt es neben der geringen Aktivität bezüglich nicht-phosphorylierter Akzeptor-Substrate einen weiteren, großen Nachteil: Es zeigt sich nämlich, dass die DERA_{EC} schon nach wenigen Stunden Inkubation in (für synthetische Zwecke notwendigen) Acetaldehyd-Mengen von 200-300mM nicht mehr aktiv ist.^[11-12] Ein vergleichbarer Effekt wurde bei 2-Chloracetaldehyd als Substrat beobachtet, welches sich lediglich durch das C α -gebundene Chloratom vom Acetaldehyd (**3**) unterscheidet und als Substrat durch den Einbau des Halogens als gute Abgangsgruppe für spätere Substitutionsreaktionen eignet.^[12] 2006 haben *Jennwein et al.* auf das Problem aufmerksam gemacht und konnten durch einen *In-vitro*-Evolutionansatz eine F200I-Mutante entwickeln, welche eine höhere Stabilität gegenüber 2-Chloracetaldehyd gezeigt hat.^[12] Des Weiteren vermuteten sie, dass die Bildung von Schiff'schen Basen des Aldehyds mit den äußeren Lysin-Resten die Ursache der Inaktivierung ist. In ihrer Studie haben sie jeden Lysin-Rest einzeln in einer Zufallsmutagenese ausgetauscht, konnten jedoch in keiner neuen Enzymvariante eine Verbesserung der Acetaldehyd-Toleranz feststellen.^[12]

In den folgenden Jahren wurde eine Vielzahl von neuen DERAs aus meso- und (hyper)thermophilen Organismen charakterisiert, um eine Enzymvariante mit besseren Eigenschaften für die organische Synthese zu finden (siehe Tabelle 2-3). Dabei wurden eine Reihe von neuen DERAs beschrieben, welche im Vergleich zur DERA_{EC} eine höhere Acetaldehyd-Toleranz zeigen (Tabelle 2-3). Die besten Varianten waren dabei in hyperthermophilen Organismen (bis zu 70 % Restaktivität nach mehreren Stunden Inkubation in 300mM Acetaldehyd) zu finden,

welches einen möglichen Zusammenhang zwischen Thermo- und Acetaldehyd-Stabilität erkennen lässt.^[104-106] Diese Enzyme haben jedoch den Nachteil, dass sie bei Raumtemperaturen (bei der die DERA-Reaktionen normalerweise ablaufen) keine hohe Aktivität zeigen.

Tabelle 2-3 Übersicht über alle in der Literatur charakterisierten DERAs

Organismus	Autoren	Jahr	Unterschiede zur DERA _{EC} **
<i>Bacillus cereus</i>	Sgarrella et al. ^[107]	1991	--
<i>Escherichia coli</i> *	Heine et al. ^[87]	2001	--
<i>Aeropyrum penix</i> *	Sakuraba et al. ^[108]	2003	thermostabiler
<i>Streptococcus mutans</i>	Han et al. ^[109]	2003	--
<i>Thermus thermophilus</i> *	Lokanath et al. ^[110]	2004	thermostabiler
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> *	Sakuraba et al. ^[104]	2007	thermo- und Acetaldehyd-stabiler
<i>Thermotoga maritima</i> *	Sakuraba et al. ^[104]	2007	thermo- und Acetaldehyd-stabiler
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	Rashid et al. ^[111]	2008	thermostabiler, max. Aktivität bei pH 4
<i>Yersinia sp</i>	Kim et al. ^[112]	2009	Acetaldehyd-stabiler
<i>Paenibacillus sp.</i>	Kim et al. ^[113]	2010	Acetaldehyd-stabiler
<i>Hyperthermus butylicus</i>	Wang et al. ^[105]	2010	thermo- und Acetaldehyd-stabiler
<i>Aciduliprofundum boonei</i>	Yin et al. ^[106]	2011	thermo- und Acetaldehyd-stabiler
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Kullartz et Pietruszka ^[114]	2012	Acetaldehyd-stabiler
nicht bekannt	You et al. ^[115]	2013	--
<i>Haemophilus influenzae</i>	Woo et al. ^[116]	2014	Acetaldehyd-stabiler
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Fei et al. ^[117]	2015	Acetaldehyd-stabiler
<i>Lactobacillus brevis</i> *	Jiao et al. ^[118]	2015	Acetaldehyd-stabiler

* Mit Kristallstruktur

**Diese Daten wurden teilweise mit unterschiedlichen Methoden und nicht immer im direkten Vergleich mit der DERA_{EC} gemessen. Auch fehlt in fast allen Veröffentlichungen ein Vergleich der Proteinausbeute und der spezifischen Aktivität. Solche Daten wurden daher in der Tabelle nicht berücksichtigt.

Allen neuen DERAs ist noch ein zweites Problem gemeinsam: Die DERA_{EC} kann homolog in *E. coli*-BL21(DE3)-Stämmen exprimiert werden und zeigt daher eine sehr gute Proteinausbeute. Heterologe Expression der neuen Aldolasen ist zwar möglich (bisher wurde in keiner Literaturstelle auf die Bildung von *Inclusion Bodies* hingewiesen); jedoch ist die Proteinausbeute selbst bei Codon-optimierten Enzymen im Vergleich zu *E. coli* deutlich geringer.^{IV}

Vergleicht man die Tertiärstrukturen der durch Röntgenkristallographie gelösten DERA-Strukturen, fällt auf, dass alle das in Abbildung 2-3 gezeigte TIM-Barrel Motiv aufweisen und es auch sonst keine signifikanten Unterschiede zur DERA_{EC} gibt. Interessanter ist der Vergleich,

^{IV} Hier muss man hinzufügen, dass in keiner der neuen DERAs ein direkter Vergleich der Proteinausbeute mit der *E. coli* Variante durchgeführt wurde, jedoch zeigen eigene Vergleiche von insgesamt sechs verschiedenen Enzymen die Tendenz, dass die Proteinausbeute der DERA_{EC} am besten ist, und geringer wird, je niedriger die Sequenzidentität der anderen DERAs zum *E. coli* Enzym ist.

wenn man die Quartärstruktur zwischen den meso- und (hyper)thermophilen DERAs betrachtet; während die mesophilen Enzyme eine dimere Struktur aufweisen, bei der die monomeren Untereinheiten nur durch wenige Wechselwirkungen (in der *E. coli* Variante sind es zwei Salzbrücken zwischen K58 und D82) verbunden werden, sind in den (hyper)thermophilen Aldolasen mehrere hydrophobe Cluster zu finden, welche den Zusammenhalt beider Monomere stabilisieren.^[104, 108, 110] Die DERA von *Thermus thermophilus* wurde sogar als Homotetramer kristallisiert - mit insgesamt drei Interface-Bereichen mit hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Monomeren. Es wurde daher postuliert, dass die Stabilisierung dieser Schnittstelle ein wichtiger Faktor für die Thermostabilität der thermophilen Enzyme darstellt.^[110]

2.3 Strukturanalytik in der biochemischen Forschung

Enzyme sind komplexe Makromoleküle, dessen Funktion sich erst durch ein Verständnis über deren dreidimensionale Struktur erschließen lässt. Es wurde daher eine Vielzahl von Methoden entwickelt und verbessert, um Einblicke in die räumliche Struktur von Proteinen zu gewinnen.

Die Grundlage für die 3D-Struktur der Enzyme ist in der Verknüpfung der Aminosäuren zu finden. Die Massenspektrometrie hat sich in den letzten Jahren als effektivste Methode entwickelt, um die Aminosäuresequenz (Primärstruktur) der Proteine zu bestimmen.^[119] Die Proteine werden dabei in der Regel in einem ersten Schritt proteolytisch gespalten und die Peptide, sowie (nach Fragmentierung) die Peptidfragmente massenspektrometrisch analysiert. Nach einem Abgleich dieser Daten mit Proteindatenbanken können auf diese Weise komplette Proteome analysiert, sowie posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen, Acetylierungen oder Methylierungen einzelner Proteine untersucht werden.^[120]

Bioinformatische Methoden können helfen Voraussagen über die Sekundärstruktur zu machen,^[121] während eine experimentelle Bestimmung *in vitro* über die Circular-Dichroismus (CD)-Spektroskopie erfolgen kann.^[122] Dabei macht man sich die Eigenschaft zu Nutze, dass das zirkular polarisierte Licht unterschiedlich gedreht wird, je nachdem welche Sekundärstrukturelemente im Protein zu welchem Anteil vorhanden sind. So zeigen beispielsweise α -Helices zwei charakteristische Minima bei 208 nm und 222 nm, während β -Faltblätter nur ein Minimum bei 215 nm aufweisen. Mit Hilfe von mathematischen Modellen und empirischen Daten kann so der Anteil der verschiedenen Sekundärstrukturelemente abgeschätzt werden.^[122-123] Während eine exakte Bestimmung der Sekundärstruktur nach wie vor schwierig ist, eignet sich die Methode sehr gut u. a. dazu, die Thermostabilität von Proteinen zu bestimmen, indem die Probe kontinuierlich erhitzt und dabei die Faltung des Proteins verfolgt wird.^[124]

Zur vollständigen Strukturaufklärung (also der Tertiär- und Quartärstruktur) sind die Röntgenkristallstrukturanalytik und die NMR-Spektroskopie die beiden am meist genutzten

Verfahren in der Bioanalytik. Neue Proteinstrukturen werden in der Regel in einer zentralen Datenbank, der *protein data bank* (PDB, www.pdb.org) hinterlegt. Vergleicht man nun die Methoden, welche zur Strukturbestimmung verwendet werden (Stand: November 2015), so kommt man auf 90% Röntgenkristall- und 9% (Flüssig-)NMR-Strukturen.^[125] Da beide Methoden in dieser Arbeit vielfach verwendet wurden, werden sie in den beiden folgenden Kapiteln etwas ausführlicher erläutert.

2.3.1 Röntgenkristallstrukturanalytik

Durch die Entwicklung der Mikroskopie war es erstmals möglich, biologische Strukturen im Mikrometerbereich zu erkennen und zu analysieren. Die Weiterentwicklung der Technik zu ultrahochauflösenden Verfahren wie der Rasterkraft- oder Kryoelektronenmikroskopie ermöglicht heutzutage, dass Strukturen bis in den Nanometerbereich aufgelöst werden.^[126-127] Da die Bindung zwischen zwei Atomen jedoch im Angström-Bereich liegt (eine C-H-Bindung entspricht einer Länge von ca. 1.1\AA bzw. 0.11 nm), ist die sog. Röntgenkristallstrukturanalytik notwendig, um beispielsweise die Struktur eines Enzyms auf atomarer Ebene vollständig zu lösen. Bei diesem Verfahren macht man sich die Eigenschaften von Röntgenstrahlen zu Nutze, welche eine sehr kurze Wellenlänge zwischen 1 pm und 0.25 nm aufweisen und somit direkt mit den Elektronen der zu untersuchenden Struktur interferieren.^[128]

Zur Ausbildung eines Interferenzmusters ist eine dreidimensionale, periodische Anordnung der zu untersuchenden Struktur notwendig: ein Kristall. Daraus entwickelt sich das Problem, dass es bis heute nicht möglich ist, die Bedingungen für das Wachstum eines Proteinkristalls vorherzusagen, sodass man auf ein Screening unterschiedlicher Bedingungen angewiesen ist. Möchte man Proteinkristalle erhalten, ist eine möglichst homogene, hochkonzentrierte und reine Proteinlösung erforderlich. Die am weitesten verbreitete Methode zur Proteinkristallisation ist die Dampfdiffusionsmethode.^[129] Dabei wird ein Teil einer Kristallisationslösung in ein Reservoir einer Kammer eingefüllt, ein Tropfen der Proteinlösung 1:1 mit der Kristallisationslösung als „*sitting drop*“ in die Mitte der Kammer pipettiert und dies anschließend luftdicht verschlossen. Die Kristallisationslösungen enthalten neben einem Fällungsmittel verschiedene pH-Werte, Puffer und Zusätze von organischen und/oder anorganischen Molekülen. Durch Dampfdiffusion bewegen sich die Wassermoleküle von der Proteinlösung in die Reservoirkammer und die Proteinlösung ist ab einem bestimmten Zeitpunkt so weit übersättigt, dass das Protein Kristallisationskeime bilden kann. Haben die gebildeten Kristalle eine geeignete Morphologie (wichtig ist dabei z. B., dass diese nicht als amorphe Teilchen ausfallen, oder nur als zweidimensionale „Plättchen“ wachsen), können sie mit einer Röntgenquelle vermessen werden. Das erhaltene Beugungsmuster kann anschließend rechnerisch

ausgewertet und so die Elektronendichte des Proteins im dreidimensionalen Raum bestimmt werden.^[130]

Mit Myoglobin konnte 1958 die erste Proteinstruktur mittels Röntgenkristallstrukturanalytik aufgeklärt werden.^[131] Es folgte ein exponentieller Zuwachs an neu bestimmten Proteinstrukturen, welche in der *protein data bank* hinterlegt sind. Von den knapp 100000 Einträgen (Stand: November 2015) befinden sich auch DERA-Strukturen von sechs verschiedenen Organismen (vgl. Tabelle 2-3)

2.3.2 NMR-Spektroskopie von biologischen Makromolekülen

Die Methode, welche am zweithäufigsten für die Untersuchung von biologischen Makromolekülen verwendet wird, ist die NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*). Sie macht sich die Eigenschaft zu Nutze, dass manche Atomkerne im Grundzustand einen von Null verschiedenen Eigendrehimpuls, den sog. Kernspin, besitzen. Diese Atomkerne haben somit ein magnetisches Moment und können durch ein starkes, äußeres Magnetfeld parallel oder antiparallel zu diesem Feld ausgerichtet werden. Die Energiedifferenz zwischen den Ausrichtungen entspricht ungefähr dem Energiebereich der Radiowellen. Strahlt man nun verschiedene Energiefrequenzen im Radiowellenbereich ein, werden diese bei einer bestimmten Frequenz im Resonanzzustand (man spricht auch von der Resonanz- bzw. Larmorfrequenz) von den Atomkernen absorbiert, was spektroskopisch erfasst werden kann. Diese Larmorfrequenz hängt von den individuellen atomar aktiven Magnetfeldern ab. Durch den Einfluss der elektronischen Umgebung und durch die Interaktionen zu den benachbarten Kernen wird dieser Wert weiter beeinflusst. Daraus ergeben sich Informationen, die zu der Bestimmung von Molekülstrukturen genutzt werden können.^[132] Über den NOE (*nuclear Overhauser enhancement*)-Effekt können Abstandsinformationen benachbarter, nicht kovalent verknüpfter Atomkerne gewonnen werden, indem zusätzlich zu der Resonanzfrequenz des gemessenen Kerns eine zweite Frequenz zur Entkopplung eingestrahlt wird. Dadurch verändert sich die Intensität der Signale, während sich die Intensität räumlich benachbarter Kerne erhöht.^[133] Dieser Effekt ist proportional zu den Abständen zwischen den Kernen ($\text{NOE} \sim r^{-6}$).^[134]

Während die NMR-Spektroskopie mittlerweile die Standardmethode in der organischen Chemie ist, um die Korrektheit und Reinheit einer synthetisierten Substanz zu überprüfen, steht die Strukturbiologie vor der großen Herausforderung, die Vielzahl an Signalen in der Probe richtig zu interpretieren. Ein weiteres Problem ist, dass generell nur chemische Elemente mit einem Kernspin $\neq 0$ benutzt werden können. Da die am häufigsten vorkommende Isotope der

biologisch relevanten Elemente Sauerstoff, Stickstoff^V und Kohlenstoff dieses Kriterium nicht erfüllen, löst man dieses Problem, indem man Proteine in sogenannten Minimalmedien exprimiert, welche als einzige Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle ¹³C- und ¹⁵N-angereicherte und relativ einfach herzustellende Grundbausteine wie ¹³C-Glukose oder ¹⁵N-Ammoniumchlorid enthalten.^[135] Weitere Fortschritte konnten durch die Entwicklung leistungsfähiger NMR-Spektrometer mit höheren Frequenzbereichen (im Forschungszentrum Jülich wird zurzeit eine der weltweit ersten NMR-Geräte mit einer Leistung von 1.2GHz gebaut) erzielt werden, sowie neuer Messtechniken, die es mittlerweile ermöglichen, auch die Strukturen von biologischen Makromolekülen aufzuklären. 1982 konnte für ein kleines Protein erstmals eine vollständige Signalzuordnung eines Protonenspektrums durchgeführt werden,^[136] während drei Jahre später die erste Proteinstruktur mittels NMR-Spektroskopie gelöst wurde.^[137]

Während die Strukturaufklärung von Proteinen mittels NMR-Spektroskopie im Vergleich mit der Kristallographie in der Regel deutlich aufwändiger bezüglich Probenpräparation, Messzeit und Auswertung ist, hat die Methode u. a. den großen Vorteil, dass sich das Protein in Lösung und damit in seiner im Vergleich zum Kristall natürlicheren Umgebung befindet. Dies ermöglicht auch weitere Untersuchungen wie die dynamischen Prozesse beim Binden eines Liganden, Proteinaggregation, Konformationsänderungen oder die Auswirkung von Änderungen der äußeren Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert oder Lösungsmittel zu untersuchen. Die Bandbreite der verschiedenen Möglichkeiten ist sehr groß. An dieser Stelle sei nur auf entsprechende Literaturstellen verwiesen, die einen guten Überblick über das Themengebiet liefern.^[138-141] In diesem Kapitel soll nur auf zwei Methoden eingegangen werden, die in der Arbeit benutzt wurden, um den Einfluss von Acetaldehyd (**3**) auf die Aktivität der DERA (vgl. 2.2.3) zu untersuchen.

Ein wichtiges Standardexperiment ist das sog. [¹H, ¹⁵N]-HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*). Dabei findet in einem 2D-Experiment eine direkte Kopplung zwischen den Protonen und den (¹⁵N-markierten) Stickstoffatomen der Peptidbindung zwischen den einzelnen Aminosäuren statt und man erhält ein zweidimensionales Spektrum, in dem für jede NH-Gruppe ein Signal enthalten ist.^[142] Ein solches Spektrum wird auch als Protein-Fingerprint bezeichnet, da es von der Primär-, Tertiär- und Quartärstruktur sowie dessen Umgebung beeinflusst wird. Eine Alternative des HSQC ist das sog. TROSY-Experiment (*transverse relaxation optimized spectroscopy*). Ohne NH-Entkopplung spalten sich bei einem normalen HSQC-Experiment die NH-Korrelationsignale durch die NH-Kopplungen in beiden Dimensionen zu vier quadratisch angeordneten Teilsignalen auf, die aufgrund von Relaxationsvorgängen unterschiedliche

^V Im Falle des Stickstoff-Atoms (¹⁴N) ist diese Aussage genau genommen nicht ganz richtig. Zwar lässt sich mit einer Kernspinnquantenzahl $I = 1$ ein Signal messen, jedoch sind auf Grund des Kernquadrupolmomentes die Linien des Spektrums so breit, dass diese schwer zu analysieren sind, sodass man auch hier ¹⁵N-Isotope mit $I = 0.5$ benötigt.

Linienbreiten aufweisen. Hierbei zeigt sich allgemein, dass insbesondere bei großen Proteinen das rechte untere Signal die geringste Linienbreite zeigt - also am langsamsten relaxiert. Beim TROSY-Experiment wählt man nun mit Unterstützung von Gradientenpulsen genau diesen Kohärenzpfad aus, der zu dem unteren rechten Signal führt. Somit eignet sich dieses Experiment insbesondere für große Proteine, welche auf Grund des hohen Molekulargewichts breite Signale erzeugen.^[143]

Um jedoch strukturelle Veränderung in dem Enzym (beispielsweise nach Zugabe eines Liganden) interpretieren zu können, müssen die Signale den einzelnen Aminosäuren in einer Rückgrat-Zuordnung (engl. *backbone assignment*) zugeordnet werden. Dies geschieht über eine Reihe von 3D-Experimenten, bei denen die Magnetisierung von der NH-Gruppe auf den Carbonyl-Kohlenstoff und/oder weiter auf die C_{α} - bzw. C_{β} -Atome der jeweiligen Seitenketten übertragen wird. Zwei typische Beispielerperimente werden in Abbildung 2-7 erläutert. Vereinfacht ausgedrückt erhält man also durch die Verknüpfung der NH-Signale zu deren benachbarten CO- bzw. C_{α} -Gruppen eine Verbindung zwischen den NH-Gruppen der einzelnen Aminosäuren und kann so in einer sequenziellen Zuordnung bei bekannter Primärsequenz die Signale der HSQC-Spektren entsprechend zuweisen.

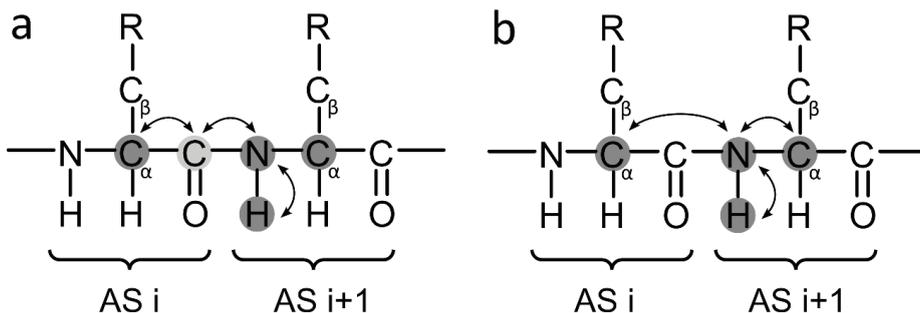


Abbildung 2-8: Schematische Darstellung der Magnetisierung in einem HN(CO)CA (a) und einem HNCA-Experiment (b).^[144] In (a) wird die Magnetisierung von dem Proton über das ^{15}N -Atom zum ^{13}C -Carbonylatom (CO) übertragen (durch Doppelpfeile symbolisiert). Von dort wird sie auf das C_{α} transferiert und zurück über CO und N auf das Proton zur Detektion übertragen. Die chemische Verschiebung wird dabei nur für die hier grau markierten Atome entwickelt, also nicht für das CO-Kohlenstoffatom (hellgrau). In (b) wird ein ähnliches Experiment dargestellt. Jedoch wird hier die Magnetisierung über J-Kopplung von dem Stickstoffatom direkt auf beide benachbarte C_{α} -Atome übertragen und von dort denselben Weg zurücktransferiert. Man erhält also in diesem Fall zwei 3D-Signale mit chemischer Verschiebung in der Protonen-, Stickstoff- und Kohlenstoffdimension. Die Darstellung erfolgte nach der Vorlage von www.protein-nmr.org.uk.^[145]

Eine solche Zuordnung ist der erste Schritt der Strukturaufklärung eines Proteins mittels NMR, auf der in der Regel die Zuordnung der Seitenketten und die Bestimmung von Atomabständen über NOE-Experimente folgt,^[146] auf die aber hier nicht eingegangen werden soll, da dies nicht Bestandteil dieser Arbeit war.

Das zweite Anwendungsbeispiel der NMR-Spektroskopie für die Strukturbio­logie, ist das sog. DOSY-Experiment. Die Abkürzung steht für *diffusion ordered spectroscopy* und ermöglicht, die Diffusion der Verbindungen in der Lösung zu messen und damit Stoffgemische in Lösung aufzutrennen und deren Molekulargewichte zu bestimmen.^[147] Ein einfaches DOSY-Experiment besteht aus den drei folgenden Schritten: Zuerst wird die Magnetisierung mit einem 90° Radiofrequenzpuls angeregt und wird anschließend durch einen magnetischen Feldgradientenpuls wieder zerstreut. In einem dritten Schritt wird mittels eines weiteren Feldgradientenpulses die Magnetisierung wieder refokussiert. Dies kann nur bei den Kernen erreicht werden, welche sich durch Diffusion nicht entscheidend bewegt haben. Dabei variiert durch die Stärke und Dauer des Feldgradientenpulses die Strecke, die sich der Kern durch Diffusion bewegen kann. Die Pulsfrequenz wird mehrfach mit unterschiedlichen Feldgradientenstärken wiederholt und die Signalintensität gegen die Feldgradientenstärke aufgetragen. Aus diesem Zusammenhang kann anschließend die Diffusionskonstante der Verbindung gemessen und über eine Kalibriergerade mit Molekülen bekannter Größe in das Molekulargewicht umgerechnet werden.^[148-149] In Abbildung 2-9 ist das Grundprinzip eines solchen DOSY-Experiments schematisch dargestellt.

Snyder et al. konnten mit der Methode am Beispiel des Lysozyms die Wechselwirkung des Enzyms mit verschiedenen Liganden charakterisieren, indem sie DOSY-Messungen der Substrate mit und ohne dem Makromolekül durchgeführt haben und somit aus deren Diffusionskonstanten die Stärke der Interaktion zum Protein ableiteten.^[150] Ein weiteres, aus analytischer Sicht recht interessantes Anwendungsbeispiel wird von *Ribeiro et al.* geschildert. Diese konnten mit dieser Technik substöchiometrische Mengen von kleinen Molekülen wie Imidazol in Proteinlösungen identifizieren, welche in einem Standardexperiment durch das Hintergrundspektrum des Proteins versteckt wären und bei anderen Methoden wie Massenspektrometrie einen höheren Aufwand bezüglich Probenpräparation zur Folge hätten.^[151]

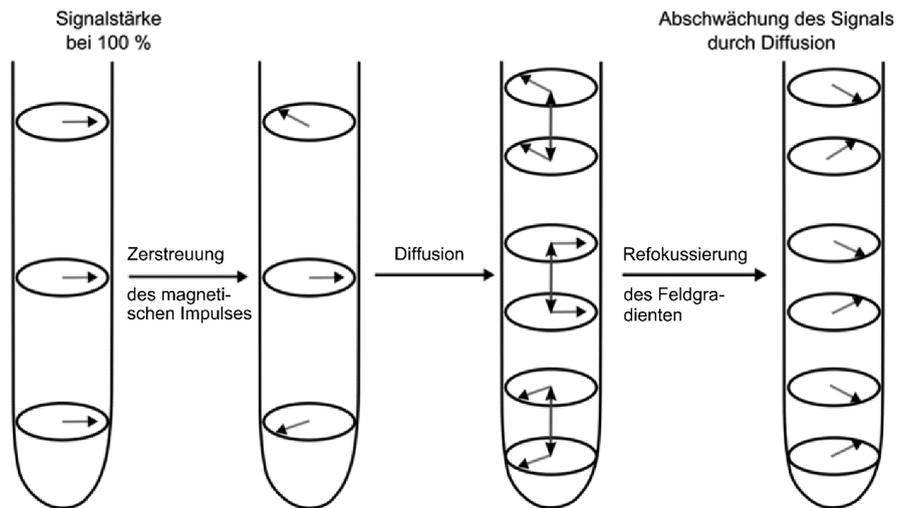


Abbildung 2-9: Skizzierung des Grundprinzips eines für *diffusion ordered spectroscopy* (DOSY) NMR-Experiments. Dargestellt sind die vier Phasen eines typischen Experiments. Die Pfeile stellen die magnetische Orientierung der Kerne dar, während durch die Doppelpfeile die Diffusion der Teilchen skizziert ist. Die Darstellung wurde nach der Vorlage von R. Hoffman erstellt.^[149]

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Projekt A: Erhöhung der Thermostabilität der DERA_{EC}

Dieses Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit Daniel B. Ciupka aus der Arbeitsgruppe „*Computational Pharmaceutical Chemistry and Molecular Bioinformatics*“ von Herrn Professor Holger Gohlke durchgeführt. Dabei wurden auf Seiten des Kooperationspartners Berechnungen erstellt, um Mutanten der DERA_{EC}, die eine Verbesserung der Thermostabilität ermöglichen könnten, vorherzusagen, welche dann bezüglich Thermostabilität getestet und mit dem Wildtyp verglichen wurden. Es soll daher bei der Beschreibung und der Interpretation der Ergebnisse vor allem auf die *In-vitro*-Experimente eingegangen werden, da die Vorhersagen nicht Bestandteil dieser Arbeit waren. Trotzdem wird ein Überblick über das Gesamtprojekt gegeben, damit die Vorgehensweise nachvollzogen werden kann und die *In-vitro*-Tests in einem Zusammenhang gebracht werden können. Des Weiteren sei angemerkt, dass bei der Verfassung dieser Arbeit (November 2015) die Analyse der Daten auf Seiten des Kooperationspartners noch nicht abgeschlossen waren, sodass eine abschließende Auswertung der Ergebnisse nur bedingt möglich ist.

3.1.1 *In-silico*-Vorhersagen (Daniel B. Ciupka)

Die Berechnungen von Daniel B. Ciupka für die Vorhersage der Mutanten zur Verbesserung der Thermostabilität der DERA basieren auf mehreren Selektionsschritten, durch welche aus 259 x 19 prinzipiell möglichen Einzelmutationen (wenn man abgesehen vom HIS-Tag jede Aminosäure der Proteinsequenz durch alle 19 anderen Vertreter austauschen würde) wenige Mutanten gefiltert wurden. In diesen Zusammenhang wurde das in Kapitel 2.1.3 vorgestellte Programm CNA verwendet. Hierbei wird das Protein als Netzwerk modelliert, bei dem die Atome und Bindungen des Netzwerkes durch gewichtete kovalente und nicht kovalente Interaktionen dargestellt werden. Eine Stabilitätsanalyse erlaubt die Aufteilung des Netzwerkes in starre Cluster, welche durch flexible Bereiche verbunden sind. Die Temperatur bedingte Entfaltung wird durch eine schrittweise Entfernung der Wasserstoffbrücken aus dem Netzwerk simuliert. Bei diesem Vorgang kann ein Phasenübergangspunkt beobachtet werden, bei welchem der größte rigide Cluster in kleinere Bereiche zerfällt. Dieser Phasenübergangspunkt kann mit dem Schmelzpunkt in Beziehung gebracht werden. Einen Vergleich des Netzwerkes vor und nach dem Phasenübergangspunkt erlaubt die Identifizierung von strukturellen Schwachpunkten

(engl. „*weak spots*“) als die Aminosäuren, welche aus dem starren Cluster in flexible Bereiche übergehen.^[83]

Für die CNA Vorhersage der DERA_{EC} wurde ein (mittels MD-Simulationen erstelltes) strukturelles Ensemble verwendet. Anschließend wurde für jede Aminosäure die Häufigkeit ermittelt, mit welcher diese von CNA - bezogen auf das strukturelle Ensemble - als *weak spots* identifiziert wurden. Diese Verteilung ist in Abbildung 3-1a innerhalb der DERA Struktur farbig gekennzeichnet.

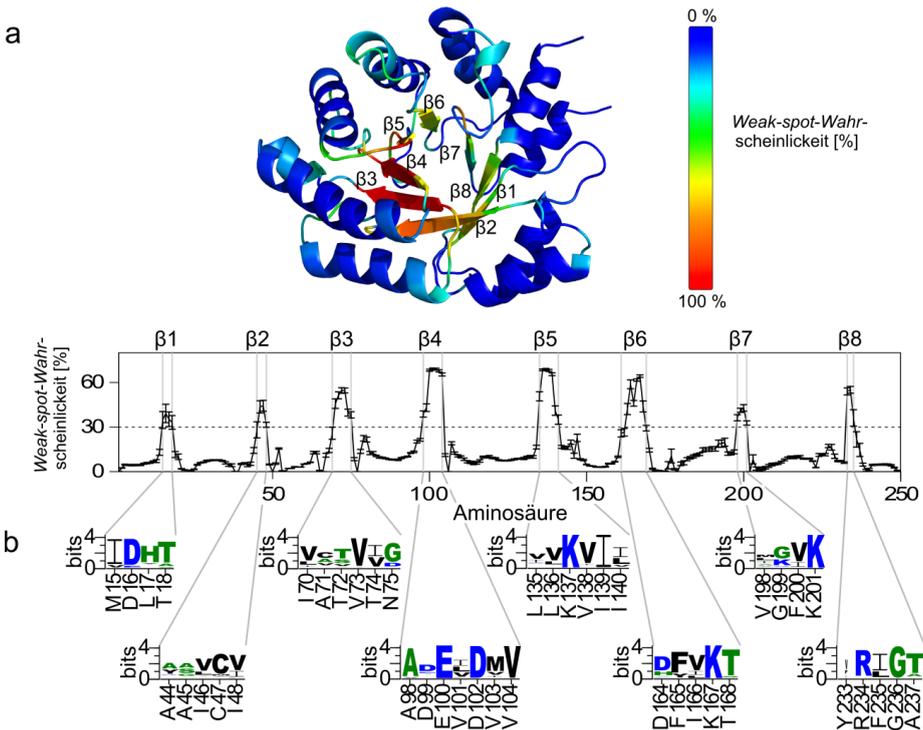


Abbildung 3-1: (a) CNA-berechnete *Weak-spot*-Wahrscheinlichkeit der einzelnen Aminosäuren in der DERA_{EC} und (b) Sequenzlogo der am häufigsten vorkommenden Aminosäuren in thermophilen DERAs. Die Berechnung der *Weak-spot*-Wahrscheinlichkeit basiert auf dem Mittelwert (mit Standardfehler) eines Ensembles von insgesamt 10000 Konformationen, welche aus fünf Wiederholungen von MDs mit je 40ns Simulationszeit erstellt wurden. Die graue Linie im mittlerem Diagramm repräsentiert den Cutoff von 30%: Alle Aminosäuren oberhalb dieses Wertes wurden für das multiple Sequenzalignment verwendet. Dieses wurde von insgesamt 94 thermophilen DERA-Sequenzen erstellt. Die Größe der Buchstaben zeigte den Konservierungsgrad der einzelnen Aminosäuren (je größer, desto stärker konserviert ist die Aminosäure).

Die *Weak-spot*-Analyse gibt einen Hinweis darauf, welche Positionen durch einen passenden Aminosäure-Austausch zu einer Stabilitätssteigerung der DERA führen können, da man (im optimalen Fall) die „Schwachstellen“ im Interaktionsnetzwerk des Proteins verstärkt.

Um Vorschläge für diese Austausche zu erhalten, wurde ein multiples Sequenzalignment von thermophilen DERAs durchgeführt. Dabei wurde der Grundgedanke verfolgt, dass in thermophilen DERAs konservierte Aminosäuren zur Stabilität des Enzyms beitragen und man diesen Effekt auch in der Entfaltungssimulation von CNA beobachten kann. In Abbildung 3-1b ist das Ergebnis dieses multiplen Sequenzalignments als Sequenzlogo^[152-153] für die Bereiche gezeigt, bei denen zuvor eine hohe *Weak-spot*-Häufigkeit ermittelt wurde.

Diese Informationen wurden dann verwendet, um die Mutationen *in silico* in das Protein einzubauen. Die CNA-Berechnungen wurden dann für ein strukturelles Ensemble dieser Mutante wiederholt und mit dem berechneten Schmelzpunkt der wt-DERA verglichen. Um ein konkretes Beispiel zu nennen, wurde für den β 4-Strang eine hohe *Weak-spot*-Häufigkeit bestimmt. Das multiple Sequenzalignment konnte ergeben, dass innerhalb dieses Bereiches an Position 103 die Aminosäure Methionin in thermophilen DERAs relativ häufig zu finden ist, während bei dem *E. coli* Enzym die Aminosäure Valin vorkommt. Daher wurde *in silico* eine V103M-Mutante erstellt und ein im Vergleich zum Wildtyp erhöhter Schmelzpunkt von 3.3 ± 0.7 K mittels CNA vorhergesagt.

Nach den Berechnungen wurden die vielversprechendsten Mutanten (bei denen der positive Einfluss auf den berechneten T_m -Wert das wichtigste Kriterium war) für die *In-vitro*-Testung ausgewählt. In Abbildung 3-2 ist die generelle Vorgehensweise schematisch zusammengefasst. Neben zwei Vorschlägen mit jeweils drei bzw. vier Mutationen (letzterer wurde nach einer genaueren Berechnung u. a. durch ein größeres strukturelles Ensemble erstellt) wurden zwei zusätzliche Kontrollen durchgeführt. Um die *Weak-spot*-Vorhersage zu testen wurden in einer „Nullkontrolle“ Mutationen ausgewählt, bei denen zwar die entsprechenden Aminosäuren bevorzugt in thermophilen DERAs zu finden sind, die Positionen aber keine *weak spots* sind. Zwei weitere Negativkontrollen beinhalteten Mutanten, welche nach der CNA-Berechnung einen negativen Effekt auf die Thermostabilität haben, obwohl sie in thermophilen DERAs bevorzugt zu finden sind.

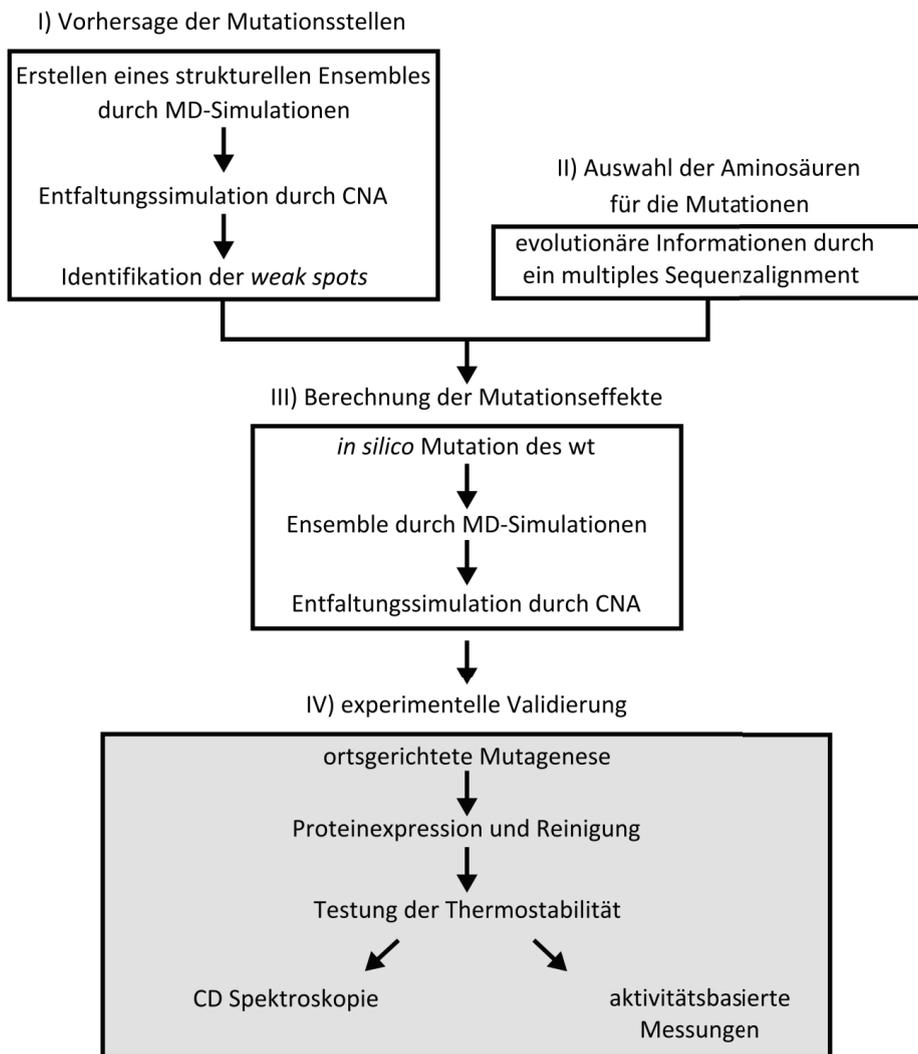


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte zur Verbesserung der Thermostabilität der DERA_{EC}. Die experimentelle Validierung ist grau hinterlegt.

3.1.2 Herstellung der Mutanten

Insgesamt wurden in dem Projekt 14 Mutanten erstellt und charakterisiert. Zusätzlich zu den oben erwähnten 11 Einzelmutanten (eingeschlossen 2 x 2 Kontrollen) wurden drei Doppelmутanten als Kombinationen verschiedener Einzelmutationen mit unterschiedlichem Effekt auf die

(*in vitro*) Thermostabilität getestet. Anhand eines Beispiels (A237T) soll im Folgenden die Herstellung einer Mutante ausführlicher beschrieben werden. Die generelle Vorgehensweise war bei allen Mutanten in diesem und auch in den folgenden Projekten gleich und wird im Methodenteil (Kapitel 6.1) erklärt. Spezifische Anpassungen bezüglich der Methode und den PCR-Bedingungen sind für jede Mutation in Tabelle 5-3 aufgeführt.

Um die Aminosäure Alanin durch ein Threonin an Position 237 zu mutieren, musste im DERA-kodierenden Gen die Nukleotide GCT durch ACT ausgetauscht werden. Zuerst wurde nach der *Round-the-Horn* Methoden (vgl. 6.1.1) ein Primerpaar erstellt, welcher im (5'-phosphorylierten Ende) am 5'-Ende des forward-Primers das gewünschte Codon enthält. Da jedoch in der PCR kein Reaktionsprodukt zu erkennen war, wurde die Methode zu QuikChange® geändert und ein neues Primerpaar erstellt. In diesen DNA-Sequenzen befindet sich die Mutation (G→A) in der Mitte beider komplementären Primern und wird von 13 bzw. 14 bindenden Nukleotiden flankiert. In der folgenden PCR mit einem Gradient der Anlagerungstemperatur zwischen 55-75°C konnte im Agarosegel das Produkt (ca. 6 kb) bei >70°C identifiziert werden.

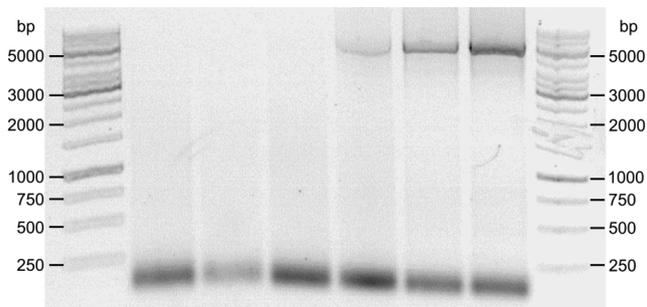


Abbildung 3-3: 0.8%iges Agarosegel nach der QuikChange® PCR zur Herstellung der A237T-Mutation im *deoC*-Gen. Als Enzym wurde die *Phusion*TM-Polymerase verwendet. Der Gradient der Anlagerungstemperatur lag zwischen 55°C (links) und 75°C (rechts). An den Rändern ist jeweils eine 1 kb Standard (*Fermentas*) aufgetragen.

Da bei 75°C die deutlichste Bande zu erkennen war, wurden 1 µL *DpnI* zu dem Reaktionsprodukt bei der entsprechenden Temperatur zugefügt (vgl. 6.1.2) und das Plasmid nach einer Übernachtinkubation bei 37°C anschließend in kompetente *E. coli* MachI Zellen transformiert (siehe 6.2.2). Von den fünf gewachsenen Kolonien auf der Agarplatte wurden deren gereinigte Plasmide sequenziert (siehe 6.2.4 und 6.1.7). Diese Sequenzierung ergab, dass in beiden Proben die gewünschte Mutation enthalten war, aber keine weiteren Änderungen in der DNA-Sequenz der DERA durch die PCR entstanden sind.

Nach der Bestätigung durch die Sequenzierung, dass die Mutationen eingebaut wurden, wurden die Plasmide der entsprechenden DERA-Varianten in *E. coli*-BI21(DE3) Zellen transformiert und die Proteinexpression gestartet. Anschließend wurden die Enzyme über eine

NiNTA-Säule gereinigt und die Reinigung mittels SDS-Gel überprüft. Das Ergebnis für alle Mutanten ist in Abbildung 3-4 dargestellt.

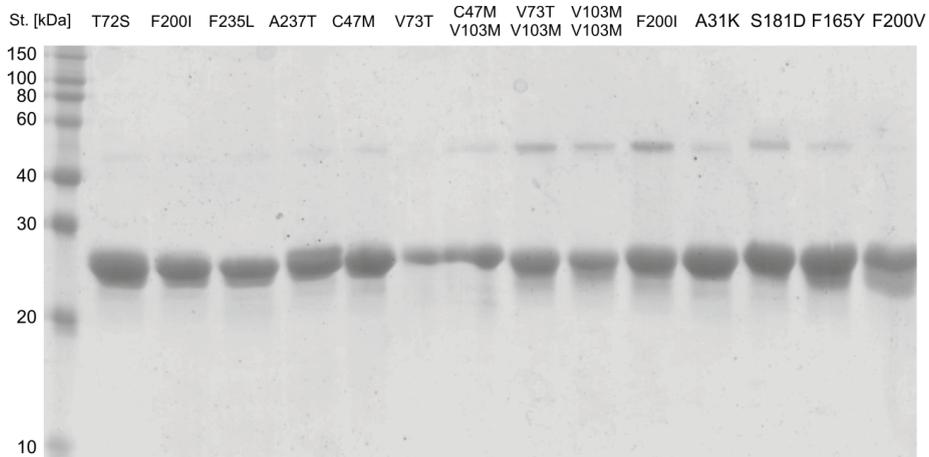


Abbildung 3-4: SDS-Gel der gereinigten Mutanten.

Man erkennt im SDS-Gel, dass alle Mutanten erfolgreich exprimiert und gereinigt werden konnten. Zwar sind teilweise Banden bei ca. 50kDa zu erkennen (möglicherweise Dimere der DERA, welche im SDS-Gel stabil geblieben sind), jedoch ist davon auszugehen, dass durch diese Verunreinigung (falls die Dimer-Hypothese nicht stimmt) in solch geringen Mengen die weiteren Tests nicht beeinflusst werden.

3.1.3 Biochemische Charakterisierung der Mutanten

Nach der erfolgreichen Herstellung und Reinigung aller Mutanten wurden diese biochemisch charakterisiert, wobei der Fokus auf der Thermostabilität lag. Zuerst wurden deren spezifische Aktivitäten (in U/mg) gemessen und die Stabilität nach 10 min Inkubationszeit bei 60°C und 5 min bei 65°C bestimmt. Aus den Werten wurde die relative Aktivität bezüglich der unbehandelten Proben ermittelt. Zusätzlich sollte ein zweiter, Aktivitäts-unabhängiger Test bezüglich der thermischen Stabilität der verschiedenen DERA-Mutanten durchgeführt werden. Dabei wurden drei verschiedene Methoden diskutiert: Die dynamische Differenzkalorimetrie (DLC, engl. *differential scanning calorimetry*),^[154] die Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes, welcher durch die Denaturierung an die hydrophoben Reste des Proteins binden kann und somit bei einer anderen Wellenlänge fluoresziert,^[155] sowie die CD-Spektroskopie^[124] (bei der die Entfaltung der Sekundärstrukturelemente verfolgt werden kann). Letztendlich wurde die CD-Spektroskopie als Methode ausgewählt, da sie im Gegensatz zum DLC im Forschungszentrum Jülich zur

Verfügung stand und man nicht auf Zugabe einer zusätzlichen Substanz (welche die Eigenschaften des Proteins beeinflussen könnte) angewiesen ist. Für jede Enzymvariante wurde zuerst ein CD-Spektrum von 190-250nm aufgezeichnet. Bei korrekter Proteinfaltung (was bei jeder Mutante der Fall war), war bei 222nm ein charakteristisches Minimum zu erkennen, welches durch die überwiegend α -helikale Proteinstruktur der DERA (siehe Abbildung 2-3) zu Stande kommt. Bei dieser Wellenlänge wurde ein Temperaturscan zur Bestimmung des Schmelzpunktes^{VI} durchgeführt (eine genauere Beschreibung ist im Methodenteil unter 6.4.4 zu finden). Beispielhaft ist hier sowohl der Wellenlängen- als auch der Temperaturscan für die wt-DERA in Abbildung 3-5 dargestellt. Die Ergebnisse der kinetischen Messungen als auch der Schmelztemperaturen sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

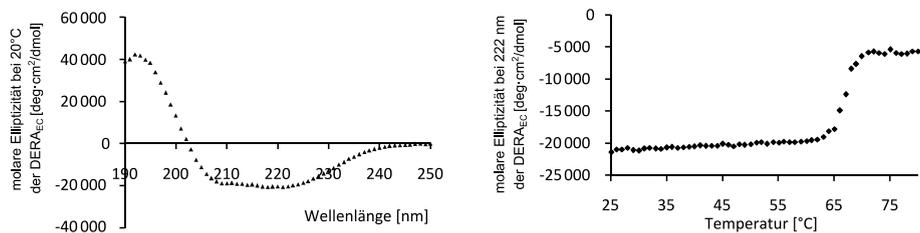


Abbildung 3-5: Wellenlängen-Scan (links) und Schmelzpunktbestimmung (rechts) für die wt-DERA aus *E. coli*. Da das Spektrum durch α -Helices dominiert wird, erhält man ein Minimum bei 222 nm. Dies wurde benutzt, um den Schmelzpunkt des Enzyms zu bestimmen.

Sowohl im Aktivitätstest als auch durch die CD-Spektroskopie wird ein Maß für die Thermostabilität der verschiedenen DERA-Varianten gemessen. Um zu überprüfen, ob beide Messwerte ein ähnliches Ergebnis zeigen, wurde die lineare Abhängigkeit beider Ergebnisse überprüft, indem sie in Abbildung 3-6 gegeneinander aufgetragen wurden. Dabei wurde nur die Stabilität bei 60°C berücksichtigt, da diese Werte ein breiteres Spektrum an Stabilitätswerten abbilden, während durch die Inkubation bei 65°C fast alle Mutanten ihre Aktivität vollständig verloren hatten. Man erkennt in Abbildung 3-6 an dem Wert von $R^2=0.86$, dass die kinetischen Werte mit den gemessenen Schmelzpunkten korrelieren. Die thermostabileren Mutanten wie V103M oder F200I zeigen bei beiden Methoden einen höheren Wert, während viele anderen Mutanten wie F235L oder T72S sowohl beim Schmelzpunkt als auch im Aktivitätsassay weniger stabil sind. Es fällt weiterhin auf, dass die CD-Spektroskopie einen differenzierteren Wert liefert als der unter

^{VI}Der Begriff „Schmelzpunkt“ wurde aus Mangel einer besseren Alternative gewählt. Experimente haben nämlich gezeigt, dass dieser von der Heizgeschwindigkeit des CD-Spektrometers abhängt und somit sowohl kinetische als auch thermodynamische Effekte den Wert beeinflussen. Es ist somit kein allgemeiner Schmelzpunkt, sondern nur ein Wert, der unter definierten Versuchsbedingungen gemessen wurde. Da alle Mutanten jedoch auf die gleiche Weise vermessen wurden, eignet er sich gut, um die erhaltenen Werte zu vergleichen.

diesen Bedingungen durchgeführte Aktivitätsassay. So ist bei allen sechs Mutanten (T72S, V73T, F165Y, S181D, F235L und A237T) kaum ein Unterschied nach 10 min bei 60°C messbar (alle sind nicht mehr aktiv), während die Schmelzpunkte einen Bereich zwischen 63-66°C abdecken.

Tabelle 3-1: Spezifische Aktivität und Stabilität der DERA_{EC}-Mutanten

	Mutante	Spez. Aktivität [U/mg]	Rel. Aktivität nach Thermoinkubation [%]		Schmelzpunkt nach CD-Spektroskopie [°C]
		unbehandelt	10 min bei 60°C	5 min bei 65°C	
1. Runde	wt	8.27 ± 0.50	25.8 ± 3.1	3.1 ± 0.7	66.6 ± 0.09
	T72S	4.56 ± 0.23	4.4 ± 0.3	0.3 ± 0.5	64.3 ± 0.05
	F200I	6.10 ± 0.30	63.3 ± 0.8	8.9 ± 0.1	70.2 ± 0.03
	F235L	5.52 ± 0.30	2.4 ± 0.2	0.2 ± 0.4	63.6 ± 0.03
	A237T	3.77 ± 0.20	2.1 ± 0.3	0.3 ± 0.5	62.9 ± 0.03
2. Runde	C47M	5.04 ± 0.25	12.0 ± 0.6	0.3 ± 0.2	66.5 ± 0.12
	V73T	6.18 ± 0.60	2.5 ± 0.8	0.6 ± 0.2	64.3 ± 0.12
	V103M	4.62 ± 0.05	52.9 ± 1.9	6.6 ± 0.9	69.0 ± 0.04
Kombinationen	C47M-V103M	3.56 ± 0.05	42.1 ± 3.2	6.5 ± 3.0	70.0 ± 0.07
	V73T-V103M	3.91 ± 0.32	17.3 ± 3.3	0.1 ± 0.1	66.2 ± 0.15
	V103M-F200I	2.06 ± 0.19	79.9 ± 1.1	38.9 ± 0.6	72.1 ± 0.06
null Kontrollen	A31K	9.06 ± 0.60	17.2 ± 1.4	0.8 ± 0.5	67.3 ± 0.07
	S181D	7.61 ± 0.46	1.9 ± 0.1	0.6 ± 0.5	65.8 ± 0.07
negativ Kontrollen	F165Y	6.19 ± 0.06	5.0 ± 0.7	6.2 ± 6.1	63.0 ± 0.05
	F200V	6.39 ± 0.30	75.0 ± 4.2	7.0 ± 2.7	70.0 ± 0.05

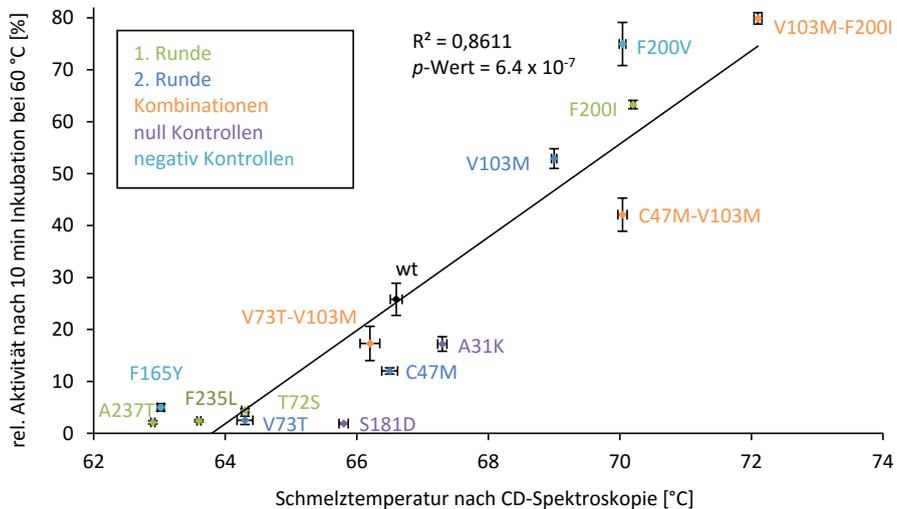


Abbildung 3-6: Vergleich der gemessenen Stabilitätswerte der DERA_{EC}-Mutanten zwischen dem Aktivitäts-basierendem Stabilitätstest und der Schmelzpunktbestimmung mittels CD-Spektroskopie.

Möglicherweise wäre hier eine kürzere Inkubationszeit bzw. niedrigere Temperatur besser, um zwischen diesen Mutanten differenzieren zu können; jedoch sind dann die Unterschiede in den hitzestabileren Mutanten schwerer messbar (der Wildtyp ist z. B. bei 55°C über Nacht ohne Aktivitätsverlust stabil). Des Weiteren hat die Erfahrung gezeigt, dass die CD-Werte deutlich besser zu reproduzieren sind: Stichprobenhaft wurde die Schmelzpunktbestimmung (teilweise mit neu gereinigten Enzymen) mehrfach wiederholt und die Werte waren jedes Mal nahezu identisch, während die Kinetikmessungen durch viele variable Parameter (u. a. Temperatur des Schüttlers, Inkubationszeit, Volumenabhängigkeit der Äquilibration auf die gewünschte Temperatur) stärkeren Schwankungen ausgesetzt sind. Man kann also zusammenfassend sagen, dass beide Methoden geeignet sind, um die Thermostabilität der Mutanten zu messen, jedoch die CD-Spektroskopie genauere und reproduzierbarere Ergebnisse liefert.

3.1.4 Vergleich der berechneten mit den experimentellen T_m -Werten

Schon in Abbildung 3-6 war deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der Mutationen ohne Effekt auf die Thermostabilität der DERA ungefähr gleich zu denen mit positivem oder negativem Effekt sind. Dabei ist zu berücksichtigen, dass nach jeder Runde einer CNA-Berechnung die potentiell besten Mutationen experimentell getestet wurden. Darauf aufbauend wurden die Vorhersagen in mehreren Runden verbessert, sodass manche bisher als sehr thermostabil eingestufte Mutationen mit verbesserten Berechnungen als weniger gut eingeordnet werden konnten. Die im November 2015 aktuellen Ergebnisse der *in silico* bestimmten Schmelzpunkte sind in Abbildung 3-7 gegen die mit CD-Spektroskopie gemessenen T_m -Werte aufgetragen.

Aus dieser Darstellung wird deutlich, dass die Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Daten variiert. Während die T_m -Werte von einigen Mutanten (z. B. F200I, V103M, C47M und F235L) qualitativ betrachtet (wenn man nicht die absoluten Werte sondern die Tendenzen des stabilisierenden bzw. destabilisierenden Effekts einbezieht) vergleichbar sind, gibt es auch Ausreißer. Zum Beispiel zeigt die Doppelmutante V103M-F200I auf der CNA-Ebene keine Verbesserung der Thermostabilität, obwohl es beim Experiment und auch bei den Einzelmutanten (auf beiden Ebenen) der Fall ist. Ein ähnlicher Effekt ist bei der Doppelmutante C47M-V103M zu sehen, dessen Einzelmutanten noch einen positiven Effekt in der CNA-Berechnung zeigen, dieser aber bei deren Kombination nicht mehr auftritt. Auch ist es überraschend, dass bei der F200I Mutante eine höhere Thermostabilität vorhergesagt wurde und diese auch auf experimenteller Ebene bestätigt werden konnte, allerdings durch das Entfernen einer einzelnen Methylgruppe (wenn man F200 anstelle von Isoleucin durch Valin ersetzt) nun ein negativer Effekt errechnet wurde. Dieser konnte durch das Experiment nicht bestätigt

werden. Vergleicht man alle experimentell und theoretisch bestimmten T_m -Werte, kann keine direkte Korrelation ($R^2 < 0.1$) festgestellt werden.

Genau zwei Mutanten (V103M und F200I) zeigen einen signifikant höheren, berechneten Schmelzpunkt. In beiden Fällen konnte der Effekt im Experiment bestätigt werden. Somit haben beide Vorhersagen in Bezug auf die stabilitätsverbessernden Einzelmutationen gestimmt.

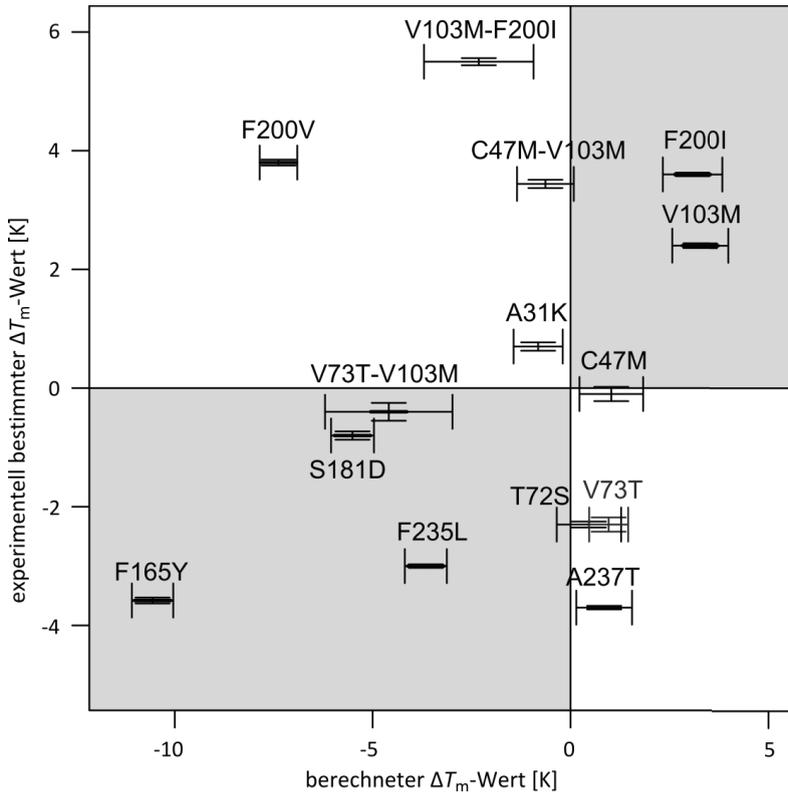


Abbildung 3-7: Grafische Auftragung der experimentell bestimmten gegen die berechneten ΔT_m -Werte der verschiedenen DERA-Varianten. Der Δ -Wert bezieht sich dabei auf die Differenz zur wt-DERA. Während die theoretischen Werte durch CNA ermittelt wurden, basieren die *In-vitro*- T_m -Werte auf den durch CD-Spektroskopie bestimmten Schmelzkurven. Die grau hinterlegten Felder markieren die Bereiche, bei denen die Vorzeichen beider Werte übereinstimmen und die V73T-Mutante ist zur besseren Unterscheidung von T72S grau gekennzeichnet.

An dieser Stelle sollen die Ergebnisse jedoch nicht weiter diskutiert werden, da, wie oben bereits erwähnt, die Analyse von Seiten der Arbeitsgruppe von Professor Gohlke noch nicht abgeschlossen sind. Da jedoch im folgenden Kapitel weiter mit dem Programm CNA gearbeitet wurde, werden diese Ergebnisse in der Zusammenfassung bzw. im Ausblick der Arbeit (Kapitel 4) bei

der Bewertung des Programmes in Bezug auf die Berechnung von Thermostabilität mit einbezogen. Trotzdem sei zu diesem Zeitpunkt schon darauf hingewiesen, dass es nicht das primäre Ziel dieses Projektes war, eine Korrelation zwischen experimentellen und berechneten Daten zu erreichen, sondern die möglichen Mutationen auf eine kleine Anzahl mit höherer Wahrscheinlichkeit, die Thermostabilität zu verbessern, zu reduzieren. Somit können die Ergebnisse trotz fehlender Korrelation als Erfolg gewertet werden, da von den sieben vorgeschlagenen Mutanten (wenn man die Kontrollen und Doppelmutanten nicht berücksichtigt) zwei Varianten auch *in vitro* einen thermostabilisierenden Effekt zeigten.

3.2 Projekt B: Vergleich extremophiler DERAs

3.2.1 Identifikation, Klonierung psychrophiler DERAs

Ziel dieses Projektes war es, neue DERAs aus psychrophilen Organismen herzustellen, zu charakterisieren und mit anderen, meso- und hyperthermophilen DERAs zu vergleichen. Um eine gute Genexpression in *E. coli* zu gewährleisten, wurde nach einem DERA-kodierenden Gen gesucht, dessen Protein eine hohe Sequenzidentität zur *E. coli* (EC) DERA aufweist. Es wurde der Organismus *Colwellia psychrerythraea* (CP) ausgewählt – ein obligat psychrophiles, gram-negatives Bakterium, welches aus arktischen Marinesedimenten isoliert wurde, optimale Wachstumsbedingungen bei 8°C zeigt und dessen Genom 2005 vollständig sequenziert wurde.^[156] Das *deoC*-Gen war daher in der Genbank markiert und konnte sehr einfach gefunden werden. Abbildung 3-8 zeigt ein Sequenzalignment zwischen DERA_{EC} und DERA_{CP}. Die Sequenzidentität liegt bei 68 % (mit 82 % Ähnlichkeit).

```

EC  MTDLKASSLRALKLMDLTLNDDDTDEKVIALCHQAKTPVGNATAAICIYPRFIPLARKTLKEQSTPEIRIATVTNFPFGN 80
CP  MSDIKVAQRAISLMDLTSLNNTETDQEIIDLCRQAKSPAGETAACIEPRFIPVAKKALKAQSTPEIRIATVTNFPQGN 80

EC  DDDIALAE TRAAIAYGADEVVVFPYRALMAGNEQVGFDLVKACKKACAAANVLLKVI IETGELKDEALIRKASEIISK 160
CP  DDDIALAE TRAAVAYGADEVIVFPYRALIQGNETIIGFDVVKVCKQACSG-NAKLKV I IETGELKSEELIRKASEIAIN 159

EC  AGADFIKTSTGKVAINATPEASARIMBEVIRDMGVKTVGFKPAGGVRTAEDAQKYLA LADELFCADWADARHYRFGASSL 240
CP  AGADFIKTSTGKVAINATPEAAKVMMLTVIKNK--NTAVGFKPAGGVRNAADAAIYLDLADNILEWADANHFRFGASSL 237

EC  LASLLKALGHG-IGKSSASY 259
CP  LISLLDTLGHKSNIKSSSNY 257

```

Abbildung 3-8: Sequenzvergleich zwischen DERA_{EC} und DERA_{CP}. Identische Aminosäuren sind schwarz und ähnliche grau unterlegt. Die Blossum62 Matrix wurde für das Sequenzalignment benutzt.

Eine Analyse der *Codon Usage* mit *graphical codon usage analyser (GCUA)*^[157] zeigte nur wenige seltene Codons, welche die Proteinexpression in *E. coli* erschweren könnten. Diese wurden, wie in Tabelle 3-2 gezeigt, durch häufiger verwendete Codons ausgetauscht. Das Gen wurde anschließend, wie in Kapitel 5.4 beschrieben, als synthetisches Gen bestellt und in den pET21a(+)-Vektor kloniert.

Tabelle 3-2: Austausch seltener Codons im *deoC*_{CP}-Gen

Seltenes Codon	Kodiert für	Häufigkeit [%]*	Anzahl in <i>deoC</i> _{CP} -Gen	Austausch zu [Häufigkeit (%)]
AGA	Arg	4	3	CGT (42)
CGA	Arg	5	1	CGT (42)
CTA	Leu	3	1	CTG (55)
ATA	Ile	7	6	ATT (47)

*Der Wert bezieht sich auf den Vergleich zu den anderen Codons, welche für dieselbe Aminosäure kodieren.

Als weiteres psychrophiles Enzym wurde die DERA aus dem Organismus *Shewanella halifaxensis* ausgewählt, da uns dessen genomische DNA von Herrn Dr. Filip Kovacic des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) zur Verfügung gestellt wurde. Das Bakterium wurde im atlantischen Ozean in einer Tiefe von 215 m isoliert und hat eine optimale Wachstumstemperatur von 10 °C.^[158] 2010 wurde dessen Genom vollständig sequenziert.^[159] Der Sequenzvergleich ergab wie auch bei *C. psychrerythraea* eine hohe Sequenzidentität von 69 % (78 % Ähnlichkeit) zur DERA_{EC}.

```

EC MIDLKASSLRALIKLMDLTTLNDDDTDEKVIALCHCAKTPVGNNTAAICIYPRFTPIARKTLKEOCTPEIRLATVTNFPHGN 80
SH MSDLKKAQAQALISLMDLTTLNDDDTDQKVIELCHCAKTPAGDTAAICIYPRFTPIARKTLNEIGDDIKLATVTNFPHGN 80

EC DDIDIALAETRAALAYGADEVVVFPYRALMAGNEOVGFDLVKACKEACAANVLLKVIETETGELKDEALIRKASELSTIK 160
SH DDIDIAVLETRAAYAVGADEVVVFPYRALMAGNETVGFELVKACKEACC-EETILKVIIESGVLADPALIRKASELSTID 159

EC AGADFIKTS'TGKVAVNATLESARIMMEVIRDMGVFKTVGFKPAGGVRTAEDAQKYLAIADBLEGADWADARHYRFGASSL 240
SH AGADFIKTS'TGKVAVNATLEAABIMMIVISEK--NPKVGFKPAGGVKDAAAAAEFLGVAARLLGDDWATPATIRFGASSL 237

EC IASLLKALGHG-DGKSASSY 259
SH LTNLLLTLELADAPQGAQGY 257

```

Abbildung 3-9: Sequenzvergleich zwischen DERA_{EC} und DERA_{SH}. Identische Aminosäuren sind schwarz und ähnliche grau unterlegt. Die Blossum62 Matrix wurde für das Sequenzalignment benutzt.

Da das Gen aus genomischer DNA isoliert werden sollte, konnte keine Optimierung der *Codon Usage* erfolgen, eine Analyse mit GCUA ergab jedoch, dass keine sehr seltenen Codons im Gen verwendet werden. Das ca. 800 bp große *deoC_{SH}*-Gen konnte, wie in Abbildung 3-10 zu sehen ist, erfolgreich aus der genomischen DNA des Ursprungsorganismus amplifiziert werden und wurde anschließend in den pET21a(+)-Vektor kloniert. Beide Gene der psychrophilen DERAs enthielten außerdem die Sequenz für einen C-terminalen 6x-HIS-Tag, um eine einfache Reinigung mittels IMAC zu gewährleisten.

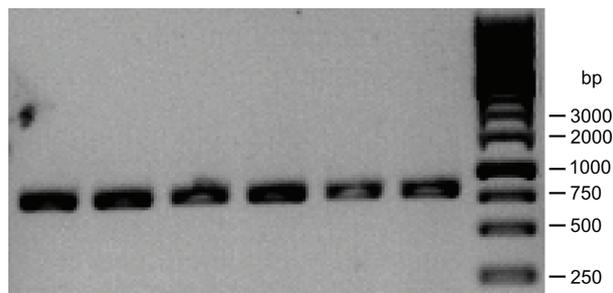


Abbildung 3-10: 1.0%iges Agarosegel zur Isolation des *deoC_{SH}*-Gens (ca. 800 bp) aus der genomischen DNA von *Shewanella halifaxensis*. Als Enzym wurde die *Pfu*-Polymerase verwendet. Der Gradient der Anlagerungstemperatur lag zwischen 55 °C (links) und 75 °C (rechts). Am rechten Rand ist ein 1 kb Standard (*Fermentas*) aufgetragen.

3.2.2 Proteinexpression und Reinigung

Beide psychrophile Enzyme konnten in *E. coli*-BL21(DE3) exprimiert und anschließend gereinigt werden. Der Erfolg der einzelnen Reinigungsschritte ist in Abbildung 3-11 in Form eines SDS-Gels zu sehen, während ein beispielhaftes NiNTA-Säulenchromatogramm von DERA_{CP} in Abbildung 3-12 dargestellt ist. Im Rohextrakt erkennt man auf dem Gel in beiden Fällen eine dominante Bande bei 25-30kDa, was darauf hindeutet, dass die Proteine (28kDa) überexprimiert werden konnten. Während DERA_{CP} nahezu vollständig an die Säule gebunden hat, sieht man bei DERA_{SH} noch eine Bande im Rohextrakt nach Beladung der Säule. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung an das Nickel etwas schlechter ist oder die Kapazität der Säule für eine Bindung des gesamten Materials nicht ausreichend war. In beiden Fällen ist im Eluat mit 250 mM Imidazol nur noch die Proteinbande der DERA zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass die Reinigungen erfolgreich waren und die Proteine einen hohen Reinheitsgrad haben.

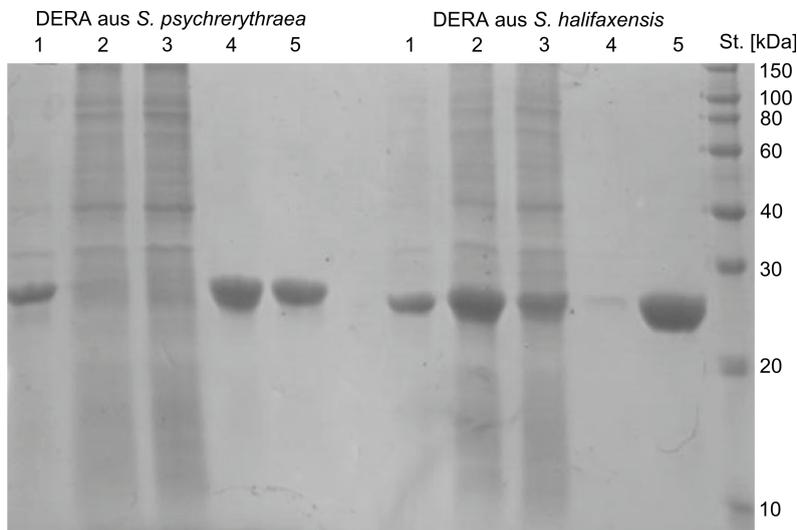


Abbildung 3-11: SDS-Gel der Expression und Reinigung von DERA_{CP} und DERA_{SH} mittels NiNTA-Säulen. 1: Überstand des Rohextraktes nach dem Zellaufschluss, 2: Überstand nach Beladung der Säule, 3: Durchfluss ohne Zugabe von Imidazol, 3: Eluat nach 30 mM Imidazol, 4: Eluat mit 250 mM Imidazol zur Elution der DERA. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden zuvor angepasst. Somit spiegeln die Bandenstärken nicht die Proteinmengen sondern den Reinigungsgrad wider.

Während das SDS-Gel den qualitativen Erfolg der einzelnen Reinigungsschritte widerspiegelt, sind in Tabelle 3-3 die Gesamt-Proteinmengen dieser Schritte (in Bezug auf 1g aufgeschlossene Zellen) aufgelistet. In beiden Fällen konnten 60-80% der Gesamtmenge an aufgeschlossenen

Proteinen gereinigt werden. Insgesamt wurden in dieser beispielhaft gezeigten Reinigung ca. 90mg DERA_{CP} und ca. 60mg DERA_{SH} erhalten, was umgerechnet auf 1 L Expressionsmedium bei einer Zellausbeute von 10g/L insgesamt 900mg bzw. 600mg gereinigtem Enzym entspricht.

Tabelle 3-3: Vergleichende Proteinmengen während der einzelnen Reinigungsschritte für beide psychrophile DERAs. Die entsprechenden Mengen wurden mit dem Bradford-Assay bestimmt. Die Prozentzahlen beziehen sich auf das Verhältnis zur Menge im Rohextrakt (Überstand) nach dem Aufschluss (Schritt 1). Durch Ungenauigkeiten während der Messungen und der Reinigung ergibt die Summe aller vier folgenden Schritte nicht 100%.

Quellorganismus der DERA	Proteinmenge (bezogen auf 1 g aufgeschlossene Zellen)									
	Rohextrakt		Nach Beladung*		Durchfluss		30mM Imidazol		250mM Imidazol	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
<i>C. psychrerythraea</i>	111	100	25	22	11.4	10	13	12	92.5	83
<i>S. halifaxensis</i>	105	100	26	25	19.8	19	13.5	13	58.75	56

*Für diese Messung wurde die Säule mit Protein aus dem aufgeschlossenen Rohextrakt beladen und anschließend die Proteinmenge bestimmt, welche nicht an die Säule gebunden wurde.

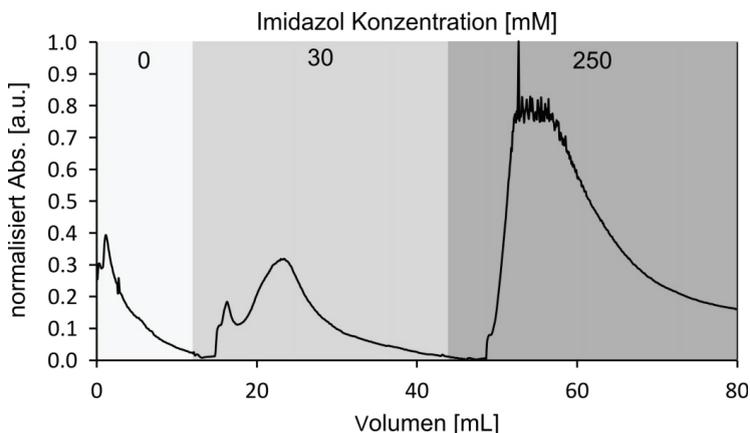


Abbildung 3-12: Säulenchromatogramm einer typischen NiNTA-Reinigung. Hier gezeigt ist das Beispiel der DERA aus *C. psychrerythraea*. Die Flussgeschwindigkeit betrug 5mL/min, die Proteinfractionen wurden bei 250mM Imidazol gesammelt und die Detektion der Proteinfractionen erfolgte über die Absorption bei 280nm.

Jedoch muss man beachten, dass dies die Werte einer einzelnen Reinigung sind und durch dessen Wiederholung teilweise andere Ergebnisse erhalten wurden. Dies liegt daran, dass durch unterschiedliche Bedingungen während der Expression (Medium, Zelldichte der Vorkultur) sowie während der Reinigung [Qualität des Zellaufschlusses, Säulenmaterial (es wurden verschiedene Säulen benutzt und nicht nach jedem Lauf neu beladen), Länge und Durchflusgeschwindigkeit der Beladung, etc.] sehr viele Parameter variieren können. Die Erfahrung hat

gezeigt (insgesamt wurden die Enzyme während der Promotion mindestens 30-mal gereinigt), dass es schwierig ist, die erhaltenen Werte exakt zu reproduzieren. Nichtsdestotrotz kann festgehalten werden, dass immer gute Proteinausbeuten und sehr saubere Proteine erhalten wurden und die Ausbeuten der DERA_{CP} tendenziell höher waren als bei DERA_{SH} (vergleichbar mit der DERA von *E. coli*). Man kann also zusammenfassend sagen, dass auf Grund der hohen Reinheit und Proteinmenge (a) kein weiterer Reinigungsschritt für eine biochemische Charakterisierung erforderlich war und (b) auf eine weitere Optimierung der Expression und Reinigung verzichtet wurde, da die Menge von über 50mg gereinigtes Protein pro Gramm aufgeschlossener Zellen mehr als ausreichend für die weiteren Tests war.

3.2.3 Vergleichende biochemische Charakterisierung

Um einen Vergleich der neuen, psychrophilen DERAs mit dessen meso- und (hyper)thermophilen Orthologen zu erstellen, wurden weitere DERA-Varianten aus *Escherichia coli* (mesophil), *Thermotoga maritima* und *Pyrobaculum aerophilum* (beide hyperthermophil) exprimiert und gereinigt. Alle drei Enzyme wurden bereits in der Literatur charakterisiert und deren Kristallstruktur gelöst (vgl. Tabelle 2-3). Durch Vorarbeiten von Frau Dr. Irene Küberl, née Kullartz konnten die Gene bereits erfolgreich in den pET21a(+)-Vektor kloniert werden.^[160] In Tabelle 3-4 sind die verwendeten Organismen in einer Übersicht zusammengestellt.

Tabelle 3-4: Übersicht über die Quellorganismen für die vergleichenden DERA-Studien

Anpassung	Organismus	Optimale Wachstumstemperatur	3D-Struktur bekannt
psychrophil	<i>Colwellia psychrerythraea</i> (CP)	8 °C ^[156]	nein
	<i>Shewanella halifaxensis</i> (SH)	10 °C ^[158]	nein
mesophil	<i>Escherichia coli</i> (EC)	37 °C	ja ^[87]
hyperthermophil	<i>Thermotoga maritima</i> (TM)	80 °C ^[161]	ja ^[104]
	<i>Pyrobaculum aerophilum</i> (PA)	100 °C ^[162]	ja ^[104]

Die Stabilität der Enzyme ist ein wichtiges Merkmal, welches die Anpassung an extreme Bedingungen beschreibt. Daher wurde von allen fünf DERAs der Schmelzpunkt mittels CD-Spektroskopie bestimmt (Abbildung 3-13). Um eine zusätzliche, unabhängige Kontrolle zu erhalten, wurde in einem aktivitätsbasierten Assay die Halbwertszeit der Enzyme bei verschiedenen Temperaturen ermittelt (Tabelle 3-5).

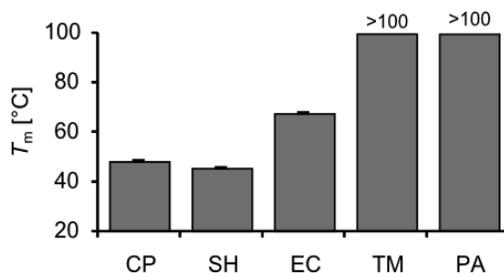


Abbildung 3-13: Schmelztemperaturen, welche durch CD-Spektroskopie bei 222 nm bestimmt wurden.

Die DERAs aus psychrophilen Organismen zeigten einen ähnlichen Schmelzpunkt und waren ca. 20 °C weniger stabil als $DERA_{EC}$. Die Werte aus dem aktivitätsbasierten Assay bestätigen dieses Ergebnis. Für beide hyperthermophilen Enzyme konnte kein Schmelzpunkt bestimmt werden, da dieser mit über 100 °C oberhalb des detektierbaren Bereiches des CD-Spektrometers liegt. Jedoch konnte festgestellt werden, dass bei einer Inkubationstemperatur von 100 °C nur die DERA aus *P. aerophilum* längere Zeit stabil war (siehe Tabelle 3-5). Dies wurde bereits von *Sakuraba et al.* beschrieben, welche beide Enzyme bei 100 °C für 10 min inkubierten und nur einen Aktivitätsverlust bei $DERA_{TM}$ beobachteten.^[104]

Tabelle 3-5: Halbwertszeit der Enzymaktivität nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen

	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C	100 °C
CP	> 16 h	29 min	1 min	< 1 min	--	--	--	--
SH	> 16 h	6.6 h	1 min	< 1 min	--	--	--	--
EC	--	--	> 16 h	11 min	1 min	< 1 min	--	--
TM	--	--	--	--	--	> 16 h	13.6 h	22 min
PA	--	--	--	--	--	> 16 h	> 16 h	> 16 h

Um einen Eindruck von den katalytischen Daten der verschiedenen Enzyme zu bekommen, wurden Michaelis-Menten Kurven aufgenommen (Abbildung 3-14) und daraus die Werte für k_{cat} und K_M bestimmt. In einem von Carolin Bisterfeld durchgeführten Assay wurden des Weiteren die ee -Werte der Enzyme für die Umsetzung von Acetaldehyd (**3**) und Propanal zu 3-Hydroxy-Pentanal bestimmt, welche zusammen mit den Michaelis-Menten Werten in Tabelle 3-6 gezeigt werden und für alle Enzyme einen hohen Wert (89-97 %) für das (*R*)-Enantiomer aufweisen.

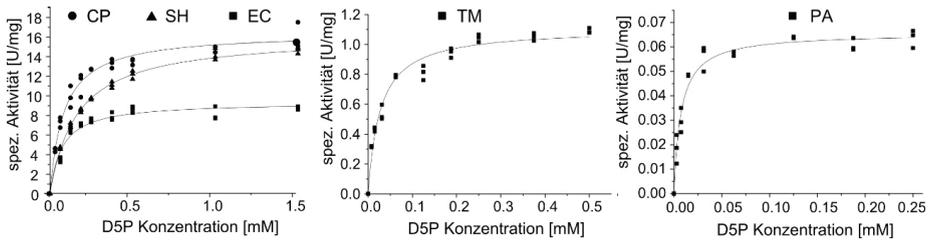


Abbildung 3-14: Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter für alle fünf DERA-Orthologe. Es wurden Dreifachmessungen bei 25 °C mit verschiedenen Konzentrationen des natürlichen Substrats 2-Desoxy-D-ribose-5-Phosphat (D5P) durchgeführt.

Die k_{cat} -Werte bei 25 °C waren für beide psychrophile DERAs fast doppelt so hoch wie der von *E. coli*, während die k_{cat} -Werte von DERA_{TM} und DERA_{PA} ca. 9-mal bzw. 147-mal niedriger waren. Auch die K_{M} -Werte sind von psychro- über meso- zu hyperthermophilen DERAs gesunken. Trotz der geringeren Substrataffinität (abgeleitet von den hohen K_{M} -Werten) der Kälte-adaptierten Enzyme lässt sich der allgemeine Trend erkennen, dass die katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) mit abnehmenden optimalen Wachstumsbedingungen zunimmt.

Tabelle 3-6: Michaelis-Menten- und ee -Werte der fünf DERAs

Anpassung	Organismus	K_{M} [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	$k_{\text{cat}}K_{\text{M}}^{-1}$ [$\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$]	ee -Wert [%]
psychrophil	<i>C. psychrerythraea</i>	83.3±8.3	7.6±0.2	91.6±9.4	95.0±0.6
	<i>S. halifaxensis</i>	164±5.7	7.6±0.7	46.3±4.6	96.9±0.7
mesophil	<i>E. coli</i>	72.5±8.7	4.4±0.1	60.7±7.4	89.0±1.2
	<i>T. maritima</i>	27.1±2.5	0.5±0.01	19.2±1.8	92.0±0.8
hyperthermophil	<i>P. aerophilum</i>	7.3±0.8	0.03±0.01	3.8±0.6	96.6±1.0

Bisher wurden alle Kinetikmessungen bei einer konstanten Temperatur von 25 °C durchgeführt. Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, welchen Einfluss diese auf die Aktivität der Enzyme hat. Dazu wurde die spezifische Aktivität zwischen 10 °C und 60 °C Reaktionstemperatur bestimmt. Eine höhere Temperatur war nicht möglich, da das zweite an die Reaktion gekoppelte Enzym sonst denaturiert werden würde.

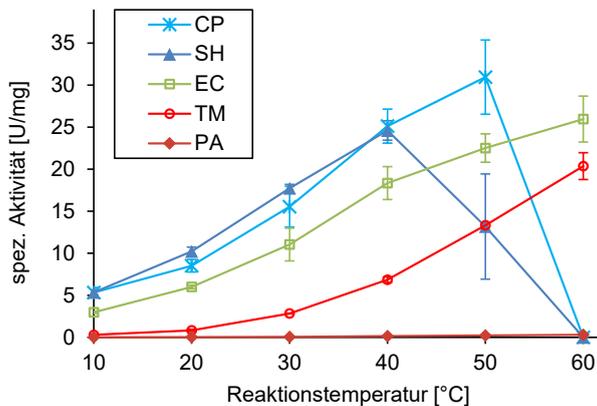


Abbildung 3-15: Spezifische Aktivität für bei verschiedenen Reaktionstemperaturen. Für diesen Assay wurde die in Kapitel 6.4.5 beschriebene Methode zur Bestimmung der spez. Aktivität variiert. Der Mastermix bestand nur aus Substrat (D5P), Cosubstrat (NADH) und TEA-Puffer. Dieser wurde auf die Reaktionstemperatur eingestellt. Das zweite Enzym, die GDH/TPI, wurde erst direkt zum Start der Messung zusammen mit der DERA zugegeben. So sollte verhindert werden, dass die (kinetische) Stabilität der Enzyme die Messung beeinflusst.

Für alle fünf DERAs steigt die Aktivität mit höherer Temperatur, bis der Schmelzbereich erreicht ist (vgl. Abbildung 3-13 und Tabelle 3-5). Diese Daten unterscheiden sich von den meisten Literaturwerten anderer psychrophiler Enzyme, bei denen die Aktivität schon bei niedrigeren Temperaturen sinkt.^[38] Strukturell wurde diese Eigenschaft in der Literatur damit erklärt, dass die aktive Tasche der psychrophilen Enzyme besonders flexibel und somit auch empfindlicher gegenüber hohen Temperaturen ist, sodass die Aktivität schon bei Werten sinkt, bei dem das Proteingerüst noch stabil bleibt. Dass sich die psychrophilen DERAs anders verhalten, soll in Kapitel 3.2.8 nach weiteren, strukturellen Untersuchungen diskutiert werden. Ein weiteres auf den ersten Blick überraschendes Ergebnis ist die hohe Aktivität der psychrophilen Aldolase von *S. halifaxensis* bei 50 °C, obwohl der in Abbildung 3-13 gezeigte Schmelzpunkt bei 45 °C liegt. Dies lässt sich damit erklären, dass die Aktivität nur für 1 min gemessen wurde und somit die zeitabhängige Denaturierung verzögert wird. Bei der CD-Spektroskopie werden die Enzyme jedoch mit 1 °C/min von 25 °C auf 100 °C aufgeheizt (vgl. 6.4.4), sodass kinetische Effekte einen Einfluss auf die Stabilität des Proteins und somit dessen Schmelzpunkt haben.

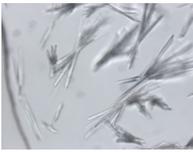
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der zu erwartende Trend, bei dem die Aktivität von psychro- über meso- bis hin zu hyperthermophilen DERAs abnimmt, während die Stabilität steigt, zu beobachten war. Des Weiteren stimmen die Ergebnisse mit den von *Sakuraba et al.* gemessenen Werten bezüglich Aktivität und Stabilität von DERA_{EC} mit DERA_{TM} und DERA_{PA} überein.^[104] Um eine Erklärung für die gemessenen Daten zu erhalten, sollten nun

im nächsten Schritt die Strukturen der neuen, psychrophilen DERAs aufgeklärt werden, um Einblicke in die Funktionsweise der Enzyme zu bekommen.

3.2.4 Strukturaufklärung psychrophiler DERAs

Da zu diesem Zeitpunkt keine Strukturen für psychrophile DERAs vorhanden waren, wurden Kristallisationsversuche unternommen und es konnten geeignete Kristalle für Diffraktionsexperimente erhalten werden, welche in Tabelle 3-7 dargestellt sind.

Tabelle 3-7: Kristallisationsbedingungen

		<i>C. psychrerythraea</i>		<i>S. halifaxensis</i>
Kristallisationsbedingung	Salz	50 mM NaHEPES (pH 7.5)	0.2 M Ca(AcO) ₂	1.0 M LiCl, 0.1 M NaAcO
	Puffer		0.1 M Imidazol (pH 8)	
	Präzipitant	20 % (w/v) PEG 3350	20 % (w/v) PEG 1000	30% (w/v) PEG 6000
Kristallbilder				

Die Röntgenkristallstrukturen konnten für beide psychrophile Enzyme mit einer Auflösung von 2.1Å für *C. psychrerythraea* und 1.8Å für *S. halifaxensis* bestimmt werden. Die gesammelten kristallographischen Daten sind in Tabelle 3-8 zusammengefasst.

Eine Superpositionierung der tertiären Struktur mit den anderen drei DERAs ergab eine hohe Ähnlichkeit mit RMSD-Werten von 0.63-1.65Å (siehe Abbildung 3-16). Alle Strukturen zeigen ein TIM-Barrel Faltungsmotiv, welches aus acht α - β -Einheiten besteht, mit einer zusätzlichen N-terminalen Helix ($\alpha 0$), welche direkt an die C-terminale Helix 8 angrenzt. Des Weiteren weisen alle fünf Aldolasen eine dimere Struktur auf. Dabei entspricht die relative Orientierung der Protomere der psychrophilen Enzyme der Orientierung von DERA_{EC}. Beide hyperthermophilen Proteine nehmen hingegen eine andere Anordnung an, welche im folgenden Kapitel noch ausführlicher diskutiert wird.

Tabelle 3-8: Kristalldatensammlung und Verfeinerungsstatistik

	DERA _{CP} (tetragonale Form)	DERA _{CP} (hexagonale Form)	DERA _{SH}
PDB-Codes	5C2X	5C5Y	5C6M
Datensammlung			
Raumgruppen	P4 ₁ 2 ₁ 2	P6 ₁ 22	C2
Zelldimensionen			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> [Å]	103.76, 103.76, 112.98	115.84, 115.84, 400.10	154.03, 52.51, 143.21
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>g</i> [°]	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 120.00	90.00, 122.34, 90.00
Auflösung [Å]	47.15-2.11 (2.16-2.11)*	49.77-2.10 (2.15-2.10)	48.70-1.76 (1.81-1.76)
CC _{1/2} [%]	99.8 (56.4)	99.9 (87.5)	99.8 (70.5)
<i>R</i> _{meas} [%]	12.9 (98.6)	9.1 (118.8)	7.8 (80.1)
<i>I</i> / <i>σ</i>	12.2 (2.0)	21.4 (2.6)	12.3 (2.0)
Vollständigkeit [%]	82.3 (82.2)	99.6 (97.8)	99.4 (99.6)
Redundanz	6.9 (6.5)	13.4 (12.8)	4.1 (4.2)
Verfeinerung			
Auflösung [Å]	47.15-2.11	49.77-2.10	48.70-1.76
Anzahl der Reflexe	29929	93105	95902
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} [%]	16.1 / 20.1	17.3 / 19.9	16.8 / 19.8
Anzahl der Atome			
Protein	3611	7389	7361
Liganden/Ionen	26	48	6
Wasser	303	438	922
<i>B</i> -Faktoren [Å ²]			
Protein	33.4	50.4	39.2
Liganden/Ionen	45.0	69.3	34.0
Wasser	42.0	48.5	42.5
RMSD			
Bindungslänge [Å]	0.005	0.006	0.006
Bindungswinkel [°]	0.813	0.903	0.927

*Daten in Klammern beziehen sich auf die Werte der Hülle mit der höchsten Auflösung

Vergleicht man die Substrat-Bindetasche der neuen Strukturen mit der der DERA_{EC} (Abbildung 3-17), findet man keine Aminosäure-Austausche oder konformelle Unterschiede in einem Radius von 5 Å um das natürliche Substrat, welches als kovalent gebundenes Intermediat in der Kristallstruktur der DERA_{EC} 1JCL enthalten ist. Man kann also zusammenfassend festhalten, dass die neuen, psychrophilen Aldolasen auf den ersten Blick nahezu identisch mit der DERA_{EC} sind, und keine Eigenschaften wie die höhere Aktivität direkt abgeleitet werden können. Nichtsdestotrotz ermöglichen die fünf Kristallstrukturen weitere strukturbasierte Analysen, wie das rationale Enzymdesign oder computergestützte Untersuchungen.

Sequenzidentität

	CP	SH	EC	TM	PA
CP		65 %	66 %	31 %	30 %
SH	0.69 Å		68 %	29 %	30 %
EC	0.68 Å	0.63 Å		32 %	31 %
TM	1.40 Å	1.37 Å	1.26 Å		36 %
PA	1.65 Å	1.56 Å	1.48 Å	1.31 Å	

strukturelles Alignment

Abbildung 3-16: Paarweise strukturelle und sequenzielle Ähnlichkeit von DERA-Orthologen, welche als C_{α} -RMSD-Werte und Prozente an Sequenzidentität dargestellt sind. Der Vergleich basiert bei allen Enzymen auf den monomeren Untereinheiten (Kette A). Die Strukturen von *E. coli* (1JCL), *T. maritima* (3R12) und *P. aerophilum* (1VCV) wurde aus der Protein Datenbank genommen. Die Blossum62 Matrix wurde für das Sequenzalignment benutzt.

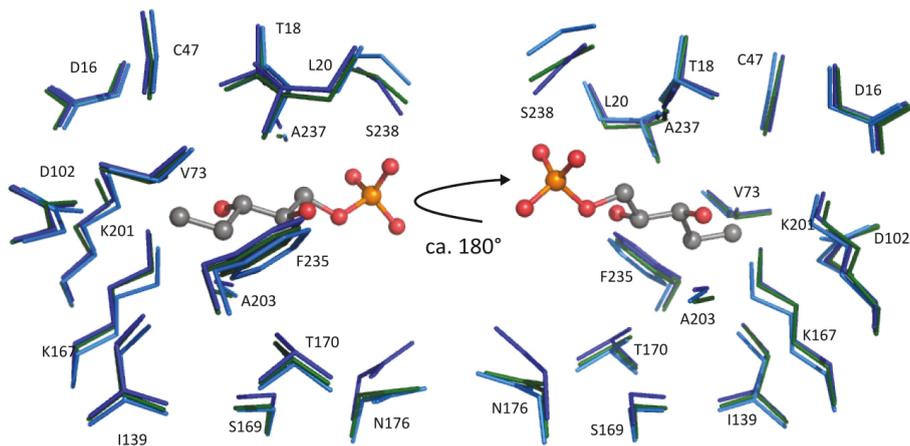


Abbildung 3-17: Superpositionierte Bindetaschen von DERA_{EC} (grün), DERA_{SH} (dunkelblau) und DERA_{CP} (hellblau). Das natürliche Substrat DSP (4) wurde aus der PDB-Struktur der DERA_{EC} entnommen (1JCL) und dessen Atome sind nach den Elementen (Kohlenstoff grau, Sauerstoff rot und Phosphor orange) farbig gekennzeichnet. Atome des Proteinerückgrats sind aus Übersichtsgründen nicht dargestellt.

3.2.5 Design von monomeren DERAs zur Analyse des Dimer-Interfaces

Wie im vorherigen Kapitel schon erwähnt, zeigen die Protomere der hyperthermophilen DERAs eine nahezu identische Tertiärstruktur wie die DERA_{EC}, jedoch unterscheidet sich die Anordnung beider monomeren Untereinheiten in der Quartärstruktur. Als deren Strukturen 2007 von *Sakuraba et al.* gelöst wurden, postulierten diese, dass möglicherweise die Interaktionen im dimeren Interface für die hohe Thermostabilität verantwortlich sind.^[104] In Abbildung 3-18 sind diese Wechselwirkungen von *T. maritima* (stellvertretend für beide Enzyme) dargestellt und mit denen der DERA_{EC} verglichen.

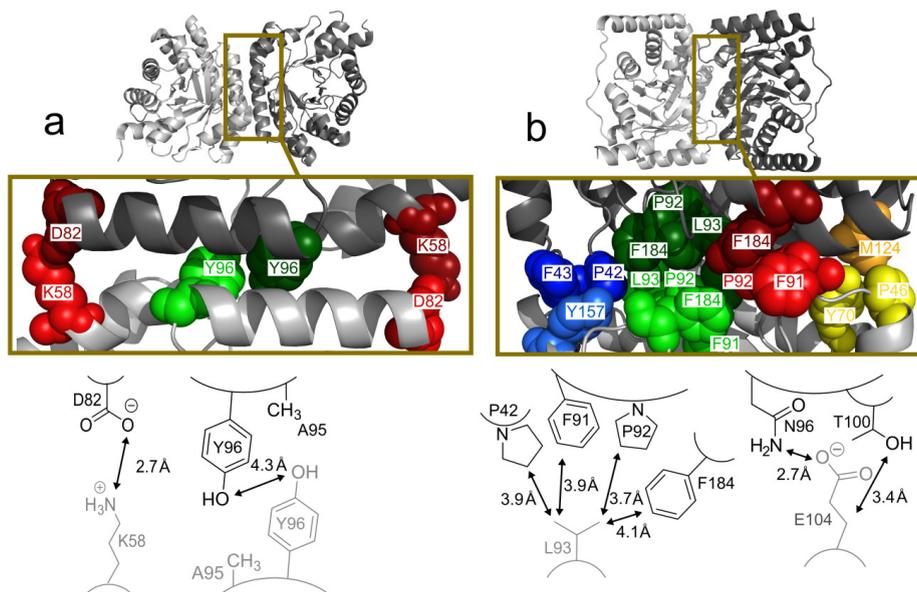


Abbildung 3-18: Interaktionen im Dimer Interface der (a) mesophilen DERA_{EC} und (b) hyperthermophilen DERA_{TM}. Aminosäuren, welche zu demselben Paar oder Cluster gehören, werden oben mit ähnlichen Farben dargestellt. Die Abstände zwischen zwei Atomen in der Kristallstruktur sind im unteren Teil der Abbildung durch Doppelpfeile gekennzeichnet.

Man erkennt, dass in der hyperthermophilen DERA durch eine andere Orientierung der einzelnen Monomere zueinander die Kontakte zwischen den beiden Untereinheiten stärker geworden sind. Betrachtet man die verschiedenen Wechselwirkungen, fällt auf, dass im mesophilen Enzym lediglich zwei Salzbrücken an dem äußeren Bereich des Interfaces zwischen D82 und K58 zu erkennen sind. Die beiden W96-Reste sind räumlich so nah (4.3 Å – vgl. Abbildung 3-18), dass in einer anderen Orientierung der Reste eine Wasserstoffbrücke denkbar wäre. In der hyperthermophilen Aldolasen ist eine Vielzahl von größtenteils hydrophoben

Clustern im Interface zu erkennen, welche möglicherweise die beiden Protomere auch bei höheren Temperaturen zusammenhalten und daher die Gesamtstruktur stabilisieren.

Um diese Hypothese zu untermauern, wurden Mutanten von allen fünf DERA-Orthologen erzeugt, welche die Wechselwirkungen zwischen den Protomeren behindern und somit das Enzym „monomerisieren“ sollen. Anschließend sollte überprüft werden, welchen Einfluss die Monomerisierung auf die Stabilität der Enzyme hat. Für das rationale Design der Mutationen wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt: Entweder sollte ein geladener oder hydrophober Interaktionspartner so mutiert werden, dass eine abstoßende Wechselwirkung entsteht (z. B. durch eine K58E Mutation, welche die Salzbrücke mit E82 verhindert), oder eine sterisch anspruchsvolle Aminosäure wie Tryptophan wurde eingebaut, welche auf Grund seines großen Van-der-Waals Radius den Abstand zwischen den monomeren Einheiten erhöht. Größenauschlusschromatographie wurde als Methode gewählt, um den hydrodynamischen Radius der Mutanten zu bestimmen. Abbildung 3-19 zeigt das Ergebnis der Chromatogramme für die Einzel- und Doppelmutante der DERA_{EC}.^{vii} Aktive und lösliche monomere Varianten konnten für die DERAs aus *C. psychrerythraea*, *S. halifaxensis*, *E. coli* und *T. maritima* erhalten werden; die spezifischen Mutationen sind in Tabelle 3-9 zusammengefasst. Die Aldolase aus *P. aerophilum* blieb auch nach dem Austausch von drei Aminosäuren in ihrem ursprünglichen, dimeren Zustand und konnte daher als einziges Enzym nicht monomerisiert werden. Dies soll in Kapitel 3.2.6 weiter diskutiert werden.

^{vii}Hier sei anzumerken, dass das Design und die Herstellung der *E. coli* Mutanten von Herrn Dr. Thomas Classen mit Unterstützung von Frau Jennifer Klug für ein anderes Projekt durchgeführt wurde. Da die Ergebnisse auf dieses Projekt übertragen und durch weitere Mutationsstudien erweitert wurden, sind diese in die Arbeit mit aufgenommen worden. Die grundlegende Idee, die DERA_{EC} (für spätere NMR-Studien) zu monomerisieren (vgl. Kapitel 3.3), stammt von Herrn Dr. Philipp Neudecker.

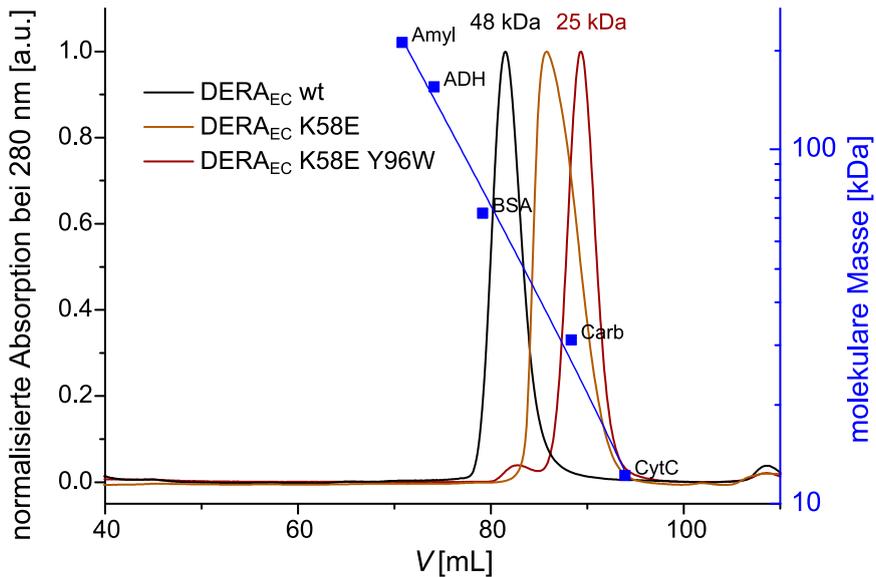


Abbildung 3-19: Größenausschlusschromatogramm verschiedener DERA_{EC}-Varianten. Eine logarithmische Kalibrierkurve (blau) mit Protein Standards β -Amylase (Amyl, 200kDa), Alkohol Dehydrogenase (ADH, 150kDa), Bovine Serum Albumin (BSA, 66 kDa), Carbonanhydrase (Carb, 29kDa) und Cytochrom C (CytC, 12.4kDa) wurden zur Bestimmung der molekularen Massen verwendet. Die *In-silico*-Masse war 28.6kDa für den Wildtyp der DERA_{EC} (monomere Form).

Wie bereits in Abbildung 3-19 zu sehen ist, liegt der hydrodynamische Radius der K58E-Mutante von DERA_{EC} genau zwischen den Werten des Monomers und des Dimers. Dies deutet darauf hin, dass diese Variante ein Gleichgewicht zwischen beiden Formen darstellt.

Tabelle 3-9: Design und kinetische Evaluierung der monomeren DERA-Varianten

	Monomer		Dimer		Intermediat	
wt	Einzelmutante	Doppelmutante	Dreifachmutante	spez. Aktivität (U/mg)*		
CP	--	Y96W	--	--	10.33±0.94	9.76±0.63
SH	--	Y96W	--	--	11.51±0.69	11.76±0.47
EC	K58E	Y96W	K58E-Y96W	--	7.5±0.32	5.87±0.52
TM	L93E	E104W	L93E-E104W	L93E-E104W-99E	1.09±0.04	1.08±0.02
PA	--	--	F61W-Y156I	F61W-Y156I-R75L	--	--

*Die Werte der Monomere beziehen sich auf die Variante mit den wenigsten Mutationen

Die Aktivitätswerte der monomeren DERAs zeigen im Vergleich mit den (dimeren) Wildtypen kaum Veränderungen. Diese Messungen sind ein guter Hinweis darauf, dass die Struktur der

Enzyme keinen Einfluss durch die Mutation und die daraus folgende Monomerisierung genommen hat.

Um zu testen, wie die Stabilität der Aldolasen durch die Monomerisierung beeinflusst wird, wurden die Schmelzpunkte der Monomere bestimmt und zusätzlich die Halbwertszeit der spezifischen Aktivität bei erhöhten Temperaturen vermessen und mit den jeweiligen Wildtypen verglichen (Abbildung 3-20). Man erkennt, dass die Stabilität sowohl bei den psychro- als auch bei den mesophilen DERAs keine großen Unterschiede aufweist. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Dimerisierung nicht wesentlich zur Thermostabilität der Enzyme beiträgt. Ganz anders verhält es sich mit der hyperthermophilen DERA aus *T. maritima*: Der Schmelzpunkt sinkt von über 100°C auf ca. 65°C und während der Wildtyp bei 90°C noch über zwölf Stunden aktiv ist, wurde in der monomeren Mutante schon bei 70°C eine Halbwertszeit von weniger als 30 min ermittelt.

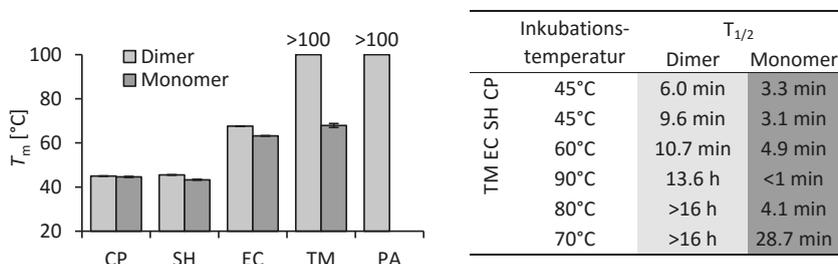


Abbildung 3-20: Vergleich der Stabilität der dimeren und monomeren DERA-Varianten. Links sind die Schmelztemperaturen dargestellt, welche durch CD-Messungen bei 222 nm ermittelt wurden. Rechts gezeigt ist die aktivitätsbasierte Halbwertszeit.

Die Ergebnisse zeigen daher experimentelle Belege für die These, dass die intermolekularen Interaktionen keine thermostabilisierenden Faktoren in den meso- und psychrophilen DERAs sind;^{viii} die jedoch deutlich ausgeprägteren Wechselwirkungen zwischen den monomeren Untereinheiten in DERA_{TM} erweisen sich als essentiell für dessen hohe Thermostabilität.

3.2.6 CNA-Berechnungen

Die Untersuchung des Dimer-Interfaces konnte einen Erklärungsansatz für die Hitzestabilität einer hyperthermophilen DERA liefern, jedoch fehlt weiterhin eine genaue Quantifizierung dieser intermolekularen Wechselwirkungen. Des Weiteren scheiterten die Versuche, die zweite

^{viii} Dieses Ergebnis schließt nicht aus, dass artifiziell eingefügte, zusätzliche Interaktionen zwischen den Monomeren die Thermostabilität auch in meso- und psychrophilen DERAs erhöhen (vgl. Kapitel 3.2.7); jedoch konnte ein solcher Effekt in den Wildtyp-Enzymen nicht beobachtet werden.

hyperthermophile DERA zu monomerisieren, sodass in diesem Fall die thermostabilisierende Funktion des dimeren Interfaces nicht gezeigt werden konnte. Völlig offen bleibt weiterhin, wieso beide psychrophilen Aldolasen eine höhere Aktivität und niedrigere Stabilität als die DERA_{EC} haben. Bisher zeigten alle strukturellen Untersuchungen (Kristallisation, Monomerisierung) keine Unterschiede zwischen den drei Enzymen. Aus diesen Gründen wurde versucht, mit *In-silico*-Methoden basierend auf den Kristallstrukturen die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen der fünf verschiedenen DERAs zu quantifizieren. Die erste Strategie war, die Anzahl und Stärke der nicht-kovalenten Interaktionen (Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und hydrophobe Kontakte) der Kristallstrukturen mit dem Programm FIRST^[163] zu bestimmen. Wie in Tabelle 3-10 gezeigt, konnte jedoch nur eine Korrelation zwischen Enzymstabilität (warum nicht die Schmelzpunkte, sondern die Wachstumstemperaturen der Bakterien genommen wurden, wird an späterer Stelle diskutiert) und den hydrophoben Kontakten ($R^2=0.91$) gefunden werden. Doch selbst bei diesen Werten gibt es z. B. keine Unterschiede zwischen den hyperthermophilen DERAs, obwohl DERA_{PA} eine höhere Thermostabilität zeigt (vgl. Tabelle 3-5). Außerdem haben auch DERA_{SH} (psychrophil) und DERA_{EC} (mesophil) die gleichen Werte.

Tabelle 3-10: Anzahl an nicht kovalenten Interaktionen der verschiedenen DERA-Dimere und deren Korrelation zu den optimalen Wachstumstemperaturen von deren Ursprungsorganismen. Die FIRST Software wurde verwendet, um die Anzahl an Interaktionen entweder der Kristallstrukturen oder des Ensembles an Konformationen (extrahiert aus 3 x 50 ns MD-Simulationen) zu berechnen.

Optimale Wachstumstemperatur des entsprechenden Organismus		DERA _{CP}	DERA _{SH}	DERA _{EC}	DERA _{TM}	DERA _{PA}	Steigung* R ²		
		8 °C	10 °C	37 °C	80 °C	100 °C			
Kristallstruktur	Wasserstoff- und Salzbrücken	<-0.1 kcal/mol	511	524	562	567	497	0.02	0.00
		<-1 kcal/mol	406	406	442	447	381	-0.05	0.01
		<-2 kcal/mol	339	361	386	392	322	-0.06	0.01
		<-3 kcal/mol	287	280	316	343	254	0.01	0.00
		<-4 kcal/mol	207	198	226	261	175	0.03	0.00
		<-5 kcal/mol	122	114	143	170	108	0.13	0.05
		<-6 kcal/mol	63	62	79	92	66	0.14	0.22
	Hydrophobe Wechselwirkungen	201	225	226	297	294	1.01	0.91	
Ensemble aus MD	Wasserstoff- und Salzbrücken	<-0.1 kcal/mol	556±11	552±12	586±13	612±11	531±10	0.06	0.01
		<-1 kcal/mol	406±10	402±10	431±11	453±10	396±9	0.13	0.06
		<-2 kcal/mol	321±10	316±11	342±10	361±11	316±10	0.15	0.10
		<-3 kcal/mol	248±10	243±10	267±10	282±10	249±10	0.18	0.19
		<-4 kcal/mol	181±9	177±10	199±9	212±9	189±9	0.21	0.37
		<-5 kcal/mol	121±8	120±8	139±8	150±9	137±8	0.25	0.62
		<-6 kcal/mol	73±6	75±7	90±7	100±7	96±7	0.28	0.84
	Hydrophobe Wechselwirkungen	192±14	190±13	213±15	247±17	184±14	0.18	0.08	

*Die Werte wurden durch Auftragung der Kontakte gegen die Wachstumstemperatur ermittelt

Die Quantifizierung der nicht-kovalenten Interaktionen über ein Ensemble von Konformationen, welche durch 3 x 50 ns Moleküldynamik (MD) Simulationen erstellt wurde, konnte teilweise den Korrelationskoeffizienten R^2 in Bezug auf Wasserstoff- und Salzbrücken verbessern, aber eine gute Korrelation ($R^2 \geq 0.8$) wurde nur dann erreicht, wenn die stärksten (und am wenigsten vorkommenden) Interaktionen dieser Art berücksichtigt wurden. Des Weiteren zeigten im Ensemble die hydrophoben Wechselwirkungen keine Korrelation mehr mit der Thermostabilität ($R^2 = 0.08$). Man kann also zusammenfassend sagen, dass diese Ergebnisse nicht die direkte Schlussfolgerung zulassen, dass die reine Anzahl der nicht-kovalenten Interaktionen direkt mit der Enzymstabilität korreliert. Daher wurde vermutet, dass nicht nur die Häufigkeit sondern auch die Verteilung der Wechselwirkungen innerhalb des Proteins wichtig ist.

Aus diesem Grund wurde das Programm CNA (vgl. Kapitel 2.1.3) benutzt, um am Computer eine thermische Entfaltung zu simulieren, um so die berechneten Phasenübergangszustände T_p (man kann auch von theoretischen Schmelzpunkten reden) mit den experimentellen Daten zu vergleichen. Für alle fünf DERAs wurden zuvor drei unabhängige MD-Simulationen von 100 ns durchgeführt. Die Evaluation dieser Simulationen, in dem das Abstandsquadrat der C_α -Atome (RMSD-Wert, engl. *root mean square deviation*) in Bezug auf die Startstruktur, sowie den Trägheitsradius (engl. *radius of gyration*) der C_α -Atome ermittelt wurde, zeigte, dass während der Simulationszeit von 100 ns alle fünf DERAs strukturell stabil blieben. (RMSD meistens weniger als 5 Å und die Standardabweichung des durchschnittlichen Trägheitsradius weniger als 2 Å). Als weiterer Test wurde das innere Produkt des Abstandsquadrats (RMSIP, engl. *root mean square inner product*) zwischen zwei MDs desselben Enzyms als Maß für die Ähnlichkeit zwischen beiden Konformationsräumen über die ersten zehn Komponenten einer prinzipiellen Komponentenanalyse bestimmt.^[164] Der Wert lag zwischen 0.63 und 0.79. Dies bedeutet, dass der Konformationsraum, welcher von beiden miteinander verglichenen Simulationen eingenommen wird, sehr ähnlich ist. Die entsprechenden Tabellen bzw. Abbildungen zu den Evaluationen sind im Anhang unter 7.4 zu finden.

Von den Simulationen wurden 1125 Konformationen der Zeitskala zwischen 5-50 ns ausgewählt und die T_p -Werte für jede Konformation mittels CNA ausgerechnet. Die Verteilung der T_p -Werte in dem Ensemble folgte in allen fünf DERA-Varianten einer Gauß-Verteilung, die im Anhang unter 7.4.3 zu finden ist. Es sei anzumerken, dass die ermittelten T_p -Werte als relative Werte betrachtet werden sollten, da die absoluten Phasenübergangstemperaturen von der Architektur und der Größe des Makromoleküls abhängen und somit nur direkt bei Proteinen aus derselben Familie verglichen werden können.^[80] Um zu überprüfen, ob eine Verlängerung der Simulationszeit das Ergebnis verbessern könnte, wurden CNA-Berechnungen für den Simulationszeitraum von 50-100 ns wiederholt. Damit die Daten auf einer makroskopischen Ebene durch experimentell bestimmte Werte validiert werden können, wären (im optimalen Fall

rein thermodynamisch bestimmte) Schmelzpunkte die besten Messwerte für einen direkten Vergleich. Leider konnten diese für die hyperthermophilen DERAs nicht ermittelt werden, da sie mit über 100 °C außerhalb des messbaren Bereiches liegen (siehe Abbildung 3-13). Deshalb wurde entschieden, stattdessen die optimalen Wachstumsbedingungen der Ursprungsorganismen (T_{org}) zu verwenden, welche schon in früheren Studien verwendet wurden, um meso- und thermophile Proteine zu vergleichen.^[81, 83, 165] Mit T_{org} kann die Thermostabilität eines Proteins ungefähr abgeschätzt werden und entspricht im Durchschnitt dem Schmelzpunkt abzüglich 24 °C,^[165] wobei der Wert, abhängig von den Messbedingungen und der Art des Proteins, variieren kann. Für die Evaluierung wurden die Konformationen von allen drei MD-Simulationen der verschiedenen DERAs extrahiert und der durchschnittliche T_p -Wert wurde zusammen mit dessen Standardfehler bestimmt (Abbildung 3-21 a-b).

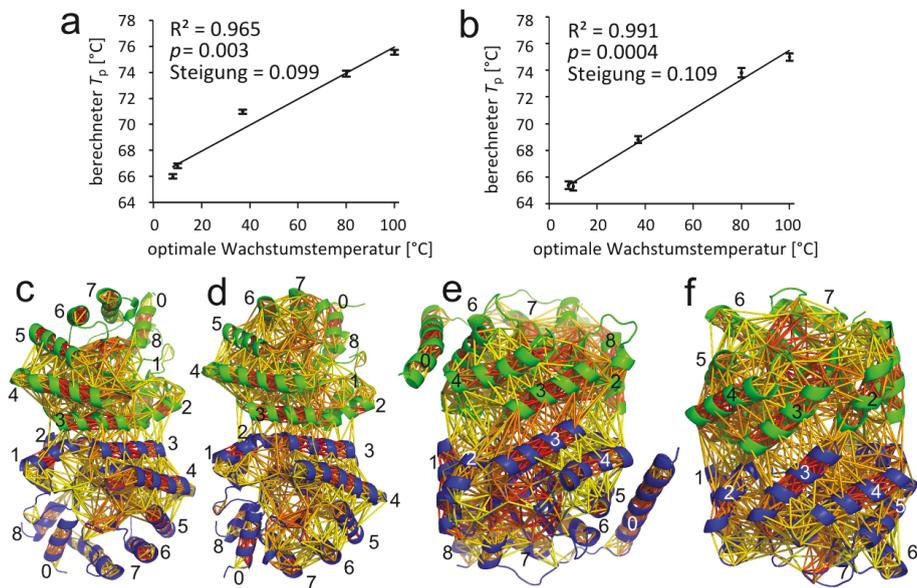


Abbildung 3-21: Strukturelle Rigidität von DERAs aus psychrophilen, mesophilen und hyperthermophilen Organismen, welche durch CNA berechnet wurde. (a) und (b) Korrelation zwischen den Phasenübergängen der CNA-Berechnungen mit den optimalen Wachstumsbedingungen der entsprechenden Ursprungsorganismen. Die Phasenübergänge wurden aus einem Ensemble von Konformationen aus MD-Simulationen von (a) 5-50 ns und (b) 50-100 ns berechnet. Die Fehlerbalken zeigen jeweils den Standardfehler des Durchschnittswertes an. (c)-(g) Visualisierung der rigiden Kontakte zwischen Aminosäurepaaren für (c) DERA_{CP} (DERA_{SH} zeigte ein nahezu identisches Muster), (d) DERA_{EC} , (e) DERA_{TM} , und (f) DERA_{PA} . Die unterschiedliche Orientierung der Strukturen resultierten aus den ungleichen Dimer-Anordnungen in psychro-/mesophilen gegenüber den hyperthermophilen DERAs. Die Stärke der Interaktionen ist von Gelb (schwach) zu Rot (stark) farbig gekennzeichnet.

Die T_p -Werte der einzelnen MDs, welche in Tabelle 3-11 zu sehen sind, zeigen, dass diese Werte nur um maximal 3.3 °C von den Gesamtwerten abweichen, was verdeutlicht, dass man trotz unterschiedlichen Trajektorienverlaufs durch die drei unabhängigen Simulationen zu einem ähnlichen Endergebnis gelangt.

Tabelle 3-11: Durchschnittliche Phasenübergangspunkte T_p der einzelnen MD-Simulationen. Die Standardfehler des Mittelwertes aller drei MDs wurde aus den Standardfehlern der einzelnen MDs mittels Fehlerfortpflanzung bestimmt.

Quelle	Phasenübergangspunkt T_p mit Standardfehler [°C]							
	5-50 ns				50-100 ns			
	MD1	MD2	MD3	Mittelwert	MD1	MD2	MD3	Mittelwert
DERA _{CP}	65.3±0.30	66.5±0.29	66.2±0.29	66.0±0.51	65.3±0.29	66.9±0.31	63.9±0.26	65.4±0.50
DERA _{SH}	68.7±0.33	66.7±0.31	65.4±0.29	66.9±0.54	65.3±0.32	64.4±0.28	66.2±0.32	65.3±0.53
DERA _{EC}	70.0±0.27	71.2±0.28	71.8±0.28	71.0±0.48	68.5±0.26	68.7±0.26	69.2±0.24	68.8±0.44
DERA _{TM}	73.8±0.38	72.9±0.44	74.9±0.36	73.9±0.68	72.6±0.37	73.0±0.37	75.9±0.32	73.8±0.61
DERA _{PA}	76.3±0.31	73.1±0.31	77.0±0.32	75.5±0.54	75.4±0.30	75.2±0.27	74.3±0.26	75.0±0.48

Wie in Abbildung 3-21 a-b zu sehen ist, bei der die T_p -Werte aller Konformationen gegen die optimale Wachstumstemperatur der Bakterien aufgetragen sind, zeigte bei den hier beschriebenen Messungen der T_p -Werte von 5-50ns eine signifikante ($p < 0.01$) und sehr gute Korrelation mit T_{org} ($R^2 = 0.965$). Durch die Verlängerung der Simulationszeit konnte R^2 sogar auf 0.991 verbessert werden. Der Bereich der berechneten T_p -Werten ist kleiner als der von den experimentellen T_{org} -Werten und folgt einer Steigung von ca. 0.1 (Änderung von T_{org} von 10K entspricht also 1K Differenz bei T_p). Ein Grund dafür könnte sein, dass der T_p -Wert auf einer empirischen Beziehung beruht, welche durch einen Datensatz von meso- und thermophilen Proteinhomologen mit T_{org} in dem Bereich zwischen 30-83 °C bestimmt wurde.^[81-82] Die Abweichungen verdeutlichen, dass hier eine systemspezifische Anpassung der T_p -Werte nötig wäre. Die Unterschiede der berechneten T_p -Werte zwischen den ersten und zweiten 50ns zeigen einen maximalen Wert von 2.2K in allen Simulationen, welche für eine konvergierende Berechnung spricht und somit längere Simulationszeiten nicht notwendig sind. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die CNA-Berechnungen eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten darstellen und somit weitere Analysen mit dem CNA-Modell gerechtfertigt sind.

Es wurde daher im nächsten Schritt untersucht, wie der Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Thermostabilität der einzelnen Enzyme und den Unterschieden der CNA-berechneten Rigidität (Stabilität) zustande kommt. Dazu wurde die strukturelle Stabilität in Bezug auf die Stärke der lokalen Kontakte charakterisiert. Dieser Wert beschreibt, wann zwei Reste aus einem rigiden Cluster während der thermischen Entfaltungssimulation herausfallen. Je negativer der Wert also ist, desto stärker sind auch die Wechselwirkungen zwischen den beiden

Resten.^[82, 84] In Abbildung 3-21 c-f ist das Netzwerk der rigiden Kontakte der verschiedenen DERAs miteinander verglichen. Man erkennt, dass die beiden hyperthermophilen Enzyme sehr dichte Netzwerke sowohl innerhalb als auch im Interface zwischen den beiden Monomeren haben. Im Gegensatz dazu haben die meso- und psychrophilen Aldolasen deutlich weniger rigide Kontakte in der Interface-Region. Vergleicht man die beiden Gruppen untereinander, fällt auf, dass in den psychrophilen DERAs die Kontakte zwischen den äußeren Helices 5-7 und den inneren Faltblättern weniger ausgeprägt sind, als in dem *E. coli* Enzym. Bevor dieser Punkt in Kapitel 3.2.8 näher untersucht wird, soll zuerst die Rolle des Interfaces betrachtet werden.

Um den Einfluss dieser intermolekularen Wechselwirkungen auf die Thermostabilität zu quantifizieren, wurde die Summe aller Energiewerte der rigiden Kontakte zwischen den monomeren Untereinheiten für alle fünf Enzyme berechnet (Abbildung 3-22a). Je negativer dieser Wert ist, desto stabiler ist auch das Dimer-Interface. Aus den Daten kann abgelesen werden, dass die Interface-Region von DERA_{TM} und DERA_{PA} strukturell deutlich stabiler ist als die von den meso- und psychrophilen Enzymen. Das Ergebnis erklärt außerdem, wieso die monomere Mutante von *T. maritima* viel weniger thermostabil ist als der dimere Wildtyp.

Um zu identifizieren, welche Teile des Proteins am meisten zur Stabilität des Interfaces beitragen, wurde die Aminosäure-Verteilung der Energiewerte von den rigiden Kontakten berechnet und in Abbildung 3-22 b-d aufgetragen. Die Positionen, welche durch Mutationen in Tabelle 3-9 zu der Monomerisierung geführt haben, zeigen besonders hohe Energiewerte. Die Berechnungen liefern also eine Erklärung für den Erfolg der Mutanten. Da die DERA_{PA} trotz Dreifachmutante nicht monomerisiert werden konnte, wurde auf Grund dieser Auswertung eine neue Mutante - I39A - ausgewählt, da diese Position einen besonders niedrigen Energiewert hat. Ziel war es, die hydrophoben Kontakte zu den wechselwirkenden Aminosäuren der anderen monomeren Untereinheit zu unterbinden. Leider konnte auch durch diese Mutation die gewünschte Monomerisierung nicht erzielt werden. Es sei aber anzumerken, dass der berechnete Energiewert keine freie Bindungsenergie, sondern die strukturelle Stabilität in Bezug auf eine Temperaturerhöhung darstellt. Somit liefern die in Abbildung 3-22 dargestellten Ergebnisse zwar einen Zusammenhang zwischen den berechneten Daten und den monomerisierenden Mutationen, jedoch sind die Energiewerte der CNA-Berechnung nicht direkt mit der Bindungsaffinität zwischen den Monomeren gleichzusetzen.

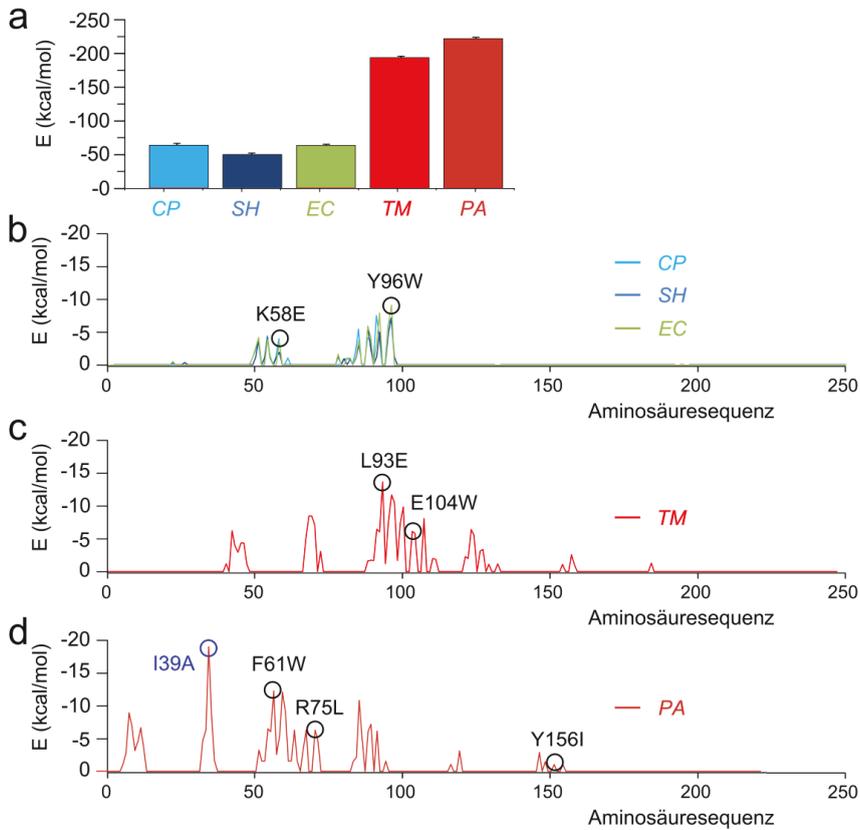


Abbildung 3-22: Stärke (Energie) der rigiden Kontakte zwischen den monomeren Untereinheiten für die verschiedenen DERAs. (a) Summe aller Energien der rigiden Kontakte zwischen den Paaren von Resten im Dimer-Interface. Die Fehlerbalken stellen dabei den Standardfehler dar. (b)-(d) Sequentielle Verteilung der Energiewerte bezogen auf die einzelnen Aminosäuren der Enzyme. Die in Tabelle 3-9 beschriebenen Mutanten, welche zur Bildung der Monomere führten (im Falle von DERA_{PA} führen sollten), sind durch schwarze Kreise gekennzeichnet. Die neue Mutante für DERA_{PA} ist durch einen blauen Kreis markiert.

3.2.7 Versuche zur Stabilisierung des Dimer-Interfaces

Durch die Behinderung der intermolekularen Interaktionen ist es gelungen, ein hyperthermophiles Enzym zu destabilisieren. Dies wurde durchgeführt, um die Bedeutung des Dimer-Interfaces für die Thermostabilität zu belegen. Für biotechnologische Anwendungen ist jedoch der umgekehrte Weg, bei dem Enzyme stabilisiert werden, von Interesse. Die gewonnene Erkenntnis über die Beiträge von intermolekularen Wechselwirkungen für die Thermostabilität wurde dazu verwendet, das dimere Interface der meso- und psychrophilen Enzyme zu stabilisieren, um anschließend zu überprüfen, ob diese dadurch hitzeresistenter geworden sind. Eine Möglichkeit

wäre, hydrophobe Cluster einzubauen, wie sie auch in den hyperthermophilen DERAs zu finden sind. Nachteil dieses Vorgehens ist jedoch, dass neben einem großen molekularbiologischen Aufwand durch die hohe Anzahl an Mutationen das Risiko von negativen Nebeneffekten (Einfluss auf das Expressionslevel, spezifische Aktivität und Stabilität) besteht. Aus diesem Grund sollte eine artifizielle Disulfidbrücke eingebaut werden, da diese (abgesehen von seltenen Isopeptid-Bindungen) die einzige kovalente und damit die stärkste Verbindung zwischen zwei nicht benachbarten Aminosäuren darstellt. Nach den empirisch hergeleiteten Regeln von *Hazed et al.*^[166] wurden die Abstände der C β -Atome zwischen den Seitenketten beider monomeren Untereinheiten bestimmt und alle Aminosäure-Paare (Prolin ausgenommen) mit einem Abstand von $3.83 \pm 0.18 \text{ \AA}$ ausgewählt. Für die drei nicht-hyperthermophile DERAs wurde genau ein Paar gefunden: A95-A95. Da diese Position direkt an der C2-Symmetrieachse lokalisiert ist, war nur eine Mutation erforderlich, um beide Cysteine für die neue Disulfidbrücke zu erstellen. Nach der Expression und Reinigung der A95C-Mutanten wurde, wie in Abbildung 3-23 gezeigt, die Bildung der Disulfidbrücke mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen überprüft, da nur die oxidierte Form der jeweiligen A95C-Mutante die dimere Form im SDS-Gel beibehält und somit eine ca. 56 kDa große Bande auf dem Gel zeigt.

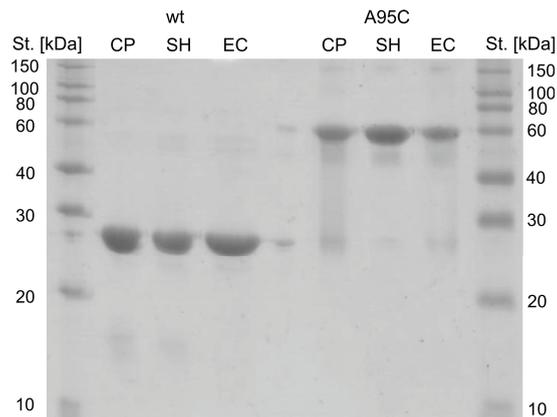


Abbildung 3-23: SDS-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen

Die Stabilität aller drei DERA-Varianten wurde in der oxidierten und reduzierten Form (mit DTT) über die Schmelzpunktbestimmen mittels CD-Spektroskopie bestimmt und mit dem jeweiligen Wildtyp verglichen (siehe Abbildung 3-24). Durch eine hier nicht gezeigte zusätzliche Kontrolle (Wildtyp mit DTT) wurde sichergestellt, dass DTT als Reduktionsmittel per se keinen Einfluss auf die Enzymstabilität hat.

In der reduzierten Form (ohne Bildung der Disulfidbrücke) hatte die A95C-Mutante einen negativen Effekt auf die Stabilität von DERA_{SH} und DERA_{EC}, ohne jedoch die Stabilität von

DERA_{CP} zu beeinflussen. Es bleibt unklar, wieso in zwei von drei Fällen die A95C-Mutante einen negativen Effekt bezüglich Thermostabilität hat, jedoch ist dieses Ergebnis nicht überraschend, da Untersuchungen gezeigt haben, dass mehr als 80 % aller Einzelmutationen die Stabilität von Proteinen senken.^[167] Jedoch können die Ergebnisse zeigen, dass die Oxidation der Cysteine (also die Ausbildung der Disulfidbrücken) in allen drei Fällen einen erhöhten Schmelzpunkt zur Folge hat. Somit konnte in allen drei Beispielen gezeigt werden, dass durch die Verstärkung der intermolekularen Wechselwirkungen die Stabilität der (nicht thermophilen) Enzyme erhöht werden kann. Dies bestätigt die Ausgangshypothese, dass im konkreten Beispiel der DERA die Interaktionen im Dimer-Interface nur in den hyperthermophilen Enzymvarianten wichtig sind, jedoch das Konzept auf andere, meso- und psychrophile Enzyme übertragen werden kann, um diese hitzestabiler zu machen. Während der Schmelzpunkt der oxidierten Mutante in DERA_{SH} und DERA_{EC} noch immer niedriger war als der des Wildtyps, konnte dieser in DERA_{CP} um 8.4K erhöht werden. Weitere Tests zeigten eine längere Halbwertszeit nach Inkubation bei 50 °C (>80 min im Vergleich zu 1 min beim Wildtyp) und 86±8 % der Wildtyp-Aktivität.

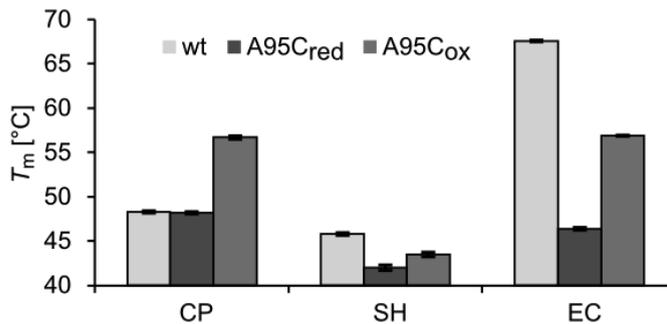


Abbildung 3-24: Schmelzpunkte der oxidierten und reduzierten Formen der A95C-Mutanten im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen. Diese wurden mittels CD Spektroskopie bei 222 nm ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler des berechneten Wendepunktes der sigmoiden Kurve.

Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem aus Projekt A, bei dem durch eine Doppelmutante die Thermostabilität der DERA_{EC} um 5.5K (mit 25±2% der Wildtyp-Aktivität) erhöht wurde, wird neben dem deutlich besseren stabilisierenden Effekt mit nur einer einzelnen Mutante auch ein zweiter, positiver Effekt deutlich: Während in der Doppelmutante die spezifische Aktivität erheblich gesenkt wurde, ist durch die Einzelmutante in der psychrophilen DERA kaum Aktivitätsverlust eingetreten. Obwohl an dieser Stelle der Grund für dieses Ergebnis nicht abschließend geklärt werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass die Mutationen im Proteininneren in der Nähe des aktiven Zentrums (was bei der DERA_{EC} der Fall war) die Aktivität des Enzyms deutlich stärker beeinflusst wird, als es bei dem Austausch einer Aminosäure an der Proteinoberfläche der Fall ist.

3.2.8 Strukturelle Anpassung psychrophiler DERAs

Wenn man nur die DERAs aus psychro- und mesophilen Organismen vergleicht, konnten anhand der CNA-Daten - wie auch schon in den Mutationsstudien - keine eindeutigen Unterschiede in der Bedeutung des Dimer-Interfaces für die Stabilität erkannt werden. Man kann also daraus schließen, dass die in Kapitel 3.2.3 gezeigten Differenzen in Aktivität und Stabilität sich aus der Art und Stärke der intramolekularen Wechselwirkung im Protein herleiten. Wie bereits in Abbildung 3-21 zu sehen war, konnten Unterschiede in den Kontakten zwischen den Sekundärstrukturelementen erkannt werden. Um diesen Aspekt zu quantifizieren, wurde für jede Helix und jedes Faltblatt die Energiesumme der rigiden Kontakte berechnet, welche das jeweilige Sekundärstrukturelement mit dem Rest des Proteins verbindet (siehe Abbildung 3-25). In allen drei DERAs waren die inneren β -Faltblätter stärker mit anderen Proteinregionen verbunden als die äußeren α -Helices. Vergleicht man die drei DERAs untereinander, erkennt man kaum Unterschiede zwischen den jeweiligen β -Faltblättern. Im Gegensatz dazu zeigen Helices 5 und (insbesondere) 6 und 7 weniger starke rigide Kontakte in den psychrophilen Enzymen. Diese Helices befinden sich gegenüber des Dimer-Interfaces und umgeben die β -Faltblätter 6 und 7, welche die katalytisch aktiven K167 (Bildung der Schiff'schen Base) und K201 (pK_s, Absenkung des aktiven Lysins) beinhalten. Diese Ergebnisse liefern eine mögliche Erklärung dafür, wieso beide psychrophile DERAs unter gleichen Reaktionsbedingungen eine höhere Aktivität aufweisen als deren mesophiles Pendant: Eine schwächere Verbindung der äußeren Helices mit dem inneren Proteinkern ermöglicht eine höhere Flexibilität der angrenzenden β - α -Schlaufen, welche in Proteinen mit dem TIM-Barrel Motiv die katalytische Tasche einschließen. Da diese Schlaufen somit sowohl Teil des Substrateingangs als auch des katalytischen Zentrums sind,^[29,30] beeinflussen sie die katalytische Spezifität bzw. die Substratumsatzrate. Durch Mutationen sowohl in den äußeren Helices als auch in den β - α -Schlaufen konnte schon in einer früheren Studie die Aktivität einer hyperthermophilen Indol-3-glycerolphosphat synthase (TrpC) für niedrigere Temperaturen erhöht werden.^[168]

Eine Unterstützung für diese These konnte durch die kristallographischen Daten erhalten werden. Bei der Verbesserung einer Struktur werden B-Faktoren dazu verwendet, um die Unsicherheit der angegebenen Atomkoordinaten zu parametrisieren. Je höher der Wert ist, desto wahrscheinlicher ist eine thermische Bewegung des entsprechenden Atoms. Die absoluten Werte hängen jedoch von vielen weiteren Faktoren wie den Messbedingungen des Röntgenexperiments ab, weswegen sie nicht direkt verglichen werden können, um z. B. eine allgemein höhere Flexibilität der psychrophilen DERAs zu bestimmen. Daher wurde hier die relative Verteilung der B-Faktoren der Rückgrat-Atome innerhalb eines Proteins untersucht. Man kann (wie in Abbildung 3-25 gezeigt) die Tendenz erkennen, dass in Helices 0, 6 und 7 der psychrophilen

Enzyme verglichen mit der DERA_{EC} eine höhere Flexibilität vorhanden ist. Dies ist, wie auch schon in den CNA-Berechnungen gezeigt, genau der Bereich, welcher das natürliche Substrat umschließt. Ein ähnlicher Trend konnte für die entsprechenden β - α -Schlaufen erhalten werden - besonders in den Segmenten, welche direkt an den Helices angrenzen.

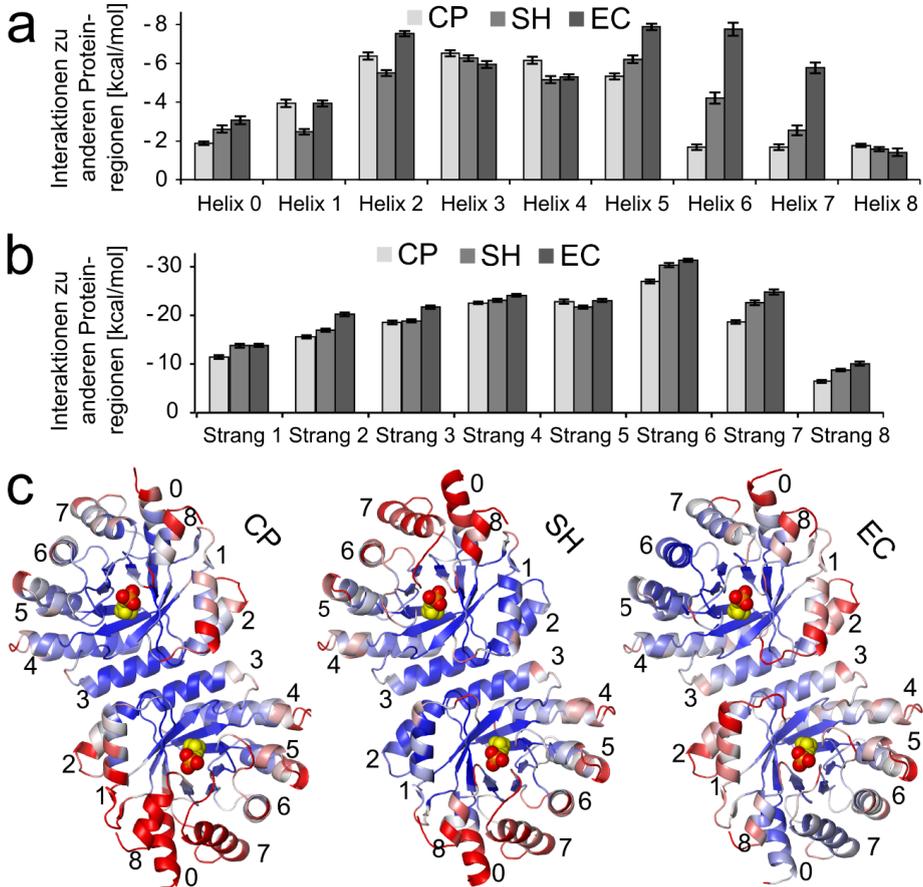


Abbildung 3-25: Vergleich der strukturellen Stabilität und Flexibilität in den Sekundärstrukturelementen von psychro- und mesophilen DERAs. (a),(b) Energiesummen der rigiden Kontakte zwischen Resten der einzelnen (a) α -Helices und (b) β -Strängen von DERA_{EC}, DERA_{CP} und DERA_{SH} mit dem Rest des Proteins (ohne das entsprechende Sekundärstrukturelement). Die Werte wurden durch die Anzahl der Aminosäuren im Sekundärstrukturelement dividiert und zeigen somit einen Durchschnittswert mit Standardfehler. (c) Relative B-Faktor-Verteilung von blau (Mittelwert - SD) zu rot (Mittelwert + SD). Das natürliche Substrat wird durch die Van-der-Waals Radien der Atome dargestellt (Phosphatgruppe in rot/orange und die anderen Atome in gelb). Für DERA_{EC} wurde der PDB-Code 1JCL verwendet.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass man aus diesen beiden unabhängigen Experimenten ableiten kann, dass psychrophile DERAs als Teil der Anpassung an niedrige Temperaturen eine besonders flexible Umgebung der Substrat-Bindetasche haben.

3.2.9 Selektivitätsscreening durch neue Fluoreszenzsubstrate

In der Dissertation von Irene Küberl, née Kullartz, wurden neue Fluoreszenzsubstrate hergestellt, welche zur Testung der Selektivität verschiedener DERA-Mutanten verwendet wurden.^[160] Diese basieren auf einem von *Jourdain et al.*^[169] und *Greenberg et al.*^[7] entwickelten Fluoreszenzsystem, welches von ihr auf das Screening von Enantio- und Diastereoselektivität erweitert wurde. Das Projekt wurde von Carolin Bisterfeld abgeschlossen und gemeinsam auf die fünf DERAs (plus eine zweite, mesophile DERA aus *Rhodococcus erythropolis*^[114]) angewendet. An dieser Stelle wird daher nicht auf die Synthese eingegangen, welche in der Arbeit von Frau Küberl ausführlich beschrieben wird, sondern nur die Anwendung beschrieben. Der Reaktionsablauf ist in Abbildung 3-26 b dargestellt. Die Desoxyribose ist an Methylumbelliferon gekoppelt, welches nach der DERA-katalysierten Abspaltung von Acetaldehyd (**3**) und einer spontanen β -Eliminierung des 2-Hydroxypropenals (**7**) bei einer Wellenlänge von 340 nm (und Anregung bei 460 nm) fluoresziert.

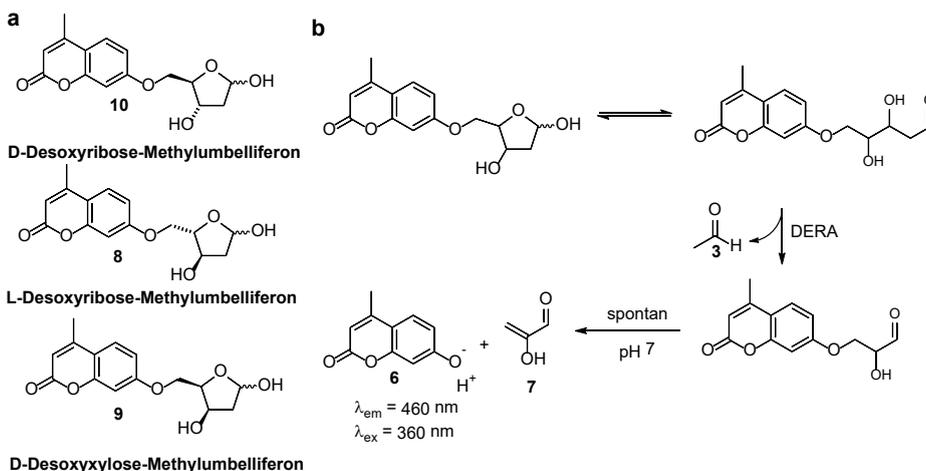


Abbildung 3-26: (a) Screeningsubstrate und (b) das DERA-katalysierte Reaktionsschema. Die Synthese der in (a) gezeigten Screeningsubstrate wird in der Dissertation von Irene Küberl, née Kullartz, beschrieben.^[160]

Als Enzyme wurden die Rohextrakte der DERAs aus *C. psychrerythraea*, *S. halifaxensis* (psychrophil), *E. coli*, *R. erythropolis* (mesophil), *P. aerophilum* und *T. maritima* (hyperthermo-

phil) verwendet. Zusätzlich wurden eine Kontrolle [pET21a(+)] ohne *deoC*-Gen als Leervektor] benutzt. Die Reaktionen wurden jeweils bei 25 °C durchgeführt. Um zu überprüfen, welchen Einfluss das Expressionslevel auf die Aktivität hat (da im Rohextrakt nicht nur die Aktivität, sondern auch die Menge des entsprechenden Enzyms berücksichtigt werden muss), wurde ein SDS-Gel erstellt, welches in Abbildung 3-27 zu sehen ist. Aus dem Screening, bei dem die Aktivität der verschiedenen Enzyme bezüglich der drei Substrate gemessen wurde und welches in Abbildung 3-28 dargestellt ist, wird deutlich, dass bei vergleichbarem Expressionslevel beide psychrophile DERAs aktiver als die mesophilen Varianten sind. Die hyperthermophilen Enzyme zeigen keine Aktivität, welche höher als die der Kontrolle ist. Die geringe Proteinmenge hat dabei sicher auch einen Einfluss auf diese Werte, dennoch bestätigen sie die bereits in Kapitel 3.2.3 gezeigten Ergebnisse, dass die hyperthermophilen DERAs bei moderaten Temperaturen insgesamt wenig aktiv sind. Interessant ist vor allem das Ergebnis bezüglich der Enantio- und Diastereoselektivität der DERA_{cp}. Hierbei ist es wichtig, zu erwähnen, dass dieser Assay die Retroaldolreaktion katalysiert und somit kein neues stereogenes Zentrum gebildet wird.

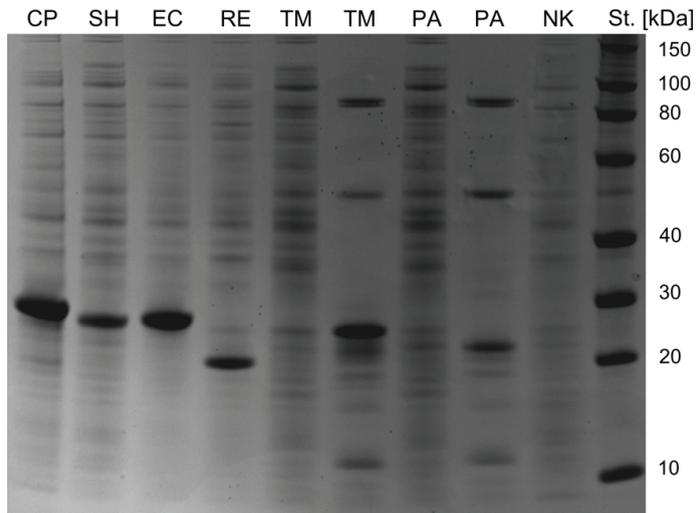


Abbildung 3-27: SDS-Gel der Rohextrakte von DERAs aus psychrophilen (CP und SH), mesophilen (EC und RE) und hyperthermophilen (TM und PA) Organismen, sowie einer Negativkontrolle mit einem Leervektor (NK). Die Proteine wurden in *E. coli*-BL21(DE3) Zellen exprimiert. NC steht für die Kontrolle mit einem Leervektor als Plasmid. Da in TM und PA kaum Produkt zu erkennen war, wurde in einer Schnellreinigung (NiNTA-Säule ohne Waschschrift mit 30 mM Imidazol) der Proteinanteil in den Proben erhöht, sodass eine Bande erkennbar war.

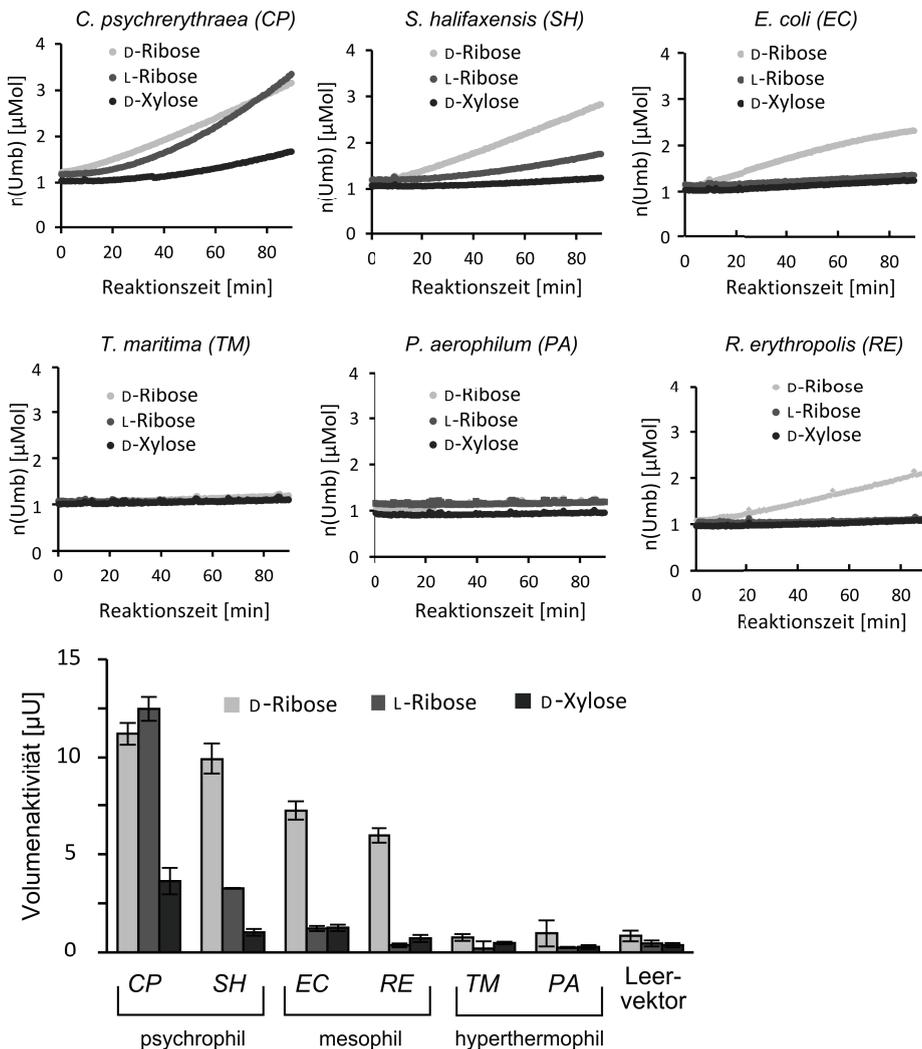


Abbildung 3-28: Aktivität von psychro-, meso- und hyperthermophilen DERAs für das 4-Methylumbeliferon gekoppelte D-Ribose-, L-Ribose- und D-Xylose-Substrat. In diesem Assay wurde kein gereinigtes Enzym verwendet; deswegen ist keine spezifische, sondern eine Volumenaktivität angegeben. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Dreifachbestimmung dar. Als Kontrolle wurden *E. coli* Zellen mit einem transformierten Leervektor verwendet.

Der von Carolin Bisterfeld entwickelte Assay in Aldolrichtung (Reaktion von Acetaldehyd (3) mit Propanal) zeigte, dass alle fünf DERAs einen ähnlich hohen *ee*-Wert (89-96%) für das *R*-Enantiomer aufweisen (vgl. Tabelle 3-6). In diesem Fluoreszenzassay kann daher nur über den Vergleich der Aktivitäten überprüft werden, welches Substrat schneller umgesetzt wird. Dabei

zeigt sich, dass beide psychophilen Enzyme auch einen Umsatz für die an Methylumbelliferon gekoppelte L-Desoxyribose (**8**) und die D-Desoxyxylose (**9**) zeigen und im Falle von DERA_{CP} ist dieser für die L-Desoxyribose (**8**) sogar genauso schnell wie für dessen (vom natürlichen Substrat abgeleiteten) D-Enantiomer (**10**). Man kann also festhalten, dass die Selektivität in Aldolrichtung trotz der erhaltenen Ergebnisse zwar auch in den Kälte-adaptierten DERAs nicht anders ist, diese allerdings möglicherweise eine höhere Substratbreite haben. Dies wurde bereits in der Literatur für andere psychophile Enzyme beschrieben^[170] und liefert somit einen ersten Hinweis, dass auch andere Aldehyde, die bisher durch die limitierte Anzahl an Akzeptor-Molekülen nicht von der DERA_{EC} umgesetzt werden,^[171-172] in den psychophilen DERAs als Substrate verwendet werden könnten.

3.3 Projekt C: Analyse der Deaktivierung bei hohen Acetaldehyd-Konzentrationen

3.3.1 Analyse der Schiff'schen Base Bildung

Ziel dieses Projektes war es, die DERA_{EC} für die organische Synthese zu optimieren, indem die Stabilität bezüglich dessen natürlichen Substrats Acetaldehyd (**3**) verbessert wird. Wie bereits in Kapitel 1.1 und 2.2.3 erwähnt, ist das Enzym schon nach kurzer Zeit (2-3h) Inkubation in 300 mM Acetaldehyd (**3**) inaktiv und die Aktivität lässt sich auch nicht durch das Entfernen des Aldehyds wieder herstellen. Als mögliche Ursache für die Inaktivierung wurde die Bildung von Schiff'schen Basen der äußeren Lysine des Proteins mit Acetaldehyd (**3**) diskutiert, welche eine (partielle) Entfaltung/Destabilisierung des Proteins zur Folge haben kann. Treibende Kraft einer Proteinfaltung ist der sog. hydrophobe Effekt, bei dem sich hydrophobe Aminosäuren zum Proteinzentrum hin orientieren, während sich die polaren Reste tendenziell zur Proteinoberfläche anordnen und somit direkte Kontakte mit den polaren Wassermolekülen eingehen.^[173-174] Lysine sind auf Grund ihrer (unter physiologischen Bedingungen) positiven Ladung an der Aminogruppe sehr polar und es ist daher nicht erstaunlich, dass sich 16 der insgesamt 19 Lysin-Reste der DERA_{EC} an der Proteinoberfläche befinden, wie in Abbildung 3-29 gezeigt ist.

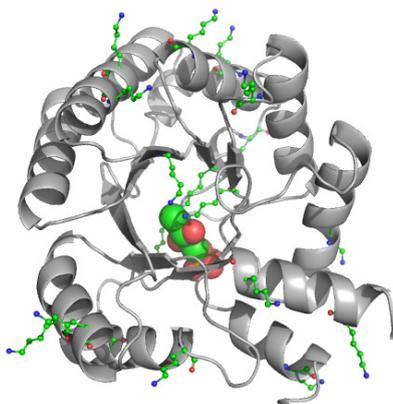


Abbildung 3-29: Positionen der insgesamt 19 Lysin-Reste in der DERA-Struktur. Während die Lysine im Kugel-Stab-Modell gekennzeichnet ist, wird das natürliche Substrat im katalytischen Zentrum durch die Van-der-Waals Radien der Atome hervorgehoben. Kohlenstoffatome sind grün, Sauerstoffe rot, sowie Stickstoffatome blau gekennzeichnet.

Durch die Ausbildung einer Schiff'schen Base wird der pK_s-Wert der Aminogruppe reduziert, welches bei einem pH-Wert von sieben zu einem neutralen und somit unpolaren Seitenketten-

rest führt.^[175] Dies könnte wiederum zu dem oben beschriebenen destabilisierenden Effekt führen. Um zu überprüfen, ob es tatsächlich zu einer Reaktion der (äußeren) Lysine mit Acetaldehyd (3) kommt, wurde die DERA nach Inkubation mit dem Substrat und anschließender Reduzierung mit NaBH₄ (zur Stabilisierung des Imins) massenspektrometrisch untersucht (siehe Abbildung 3-30).

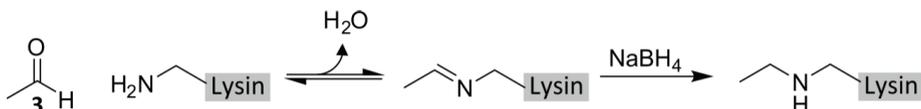


Abbildung 3-30: Schematische Darstellung der Bildung einer Schiff'schen Base der Lysine mit Acetaldehyd (3). Anschließend wurde das Imin reduziert, um die Modifikation für die massenspektrometrische Untersuchung zu stabilisieren.

Dabei wurden nach einer tryptischen Spaltung des Proteins in einer MALDI-TOF/TOF-Analyse zuerst die Massen der Peptide (*Precursor*-Massen) bestimmt. Nach Fragmentierung der Peptide (*Post Source Decay* innerhalb des Analysators) und Bestimmung der Fragmentmassen über MALDI-TOF/TOF-MS wurden die Daten mit den theoretischen *Precursor*- und Fragmentdaten aus einer *In-Silico*-Analyse der Aminosäuresequenzen der Proteine (mit und ohne Lysin-Modifikation) verglichen (Mascot-Analyse). In Tabelle 3-12 sind die Peptide, welche einen (nach der Reduktion des Imins) ethylierten Lysinrest an der Proteinoberfläche enthalten, aufgelistet. Insgesamt konnte somit indirekt die Bildung einer Schiff'schen Base in 14 von 16 äußeren Lysinen nachgewiesen werden.

Tabelle 3-12: Massenspektrometrisch ermittelte Peptidmassen der DERA_{EC}, welche in ihrer Aminosäuresequenz einen ethylierten Lysinrest (der Proteinoberfläche) enthalten. Während die hier gezeigten *Precursor*-Massen über MALDI-TOF-MS ermittelt wurden, konnte über MALDI-TOF/TOF-MS deren Aminosäuresequenz und vorhandene Lysinmodifikationen verifiziert werden. Die berechneten Werte aus Spalte 5 wurden mit Hilfe des Online-Tools *ExPASy - PeptideMass*^[176-177] (Einstellungen: [M+H]⁺ und monoisotope Massen) ermittelt.

Lysin an der Proteinoberfläche	Start-Ende	Sequenz (K* = ethyliertes Lysin)	Masse (m/z) [Da]	
			bestimmt	berechnet
K5	1-10	MTDLK*ASSLR	1149.64	1149.60
K13	11-27	ALK*LMDLTLNDDDTDEK	2078.99	2078.98
K28	14-37	LMDLTLNDDDTDEK*VIALCHQAK	2730.32	2730.30
K37	29-51	VIALCHQAK*TPVGNTAAICIYPR	2467.33	2467.30
K58,61	58-69	K*TLK*EQGTPEIR	1455.84	1455.79
K123	109-126	ALMAGNEQVGFDLVK*ACK	1921.97	1921.96
K146	138-152	VIIETGELK*DEALIR	1721.99	1721.96
K153,160	153-167	K*ASEISIK*AGADFIK	1633.94	1633.89
K172	161-183	AGADFIK*TSTGK*VAVNATPESAR	2347.24	2347.20
K196	191-201	DMGVEK*TVGFK	1238.64	1238.61
K214	209-231	TAEDAQK*YLAIADFLGADWADAR	2668.28	2668.26
K246	235-254	FGASSLLASLLK*ALGHGDGK	1970.11	1970.08

Im zweiten Schritt sollte nun untersucht werden, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen der Acetaldehyd-Stabilität der DERA und der Anzahl der äußeren Lysine gibt. In einem ersten Versuch wurden drei an unterschiedlichen Proteinbereichen liegende Lysin-Reste durch Arginin ausgetauscht, da Arginin auf Grund seiner Guanidinogruppe eine positive Ladung enthält, jedoch kein Imin mit Acetaldehyd (**3**) ausbilden kann. Die K61,160,172R-Mutante zeigte jedoch keine Verbesserung der Substrattoleranz, wie in Abbildung 3-31 zu sehen ist.

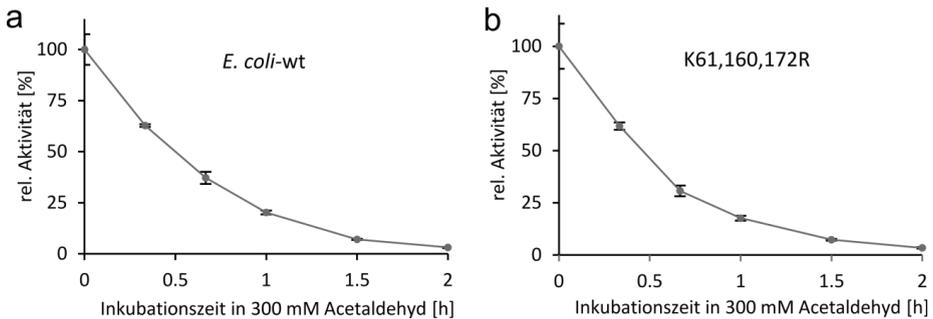


Abbildung 3-31: Vergleich der Acetaldehyd-Toleranz zwischen dem Wildtyp der DERA_{EC} (a) und der K61,160,172R Mutante (b). Dargestellt wird (wie auch in den folgenden Diagrammen) die relative Aktivität des Enzyms bezogen auf das natürliche Substrat Desoxy-D-ribose-5-Phosphat (**4**) während der Inkubation in Acetaldehyd (**3**). Der Anfangswert wurde direkt nach Substratzugabe gemessen und als 100% Aktivität definiert. Die Proteinkonzentration betrug in beiden Fällen ca. 1 mg/mL.

Obwohl dieser erste Test nicht das gewünschte Ergebnis gebracht hatte, wurde die Hypothese des Einflusses der Oberflächenlysine auf die Substrattoleranz nicht direkt verworfen, weil es nicht auszuschließen war, dass entweder zu wenige oder die falschen Lysin-Reste mutiert wurden. Der Austausch aller Oberflächenlysine wäre eine denkbare Strategie; allerdings besteht dabei die Gefahr, dass eine solch große Anzahl von Mutationen negative Effekte auf die Proteinstruktur haben. Daher wurde nach einer DERA gesucht, die in ihrem Wildtyp bereits eine geringe Anzahl von Oberflächenlysinen enthält. Dazu wurden alle DERA Strukturen mit einer Sequenzidentität von $\geq 20\%$ zum *E. coli* Enzym mittels des BLAST-Algorithmus gesucht und insgesamt ca. 3700 Sequenzen gefunden. Anschließend wurden die Sequenzen selektiert, welche neben einer möglichst geringen Anzahl von Lysinen ähnliche Eigenschaften wie die DERA_{EC} in Bezug auf Größe und Ladung haben. Ausgewählt wurde die DERA aus *Corynebacterium bovis* mit insgesamt einem Oberflächenlysin. Das Codon-optimierte Gen wurde synthetisch bestellt, in den pET21a(+)-Vektor kloniert und anschließend exprimiert und gereinigt. Jedoch zeigte der Stabilitätstest bezüglich Acetaldehyd (**3**) keine Verbesserung zur DERA_{EC} (siehe Abbildung 3-32). Es wurde weiterhin versucht, das noch fehlende Oberflächenlysin zu mutieren; jedoch führte dies zu der Bildung von Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*), welche sich nicht

mehr zurückfalten ließen. Unabhängig davon ist es aber sehr unwahrscheinlich, dass ein einzelner Lysinrest einen solch großen Einfluss auf die Polarität der Proteinoberfläche hat, dass die Bildung eines Imins mit Acetaldehyd (3) die Entfaltung verursacht. Insgesamt konnte also aus diesen Untersuchungen geschlussfolgert werden, dass nicht nur am katalytisch aktiven Lysin, sondern auch an den Oberflächenlysinen Schiff'sche Basen mit Acetaldehyd (3) gebildet werden, es aber keinen direkten Zusammenhang zwischen der Anzahl dieser Aminosäure im Protein und der Stabilität bezüglich des Substrats zu geben scheint.

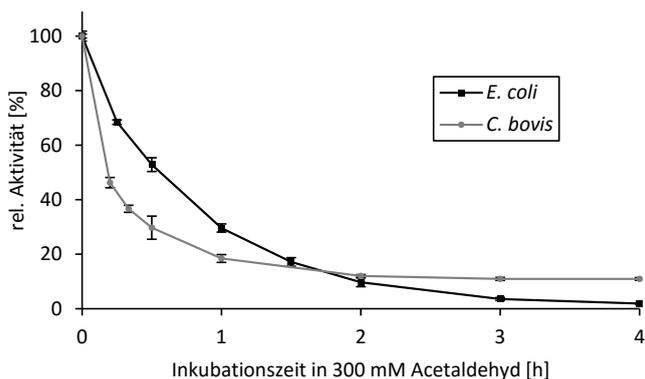


Abbildung 3-32: Acetaldehyd-Stabilität der DERA aus *E. coli* (16 äußere Lysine) und *C. bovis* (1 äußeres Lysin). Die Proteinkonzentration betrug in beiden Fällen ca. 0.7 mg/ml.

3.3.2 Untersuchung möglicher struktureller Änderungen

Bisher scheiterten alle Versuche, die Mechanismen der DERA-Inaktivierung durch Acetaldehyd (3) zu verstehen, insbesondere daran, dass nicht bekannt ist, welche strukturelle Veränderung des Enzyms die Reaktion mit dem Substrat zur Folge hat. Daher sollte im Folgenden zunächst untersucht werden, ob signifikante Veränderungen in der Proteinstruktur (wie z. B. Aggregation) nach der Behandlung mit dem Substrat zu beobachten waren. Ein CD-Spektrum, welches in Abbildung 3-33 dargestellt ist, zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen der aktiven und nicht aktiven Form.

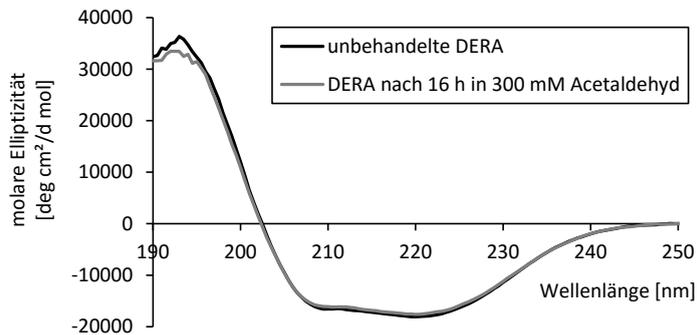


Abbildung 3-33: CD-Spektrum der DERA vor und nach Acetaldehyd-Inkubation. Nach der Inkubation über Nacht wurde das Substrat herausgewaschen, um eine Beeinflussung der Messung durch eine andere Umgebung des Enzyms zu verhindern.

Ein weiteres Indiz, welches dafür spricht, dass es zu keiner Aggregation kommt, ist das Ergebnis der in Abbildung 3-34 gezeigten Messreihe, bei der verschiedene Proteinmengen mit 300 mM Acetaldehyd inkubiert wurden. Dabei zeigte sich, dass bei einer höheren Proteinkonzentration auch die Halbwertszeit (und damit die Stabilität) des Enzyms während der Substratinkubation ansteigt. Bei einer Aggregation würde man einen umgekehrten Effekt erwarten, da diese durch höhere Proteinmengen begünstigt wird. Dieser beobachtete Effekt ist auch in Bezug zu den in der Literatur beschriebenen, Acetaldehyd-stabilen DERAs aus neuen Organismen interessant. Zwar wird in den meisten Fällen ein Vergleich mit der DERA_{EC} durchgeführt, jedoch wird in keinem Beispiel die Proteinkonzentration angegeben. Deshalb ist es nicht auszuschließen, dass die beobachteten Effekte durch unterschiedliche Proteinmengen, sowohl in positiver als auch in negativer Hinsicht verfälscht werden.

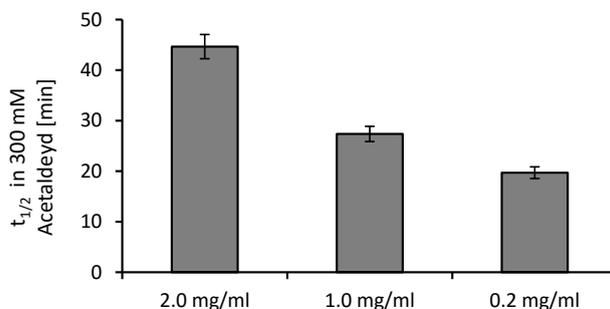


Abbildung 3-34: Konzentrationsabhängigkeit der Acetaldehyd-Stabilität der wt-DERA aus *E. coli*. Für diese Messung wurde wie in den vorherigen Beispielen die zeitliche Abhängigkeit der relativen Aktivität des Enzyms während der Inkubation in Acetaldehyd (3) gemessen. Anschließend wurde über eine exponentielle Zerfallsfunktion 1. Ordnung die Halbwertszeit mit Standardabweichung bestimmt.

Eine vollständige Entfaltung des Proteins kann also ausgeschlossen werden; dennoch zeigt die Deaktivierung, dass (strukturelle) Änderungen stattgefunden haben müssen. Es wurde daher beschlossen, das Protein mittels NMR zu untersuchen, da dies eine gute Methode ist, um verschiedene Arten von strukturellen Änderungen in einem Protein wie (teilweise) Entfaltung, Konformationsänderungen oder Substratbindung durch die Unterschiede in der chemischen Verschiebung zu detektieren.^[178] Da die DERA ein dimeres Protein ist, verursacht sie breite Signale, welche durch die Signalüberlappung gleicher Aminosäuren in den monomeren Untereinheiten des Enzyms zu Stande kommen. Es wurde daher eine in Kapitel 3.2.5 beschriebene monomere Variante der DERA (K58E-Y96W^{IX}) verwendet, welche sowohl bei der Stabilität ($T_m=67.7\pm 0.4^\circ\text{C}$), als auch bei der spezifischen Aktivität ($U=10.26\pm 0.48\text{U/mg}$) nahezu identische Eigenschaften zum Wildtyp aufweist. Ein TROSY-Spektrum, welches sowohl von der dimeren, als auch von der monomeren DERA aufgezeichnet wurde, konnte die Vermutung bestätigen, dass im zweiten Fall deutlich schärfere Signale zu sehen sind, wie in Abbildung 3-35 gezeigt wird. Um sicherzugehen, dass die strukturellen Untersuchungen am Monomer direkt auf das Dimer übertragen werden können, wurde die Kristallstruktur der monomeren Doppelmutante in einer Auflösung von 1.6\AA bestimmt.^X Aus der Superpositionierung beider Strukturen wurde ein RMSD-Wert von 0.38\AA (bezogen auf alle Nicht-Wasserstoffatome) ermittelt. Dieses Ergebnis zeigt, dass beide DERA-Varianten strukturell praktisch identisch sind.

^{IX} Der findige Leser wird sich vielleicht die Frage stellen, wieso nicht die Einzelmutante (Y96W), welche zur Monomerisierung ausgereicht hat, für die weiteren Studien benutzt wurde. Der Grund dafür liegt darin, dass diese Mutante erst untersucht wurde, als schon eine Vielzahl von Studien mit der Doppelmutante durchgeführt worden war. Da jedoch beide Mutanten sich in ihren biochemischen Eigenschaften nicht unterscheiden, wurde darauf verzichtet, die Experimente mit der Einzelmutante zu wiederholen.

^X Da im späteren Verlauf der Arbeit (vgl. Kapitel 3.3.6) von derselben Enzymvariante die Struktur mit besserer Auflösung bestimmt wurde, wurde auf eine finale Verfeinerung dieser Struktur verzichtet und daher ist auch keine Tabelle mit kristallographischen Statistiken gezeigt.

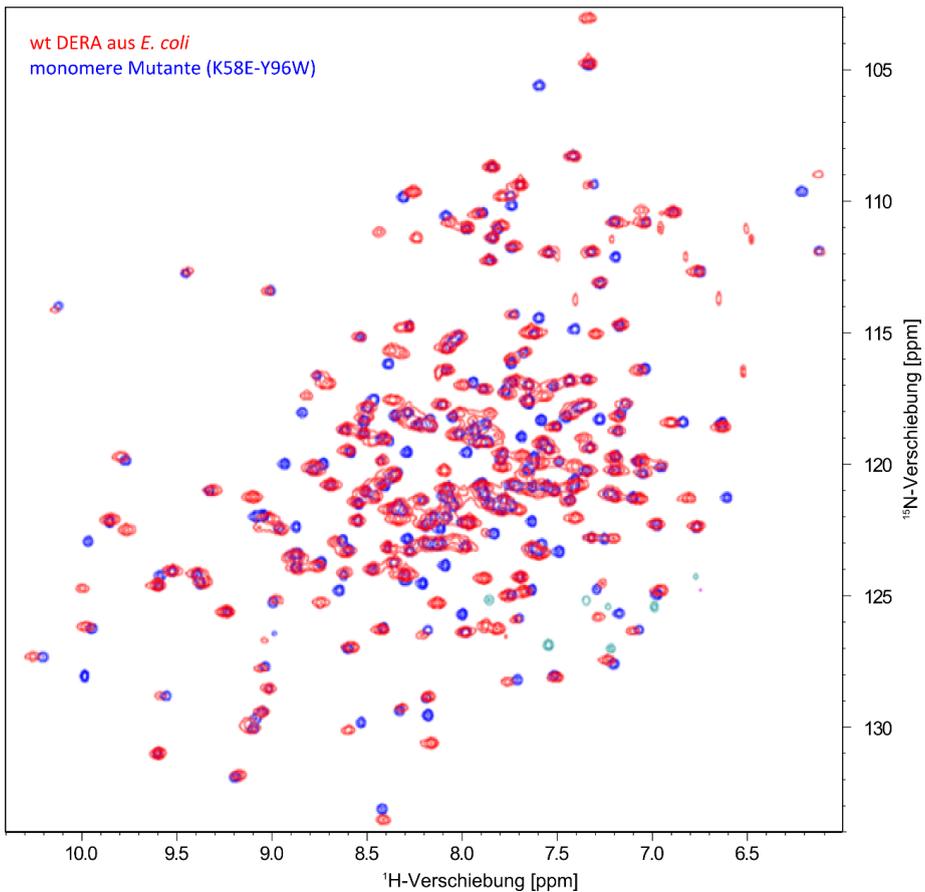


Abbildung 3-35: Vergleich eines TROSY-Spektrums der dimeren und monomeren DERA_{EC}.

Von der monomeren DERA wurde ein TROSY-Spektrum vor und nach Acetaldehyd-Inkubation aufgenommen, welches in Abbildung 3-36 zu sehen ist. Bei den meisten Signalen kommt es zu keinen Veränderungen. Dies entspricht den oben beschriebenen Ergebnissen, dass die Struktur des Proteins auch in der inaktiven Form weitgehend erhalten bleibt. Trotzdem konnten beim direkten Vergleich beider Spektren Unterschiede in der chemischen Verschiebung festgestellt werden, wie beispielsweise im Bereich der ^1H -Verschiebung von >9.5 ppm. Dieses Spektrum ist der erste Hinweis darauf, dass durch die Acetaldehyd-Inkubation die Struktur der DERA beeinflusst wird.

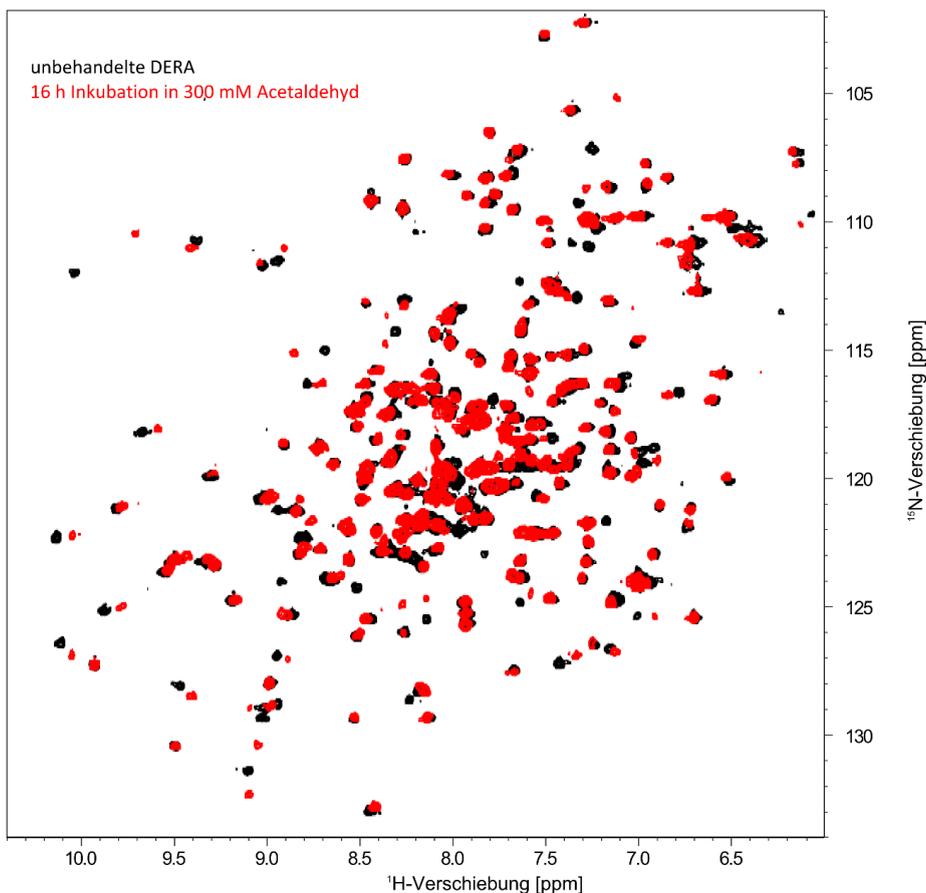


Abbildung 3-36: Vergleich eines TROSY-Spektrums der monomeren DERA_{EC} vor und nach Acetaldehyd-Inkubation. Um einen Effekt der hohen Substratkonzentration auf die chemische Verschiebung auszuschließen, wurde es nach der Inkubationszeit herausgewaschen.

3.3.3 Rückgrat-Zuordnung des DERA-Monomers

Um die Unterschiede in den in Abbildung 3-36 gezeigten Spektren den entsprechenden Aminosäuren zuzuordnen, wurde eine Rückgrat-Zuordnung des unbehandelten DERA-Monomers etabliert. In den ersten Tests wurde versucht, mit HNCACB und HN(CO)CACB Dreifach-Resonanz-Experimenten die Magnetisierung von den Proteinrückgrat H_N zu dem C_β -Atom der Seitenkette zu übertragen;^[179] jedoch scheiterten die Experimente auf Grund eines schwachen Signal-zu-Rauschen Verhältnisses (welches möglicherweise auf die Größe des

Enzyms zurückzuführen ist).^[146] Stattdessen wurden HNCA, HN(CO)CA, HNCO und HN(CA)CO Experimente verwendet, bei denen die Magnetisierung nur bis zum C α -Atom transferiert wird.^[144] Ein Ausschnitt aus dieser Zuordnung ist in Abbildung 3-37 beispielhaft dargestellt.

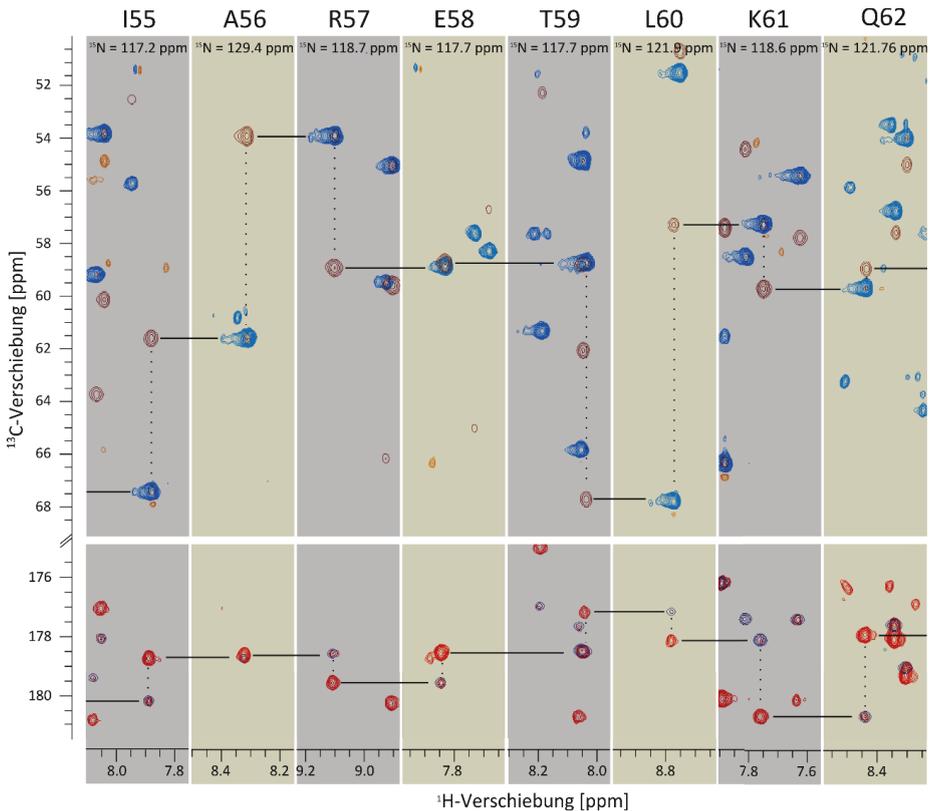


Abbildung 3-37: Zuordnung der Proteinrückgrat-Resonanzsignale der DERA mit Hilfe von HNCA/HN(CO)CA und HNCO/HN(CA)CO Dreifach-Resonanz-Experimenten. Hier dargestellt sind 8 Streifen einer beispielhaft ausgewählten Aminosäure-Sequenz. Im oberen Teil sind die zwei Signale der C α -Atome im HNCA-Experiment in brauner Farbe gezeigt, während das einzelne Signal des HN(CO)CA-Experiments blau gekennzeichnet ist. Unten sind die beiden HN(CA)CO-Signale rot und das einzelne HNCO-Signal blau markiert. Über die ^{13}C -Verschiebung kann (wie durch die schwarzen Linien gekennzeichnet) die Verknüpfung zwischen den einzelnen Aminosäuren hergestellt werden, während die Resonanzsignale innerhalb eines Aminosäure-Rückgrats sowohl in der ^{15}N - als auch in der ^1H -Dimension (hier durch die gestrichelten Linien gezeigt) identisch sind.

Man erkennt in dieser Darstellung, dass für jeden Aminosäurestreifen (mit dessen spezifischer ^1H - und ^{15}N -Verschiebung) im HNCA-Experiment für das eigene und das benachbarte C α -Atom

ein (etwas schwächeres) Signal vorhanden ist. Durch das zusätzliche HN(CO)CA-Experiment wurde nur das eigene C_α-Atom angeregt, weshalb besser zwischen den beiden Signalen unterschieden und eine Verknüpfung zwischen den Aminosäuren hergestellt werden konnte. Da die HNCA/HN(CO)CA Kombination allein nicht ausreichte, um alle Resonanzen eindeutig zuzuweisen, wurden zusätzlich HNCO/HN(CA)CO-Experimente durchgeführt, welche im unteren Teil von Abbildung 3-37 zu sehen sind. Diese beruhen auf demselben Prinzip, nur dass im Unterschied diesmal die Magnetisierung über das C_α-Atom auf den Carbonyl-Sauerstoff im Rückgrat transferiert wird. Auch hier wurden im HN(CA)CO-Experiment zwei Signale für das eigene und benachbarte C_α-Atom der entsprechenden Aminosäure erhalten, während im HNCO-Experiment nur das eigene C_α-Atom angeregt wurde. Nach der Zuordnung der Signale zu den einzelnen Aminosäuren kann diese Information dann auf das HSQC- (bzw. TROSY-) Spektrum übertragen werden, da dessen ¹H- und ¹⁵N-Verschiebungen denen der Dreifach-Resonanz-Experimente entspricht. Um den Nachteil auszugleichen, dass durch diese Spektren keine Informationen über die C_β-Atome und somit die Seitenketten gesammelt werden, wurde zusätzlich ein HSQC-TOCSY-Spektrum gemessen, bei dem die Magnetisierung zwischen den ¹H-Spins der Seitenketten transferiert und anschließend über den ¹⁵N-Kern zu dem H_N-Proton zur Detektion übertragen wird.^[180] Obwohl durch dieses Experiment keine Informationen über die meisten Seitenketten gesammelt werden konnten, war es möglich, zwei Signale bei ca. 4 und 1-1.5 ppm für die H_β und H_α Kerne der meisten Alanin-Reste zu detektieren. Dies ist beispielhaft in Abbildung 3-38 für drei Alanine dargestellt.

Mit Hilfe dieser Informationen war es möglich, alle Aminosäuren mit Ausnahme der terminalen Sequenzen und S239, welches in einer Schleifen-Region lokalisiert ist (insgesamt 95 % der Protein Sequenz), zuzuordnen. Das den entsprechenden Aminosäuren zugeordnete TROSY-Spektrum des DERA-Monomers ist in Abbildung 3-39 dargestellt. Eine Auflistung aller chemischen Verschiebungen zu den Aminosäuren ist im Anhang unter Tabelle 7-1 zu finden und wurde zudem in der BMRB (*biological magnetic resonance data bank*) unter der Nummer 25904 hinterlegt.

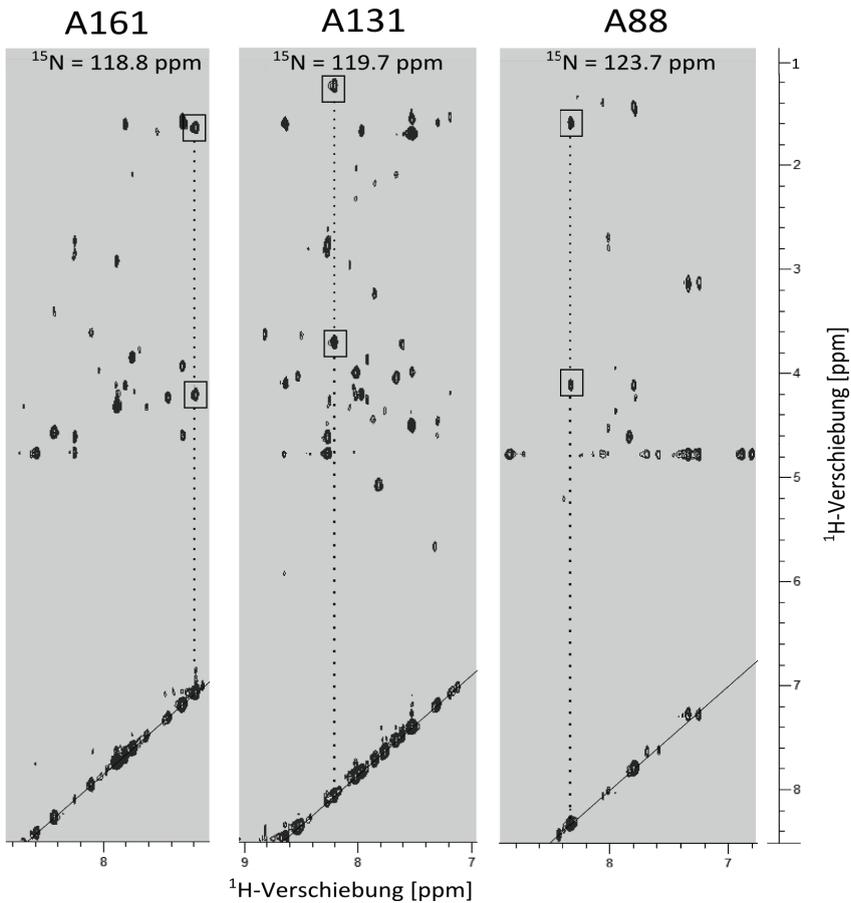


Abbildung 3-38: ^{15}N -HSQC-TOCSY Spektrum zur Detektion der Seitenketten-Protonen. Dargestellt sind drei Streifen, bei denen die Alanin-Protonen des C_α - und C_β -Atoms zwei deutliche Signale bei ca. 4 ppm und 1-1.5 ppm im Spektrum zeigten (hier durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet). Für alle anderen Aminosäuren waren die Spektren nicht eindeutig genug, um durch das TOCSY-Experiment Informationen über die Seitenketten zu bekommen.

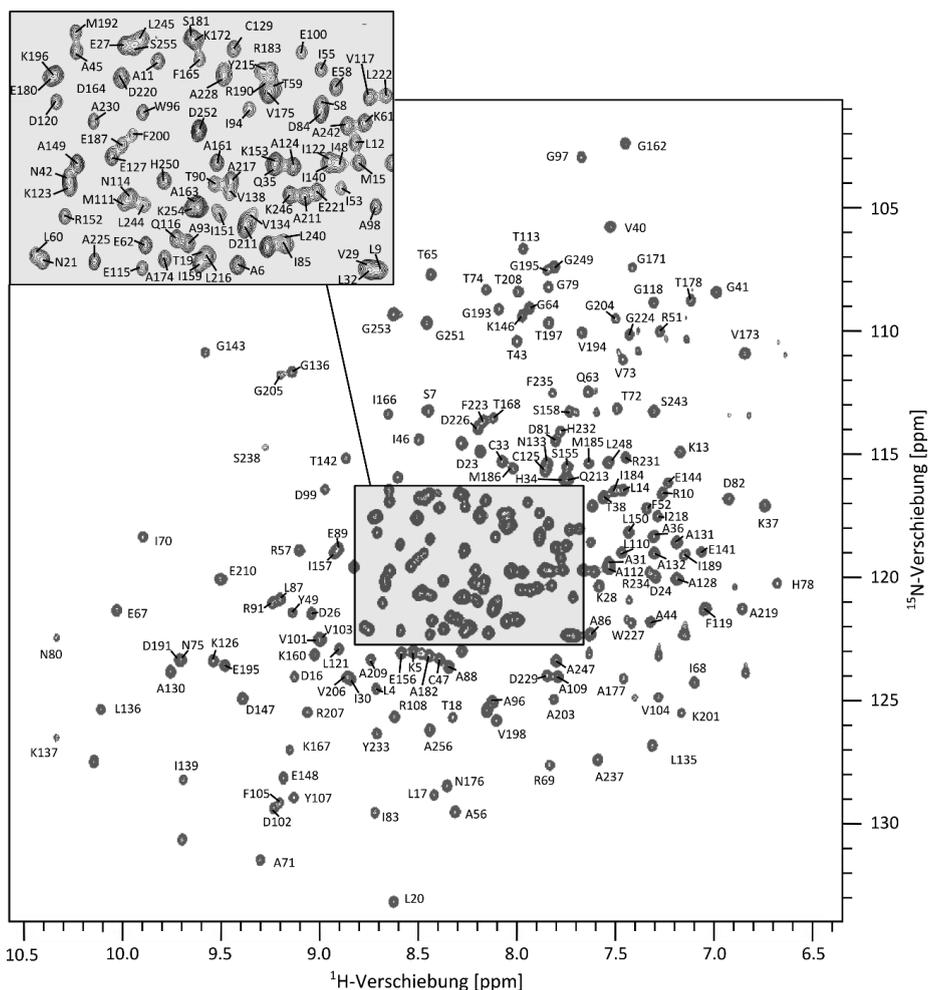


Abbildung 3-39: Den entsprechenden Aminosäuren zugeordnete ^{15}N - ^1H -Verschiebungen der Amidbindungen im Proteinrückgrat des DERA-Monomers. Die Signale einiger Aminosäuren sind in diesem Spektrum nicht erkennbar, da deren Intensität sehr schwach war. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde darauf verzichtet, die Intensität so weit zu erhöhen, dass alle Signale erkennbar wären. In Tabelle 7-1 sind diese Signale und deren Zuordnung mit enthalten.

Als Qualitätskontrolle wurden die experimentellen chemischen Verschiebungen der C_α -Atome mit den theoretischen Werten, welche auf Basis der Kristallstruktur mittels des Programms SPARTA^[181] berechnet wurden, verglichen (siehe Abbildung 3-40). Dabei erkennt man eine maximale Abweichung von 4 ppm, wenn man die Differenz beider Werte nimmt, während die absoluten chemischen Verschiebungen im Bereich zwischen 44-69 ppm liegen. Dies zeigt einerseits, dass die Vorhersage durch SPARTA relativ genau ist, und bedeutet im Umkehr-

schluss, dass eine falsche Zuordnung einzelner Signale zu deutlichen Ausreißern in Bezug auf den ΔCV -Wert in Abbildung 3-40b geführt hätte.

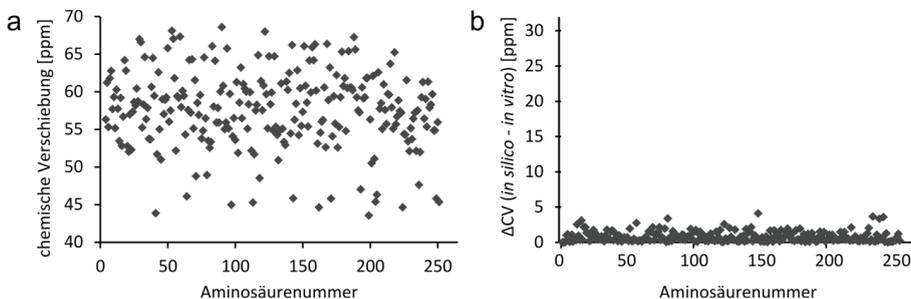


Abbildung 3-40: Evaluierung der chemischen Verschiebung der C_{α} -Atome, welche von den HNCA- und HN(CO)CA-Experimenten der monomeren DERA ermittelt wurden. (a) C_{α} chemische Verschiebungen für jede Aminosäure, welche durch die Zuordnung der NMR-Spektren bestimmt wurden. (b) Differenzwert der chemischen Verschiebung (ΔCV) zwischen den von SPARTA auf Basis der Kristallstruktur berechneten Werten und den experimentell bestimmten Daten.

In einer weiteren Analyse wurden die chemischen Verschiebungen von HN, NH, CA und CO verwendet, um mit CSI 2.0^[182] (*chemical shift index*) eine Sekundärstrukturvorhersage zu erstellen und auch diese Werte mit den (diesmal experimentellen) Daten aus der Kristallstruktur zu vergleichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-41 gezeigt. Auch diese Analyse zeigt deutlich, dass die NMR-Signale mit den kristallographischen Daten übereinstimmen. Die einzige Abweichung im Bereich zwischen den Aminosäuren 165-170 lässt sich sowohl als β -Strang, als auch als Schleife interpretieren, weshalb beide Ergebnisse gleichermaßen zulässig sind. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Qualitätskontrollen dafür sprechen, dass die Zuordnung korrekt ist und weitere Analysen auf Basis dieser Zuordnung durchgeführt werden können.

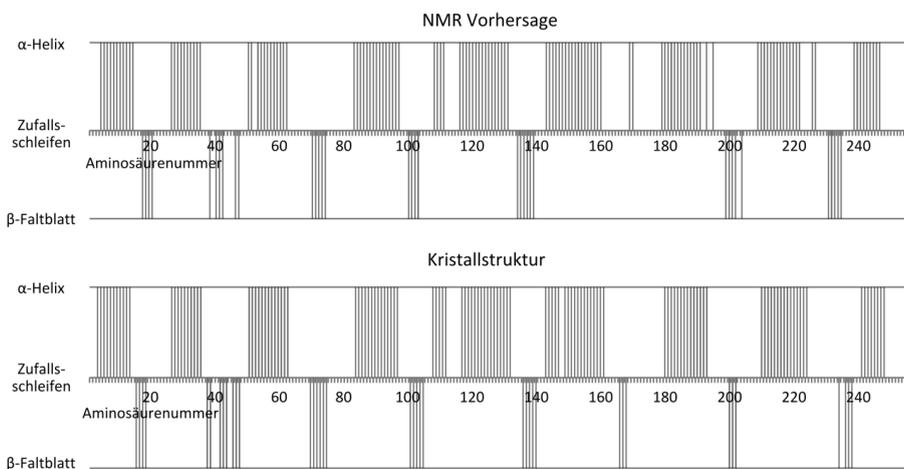


Abbildung 3-41: Vergleich der Sekundärstrukturvorhersage mit CSI 2.0 und den Werten der 3D-Struktur der monomeren DERA. Die Sekundärstrukturvorhersage auf Basis der NMR-Daten wurde aus den chemischen Verschiebungen der C_{α} , H_N , N_H und C_D Atome des Proteinerückgrates berechnet. Die Werte der entsprechenden Sekundärstrukturelemente der Aminosäuren in der Kristallstruktur wurden mit Hilfe des Wasserstoffbrücken-Vorhersagealgorithmus (engl. *hydrogen bond estimation algorithm*, DSSP) bestimmt.^[183]

Basierend auf der Rückgrat-Zuordnung wurde die Verteilung der chemischen Verschiebung (engl. *chemical shift perturbation*) für alle Resonanzen vor und nach Acetaldehyd-Inkubation nach *Tochio et al.*^[184] berechnet und diese farblich in der Kristallstruktur der DERA gekennzeichnet (siehe Abbildung 3-42). Diese Methode wird allgemein dazu verwendet, die Unterschiede von chemischen Verschiebungen in 2-dimensionalen NMR-Spektren zu quantifizieren. Man erkennt, dass nur im inneren Bereich der DERA, insbesondere in der Region, in der auch das natürliche Substrat binden würde, Unterschiede in der chemischen Verschiebung gemessen wurden. Aus dieser Analyse ergibt sich die Schlussfolgerung, dass nach der Entfernung des Acetaldehyds (**3**) aus der Lösung das Substrat und/oder Reaktionsprodukte im Bereich der Substratbindetasche bleiben und anscheinend das aktive Zentrum der DERA blockieren.



Abbildung 3-42: Basierend auf der Rückgrat-Zuordnung wurde die Verteilung der chemischen Verschiebung vor und nach Acetaldehyd-Inkubation der DERA berechnet und die Struktur des Enzyms diesbezüglich farblich gekennzeichnet. Der Unterschied variierte von schwarz (0 ppm) bis rot (> 5 ppm). Das natürliche Substrat (2-Deoxy-D-ribose-5-phosphat, übernommen aus der PDB-ID 1JCL) wurde zur Orientierung in die Struktur eingefügt. Dieses ist im Kugel-Stab-Modell farblich gekennzeichnet (Phosphor orange, Sauerstoff rot und Kohlenstoff grün).

3.3.4 Identifikation und Lokalisation der Reaktionsprodukte

Die DERA katalysiert eine sequenzielle Aldolreaktion, bei der Aldolprodukte zwischen zwei oder drei Acetaldehyd-Molekülen (**3**) gebildet werden. Das zweite Produkt wird durch eine spontane Zyklisierung weiter zu einem Lactol **11** umgesetzt.^[101] Des Weiteren wird durch Addition oder Eliminierung von Wassermolekülen die Diversität der möglichen Reaktionsprodukte erhöht. Eine Identifizierung aller Verbindungen, die im Laufe der DERA-Reaktion entstehen, könnte helfen, potentielle Kandidaten zu detektieren, welche die Bindungstasche der DERA blockieren. Außerdem würde dies Informationen über die Bildung von Nebenprodukten während der Reaktion liefern. Da eine Trennung und Isolierung der Verbindungen durch eine Säulenchromatographie auf Grund von deren Instabilität und wegen der geringen Substanzmenge schwer möglich sind, wurde die DERA über Nacht mit ¹³C-markiertem Acetaldehyd (**3**) inkubiert; und nach einer Separation der wässrigen Produktmischung vom Protein (VivaSpin Konzentrador) wurde diese mittels NMR über *constant-time*-HSQC und INADEQUATE (C-C-COSY), TOCSY und COSY Experimente analysiert. Dabei wurde die Zuordnung durch eine 2015 erschienene Publikation über NMR-Studien von Acetaldehyd (**3**) in wässriger Lösung unterstützt.^[185] Ein Überblick über alle identifizierten Reaktionsprodukte und deren mögliche Reaktionswege sind in Abbildung 3-43 dargestellt. Die entsprechende Zuordnung der NMR-Signale ist im Anhang

unter Kapitel 7.3.1 zu finden. Man erkennt, dass neben der Bildung des 3-Hydroxybutanals (**2**) und des (3*R*,5*R*)-2,4,6,-Trideoxyhexapyranosids (**11**) als das ersten und zweiten Aldolprodukt der DERA-katalysierten Reaktion auch eine Hydratisierung der offenkettigen Aldehyde zu 1,1-Dihydroxyethan (**12**) und 1,1,3-Trihydroxybutan (**13**) sowie die Eliminierung von 3-Hydroxybutanals (**2**) zum Crotonaldehyd (**1**) stattfindet. Außerdem konnten mit Acetat (**14**) und Paraldehyd (**15**) das Oxidations- bzw. das Polymerisationsprodukt des Acetaldehyds (**3**) beobachtet werden. Die Analyse macht daher deutlich, dass Acetaldehyd (**3**) eine hochreaktive Verbindung ist und neben der DERA-katalysierten Aldoladdition eine Vielzahl von unerwünschten Nebenprodukten entstehen, welche neben ihrer möglichen Eigenschaft als irreversible Inhibitoren auch die Ausbeute der Reaktion senken können.

chemische Reaktion	Acetaldehyd	1. Aldolprodukt	2. Aldolprodukt(e) nach einer spontanen Zyklisierung	
DERA-katalysierte Reaktionen	 3 (13.0 %)	 2 (1.1 %)	 11a (15.9 %)	 11b (3.2 %)
+H ₂ O	 12 (21.6 %)	 13 (1.6 %)	—	
-H ₂ O	—	 1 (0.5 %)	—	
weitere Reaktionen von Acetaldehyd	Oxidation 14 (*)	Polymerisation 15 (43.2 %)	*Integral konnte auf Grund von Signalüberlappungen nicht bestimmt werden	

Abbildung 3-43: Reaktionsprodukte der DERA-katalysierten Aldolreaktion von ¹³C-markiertem Acetaldehyd (3**).** Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen zu den entsprechenden Reaktionsprodukten ist im Anhang unter 7.3.1 zu finden. Die Prozentzahlen zeigen den Anteil der jeweiligen Moleküle (in Molprozent) an, welche durch Signalintegration im Protonenspektrum ermittelt wurde. Die Werte beziehen sich dabei auf das Verhältnis zu allen Verbindungen, bei denen ein Integral bestimmt werden konnte.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob diese Reaktionsprodukte an die DERA binden. Dazu wurde eine (unmarkierte) DERA mit ¹³C-markiertem Acetaldehyd (**3**) inkubiert und nach

einigen Waschschrinen ein 1D- ^{13}C -Spektrum aufgenommen (Abbildung 3-44). Es zeigte sich, dass in der Tat ^{13}C -markierte Verbindungen gefunden wurden. Während scharfe Signale (z. B. bei 60 und 33 ppm) darauf hindeuten, dass sich noch immer freie Aldolprodukte in der Lösung befinden (möglicherweise auf Grund eines Gleichgewichtes zwischen proteingebundenem und freiem Zustand), erscheinen einige breitere Signale z. B. bei 54 und 47 ppm. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Moleküle an die DERA gebunden sind bzw. mit ihr wechselwirken.

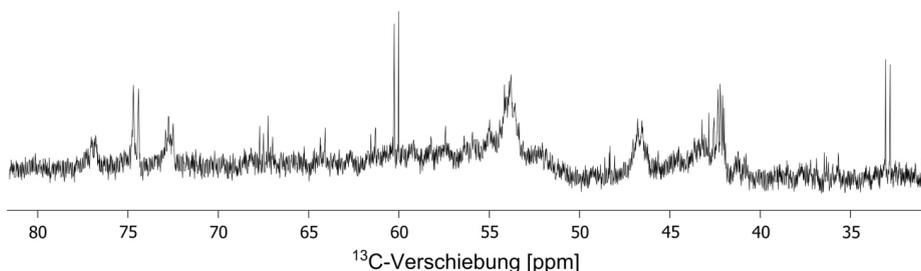


Abbildung 3-44: Auszug aus dem ^{13}C Spektrum der unmarkierten DERA nach Inkubation in ^{13}C -markiertem Acetaldehyd (**3**). Nach der Inkubation wurden die niedermolekularen (^{13}C -markierten) Verbindungen herausgewaschen.

Um diesem Hinweis weiter nachzugehen, wurden DOSY-Messungen durchgeführt, welche verwendet werden, um den Diffusionskoeffizienten der ^{13}C -markierten Verbindungen zu bestimmen, welcher direkt mit dessen Molekulargewicht korreliert (im folgenden Kapitel in Abbildung 3-48 dargestellt). Mit dieser Analyse konnte die Diffusionskonstante der Reaktionsprodukte des ^{13}C -markierten Acetaldehyds ermittelt und daraus abgeleitet werden, dass die Verbindungen teilweise im Größenbereich von Makromolekülen diffundieren. Somit wurde gezeigt, dass Acetaldehyd und/oder dessen Reaktionsprodukt(e) eine kovalente Bindung bzw. eine Wechselwirkung mit der DERA eingeht.

3.3.5 Reaktivierung der DERA durch Erhitzen

Die Erkenntnis, dass Reaktionsprodukte (bzw. ein Reaktionsprodukt) der DERA-katalysierten Reaktion mit dem Protein interagieren und so möglicherweise die Bindungstasche blockieren, wurde als Ausgangspunkt genutzt, um Strategien zu entwickeln, die Inaktivierung zu verhindern bzw. wieder rückgängig zu machen. Eine Möglichkeit bestand darin, zu testen, ob man durch einen einfachen Heizschritt die Aktivität wieder herstellen kann, indem die kovalente Bindung/Interaktion der Produkte mit der DERA gelöst wird. Da der dimere Wildtyp des Enzyms eine relativ hohe Thermostabilität aufweist und während einer Über-Nacht-Inkubation bei 55 °C

stabil bleibt (die monomere Variante bei 50 °C, vgl. dazu Kapitel 3.2.3), wurde das Enzym nach der Acetaldehyd-Inkubation mit anschließendem Entfernen der Reaktionsprodukte auf die entsprechende Temperatur erhitzt und in ausgewählten Zeitabständen die relative Aktivität (bezogen auf das unbehandelte Enzym) gemessen. Das in Abbildung 3-45 gezeigte Ergebnis macht deutlich, dass die Hitzeinkubation dazu führt, dass die Aktivität des Enzyms wieder hergestellt wird. Insgesamt war es möglich, 70 % der Wildtyp-Aktivität nach ca. 6 h Inkubation zurückzugewinnen. Ein ähnliches Ergebnis konnte beim Monomer erreicht werden. Hier wurde über 50 % der Aktivität nach mehr als 4 h erhalten.

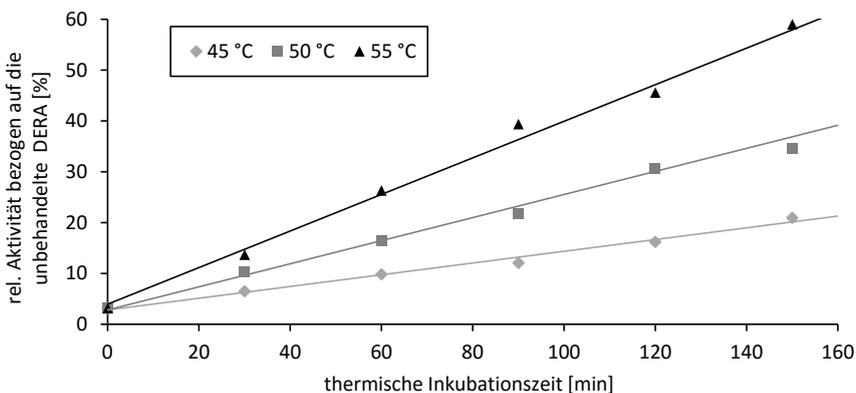


Abbildung 3-45: Reaktivierung der DERA (dimerer Wildtyp) nach Acetaldehyd-Inkubation durch Erhitzen bei verschiedenen Temperaturen.

Im Folgenden wurde untersucht, ob der Hitzeschritt auch die NMR-Spektren nach Acetaldehyd-Inkubation beeinflusst. Auf der Proteinebene verursacht die Hitzereaktivierung Signalverschiebungen im TROSY-Spektrum der ^{15}N -markierten DERA (siehe Abbildung 3-46). Während einige chemische Verschiebungen an der Position blieben, wo sie auch nach der Substratbehandlung zu sehen waren, wurden andere zu ihrer ursprünglichen Position zurückverschoben (z. B. bei ca. 10 ppm ^1H -Verschiebung und 107 ppm ^{15}N -Verschiebung). Teilweise waren auch Signale an beiden Positionen (^1H : 9.7 ppm und ^{15}N : 119 ppm) oder an einer neuen Stelle (^1H : 8.6 ppm und ^{15}N : 110 ppm) zu beobachten. Dieses Spektrum kann als ein Gleichgewicht oder eine Mischung zwischen der aktiven und inaktiven Form der DERA interpretiert werden, welches auch mit den kinetischen Daten übereinstimmt, bei der ca. 50 % der ursprünglichen Aktivität wieder hergestellt werden konnte. Auch das ^{13}C -Spektrum der DERA nach Inkubation mit markiertem Substrat wurde nach dem Hitzeschritt wiederholt.

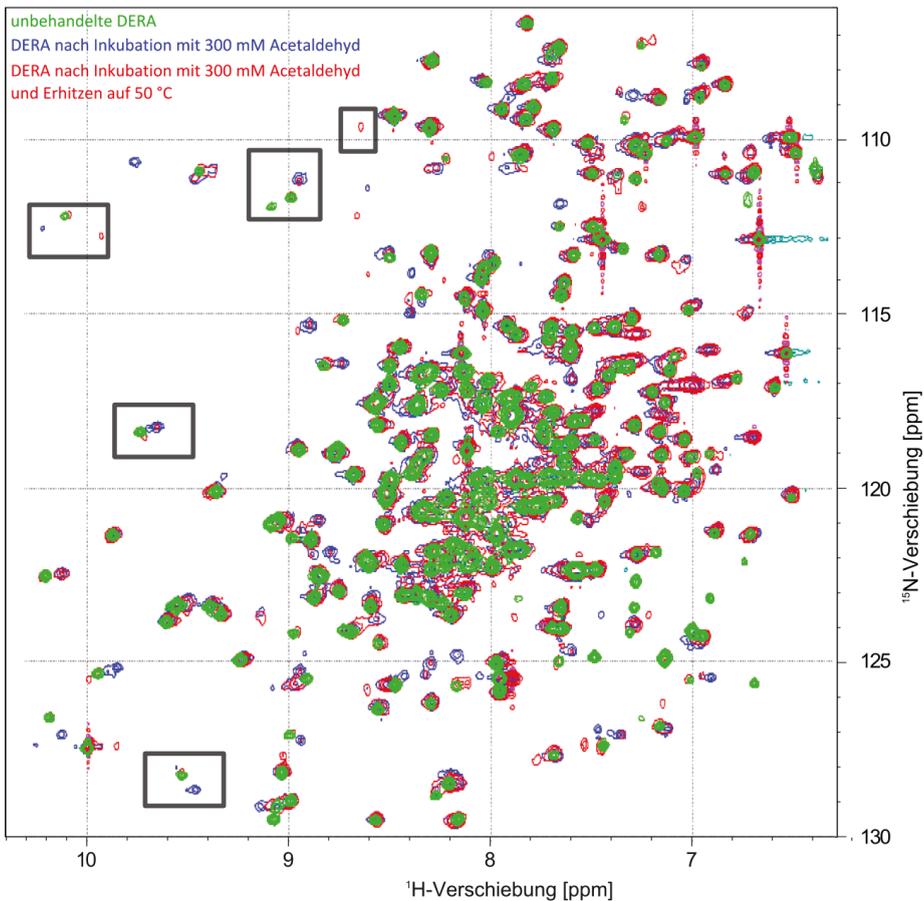


Abbildung 3-46: Ausschnitt der HSQC-Spektren der DERA in drei verschiedenen Zuständen (unbehandelt, Inkubation mit Acetaldehyd (3), nach einem zusätzlichen Hitzeschritt). Beide Acetaldehyd-behandelte Proben wurden vor der Messung durch einen Waschschrift von den niedermolekularen Verbindungen gereinigt. Die im Spektrum markierten Bereiche zeigen beispielhafte Signale, bei denen durch den Hitzeschritt eine Veränderung der chemischen Verschiebung zu beobachten war.

In Abbildung 3-47, bei der ein Ausschnitt beider Spektren vor und nach dem Erhitzen verglichen wird, ist zu sehen, dass insbesondere die Fläche der breiten Signale durch diesen Schritt verringert wurde, was dafür spricht, dass Aldolprodukte vom Protein gelöst wurden. Wie erwartet, konnte dieselbe Beobachtung auch im DOSY-Spektrum (Abbildung 3-48) gemacht werden, indem die Signale der Verbindungen, welche bezogen auf die Größe vor dem Erhitzen im Proteinbereich erschienen sind, nun teilweise einen niedrigeren Diffusionskoeffizienten aufweisen, welcher niedermolekularen Verbindungen entspricht.

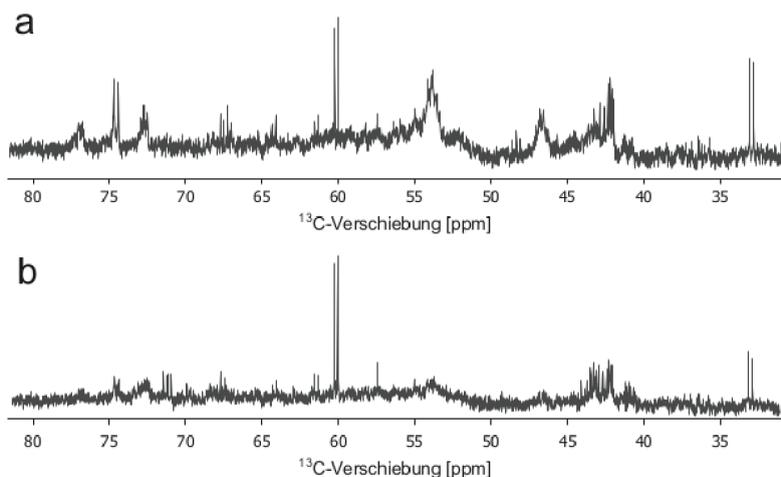


Abbildung 3-47: Auszug aus den ¹³C Spektren der unmarkierten DERA nach Inkubation in ¹³C-markiertem Acetaldehyd (3). (a) 1D Spektrum, welches nach dem Entfernen der freien Reaktionsprodukte aufgenommen wurde. (b) Dieselbe Proteinprobe wurde zusätzlich 4h bei 50 °C erhitzt. Die Messungen selbst erfolgten beide Male bei 25 °C.

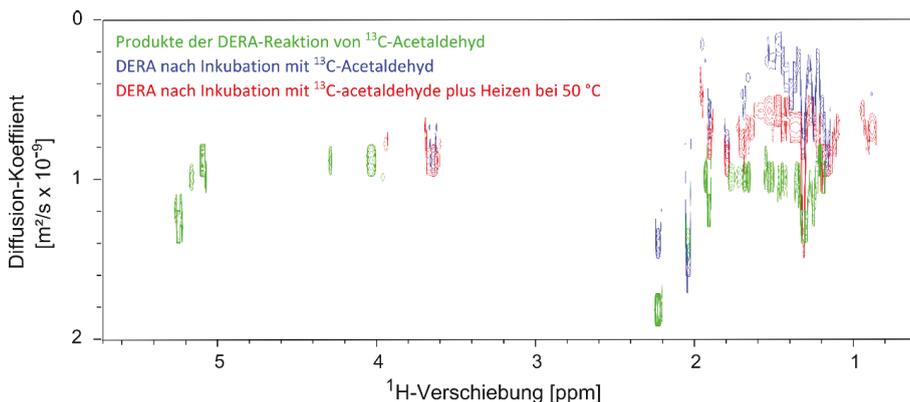


Abbildung 3-48: DOSY-HSQC-Spektrum der mit ¹³C-Acetaldehyd (3) inkubierten DERA vor und nach dem Erhitzen bei 50 °C sowie der Produkte der DERA-katalysierten Reaktion (als Referenz für niedermolekulare Verbindungen). Makromoleküle wie z. B. Proteine haben typischerweise einen Diffusionskoeffizienten im Bereich von 10⁻¹⁰m²/s in wässriger Lösung, während kleine Moleküle wie Acetaldehyd (3) um mindestens eine Potenz schneller diffundieren.^[186-187] Die Signale in der Region bei 1-1.8ppm können den aliphatischen Kohlenstoffatomen und unter 1.5ppm den Methylgruppen zugeordnet werden. Signale bei 3.6ppm werden wahrscheinlich durch Glycerin-Reste in der Lösung verursacht, während die chemischen Verschiebungen von > 4 ppm von den Aldolprodukten stammen (vgl. 7.3.1). Nach dem Erhitzen auf 50 °C verschieben sich die Signale zwischen 2-1.8ppm zu einem höheren Diffusionskoeffizienten, welches dafür spricht, dass sich die Verbindungen (teilweise) von Protein gelöst haben.

3.3.6 Kristallstrukturen der DERA nach Acetaldehyd-Inkubation

Durch die NMR Analysen wurden die Informationen gewonnen, dass (ein) Reaktionsprodukt(e), welche durch die DERA-katalysierte Reaktion entstehen, an das Proteinzentrum binden und es deshalb inaktivieren. Bis jetzt war es aber nicht möglich, die Molekülstruktur der Verbindung(en) zu bestimmen und deren exakte Bindestelle in der DERA zu ermitteln. Daher wurde versucht, die Kristallstruktur des Enzyms für die drei Zustände (vor und nach Acetaldehyd-Inkubation sowie nach dem Erhitzen) zu bestimmen. Es konnten Kristalle für alle drei Varianten unter denselben Bedingungen gefunden werden, welche in Tabelle 3-11 aufgelistet sind. Anschließend wurden die Beugungsmuster bestimmt und Datensätze von 1.1 Å (natives Enzym) bis 1.45 Å (nach Hitzeschritt) erhalten werden. Die kristallographischen Daten und deren Verfeinerungsstatistik sind in Tabelle 3-14 dargestellt. In Abbildung 3-49 ist ein Einblick in das katalytische Zentrum der Strukturen vor und nach Acetaldehyd-Inkubation dargestellt.

Tabelle 3-13: Kristallisationsbedingungen für monomere DERAs aus *E. coli* (K58E-Y96W)

	keine Behandlung	+Acetaldehyd	+Acetaldehyd/Hitze
Konz. [mg/mL]	10-20	10-20	10-20
Polyethylenglykol	20 % (w/v) PEG4000	20 % (w/v) PEG4000	20 % (w/v) PEG4000
Salz	20 % (v/v) 2-Propanol	20 % (v/v) 2-Propanol	20 % (v/v) 2-Propanol
Puffer	0.1 M HEPES pH 7.5	0.1 M HEPES pH 7.5	0.1 M HEPES pH 7.5

Tabelle 3-14: Kristalldatensammlung und Verfeinerungsstatistik der monomeren DERA (K58E-Y96W)

	Natives Enzym	Nach Acetaldehyd- Inkubation	Nach Acetaldehyd- Inkubation und Erhitzen
PDB-Codes	5EKY	5EL1	5EMU
Datensammlung			
Raumgruppen	C2	P6 ₁ 22	C2
Zelldimensionen			
<i>a, b, c</i> [Å]	110.79, 53.36, 37.84	110.83, 53.30, 37.81	110.78, 53.30, 37.86
<i>a, b, g</i> [°]	98.30	98.29	98.31
Auflösung [Å]	47.98-1.10 (1.13-1.10)*	47.94-1.25 (1.28-1.25)	47.93-1.50 (1.54-1.50)
CC _{1/2} [%]	99.7 (77.5)	99.3 (89.0)	99.6 (62.6)
<i>R</i> _{meas} [%]	6.4 (49.4)	8.8 (38.8)	9.6 (69.1)
<i>I</i> / <i>σ</i>			
Vollständigkeit [%]	9.78 (2.17)	8.63 (2.68)	8.66 (1.77)
Redundanz	97.4 (95.0)	97.7 (90.7)	98.5 (96.3)
Verfeinerung			
Auflösung [Å]	47.98-1.10	47.94-1.25	47.93-1.50
Anzahl der Reflexe	86,043	58,906	34,541
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} [%]	12.11 / 14.36	11.66 / 14.37	15.03 / 17.48
Anzahl der Atome**			
Protein	2118	2081	2051
Liganden/Ionen	27	20	20
Wasser	353	338	306
<i>B</i> -Faktoren [Å ²]			
Protein	13.0	50.4	17.1
Liganden/Ionen	12.8	69.3	23.5
Wasser	30.0	48.5	32.1
RMSD			
Bindungslänge [Å]	0.010	0.006	0.007
Bindungswinkel [°]	1.187	0.903	0.887

*Daten in Klammern beziehen sich auf die Werte der Hülle mit der höchsten Auflösung

**die Nummerierung schließt alternative Konformationen mit ein

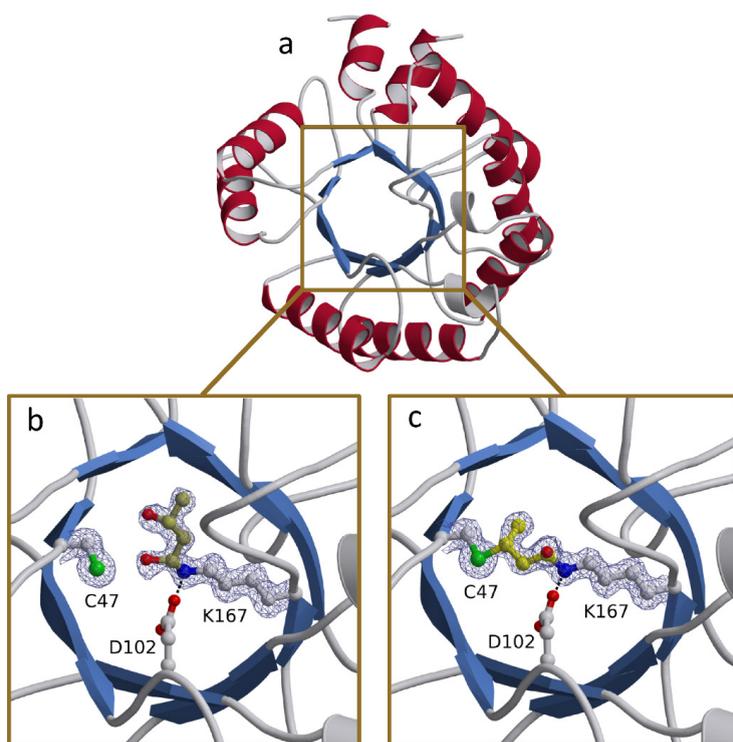


Abbildung 3-49: (a) Kristallstruktur der monomeren DERA_{EC} und Einblick in das katalytische Zentrum des Enzyms (b) vor und (c) nach Acetaldehyd-Inkubation. Die Aminosäuren sowie das kovalent gebundene Substrat sind im Kugel-Stab-Modell farbig gekennzeichnet (Stickstoff blau, Sauerstoff rot, Schwefel gelb, Kohlenstoff in Weiß für die Aminosäuren und in Gelb für das Substrat).

Alle drei Enzymvarianten waren in ihrer Gesamtstruktur nahezu identisch (RMSD nach der Superpositionierung aller nicht-Wasserstoffatome betrug maximal 0.4\AA), die Unterschiede waren auf das katalytische Zentrum beschränkt. Die unbehandelte DERA zeigt eine Elektronendichte für ein Sechsatommolekül mit einem Besetzungsgrad von ca. 70%, welches kovalent mit dem katalytischen K167 verknüpft ist (siehe Abbildung 3-49b). Die Molekülstruktur des Liganden entspricht dabei dem 3-Hydroxybutanal (**2**) als das Aldolprodukt von zwei Acetaldehyd-Molekülen (**3**), welches ein Hemiaminal (eine hydratisierte Schiff'sche Base) mit der Aminogruppe des Lysins ausbildet. Wenn man davon ausgeht, dass diese Art der Bindung durch den bereits etablierten katalytischen Mechanismus der DERA gebildet wird,^[87] kann dieses Ergebnis durch die Präsenz von Acetaldehyd-Spuren im Zellextrakt oder den Kristallisationslösungen erklärt werden. Es bleibt also festzuhalten, dass das im katalytischen Zentrum gefundene Reaktionsintermediat die Aldolase Aktivität des Proteins widerspiegelt. Nach der Acetaldehyd-Inkubation kristallisiert sich (im wahrsten Sinne des Wortes) ein ganz anderes Bild heraus: Der

Ligand hat seine Orientierung geändert und hat eine neue, kovalente Bindung mit dem Schwefelatom des C47 gebildet (Abbildung 3-49c). Im Vergleich zum Liganden der nativen Struktur besteht dieses Substrat nur aus fünf (nicht-Wasserstoff-) Atomen. Im kommenden Kapitel wird ein detaillierter Mechanismus für die Entstehung dieses Moleküls postuliert. An dieser Stelle sei nur bereits erwähnt, dass die Präsenz eines solchen Thioether-Addukts eine mögliche Erklärung für die Inhibierung der DERA durch Acetaldehyd (**3**) liefert, da dies das in der vorgehenden Kapiteln beschriebene Reaktionsprodukt sein könnte, welches das aktive Zentrum des Enzyms blockiert. Die Struktur nach dem Erhitzen zeigte dieselbe Elektronendichte wie vor dem Erhitzen, jedoch ist der Besetzungsgrad geringer geworden (0.65 an Stelle von 0.77). Dies deutet darauf hin, dass das Substrat teilweise die kovalenten Bindungen zum Enzym gelöst hat.

3.3.7 Postulierter Inaktivierungsmechanismus

Die Kristallstrukturen nach Acetaldehyd-Inkubation zeigen im Vergleich zur nativen Form zwei entscheidende Unterschiede bezüglich des am katalytischen Lysin gebundenen Liganden: Erstens fehlt die Hydroxylgruppe des C β -Atoms und zweites ist das Substrat eine kovalente Bindung mit C47 eingegangen. Wie in Abbildung 3-50 gezeigt, entsprechen die ersten Schritte des postulierten Inaktivierungsmechanismus dem katalytischen Mechanismus der DERA-Reaktion: Acetaldehyd (**3**) bildet mit K167 eine Schiff'sche Base aus, welches den Angriff auf das zweite Aldehyd ermöglicht. Anschließend wird nun ein Wassermolekül abgespalten und es entsteht ein konjugiertes n-System.

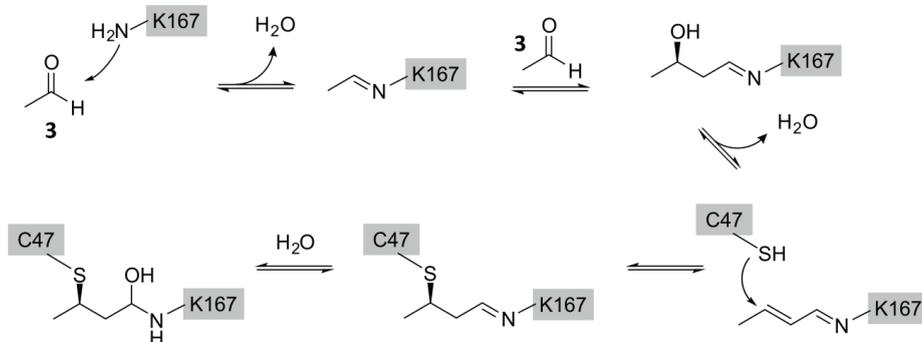


Abbildung 3-50: Postulierter Reaktionsmechanismus, durch den die DERA – ausgehend von Acetaldehyd (3**) – inaktiviert wird.** Nach der Aldoladdition der zwei Acetaldehyde (**3**) wird ein Wassermolekül aus dem gebildeten Addukt abgespalten, gefolgt von einer Michael-Addition durch C47. Die Hydratation der Doppelbindung führt zu der finalen Verbindung, welche zwischen den beiden Aminosäuren in der Kristallstruktur nach Acetaldehyd-Inkubation gefunden wurde.

Wird die Iminbindung hydrolytisch gespalten, ist das gebildete Reaktionsprodukt Crotonaldehyd (**1**), welches bereits in den NMR-Studien als ein mögliches Produkt der DERA-katalysierten Reaktion von Acetaldehyd (**3**) identifiziert werden konnte (siehe Abbildung 3-43). Alternativ kann sich jedoch das Addukt zum C47 hin orientieren, sodass das Schwefelatom des Cysteins das sp^2 -hybridisierte C_β -Atom des Substrats nukleophil in einer Michael-Addition angreifen kann und somit eine zweite, kovalente Bindung eingeht. Durch eine Wasseraddition im letzten Reaktionsschritt entsteht ein Addukt, welches kovalent mit C47 und K167 verbunden ist und der beobachteten Elektronendichte aus der Kristallstruktur nach Acetaldehyd-Inkubation entspricht.

Nach diesem Mechanismus wäre also nicht Acetaldehyd (**3**) selbst, sondern Crotonaldehyd (**1**) die „toxische“ Verbindung, welche die DERA durch eine kovalente Bindung als sog. Suizid-Inhibitor inaktiviert. Wenn diese Hypothese stimmt, wäre davon auszugehen, dass Crotonaldehyd (**1**) im Vergleich zu Acetaldehyd (**3**) bei deutlich niedrigeren Konzentrationen das Enzym inhibiert (In der in Abbildung 3-43 gezeigten Auflistung der Reaktionsprodukte liegt es, verglichen mit Acetaldehyd (**3**), nur in deutlich geringeren Mengen vor). Deswegen wurde der Einfluss dieses Substrats auf die DERA-Aktivität getestet, indem es in verschiedenen Konzentrationen mit dem Enzym inkubiert wurde und nach bestimmten Zeitabständen die relative Aktivität gemessen wurde. Aus dem in Abbildung 3-51 gezeigten Ergebnis wird deutlich, dass die DERA schon bei einer Crotonaldehyd-Konzentration von 5 mM nach ca. 30 min keine Aktivität mehr zeigt und auch bei 0.5 mM ein Effekt zu beobachten ist. Vergleicht man dies mit der zeit- und konzentrationsabhängigen Inhibierung durch Acetaldehyd (**3**), wird deutlich, dass der Inhibierungseffekt mehr als 100-fach stärker ist. Somit wird der postulierte Mechanismus der DERA-Deaktivierung durch diesen Suizid-Inhibitor mit diesem Ergebnis weiter unterstützt.

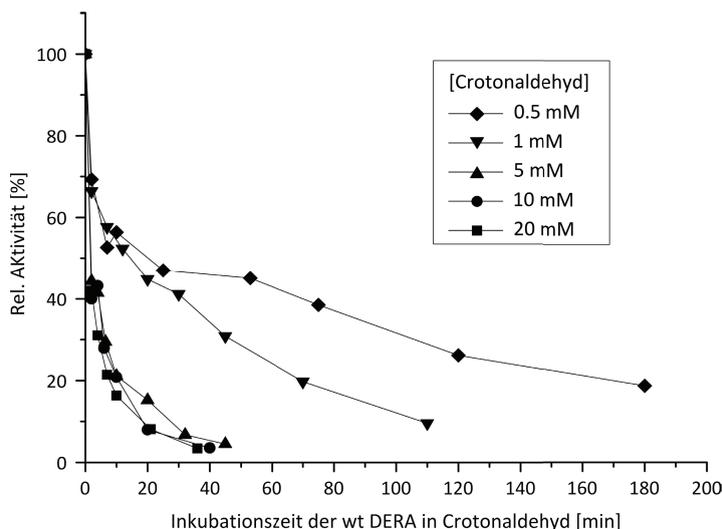


Abbildung 3-51: Zeitabhängige, relative Aktivität während der Inkubation der wt-DERA in verschiedenen Crotonaldehyd-Konzentrationen. Die Enzymkonzentration betrug ca. 1 mg/ml.

Es ist wichtig, zu erwähnen, dass schon im Jahr 1976, lange Zeit bevor strukturelle Informationen über dieses Enzym bekannt waren, von Herrn Wilton Acrolein (Propenal) als irreversibler Inhibitor der DERA identifiziert wurde und dieser einen Inaktivierungsmechanismus postuliert hat, bei dem eine Schiff'sche Base des Aldehyds mit dem katalytischen Lysin gebildet wird und dann im zweiten Schritt ein damals unbekanntes Nukleophil mit einer Michael-Addition eine kovalente Bindung mit dem Substrat eingeht.^[188] Somit konnte jetzt gezeigt werden, dass dieses Nukleophil C47 ist und derselbe Reaktionsmechanismus auch mit Crotonaldehyd (**1**) als Substrat abläuft.

Man kann also zusammenfassend festhalten, dass Aktivitäts- und NMR-Messungen, sowie die Elektronendichte der Röntgenkristallstrukturaufklärung Ergebnisse liefern, durch die Crotonaldehyd (**1**) als Inhibitor identifiziert und auch durch letztere Methode die Position im Protein, nämlich zwischen K167 und C47, bestimmt werden konnte. Weiterhin offen bleibt die Orientierung des Substrats im Enzym. Bisher wurde davon ausgegangen, dass der nukleophile Angriff auf das sp^2 -Kohlenstoffatom durch die Thiolgruppe des C47 erfolgt. Die Addition eines Wassermoleküls führt zu dem hydroxyliertem Kohlenstoff, welchen kovalent mit dem Stickstoff des K167 verknüpft ist. In einem in Abbildung 3-52 gezeigten alternativen Reaktionsmechanismus könnte die Aminogruppe des K167 die Michael Addition durchführen, während der nukleophile Angriff auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Crotonaldehyds (**1**) durch C47 erfolgt.

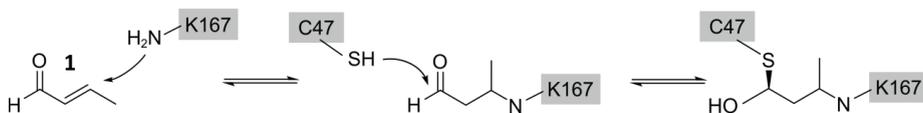


Abbildung 3-52: Alternativer Reaktionsmechanismus, welcher zur Inaktivierung der DERA führt. Das Stickstoffatom von K167 agiert als Nukleophil für die Michael Addition des sp^2 hybridisierten C_β -Atoms, während die Aldehydfunktion des Crotonaldehyds (**1**) eine Thiohemiacetalbindung mit dem Cystein eingeht.

Betrachtet man lediglich die Elektronendichte des Liganden, ist die daraus resultierende, umgekehrte Orientierung des Liganden denkbar, bei der der mit dem Schwefel verknüpfte Kohlenstoff hydroxyliert ist (siehe Abbildung 3-53). Für diese zweite Orientierung würde die polare Umgebung im Bereich zwischen K47 und K201 entsprechen. Somit könnte sich die OH-Gruppe in das Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen T18, D16 und K201 einordnen, wie in Abbildung 3-54 deutlich zu erkennen ist.

Unter Berücksichtigung dieser beiden möglichen Orientierungen des kovalent gebundenen Liganden im Protein wurde versucht, eine Zuordnung des in Abbildung 3-44 gezeigten ^{13}C -Spektrums [nach Inkubation der DERA mit ^{13}C -Acetaldehyd (**3**)] durchzuführen. Dazu wurde, wie in Abbildung 3-55 gezeigt, die chemische Verschiebung der Kohlenstoffatome von beiden Liganden vorhergesagt und überprüft, ob ein entsprechendes Signal im Spektrum vorhanden ist. Natürlich kann damit weder der eine noch der andere Mechanismus bewiesen werden, interessanterweise konnten jedoch für beide Spezies Signale identifiziert werden. Weitere NMR-Experimente, bei denen versucht wurde, eine Kopplung zwischen dem ^{15}N -Atom der Amino-Gruppe von K167 (des ^{15}N -markiertem Proteins) zu dem ^{13}C -markierten, kovalent gebundenen Kohlenstoffatom zu beobachten, um dann über die chemische Verschiebung rückschließen zu können, ob dieses Kohlenstoffatom methyliert oder hydroxyliert ist, scheiterten, da kein Signal gemessen werden konnte, welches im Bereich einer N-C-Verknüpfung war. Deshalb bleibt diese Frage letztendlich unbeantwortet, und daher wird im Ausblick auf weitere Methoden zur Beantwortung dieser Frage hingewiesen.

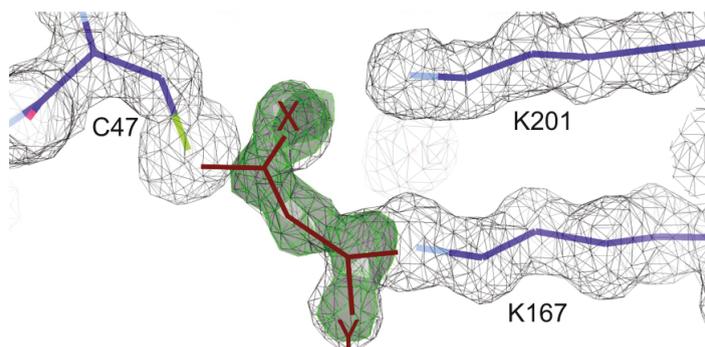


Abbildung 3-53: Ausschnitt aus der Elektronendichte im katalytischen Zentrum der DERA nach Acetaldehyd-Inkubation. Während das Kohlenstoffgerüst des Liganden mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden konnte, bleibt es aus rein kristallographischer Sicht unklar, ob $X=CH_3$ und $Y=OH$ oder umgekehrt $X=OH$ und $Y=CH_3$ ist.

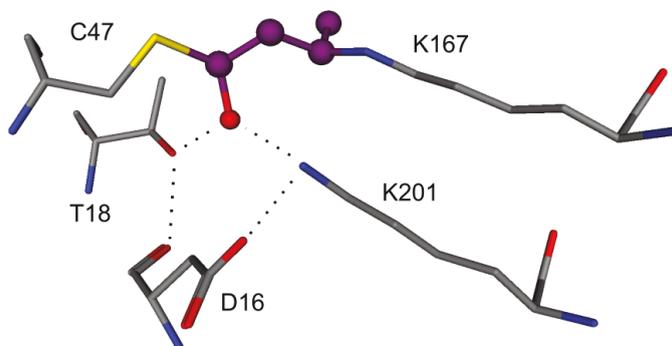


Abbildung 3-54: Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen T18, D16, K201 und der OH-Gruppe des Liganden, welches zustande kommen würde, wenn der Ligand so orientiert wäre, dass die OH-Gruppe direkt mit dem Thioether verknüpft wäre. Die Wasserstoffbrücken sind hier durch gepunktete Linien symbolisiert. Kohlenstoffatome des Liganden sind violett und die der Aminosäuren grau markiert. Sauerstoffe sind rot, Stickstoffe sind blau und das Schwefel-Atom ist gelb gekennzeichnet.

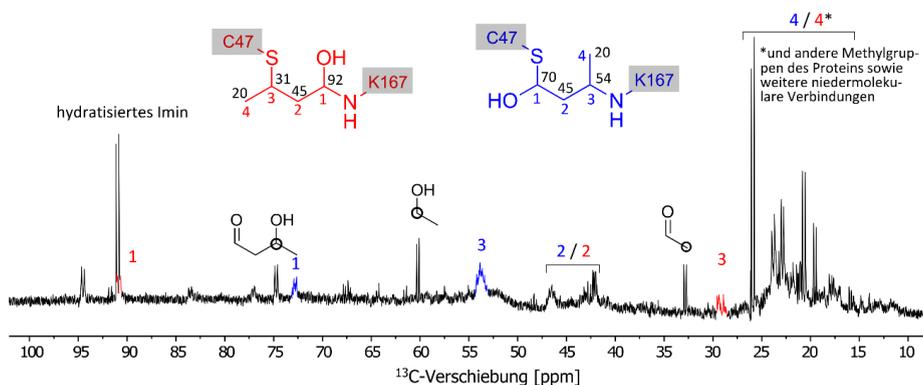


Abbildung 3-55: Postulierte Zuordnung des ^{13}C Spektrums der unmarkierten DERA nach Inkubation mit ^{13}C -markiertem Acetaldehyd (3) und dem Entfernen der Reaktionsprodukte. Die Zuordnung basiert auf einer Vorhersage der chemischen Verschiebungen.^[189] Diese berechneten Werte der entsprechenden Kohlenstoffatome (in ppm) sind in schwarz innerhalb der chemischen Strukturformel des postulierten (rot) und des alternativ gebundenen Liganden (blau) gekennzeichnet. Durch die farbige Nummerierung wird das jeweilige Atom gekennzeichnet, auf das sich die chemische Verschiebung im Spektrum bezieht. Während scharfe Signale wahrscheinlich durch die schnelle Rotation der kleineren Moleküle verursacht werden, können die breiten Signale den Verbindungen zugeordnet werden, welche mit dem Protein kovalent verknüpft sind.

Trotzdem bleibt diese zweite Orientierung eine eher unwahrscheinliche Variante. Zwar sind auch in der Natur Beispiele bekannt, bei dem der nukleophile Angriff der Thiolgruppe eines Cysteins an ein Aldehyd zur Bildung eines Hemithioacetals führt,^[190-191] jedoch müsste dann im zweiten Schritt die Aminogruppe des K167 die Michael-Addition durchführen. Dies ist jedoch unwahrscheinlicher, da der Stickstoff als eher harte Base weniger bevorzugt eine Bindung mit Kohlenstoff der C=C-Bindung eingeht als das Schwefelatom, welches auf Grund seiner höheren Polarisierbarkeit und seines größeren Ionenradius ein weiches Nukleophil ist.^[192] Außerdem erscheint in Anbetracht der natürlichen DERA-Reaktion die zweite Orientierung weniger wahrscheinlich, da das Enzym für die Ausbildung einer Schiff'schen Base zwischen K167 und einer Aldehyd-Funktion von der Natur optimiert wurde.

3.3.8 Acetaldehyd-Stabilität durch C47M Mutation

Um diese (irreversible) Deaktivierung zu verhindern, ist die Mutation des kritischen C47 eine mögliche Strategie, da K167 nicht ausgetauscht werden kann, ohne die katalytische Funktion des Enzyms zu verlieren. Ein Sequenzalignment der DERA_{EC} mit 3700 anderen DERA Strukturen ($\geq 20\%$ Sequenzidentität) zeigte, dass in 91% der Fälle ein Cystein an Position 47 (Nummerierung bezogen auf die DERA_{EC}) zu finden ist. Auch wenn diese Stelle somit relativ hoch konserviert ist, geht die katalytische Funktion des Enzyms durch einen Austausch an dieser Stelle

nicht verloren, welches auch durch Mutationsstudien von *Heine et al.* gezeigt werden konnte.^[87] Interessanterweise wurde bereits im Projekt A dieser Arbeit eine C47M-Mutante erstellt. Dabei sollte das Ziel erreicht werden, die Thermostabilität der DERA_{EC} zu erhöhen. Jedoch zeigte diese Mutation keinen Effekt bezüglich Hitzestabilität, da u.a. ein Schmelzpunkt von 66.5°C (im Vergleich zum Wildtyp mit 66.7°C) gemessen wurde (siehe Tabelle 3-1). Die spez. Aktivität dieser C47M-Mutante betrug 60±5% der Wildtyp-Aktivität. In Bezug auf dessen Eigenschaften als Nukleophil ist bei Methionin die Thiolgruppe methyliert. Somit kann zwar weiterhin ein nukleophiler Angriff stattfinden, jedoch ist die Methylgruppe (im Gegensatz zum Proton) keine gute Abgangsgruppe, sodass der in Abbildung 3-50 gezeigte Mechanismus in dieser Form nicht stattfinden kann.

Es wurden von beiden Enzymen (Mutante und Wildtyp, jeweils 2 mg/ml) die Substrattoleranz bezüglich 100, 200 und 300 mM Acetaldehyd getestet. Wie in Abbildung 3-56 zu sehen ist, ist die wt-DERA nach 3 h Inkubationszeit in 300 mM Acetaldehyd nahezu vollständig inaktiv, während in 100 mM Substratlösung ca. 50% Restaktivität nach 16 h vorhanden war.

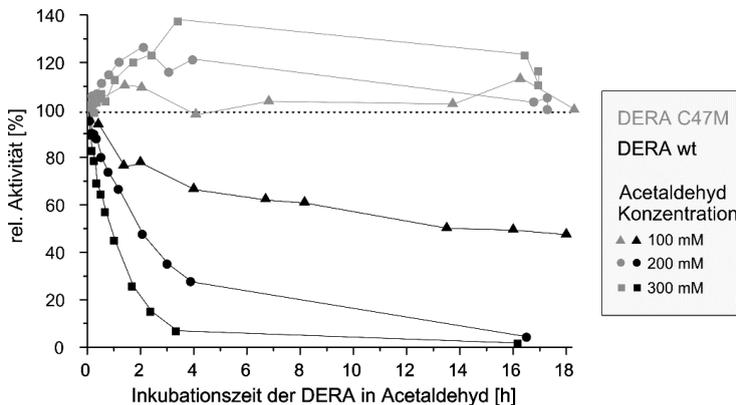


Abbildung 3-56: Zeitabhängige Aktivität der wt-DERA im Vergleich zur C47M-Mutante während der Inkubation bei verschiedenen Acetaldehyd-Konzentrationen. Die Proteinkonzentration betrug in beiden Fällen 2 mg/ml.

Dagegen verliert die C47M-Mutante auch nach 16 h Inkubation in 300 mM Acetaldehyd keine Enzymaktivität. Weitere Tests, wie in Abbildung 3-57 gezeigt, ergaben, dass sogar in 1 M Substratkonzentration das gleiche Ergebnis erzielt wurde.

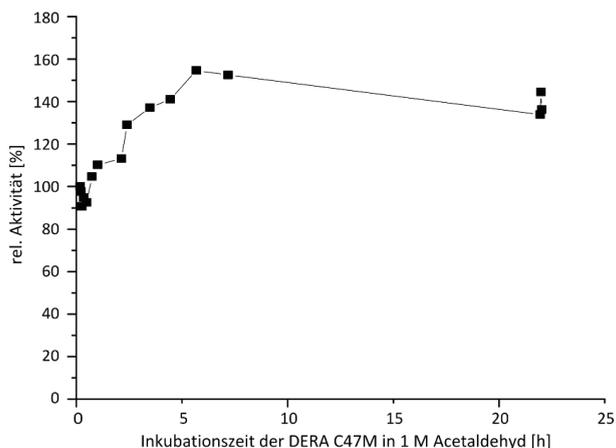


Abbildung 3-57: Zeitabhängige Aktivität der C47M-Mutante in 1 M Acetaldehyd.

Überraschenderweise stieg die Aktivität insbesondere bei den höheren Aldehydmengen auf bis zu 150% an. Dieses Ergebnis lässt sich damit erklären, dass das Gleichgewicht der Substrate in der Lösung verschoben wird. Wie in Abbildung 3-58 schematisch dargestellt (und im Methodenteil unter 6.4.6 erläutert), wird aus der Enzymlösung, welche auch die entsprechende Acetaldehyd-Menge enthält, 10 μ l zu den 390 μ l des Aktivitätsassays gegeben und anschließend indirekt die Bildung des Glycerinaldehyd-3-Phosphats (**5**) in einer Retro-Aldolreaktion gemessen.

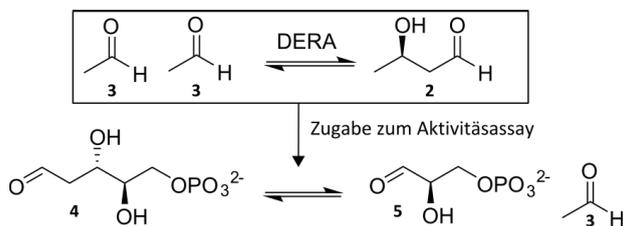


Abbildung 3-58: Schematische Darstellung beider kompetitiven Reaktionen, wenn die DERA, welche zur DSP (5**) als Substrat zugegeben wird, zuvor in Acetaldehyd (**3**) inkubiert wurde. Da Acetaldehyd (**3**) als Produkt der Retro-Aldolreaktion diese inhibiert, wird durch den Umsatz des Aldehyds dieser Inhibierungseffekt verringert.**

Da jedoch Acetaldehyd (**3**) das zweite Produkt dieser Reaktion ist, wird somit bei der Zugabe der Enzym- und Acetaldehydlösung eine Produktinhibierung verursacht. Dies spielte bisher eine untergeordnete Rolle, da dieser Effekt durch die Inaktivierung überlagert wurde. Da die neue Mutante nicht an Aktivität verliert, wird kontinuierlich das Aldolprodukt gebildet, sodass weniger Acetaldehyd (**3**) die Retro-Aldolreaktion inhibiert. Um den Effekt der Produktinhibierung zu verhindern, wäre es erforderlich, vor jeder Messung in einem genau definierten Zeitraum

das Enzym von den niedermolekularen Verbindungen zu trennen, was praktisch schwer realisierbar ist. Unabhängig davon bleibt das entscheidende Ergebnis, nämlich dass die C47M-Mutante auch nach längerer Inkubation in hohen Acetaldehyd-Mengen katalytisch aktiv bleibt, bestehen.

Ein weiterer Versuch sollte zeigen, wie sich die Mutante verhält, wenn sie direkt mit Crotonaldehyd (**1**) inkubiert wird. Der Wildtyp zeigte diesbezüglich schon in sehr geringen Mengen eine vollständige Inaktivierung (vgl. Abbildung 3-51). Eine Inkubation der C47M-Mutante in 20mM Crotonaldehyd (**1**) (die höchste, für den Wildtyp verwendete Konzentration) zeigte einerseits einen deutlichen Unterschied zum Wildtyp, andererseits ist ein zwar langsamer, aber erkennbarer Abfall der Aktivität zu erkennen.

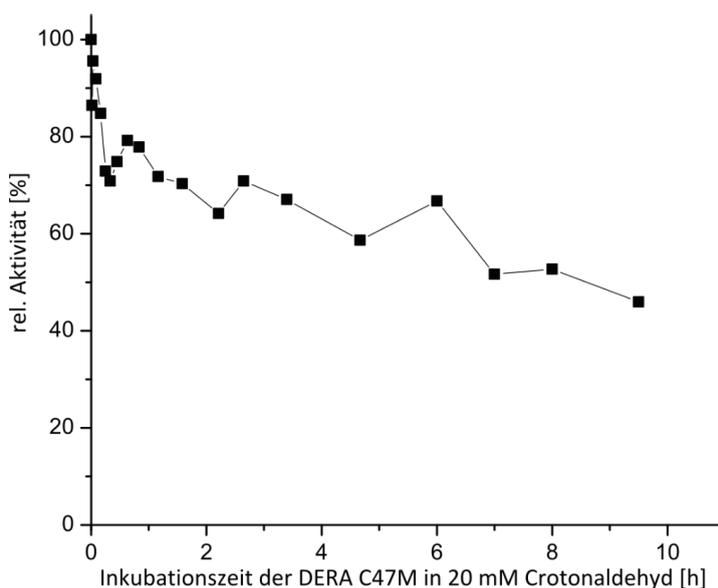


Abbildung 3-59: Zeitabhängige Aktivität der C47M-Mutante in 20mM Crotonaldehyd.

Was den Aktivitätsverlust verursacht, bleibt unklar. Anscheinend ist Crotonaldehyd (**1**) in der Lage, auch durch andere Mechanismen bzw. an anderen Positionen mit dem Protein zu reagieren oder durch eine Anlagerung an das Enzym eine Entfaltung und somit die Inaktivierung der DERA zu verursachen. Eine Untersuchung dieses Effektes wurde an dieser Stelle nicht durchgeführt. Im Rahmen der Fragestellung konnte dieses Experiment die bisherige Hypothese der Inaktivierung durch die Suizid-Inhibierung weiter bestätigen, da die Mutante auch gegenüber Crotonaldehyd (**1**) deutlich stabiler war als der Wildtyp. Dieser war unter denselben Bedingungen schon nach 20min vollständig inaktiviert.

3.3.9 NMR-Kinetik

Bisher wurde die höhere Acetaldehyd-Stabilität der C47M-Mutante nur über den indirekten Assay durch die Umsetzung des natürlichen Substrats getestet. Neben dem oben diskutierten Nachteil, dass durch die Inkubation des Enzyms in Acetaldehyd (**3**) das Gleichgewicht dieser Reaktion verschoben wird (vgl. Abbildung 3-58), ist die DERA in der Retro-Aldol-Richtung für eine synthetische Anwendung kaum von Interesse. Die Gründe, warum sie trotzdem zur Aktivitätsbestimmung der DERA verwendet wurde, sind einerseits, dass das verwendete Desoxy-D-ribose-5-phosphat das natürliche Substrat des Enzyms ist und somit eine hohe Aktivität gemessen werden kann und zum anderen durch die Kopplung an ein zweites Enzym (siehe Abschnitt 6.4.5) die Reaktion fotometrisch verfolgt werden kann. Somit ist eine relativ einfache und schnelle Messung der Aktivität möglich.

Um das Potential dieser neuen Mutante in der organischen Synthese zu testen, wurden Reaktionskinetiken sowohl von der DERA C47M als auch vom Wildtyp in Aldolrichtung – ausgehend von Acetaldehyd (**3**) als Substrat - durchgeführt. Dafür wurden beide Enzymvarianten in 300 mM und 1 M Acetaldehyd bei 25 °C inkubiert und der Reaktionsverlauf mittels NMR verfolgt. Die bereits zugeordneten NMR-Signale (vgl. Kapitel 7.3.1 im Anhang) wurden hierfür als Referenz verwendet. Die Experimente wurden von Carolin Bisterfeld durchgeführt, während die Vor- und Nachbereitung gemeinschaftlich erfolgte.

Wie in Abbildung 3-60 zu sehen ist, zeichnet sich ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Enzymen ab. Während beim Wildtyp in 300 mM Substrat nur geringe Mengen an Lactol **11** als finales Reaktionsprodukt zu sehen sind, wird bei den höheren Acetaldehydkonzentrationen fast kein Produkt gebildet, da die Aldolase wahrscheinlich sehr schnell inaktiviert wird. Im Gegensatz dazu zeigt die C47M Mutante einen schnelleren und kontinuierlichen Substratumsatz, bis das natürliche Gleichgewicht zwischen Edukt und Produkten erreicht ist. Somit konnte gezeigt werden, dass die durch die Retro-Aldolreaktion gemessenen Aktivitätswerte während der Acetaldehyd-Inkubation der C47M-Mutante direkt auf die für die Synthese relevante Aldolrichtung übertragen werden können. Der nächste Schritt wäre nun eine konkrete Anwendung der Mutante in einer organischen Synthese, um so z. B. zu zeigen, dass durch die Acetaldehyd-stabile Enzymvariante höhere Ausbeuten erzielt werden können, da ein vollständiger Substratumsatz möglich ist.

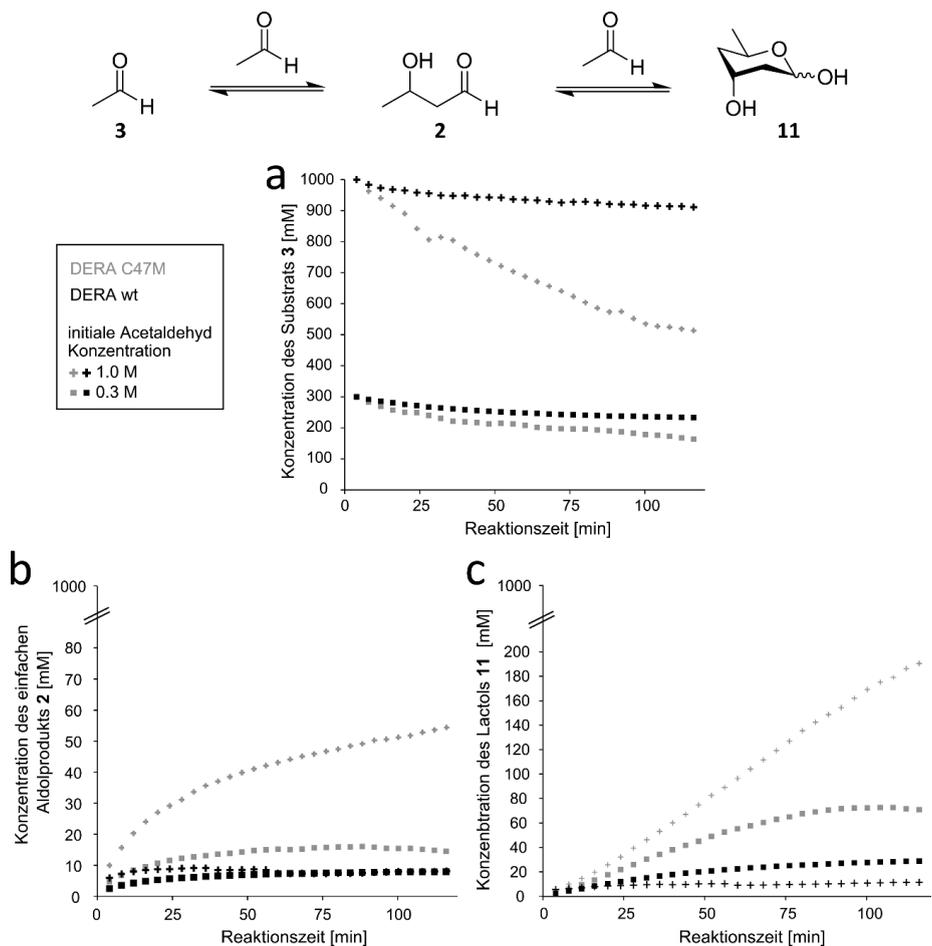


Abbildung 3-60: Zeitabhängiger (a) Substratumsatz des Acetaldehyds (3), Bildung (b) des einfachen Aldolprodukts 2 und (c) des Lactols 11 der wt-DERA und der C47M Mutante im Vergleich. Die Zu- bzw. Abnahme der Substanzen wurde über die Integration der ^1H -Signale im NMR Spektrum bestimmt. Das allgemeine Reaktionsschema ist oben abgebildet.

4 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst und in Bezug auf die aktuelle Literatur diskutiert werden. Anschließend werden im Ausblick Möglichkeiten zur Weiterführung der Projekte angesprochen.

4.1 Thermostabilität und extremophile DERAs

In dem ersten Teilprojekt (Projekt A) dieser Arbeit wurde versucht, in enger Zusammenarbeit mit Daniel B. Ciupka aus der Arbeitsgruppe *Computational Pharmaceutical Chemistry and Molecular Bioinformatics* von Herrn Prof. Holger Gohlke die Thermostabilität der DERA_{EC} zu erhöhen. Dabei wurden anhand der Berechnungen auf Seiten des Kooperationspartners Mutanten vorgeschlagen, welche anschließend im Labor getestet wurden. Mit einem aktivitätsbasierten Stabilitätsassay und der Bestimmung des Schmelzpunktes über CD-Spektroskopie wurden dabei zwei unabhängige Methoden verwendet. Neben vier Kontrollmutanten wurden insgesamt sieben Einzelmутanten erstellt, von denen zwei (V103M und F200I) die Stabilität um jeweils ca. 3K erhöhen konnten. Eine Kombination beider Mutationen erhöhte die Hitzeresistenz der DERA um 5.5K. Jedoch hatte diese Variante nur 25 % der Wildtyp-Aktivität.

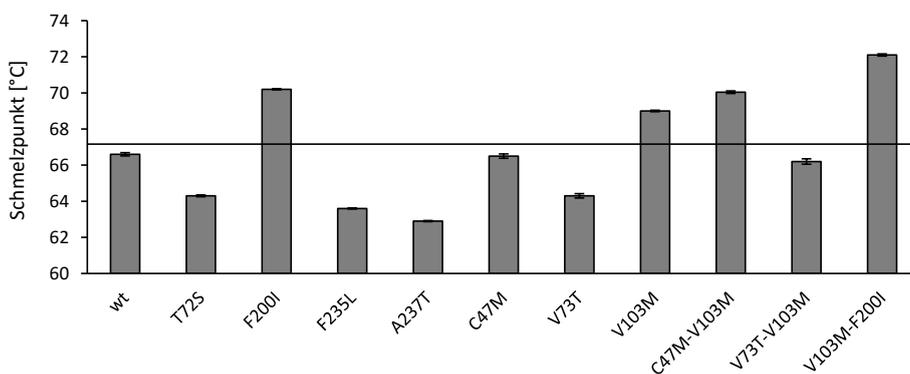


Abbildung 4-1: Schmelztemperaturen der Mutanten der DERA_{EC}, welche auf Basis der CNA-Berechnungen hergestellt wurden. Die Werte wurden über CD-Spektroskopie bei 222nm bestimmt. Kontrollmutanten sind nicht dargestellt. Die schwarze Linie repräsentiert den Schmelzpunkt der wt-DERA.

Eine fundierte Interpretation der Daten, um z. B. die Frage zu beantworten, wie erfolgreich diese Methode zur Vorhersage der Proteinestabilität im Vergleich zu anderen (in Kapitel 2.1.2 und 2.1.3

vorgestellten) literaturbekannten Methoden ist, ist zu diesem Zeitpunkt schwer möglich, da das Projekt noch nicht abgeschlossen ist und noch weitere Analysen ausstehen.

Im Projekt B dieser Doktorarbeit wurde die DERA als Modellorganismus verwendet, um die Mechanismen der thermischen Adaption von Orthologen aus extremophilen Organismen zu untersuchen. Dazu wurden fünf verschiedene DERAs aus *C. psychrerythraea*, *S. halifaxensis* (beide psychrophil, „kälteliebend“), *E. coli* (mesophil), *T. maritima* und *P. aerophilum* (hyperthermophil, „wärmeliebend“) sowohl auf biochemischer als auch auf struktureller Ebene miteinander verglichen. Während DERA_{EC}, DERA_{TM} und DERA_{PA} bereits aus der Literatur bekannt sind, werden in dieser Arbeit mit DERA_{CP} und DERA_{SH} erstmals zwei psychrophile Aldolasen beschrieben. Nach der erfolgreichen Klonierung, Expression und Reinigung zeigte die biochemische Charakterisierung zwei Trends: Auf der einen Seite sinkt die spezifische Aktivität und katalytische Effizienz mit steigender Wachstumstemperatur. Auf der anderen Seite steigt dafür die Thermostabilität des entsprechenden Enzyms. In Abbildung 4-2 sind diese Ergebnisse schematisch zusammengefasst.

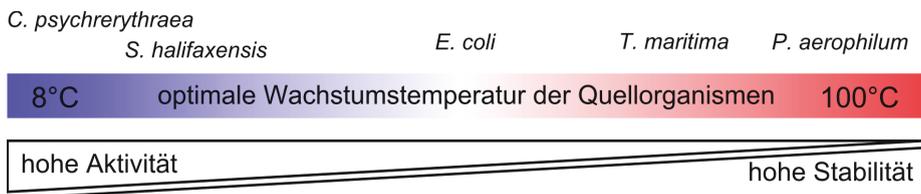


Abbildung 4-2: Aktivitäts-Stabilitätsbeziehung in extremophilen DERAs. Für die fünf charakterisierten Enzyme wurden die experimentell bestimmten Aktivitäts- und Stabilitätswerte mit den Wachstumstemperaturen der entsprechenden Quellorganismen in Bezug gebracht.

Da bisher keine Struktur einer psychrophilen DERA bekannt war, wurden Kristallisationsversuche unternommen; für beide Enzyme konnten Kristallstrukturen mit guter Auflösung (1.8Å für DERA_{SH} und 2.1Å für DERA_{CP}) bestimmt werden. Ein erster Vergleich mit der DERA_{EC} ergab große Ähnlichkeiten nicht nur in der Tertiärstruktur der Untereinheiten, sondern auch in ihrer dimeren Anordnung, d.h. der Quartärstruktur.

Sakuraba et al. vermuteten, dass die Interaktionen am Interface der dimeren DERAs eine wichtige Funktion für die Hitzeresistenz der hyperthermophilen Enzyme haben.^[104] Um dieser These nachzugehen, wurde versucht, monomere Varianten von allen fünf DERAs zu erstellen. Abgesehen von DERA_{PA} konnte in allen Orthologen das Protein durch eine Einzel- bzw. Doppelmutante monomerisiert werden. Während in den DERAs aus psychro- und mesophilen Organismen für das Monomer kein signifikanter Stabilitätsverlust gemessen wurde, sank die Thermostabilität von DERA_{TM} um mehr als 30K. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass das Dimer-Interface ein wichtiger Stabilisierungsfaktor in thermostabilen Proteinen ist.

Dies gilt jedoch offenbar nicht für die psychro- und mesophilen DERAs. Gleichwohl konnte durch den Einbau einer artifiziellen, intermolekularen Disulfidbrücke die Stabilität der psychrophilen DERA aus *C. psychrerythraea* um 8.4K gesteigert werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten in Studien mit anderen Proteinen gewonnen werden, bei denen entweder durch *In-vitro*-Evolution^[193] oder durch rationales Design^[194-195] die Thermostabilität mittels Einführung von intermolekularen Disulfidbrücken erhöht werden konnte.

Neben den Mutationsstudien wurden *In-silico*-Analysen in Form von CNA-Berechnungen durchgeführt, um die Mechanismen der molekularen Adaption in extremophilen DERAs zu verstehen. Während die Rolle der intermolekularen Interaktionen in den hyperthermophilen Enzymen bestätigt werden konnte (der Energieterm der Wechselwirkungen im Interface war in DERA_{TM} und DERA_{PA} signifikant höher als bei den anderen), konnten auch Unterschiede zwischen den meso- und psychrophilen DERAs ermittelt werden. Diese lagen jedoch nicht in den intermolekularen Interaktionen. Vielmehr konnte eine höhere Flexibilität in den β - α -Strukturelementen 6 und 7 der beiden psychrophilen Aldolasen ermittelt werden. Diese höhere Flexibilität wird durch (im Vergleich zu DERA_{EC}) abgeschwächte Wechselwirkungen zwischen den äußeren Helices und den inneren β -Strängen verursacht. Diese Region ist auf der dem Dimer-Interface gegenüberliegenden Seite des TIM-Barrels lokalisiert und enthält die katalytisch wichtigsten Reste wie das aktive Lysin und das pK_s-Wert-reduzierende Lysin. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kommt man, wenn man die B-Faktor-Verteilung der drei verschiedenen DERAs miteinander vergleicht. *In-vitro*-Studien bezüglich der Aktivität von Enzymen mit dem TIM-Barrel-Faltungsmotiv haben bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass die Region, welche die Bindetasche umschließt, die Substratumsatzrate beeinflusst.^[168, 196] Die Daten aus dieser Arbeit unterstützen also den Gedanken, dass psychrophile Enzyme in Bereich des aktiven Zentrums flexibler sind, was in direktem Zusammenhang mit ihrer katalytischen Aktivität steht.

Es ist wichtig, darauf hinzuweisen, dass in dieser Studie MD-Simulationen primär dazu verwendet wurden, um ein strukturelles Ensemble für die Berechnung der Phasenübergangszustände in der CNA zu generieren. Nichtsdestoweniger sind viele Literaturbeispiele bekannt, bei denen an Kälte angepasste Enzyme u. a. mittels MD-Simulationen untersucht wurden. Diese können also verwendet werden, um die Ergebnisse in einen literaturbekannten Kontext einzuordnen. Einige Autoren konnten zeigen, dass globale Eigenschaften wie eine reduzierte Anzahl an Salz-^[197] oder Wasserstoffbrücken^[198] zu einer höheren Flexibilität in einigen psychrophilen Enzymen führen. Die in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnisse können diese These nicht direkt unterstützen. Andere Untersuchungen haben darauf hingewiesen, dass Adaptionen meistens lokal in bestimmten Regionen zu finden sind: Indem sie meso- und psychrophile Elastasen verglichen, konnten *Papaleo et al.* flexible Loopregionen an der Substrat-Bindetasche identifizieren, welche möglicherweise die höhere Aktivität der Enzyme verursa-

chen;^[199-200] dies steht in direkter Übereinstimmung mit den Untersuchungen an der DERA. Während die meisten *In-silico*-Untersuchungen mit monomeren Proteinen durchgeführt wurden, haben *Papaleo et al.* auch den Einfluss von intermolekularen Interaktionen von Kälte-adaptierten, dimeren alkalischen Phosphatasen analysiert.^[201] Sie konnten zeigen, dass in der Interface-Region eine höhere Flexibilität zu beobachten war, welches die hohe Aktivität zu erklären vermag. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass im Beispiel der DERA die intermolekularen Wechselwirkungen zur Thermostabilität, nicht aber zur Aktivität beitragen. Wenn man beide Untersuchungen zusammenfasst, kann man also festhalten, dass die Interaktionen zwischen den monomeren Untereinheiten in extremophilen Enzymen zur Modulation sowohl der Stabilität als auch der Flexibilität genutzt werden können, um diese Proteine an die thermische Umgebung anzupassen.

Betrachtet man die Ergebnisse im Kontext der Proteinevolution, erkennt man zwei fundamentale Strategien, welche die DERA verwendet hat, um sich unterschiedlichen Temperaturen anzupassen: Die psychro- und mesophilen Enzyme benötigen keine besonders hohe Thermostabilität, weshalb ein bezogen auf die Stabilität) „neutrales“ Dimer-Interface ausreichend ist. Trotzdem müssen bei Kälte-adaptierten Enzymen die dynamischen Eigenschaften des katalytischen Zentrums (und dessen umgebende Bereiche) an die entsprechende Umgebungstemperatur angepasst werden. Dieses wird erreicht, indem die Dichte und Stärke der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Sekundärstrukturelementen variiert wird. Diese Strategie reicht jedoch anscheinend nicht aus, um die Enzyme auch an extrem hohe Temperaturen anzupassen. Deshalb wird in hyperthermophilen DERAs zusätzlich zu einer erhöhten Anzahl an intramolekularen Wechselwirkungen das Interface zwischen beiden monomeren Untereinheiten stabilisiert.

Es ist interessant, dass die beiden hier untersuchten hitzestabilen DERAs aus unterschiedlichen Domänen des Lebens stammen; die erste kommt aus einem Bakterium (*T. maritima*) und die zweite aus einem Archaeon (*P. aerophilum*). In Anbetracht dieser entfernten Verwandtschaft ist die Ähnlichkeit der Adaption an hohe Temperaturen (insbesondere in Bezug auf das Dimer-Interface) bemerkenswert. Man kann spekulieren, dass entweder (a) dieser Dimer-Typ sehr früh in einem gemeinsamen Vorfahren entstanden ist, oder (b) ein ursprüngliches Gen zu einem späteren Zeitpunkt durch Gentransfer ausgetauscht wurde (gefolgt von einer signifikanten Veränderung der Aminosäuresequenz), oder (c) diese Strategie unabhängig voneinander in beiden Domänen entwickelt wurde. Die vorliegenden Daten lassen diesbezüglich keine Entscheidung zu; es ist aber offensichtlich, dass diese Adaption auf der evolutionären Zeitskala sehr stabil geblieben ist.

4.2 Suizid-Inhibierung der DERA_{EC} durch Crotonaldehyd

In dem Projekt C wurden die Gründe für die Inaktivierung der DERA durch deren natürliches Substrat Acetaldehyd (**3**) untersucht. Während in den meisten Studien zu diesem Thema das Problem eher umgangen wurde, indem nach neuen, Acetaldehyd-stabileren DERAs gesucht wurde, war hier die Zielsetzung, die molekularen Mechanismen der Deaktivierung zu verstehen. Durch NMR-Studien sowohl auf Protein- als auch auf einer niedermolekularen Ebene konnte gezeigt werden, dass ein Reaktionsprodukt der DERA-katalysierten Aldolreaktion von Acetaldehyd (**3**) am aktiven Zentrum bindet und teilweise durch einen Heizschritt wieder entfernt werden kann, wie in Abbildung 4-4 schematisch dargestellt ist.

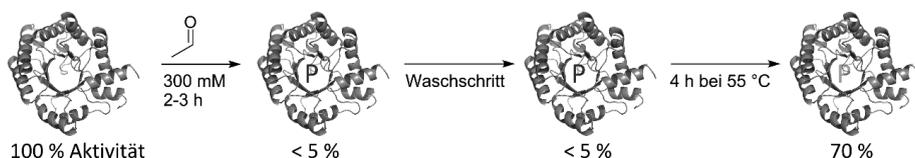


Abbildung 4-3: Schematische Darstellung des Effekts von Acetaldehyd (3**) auf die DERA-Aktivität.** Wie durch die Prozentzeichen gekennzeichnet, ist das Enzym schon nach wenigen Stunden Inkubationszeit in dem Substrat nicht mehr aktiv (< 5%), da ein Produkt (P) an das Zentrum bindet und auch durch einen Waschschriff nicht mehr entfernt werden kann. Erhitzt man das Enzym, wird das Produkt teilweise vom Protein gelöst, sodass 70 % der ursprünglichen Aktivität wiederhergestellt werden kann.

Über Röntgenkristallographie konnte dieses Reaktionsprodukt als Crotonaldehyd (**1**) identifiziert werden, welcher aus der Aldolreaktion von zwei Acetaldehyd-Molekülen (**3**) mit einer anschließenden Wassereliminierung gebildet wird. Dieser Aldehyd inaktiviert die DERA als Suizid-Inhibitor, indem die Aldehyd-Funktion mit dem katalytisch aktiven Lysin eine Schiff'sche Base eingeht und die Thiolgruppe von C47 anschließend das C_β-Atom des Crotonaldehyds (**1**) nukleophil durch eine Michael-Addition angreift und somit der Aldehyd an zwei Positionen kovalent mit dem Protein verknüpft wird.

Suizid-Inhibierung ist ein aus der Natur bekanntes Konzept zur Kontrolle der Aktivität von Enzymen. Ein sehr gut untersuchtes Beispiel ist die Proteinfamilie der Serpine, welche an der Regulation von Proteasen beteiligt sind; durch einen Konformationsübergang des im Zwischenzustand kovalent gebundenen Serpins wird das Enzym stark deformiert und somit irreversibel deaktiviert.^[202] Für klinische und pharmazeutische Anwendungen wurde eine Vielzahl von Medikamenten entwickelt, welche als Suizid-Inhibitoren fungieren. Bekannte Beispiele sind Aspirin (Acetylierung eines Serins in der Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase),^[203] Penicillin (Acetylierung eines Serins in DD-Transpeptidasen)^[204] und α -Difluormethylornithin (DFMO), eine Verbindung, welche als Medikament gegen afrikanische Trypanosomiasis (Schlafkrankheit)

eingesetzt wird. Die Substanz bindet kovalent an das Pyridoxalphosphat der Ornithin-Decarboxylase und wird dann auf einen Cystein-Rest übertragen, womit das Enzym irreversibel deaktiviert wird.^[205]

Suizid-Inhibierung als eine ungewollte Nebenreaktion, wie es beim Beispiel der DERA der Fall ist, wurde jedoch kaum in der Literatur beschrieben. Während Studien über die Optimierung von Biokatalysatoren bezüglich hoher Temperaturen oder der Gegenwart von organischen Lösungsmitteln regelmäßig publiziert werden,^[54, 206-208] sind die Bedeutung des Substrats und dessen Reaktionsprodukte bzw. Intermediate nur in wenigen Fällen untersucht. *Franken et al.* haben 2011 die Rolle von Acetaldehyd (**3**) als Reaktionsprodukt der Lipase-katalysierten Reaktion zwischen Vinylestern und Alkoholen untersucht. Mittels Massenspektrometrie konnten sie Aldolkondensationsprodukte wie Crotonaldehyd (**1**) finden, welche mit den Aminosäuren an der Oberfläche Michael-Addukte ausbilden.^[209] Eine Rolle von Cystein-Resten in einer irreversiblen Substratinhibierung wurde für die Reduktion von (*S*)-Nitroglutathion durch die humanen Carbonyl-Reduktasen 1 und 3 beschrieben. Wenn hohe Substratkonzentrationen verwendet werden, bildet C227 eine kovalente Bindung mit dem Schwefelatom des Glutathions aus, welche nur unter reduzierenden Bedingungen wieder gelöst werden kann.^[210] Zusammen mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit weisen diese Beispiele auf einen wichtigen Aspekt in der Biotechnologie hin: Wenn Enzyme in der organischen Synthese eingesetzt werden, arbeiten sie nicht in ihrer natürlichen Umgebung, was die Anfälligkeit für ungewollte Nebenreaktionen erhöht. Daher besteht ein großer Bedarf, die Biokatalysatoren individuell anzupassen, um dieses Problem zu lösen. Massenspektrometrie, Röntgenkristallographie und NMR sind Methoden, welche detaillierte Informationen über die Entstehung von „toxischen“ Verbindungen und deren Reaktionen mit dem Protein liefern können - insbesondere, wenn sie (wie in dieser Arbeit gezeigt) in Kombination verwendet werden. Um die Inaktivierung der DERA durch Acetaldehyd (**3**) zu verhindern, wurde unter Berücksichtigung der neu gewonnenen strukturellen Erkenntnisse mit C47M eine Mutante erstellt, welche den nukleophilen Angriff des Cysteins auf die Doppelbindung des Crotonaldehyds (**1**) verhindern sollte. Diese DERA-Variante zeigte sogar in einer Übernachtinkubation in 1 M Acetaldehyd keinen Aktivitätsverlust. Somit konnte anhand dieses Beispiels gezeigt werden, dass rationales Proteindesign eine mögliche und in diesem Fall auch sehr einfache Strategie ist, Biokatalysatoren in Bezug auf ihre Substratstabilität zu verbessern.

4.3 CNA als Werkzeug zur Beurteilung der Proteinstabilität

Das Programm CNA wurde entwickelt, um die Rigidität bzw. Flexibilität von Proteinen in Form eines Netzwerkes zu beschreiben, u. a. um auf diesem Wege Erkenntnisse über deren Thermo-

tabilität zu gewinnen.^[80-82, 211-212] Bereits in vorhergehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der berechnete Phasenübergangspunkt T_p einer CNA-basierten Entfaltungssimulation der thermodynamischen Thermostabilität in Paaren von Proteinorthologen aus thermo- und mesophilen Organismen zugeordnet werden kann^[81] und es außerdem möglich ist, eine Reihe solcher Orthologen mit niedriger Sequenzidentität bezüglich ihrer Thermostabilität zuzuordnen.^[83] Eine erste Untersuchung von Proteinvarianten einer Mutationsbibliothek konnte zudem zeigen, dass signifikante Unterschiede in der Thermostabilität zwischen Varianten mit einigen wenigen Mutationen detektiert werden können.^[84] Die CNA-Untersuchungen in dieser Arbeit konnten weitere Aspekte hinzufügen: Zum einen wurde das Spektrum auf psychrophile Enzyme erweitert, indem DERA-Orthologe untersucht wurden, deren Ursprungsorganismen sich in den Wachstumstemperaturen um mehr als 90 °C unterscheiden. Dabei konnte eine hohe Korrelation zwischen den Wachstumstemperaturen und den T_p -Werten festgestellt werden. Bei der Datenanalyse standen außerdem zwei neue Aspekte im Vordergrund, welche auch für weitere Arbeiten mit CNA interessant sein könnten: Die Thermostabilisierung durch intermolekulare Wechselwirkungen sowie die Gründe für die hohe Flexibilität von psychrophilen Enzymen. In Bezug auf den ersten Aspekt konnte durch eine Monomerisierung der verschiedenen DERAs ein Bezug zwischen Thermostabilität und den Wechselwirkungen im Dimer-Interface hergestellt werden. Durch die anschließend durchgeführten CNA-Berechnungen konnte außerdem die Auswahl der Reste für die Mutagenese nachträglich validiert werden, da deren Wechselwirkungen zwischen den beiden Protein-Untereinheiten besonders stark waren (vgl. Abbildung 3-22). Dies deutet darauf hin, dass mit der Methode eine Vorhersage kritischer Reste möglich ist, durch deren Mutagenese ein Proteinoligomer, z. B. für NMR-Untersuchungen, monomerisiert werden kann. Umgekehrt können die aus CNA abgeleiteten Informationen auch dazu verwendet werden, ein Protein-Interface zu stabilisieren. Im Fall der DERA war zwar auf Grund der Abstände zwischen den Aminosäureresten nur eine Mutation für eine Disulfidbrücke denkbar. In anderen Fällen könnte bei einer größeren Auswahl an potentiellen Mutationsstellen eine Analyse mit CNA einen zusätzlichen Selektionsschritt darstellen. So wäre eine Untersuchung denkbar, bei der beispielweise getestet wird, ob eine neue Disulfid- oder Salzbrücke den Phasenübergangspunkt erhöht, weil die monomeren Untereinheiten stärker miteinander wechselwirken.

Durch das Einbeziehen von psychrophilen DERAs konnten neue Erkenntnisse über die molekularen Ursachen ihrer Flexibilität und der vermutlich daraus resultierenden hohen Aktivität bei niedrigen Temperaturen gewonnen werden. Interessant wäre die Frage, ob es möglich ist, die Informationen zu nutzen, um beispielsweise die DERA_{EC} flexibler und somit sowohl aktiver als auch möglicherweise für neue Substrate zugänglich zu machen. Bisherige Vorhersagen von Proteinaktivität basieren auf bioinformatischen Methoden, wie im Falle des Webservers ZEBRA, bei dem die Unterfamilien einer Enzymgruppe analysiert und adaptive

Mutationen systematisch identifiziert und verglichen werden,^[213] oder auf molekularer Modellierung, bei der z. B. im Software-Tool CAVER die Dynamik des Substrattunnels simuliert wird, um so Informationen über die Freisetzung der Reaktionsprodukte zu gewinnen.^[214] In CNA ist eine direkte Vorsage von sog. „*weak spots*“, welche in Bezug auf Thermostabilität kritische Reste im Protein darstellen (vgl. Kapitel 3.1.1), zwar in Bezug auf flexibilitätsbedingte Aktivität noch nicht möglich, jedoch ist es denkbar, dass die Informationen über die intramolekularen Wechselwirkungen im Proteinnetzwerk genutzt werden können, um gezielt bestimmte Bereiche im Protein flexibler zu gestalten. Im konkreten Fall der DERA_{EC} würde dies die Region um die katalytische Tasche betreffen, da gezeigt werden konnte, dass in den psychrophilen Varianten des Enzyms die Wechselwirkungen zwischen den inneren β -Strängen, welche die katalytisch wichtigen Aminosäuren beinhalten, und den äußeren Helices weniger stark ausgeprägt sind. Somit könnte neben einer höheren Aktivität insbesondere auch der Zugang zu sterisch anspruchsvolleren Substraten ermöglicht werden.

Im Projekt A dieser Arbeit wurde CNA erstmals dazu benutzt, um Mutationen zur Verbesserung der Thermostabilität der DERA_{EC} in Zusammenhang mit evolutionärer Information, abgeleitet aus einem multiplen Sequenzalignment thermophiler DERAs, *in silico* vorherzusagen; diese Mutationen sollten dann experimentell validiert werden. Trotz weiterhin noch offener Fragen (z. B. bezogen auf die Vorhersage der Doppelmutanten, welche trotz positiver Effekte der jeweiligen Einzelmutanten in der Berechnung einen negativen Effekt zeigten, welcher im Experiment nicht bestätigt wurde) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass von sieben ausgewählten Einzelmutanten insgesamt zwei die Hitzeresistenz des Enzyms erhöhen konnten, was einer Erfolgsquote von ca. 30 % entspricht. Betrachtet man nur die späteren, optimierten Berechnungen, sind diese beiden Einzelmutanten sogar die einzigen Varianten, bei denen ein signifikant höherer Schmelzpunkt berechnet wurde. Dies ist trotz fehlender Korrelation zwischen berechneten und gemessenen Schmelzpunkten eine sehr gute Erfolgsquote, da in den meisten literaturbekannten *In-silico*-Methoden zusätzlich zu den Berechnungen entweder Sättigungsmutagenesen durchgeführt werden^[215] oder eine deutlich größere Mutantenbibliothek getestet wird, um thermostabilisierende Proteinvarianten zu erhalten.^[216] Eine direkte, signifikante Korrelation zwischen berechneten und experimentell bestimmten T_m -Werten wurde bisher nur in einer Studie beschrieben.^[84]

Natürlich erfordert eine genauere Beurteilung von CNA zusätzliche Tests, da der in dieser Arbeit verwendete Datensatz relativ klein war. Auch wäre zu klären, inwiefern die berechneten Phasenübergangspunkte der Mutationen sich signifikant von dem des Wildtyps unterscheiden. (Bisher wurden in Konformationsensembles von verschiedenen MD-Simulationen teilweise deutlich unterschiedliche Werte erhalten.) Daher bedarf es einer genaueren Analyse, um die erforderliche Länge und Anzahl der Simulationen zu ermitteln, mit denen der Konformations-

raum eines Proteins ausreichend abgedeckt werden kann, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Trotzdem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass das Programm ein vielversprechendes Werkzeug ist, um durch eine Vorhersage der Thermostabilität die Anzahl der zu testenden Enzymvarianten und damit den daraus resultierenden experimentellen Aufwand möglichst gering zu halten.

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, dass in CNA bisher nur eine Optimierung von Proteinen bezüglich höherer Temperaturen möglich ist, aber gerade für die organische Synthese ein großes Interesse besteht, die Lösungsmittelstabilität der entsprechenden Enzyme zu verbessern. Eine mögliche Strategie, um diesen Aspekt mit einzubeziehen, wäre, den Einfluss unterschiedlicher Verbindungen wie z. B. Ethanol, DMSO oder Aceton auf das modellierte Netzwerk im Protein zu berücksichtigen. Durch die neue Umgebung könnten die Proteindynamik sowie die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen in einem Protein beeinflusst werden, wie z. B. MD-Simulationen verschiedener Proteine in unterschiedlichen Lösungsmitteln gezeigt haben.^[217] In diesem Punkt besteht die große Herausforderung, dass CNA-Berechnungen die Thermodynamik eines Proteins berücksichtigen,^[84] jedoch die Lösungsmittelstabilität *in vitro* bisher nur auf kinetischer Ebene messbar ist (indem das Protein bei einer bestimmten Lösungsmittelkonzentration inkubiert wird und zeitabhängig strukturelle Änderungen bzw. im Fall eines Enzyms die Aktivität gemessen werden). Daher ist es schwer realisierbar, einen experimentellen Datensatz zu erstellen, welcher als Referenz zur Evaluation der CNA-Berechnungen dienen könnte.

4.4 Ausblick

4.4.1 Untersuchung der DERA-Stabilität bezüglich anderer Aldehyde

In Projekt C der Arbeit konnte die DERA zusammen mit einem kovalent gebundenen Liganden kristallisiert werden. In Kombination mit den Ergebnissen aus den NMR-Analysen konnte abgeleitet werden, dass dieser Ligand Crotonaldehyd (**1**) ist, welcher mit K167 und C47 zwei neue Bindungen eingeht und die Schiff'sche Base, welche zwischen der Aldehydgruppe des Substrats und der Aminogruppe des Lysins gebildet wird, hydratisiert vorliegt. Es wurde aber bereits angedeutet, dass auch eine andere Orientierung des Liganden denkbar ist, bei der zwischen der Thiolgruppe des C47 und dem Aldehyd ein Hemithioacetal ausgebildet wird. Da NMR-Untersuchungen diese Frage nicht beantworten konnten, bietet sich die Möglichkeit an, die Struktur der Acetaldehyd-inkubierten DERA mittels Neutronenkristallographie aufzuklären. Bei dieser Methode wechselwirken Neutronen mit den Kernen der Atome, sodass sowohl

Wasserstoffatome dargestellt als auch C-, O- und N-Atome unterschieden werden können.^[218-220] Der Nachteil dieser Methode ist (neben der erforderlichen Apparatur) der relativ schwache Flux der Neutronenstrahlen, weshalb sehr große Kristalle (ca. 1 mm³) notwendig sind, um ein Beugungsmuster zu erhalten.^[218] Da die DERA sehr gut exprimierbar und auch einfach zu kristallisieren ist (erste Kristalle wurden nach 1-2 Tagen erhalten), ist die Neutronenkristallographie für die Beantwortung dieser noch offenen Frage dennoch die Methode der Wahl.

Die aus synthetischer Sicht sicher interessantere Frage beschäftigt sich mit der Stabilität der DERA bezüglich anderer Aldehyde. Während das Enzym Acetaldehyd (**3**) als Donor-Molekül benötigt, sind als Akzeptor verschiedene, langkettigere Aldehyde wie Propanal, Hexanal oder Isobutanal einsetzbar und erweitern somit die Vielfalt an möglichen Syntheseprodukten.^[171] Von Carolin Bisterfeld durchgeführte Synthesen zeigten jedoch, dass das Protein (teilweise) ausfällt, wenn die entsprechenden Akzeptor-Aldehyde zur Enzymlösung zugegeben werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Aldolase unter Einfluss der Substrate aggregiert. Die Aggregationsgeschwindigkeit sowie die Menge des aggregierten Proteins unterschieden sich dabei je nach verwendetem Aldehyd, jedoch ließ sich eine (bisher noch nicht quantifizierte) Tendenz erkennen, dass die Aggregation desto stärker ist, je langkettiger (und in diesem Fall auch hydrophober) das Substrat ist. Unabhängig von dieser Beobachtung (die DERA aggregiert nicht nach Acetaldehyd-Inkubation) ist es auch aus einem zweiten Grund unwahrscheinlich, dass in beiden Fällen derselbe Inaktivierungsmechanismus vorliegt. Bisher wurde nicht beobachtet, dass DERA als Acetaldehyd-abhängige Aldolase eine Aldolreaktion von zwei längerkettigen Aldehyden katalysiert. Inkubiert man also das Enzym z. B. nur mit Hexanal, kann somit nicht das Aldolprodukt gebildet werden, welches nach einer Wassereliminierung als Substrat für die Michael-Addition von C47 dienen würde.

Um die Aggregation des Proteins zu erklären, könnte die ursprünglich für Acetaldehyd (**3**) in Kapitel 3.3.1 aufgestellte Hypothese (Reaktion mit den äußeren Lysinen) zum Tragen kommen. Die Bildung von Schiff'schen Basen zwischen den langkettigen Aldehyden und den Lysinresten könnte den hydrophoben Gradienten zwischen dem unpolaren Proteininneren und den polareren äußeren Bereichen deutlich stärker beeinflussen, als es beim Acetaldehyd (**3**) der Fall war. Hier würden sich Methoden eignen, welche die Entfaltung bzw. Aggregation von Proteinen detektieren können. Für kinetische Entfaltungsmessungen könnten z. B. Fluoreszenzspektren aufgenommen werden, in denen nach Substratzugabe Konformationsänderungen im Enzym durch die Zu- oder Abnahme der Tryptophanfluoreszenz gemessen werden, welche durch die Veränderung der chemischen Umgebung des entsprechenden Tryptophanrests verursacht werden.^[221] In der Literatur sind viele Beispiele zu finden, in denen solche Messungen für Entfaltungsstudien verwendet wurden. Zum Beispiel konnten mit dieser Technik das Gleichgewicht und die Kinetik der Entfaltung der humanen Glutathiontransferase A1-1 mittels

verschiedener Harnstoffkonzentrationen als denaturierendes Agens verfolgt werden.^[222] Da die DERA nur einen Tryptophanrest besitzt, welcher ohne Aktivitätsverlust ausgetauscht werden kann,^[223] wäre es denkbar, durch den gezielten Einbau dieser Aminosäure in unterschiedlichen Proteinregionen die Bereiche zu identifizieren, auf welche die Aldehyde strukturell am meisten Einfluss haben.

Die Bildung von Proteinaggregaten kann relativ einfach über dynamische Lichtstreuung (engl. *dynamic light scattering*, DLS) verfolgt werden.^[224] Bei dieser Methode kann die Größe der Partikel in Lösung bestimmt werden. Somit liefert die DLS keine Strukturinformationen auf atomarer Ebene; jedoch kann man die Keimbildung für Aggregate (also erste Oligomere) verfolgen und außerdem die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit quantifizieren. Eine alternative Methode ist die Kleinwinkelröntgenstreuung (engl. *small angle x-ray scattering*, SAXS), bei der Röntgenstrahlen durch sich in Lösung befindende Partikel gestreut werden. Wie bei einer DLS-Messung kann so die Bildung von Aggregationskeimen verfolgt werden, jedoch liefern SAXS-Messungen auch Strukturinformationen. Mit bis zu 10 Å ist die Auflösung einer solchen Messung deutlich niedriger als typischerweise bei der Röntgenbeugung von Proteinkristallen und reicht demnach nicht aus, um Änderungen im Protein auf atomarer Ebene zu untersuchen. Dennoch können wichtige Informationen über die Morphologie der Partikel gewonnen werden, aus denen man z. B. ableiten könnte, an welchen Bereichen es zu Kontakten zwischen den Proteinen bei der Aggregation kommt.^[225] In einem Literaturbeispiel von 1980 konnte so ein Modell für eine durch Röntgenstrahlen verursachte Aggregation der Malatdehydrogenase erstellt werden.^[226] Die Effekte von Temperatur und Substraten auf die Aggregation von β -Lactoglobulin wurden 2014 von *Yoshida et al.* mittels SAXS-Messungen untersucht. Dabei konnte auch ein Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität der verwendeten Alkohole und der Aggregationsgeschwindigkeit hergestellt werden.^[227] Ähnliche Effekte könnten auch beobachtet werden, wenn die DERA mit verschiedenen Aldehyden inkubiert wird.

Natürlich ist auch die NMR-Spektroskopie eine Methode, welche wichtige Beiträge zur Beantwortung dieser Frage leisten könnte. In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass sich das Enzym sehr gut NMR-spektroskopisch untersuchen lässt, und die erfolgreiche Hauptketten-Signalzuordnung könnte wie auch schon beim Acetaldehyd (**3**) verwendet werden, um Änderungen am Enzym zu untersuchen. Dabei kann durch die Wahl der Substrate und deren Konzentrationen die Aggregationsgeschwindigkeit so beeinflusst werden, dass erste Strukturänderungen, welche die Aggregation auslösen, in einem 2D-Spektrum zeitlich aufgelöst werden können. Eine Abfolge von schnell durchführbaren ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren wie z. B. BEST-TROSY^[228] würde möglicherweise sogar die Messung einer Entfaltungskinetik erlauben.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die in der Arbeit erhaltenen Ergebnisse eine Grundlage darstellen, um die Stabilität der DERA bezüglich anderer, längerkettiger

Aldehyde zu untersuchen. Da bei diesen Substraten im Gegensatz zum Acetaldehyd (3) eine Aggregation des Enzyms beobachtet wurde, können neben der NMR-Spektroskopie weitere Methoden wie Fluoreszenz-, DLS- oder SAXS-Messungen verwendet werden, um die Gründe der Aggregation zu untersuchen.

Natürlich können die oben diskutierten Methoden auch auf andere Proteine übertragen werden. Neben den in Kapitel 2.2.1 vorgestellten weiteren Aldolaseklassen werden Aldehyde auch von ganz anderen Enzymen als Substrate verwendet. Beispiele für solche in der organischen Synthese eingesetzten Enzyme sind z. B. Alkohol-Dehydrogenasen, durch welche Aldehyde stereoselektiv zu den entsprechenden Alkoholen reduziert werden können,^[229-230] oder die große Proteinfamilie der Thiamindiphosphat-abhängigen Enzyme, welche u. a. zur stereoselektiven C-C-Verknüpfung (z. B. zur Synthese von β -Hydroxyketonen) verwendet werden.^[231]

4.4.2 Eine DERA mit verbesserten Eigenschaften für die Synthese?

In dieser Arbeit wurde an drei verschiedenen Projekten gearbeitet, um die Eigenschaften der DERA für die organische Synthese zu optimieren. Im Projekt A konnte durch eine Doppelmutante die Thermostabilität der DERA_{EC} um 5.5K verbessert werden, während in Projekt C mit Hilfe einer Einzelmutante das Problem der geringen Substrattoleranz gelöst wurde. Das zweite Projekt hat sich u. a. mit den Eigenschaften psychrophiler DERAs beschäftigt und es konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu DERA_{EC} eine höhere Aktivität haben und die psychrophile DERA aus *C. psychrerythraea* mit der an Methylumbelliferon gekoppelten L-Ribose Aktivität für ein Substrat zeigt, welches von den meso- und hyperthermophilen DERAs kaum umgesetzt wird. Der zweite Punkt könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese neue Aldolase ein breiteres Substratspektrum als die DERA_{EC} hat. Durch eine intermolekulare Verknüpfung konnte des Weiteren die Stabilität dieses Enzyms um 8.4K erhöht werden. Falls es möglich ist, die einzelnen Mutanten so zu kombinieren, dass sich die Effekte additiv verhalten, würde man eine thermo- und Acetaldehyd-stabile DERA mit einem breiteren Substratspektrum erhalten. Dafür müssen jedoch einige Punkte berücksichtigt werden, welche vor allem die Aktivität und Selektivität des Enzyms einbeziehen. Durch die Doppelmutante V103M-F200I konnte zwar die Thermostabilität der DERA_{EC} erhöht werden, jedoch war nur noch weniger als 25% der Wildtyp-Aktivität vorhanden. Die natürliche DERA weist schon eine recht hohe Thermostabilität auf, und man muss bei einer Implementation dieser Mutanten z. B. in eine psychrophile DERA mit einem ähnlich hohen Aktivitätsverlust rechnen (wobei durch die höhere Rigidität des Enzyms auch die Substratbreite negativ beeinflusst werden könnte). Die ursprüngliche Idee war außerdem, diese Mutante in Bezug auf Acetaldehyd-Stabilität zu testen, da in der Literatur bereits ein Zusammenhang zwischen Substrat- und Thermostabilität vermutet^[106] und außerdem die Einzelmutan-

te F200I von *Jennwein et al.* als Acetaldehyd-stabil beschrieben wurde.^[12] Da jedoch eine solche Anwendung nicht mehr notwendig ist, ist diese Mutante zwar als Modell für die Anwendung von CNA interessant, für den Einsatz in der organischen Synthese möglicherweise aber keine Verbesserung. Aus synthetischer Sicht interessanter ist hingegen die stabilisierte psychrophile DERA. Eine Erhöhung der Thermostabilität ist bei diesem Beispiel relevanter, da psychrophile Enzyme als Kälte-adaptierte Proteine nicht sehr hitzeresistent sind. Außerdem konnte durch diese Mutation knapp 70% der Wildtyp-Aktivität erhalten werden, und da die Mutation auf der Proteinoberfläche - außerhalb des katalytischen Zentrums oder Substrateingangs - erstellt wurde, kann man vermuten, dass die Substratspezifität und -selektivität des Enzyms nicht beeinflusst werden.

Da eine Überlagerung der Strukturen der psychrophilen DERAs mit der *E. coli*-Variante ergab, dass beide katalytische Zentren (eingeschlossen C47) auf der Ebene der Primär- und Tertiärstruktur nahezu identisch sind, kann man davon ausgehen, dass die Implementierung der C47M-Mutante in die DERA des Kälte-adaptierten Enzyms die Acetaldehyd-Toleranz erhöht. Allerdings zeigte sich schon in der DERA_{EC}, dass durch die C47M-Mutation sowohl die Aktivität auf ca. 60% als auch der *ee*-Wert auf 80% (im Vergleich zu 89% beim Wildtyp) für die Reaktion von Acetaldehyd (**3**) und Propanal zum (*R*)-Enantiomer des 4-Hydroxypentanal sinkt. Eine niedrigere Aktivität ist kein überraschendes Ergebnis, da auch alle anderen Mutationen der DERA_{EC} aus Projekt A, welche im inneren Proteinbereich eingefügt wurden, die Aktivität gesenkt haben. Auch wenn es schwierig ist, eine mechanistische Erklärung für die etwas geringere Selektivität zu finden, kann spekuliert werden, dass die zusätzliche Methylgruppe im aktiven Zentrum diesen Wert beeinflusst. Um mögliche Alternativen für den Austausch von C47 zu diskutieren, bietet es sich an, die Verteilung der Aminosäuren an dieser Position in den natürlichen DERAs anzuschauen, welche in Abbildung 4-6 dargestellt ist.

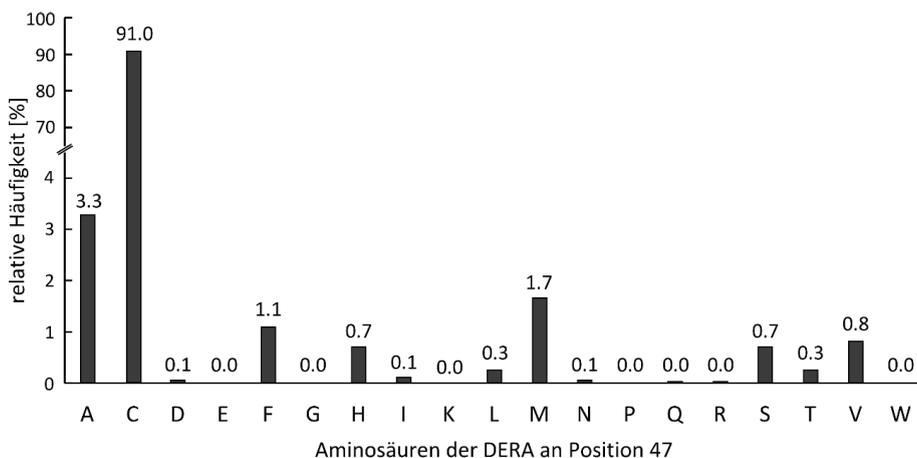


Abbildung 4-4: Verteilung der Aminosäuren der DERA an Position 47 nach einem Sequenz-Alignment von 3700 DERA-Strukturen ($\geq 20\%$ Sequenzidentität zur DERA_{Ec}). Die Nummerierung entspricht der DERA_{Ec}-Sequenz.

Daraus ergeben sich mit Alanin (3.3%) und Phenylalanin (1.1%) mögliche Alternativen, welche als Austausch für C47 in Frage kommen. Eine weitere interessante Möglichkeit wäre die C47S Mutante, da Cystein und Serin fast die gleiche Größe haben und sich lediglich darin unterscheiden, dass das Schwefelatom durch ein härteres und damit weniger nukleophiles Sauerstoffatom ausgetauscht wurde. Die Frage, welche dieser vorgeschlagenen Varianten dieselbe Acetaldehyd-Toleranz wie die C47M-Mutante haben und zusätzlich eine verbesserte Aktivität und/oder Selektivität besitzen, bleibt zu diesem Zeitpunkt spekulativ und kann erst durch die entsprechenden Experimente beantwortet werden.

Es ist nicht zu erwarten, dass eine Acetaldehyd-stabile DERA ein verbessertes Substratspektrum im Vergleich zum Wildtyp aufweist; jedoch hat Frau Dr. Irene Küberl, née Kullartz, in ihrer Dissertation eine interessante Beobachtung bezüglich der Synthese des Goniiothalamins gemacht. Dieser Naturstoff gehört zur Stoffklasse der Styryllactone und wird in der Literatur zusammen mit seinen Derivaten als hochpotentes Antitumor-Agens beschrieben.^[232-233] In einer dreistufigen Synthese konnte sie mit einer Gesamtausbeute von 40 % ein (*R*)-Goniiothalamin-Derivat erfolgreich herstellen.^[160] Jedoch würde das (*S*)-Goniiothalamin mit einer Doppelbindung an der 6-Position die biologische Aktivität steigern,^[234] dazu müsste in der DERA-katalysierten Aldolreaktion als Akzeptormolekül anstelle des 3-Phenylpropanals Zimtaldehyd verwendet werden, welches jedoch bei der wt-DERA keinen Umsatz zeigte. Da beide Moleküle vom sterischen Anspruch her ähnlich groß sind, liegt der Grund für die nicht vorhandene Aktivität bezüglich des Zimtaldehyds möglicherweise in der schnellen Inaktivierung durch die Michael-Addition an die Doppelbindung. Die deutlich verbesserte Stabilität der C47M-

Mutante bezüglich des Crotonaldehyd (**1**) könnte somit auch den Umsatz dieses ungesättigten Aldehyds verbessern, sodass eine Synthese des biologisch aktiven Naturstoffes (*S*)-Goniothalamin ermöglicht werden würde.

5 Materialien

5.1 Geräte und Software

Die in Tabelle 5-1 aufgeführten Geräte beziehen sich nur auf solche der regelmäßigen Verwendung im Labor. Spezialgeräte (wie z. B. zur Strukturaufklärung) sind im entsprechenden Methodenteil beschrieben. Die Softwareprogramme, welche in dieser Arbeit benutzt wurden, sind in Tabelle 5-2 aufgelistet.

Tabelle 5-1: Geräte des regelmäßigen Gebrauchs

Gerät	Hersteller
<i>Pipetten</i>	
<i>Eppendorf Research</i> , Pipette 0.1-2.5 µL	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg
<i>Eppendorf Research</i> , Pipette 1-10 µL	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg
<i>Eppendorf Research</i> , Pipette 10-100 µL	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg
<i>Gilson Pipetman</i> , Pipette 0.5-5 mL	<i>Gilson</i> , Middleton, WI, USA
<i>Schüttler</i>	
<i>Eppendorf Thermomixer compact</i> , beheizter Schüttelblock für 1.5-2 mL Reaktionsgefäße	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg
HLC MKR23, beheizter/gekühlter Schüttelblock für 1.5-50 mL Reaktionsgefäße	<i>HLC BioTech</i> , Bovenden
<i>Infors HT Multitron Standard</i> , beheizbare/kühlbarer Schüttelinkubator für Flüssigkulturen	<i>Infors HT</i> , Bottmingen, Schweiz
<i>BioCote Stuart rotator SB2</i> , Rotorschüttler in 37 °C Konstantraum für Kulturröhrchen	<i>BioCote Ltd</i> , Wolverhampton, UK
VKS-75 control, Standschüttler in 37 °C Konstantraum für Flüssigkulturen	<i>Edmund Bühler GmbH</i> , Hechingen
<i>Zentrifugen</i>	
<i>Sorvall RC5B</i> , gekühlte Standkühlzentrifuge	<i>Thermo Scientific Corp.</i> , MA, USA
<i>Sorvall RC6B plus</i> , gekühlte Standkühlzentrifuge	<i>Thermo Scientific Corp.</i> , MA, USA
<i>Sorvall F10S</i> , Festwinkelzentrifugationsrotor	<i>Thermo Scientific Corp.</i> , MA, USA
<i>Eppendorf Centrifuge 5810R</i> , gekühlte Zentrifuge mit Festwinkelrotor für Reaktionsgefäße (15 + 50 mL)	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg
<i>Eppendorf Centrifuge 5424</i> , gekühlte Zentrifuge mit Festwinkelrotor für Reaktionsgefäße (1.5 + 2 mL)	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg
<i>Waagen</i>	
<i>Sartorius MC1</i> , Laborwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen
<i>Sartorius LA1200S</i> , Feinwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen
<i>Sartorius 2004MP</i> , Ultrafeinwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen

Sonstiges (Molekularbiologie, Proteinreinigung/-analytik)	
ÄKTA TM Purifier, Chromatographiesystem mit UV-VIS-Detektor	GE Healthcare, München
Nano Drop 2000c, Kleinvolumenphotometer	Thermo Scientific Corp., MA, USA
Shimadzu UV-1800, kühlbares/beheizbares Spektrophotometer (CPS-240A)	Shimadzu, Duisburg
VWR Doppio, Gradienten-PCR-Cycler	VWR International GmbH, Darmstadt
Bio-Rad Mini Protean Tetra System, vertikales Gelektrophoresesystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Invitrogen Novex MiniCell, vertikales Gelektrophoresesystem für Invitrogen precast SDS-PAGE-gels	Invitrogen GmbH, Darmstadt
French Press Zeldisruptor, mit 40k Druckzelle	Thermo Electron GmbH, Karlsruhe
Sonoplus, Ultraschall Zeldisruptor mit diversen Horngrößen (1.5-50 mL)	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin

Tabelle 5-2: Verwendete Softwareprogramme

Software	Verwendung	Quelle/Hersteller
Plotten von Datensätzen		
Excel 2013	Auswertung einfacher Datensätze	Microsoft
OriginPro 8.6G	Erstellung von nicht-linearen Funktionen	OriginLab
NMR-Analysen		
TopSpin 3.2 pl6	Prozessierung und Auswertung	Bruker Biospin
NmrPipe 4.2.	Prozessierung	[235]
CCPNmr Analysis 2.3.1.	Zuordnung der Proteintrückgrats	[236]
Röntgenkristallographie		
XDS/XSCALE 15.10	Prozessierung	[237]
MOLREP 11.0.	Molekularer Ersatz	[238]
Coot 0.8.2.	Strukturverfeinerung	[239]
Computerbiochemie		
Amber 14	MD-Simulation	[240]
Amber Tools 14	Vorbereitung und Auswertung von MD-Simulationen	[240]
FIRST	Berechnung nicht-kovalenter Interaktionen	[163]
CNA	Bestimmung rigider Cluster / Entfaltungssimulation	[80]
Sonstiges		
PyMol 1.7.4.	Visualisierung von Proteinstrukturen	Schrödinger, LLC.
Inkscape 0.48	Erstellen und Bearbeitung von Vektorgrafiken	Inkscape Community
ChemDraw std 14.0	Zeichnen von chemischen Strukturen	PerkinElmer
CloneManager 9.0	Entwicklung und Überprüfung von Klonierungsstrategien	Sci-Ed
Word 2013	Textverarbeitung	Microsoft

5.2 Chemikalien, Enzyme und Fertigkits

Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von *Carl Roth GmbH + Co KG* (Karlsruhe), *Sigma Aldrich* (München), *Fermentas GmbH* (St. Leon-Rot), *Cambridge Isotope Laboratories* (Saarbrücken) erworben oder stammen aus Schenkungen.

Enzyme

Pfu-Polymerase, T4-Ligase, Restriktionsendonukleasen, dNTPs wurden bei *Fermentas GmbH* (St. Leon-Rot) und *PhusionTM* Hotstart II Polymerase sowie T4-Polynukleotidkinase bei *New England Biolabs GmbH* (Frankfurt a. Main) erworben.

Fertigkits

Plasmidisolierung (mini): innuPREP Plasmid Mini Kit, *Analytik Jena AG Life Science* (Jena)

Gelreinigung: QIAQuik[®] Gel Extraction Kit, *Qiagen GmbH* (Hilden)

Reinigung von Peptiden für MALDI-MS: ZipTip[®] Pipettenspitzen, *Merck Millipore* (Darmstadt)

5.3 Stammlösungen

IPTG und Ampicillin wurden als Stammlösungen sterilfiltriert (Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm) und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

IPTG: (1000-fach): 1 M in *Aqua dest.*

Ampicillin (1000-fach): 100 mg/ml in *Aqua dest.*

5.4 Plasmid, Primer und synthetische Gene

Plasmid

Als Plasmid wurde der pET21a(+)-Vektor von *Novagen* (USA) verwendet, welcher einen T7-Promotor, einen lacZ-Operator und eine Ampicillin-Resistenz enthält (vgl. Abbildung 5-1). Die fertigen Gene von *deoC_{EC}*, *deoC_{TM}* und *deoC_{PA}* wurden bereits von Frau Dr. Irene Küberl, née Kullartz, in den Vektor kloniert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Gene der psychrophilen DERAs wurden ebenfalls in diesen Vektor kloniert.

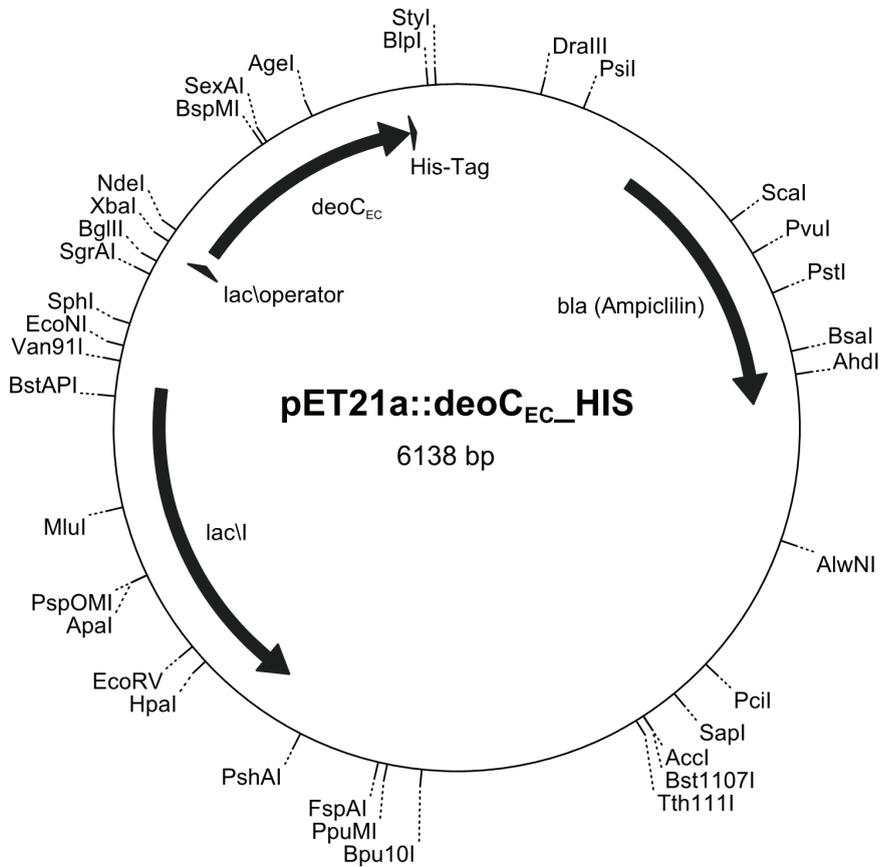


Abbildung 5-1: Plasmidkarte des pET21a(+)-Vektors mit dem DERA-kodierenden Gen aus *E. coli* (*deoC_{EC}*). Die vollständige DNA-Sequenz von *deoC_{EC}* (mit dem C-terminalen His-Tag) ist im Anhang unter 7.1 zu finden.

Tabelle 5-3: Liste der verwendeten Oligonukleotide (Primer). Die Namen enthalten das verwendete DERA-kodierende Gen und die einzubauende Mutation. Die Abkürzung fw (*forward*) bedeutet, dass der Primer dieselbe Orientierung wie der *Sense* Strang der DNA hat (bei rv für *reverse* ist es umgekehrt der *Antisense* Strang). [PHOS] steht für die Phosphorylierung eines 5'-Endes (vgl. 6.1.1). Die zu verändernden Nukleotide sind in den Sequenzen unterstrichen. In der Methodenspalte steht iso für die in 6.1.4 beschriebene Genisolierung und Seq. für eine Sequenzierung (6.1.7) bzw. Kolonie-PCR (6.1.3) während RTH (round-the-horn), QC (QuikChange®) und QC2 (QuikChange® in zwei Stufen) in Abschnitt 6.1.1 erklärt werden. Die Anlagerungs- (*Annealing*-) Temperatur ist der Bereich, bei welcher eine erfolgreiche Amplifikation im Agarosegel (6.1.5) gemessen wurde. Aus Übersichtsgründen wurden diese Werte hier eingefügt und nicht extra im Methoden-/oder Ergebnisteil aufgelistet.

Name	5'-3'-Sequenz	Methode	Anlagerungs- temperatur [°C]
Isolation von <i>deoC_{SH}</i> aus genomischer DNA von <i>S. halifaxensis</i>			
<i>deoC_{SH}_fw</i>	CATATGAGCGACTTAAAAAAGCAGC	iso*	60-80
<i>deoC_{SH}_rv</i>	GACTCGAGGTAACCTTGTGCACCTTG		
Primer zur Sequenzierung der Gene im pET21a(+)-Vektor und für Kolonie-PCRs			
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Seq.	55
pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG		
Mutanten zur Erhöhung der Thermostabilität der DERA _{EC}			
<i>deoC_{EC}_T72S_fw</i>	[PHOS] <u>AGCGT</u> AACCAACTCCCACACGG	RTH	53-70
<i>deoC_{EC}_T72S_rv</i>	AGCGATACGGATTTCCGGGGTG		
<i>deoC_{EC}_F200I_fw</i>	[PHOS] <u>ATT</u> AAACCGGCGGGCGGCTG	RTH	60-70
<i>deoC_{EC}_F200I_rv</i>	ACCAACGGTTTTTCTACGCCATATCACG		
<i>deoC_{EC}_F235L_fw</i>	[PHOS] <u>TTAG</u> GCGCTTCCAGCCTGCTG	RTH	60-75
<i>deoC_{EC}_F235L_rv</i>	GCGGTAGTGACGCGCATCTGC		
<i>deoC_{EC}_A237T_fw</i>	CTACCGCTTTGGC <u>ACT</u> TCCAGCCTGCTG	QC	70-80
<i>deoC_{EC}_A237T_rv</i>	CAGCAGGCTGGAAG <u>IG</u> CCAAAGCGGTAG		
<i>deoC_{EC}_C47M_fw</i>	[PHOS] <u>ATG</u> ATCTATCCTCGCTTATCCCGATTGC	RTH	60-80
<i>deoC_{EC}_C47M_rv</i>	GATAGCGGCGGTATTGCCGACC		
<i>deoC_{EC}_V73T_fw</i>	[PHOS] <u>ACG</u> ACCAACTCCCACACGGTAACGAC	RTH	60-80
<i>deoC_{EC}_V73T_rv</i>	CGTAGCGATACGGATTTCCGGGGTG		
<i>deoC_{EC}_V103M_fw</i>	CTGATGAAGTTGAC <u>ATG</u> GTGTTCCCGTAC	QC	50-75
<i>deoC_{EC}_V103M_rv</i>	GTACGGGAACACCA <u>TG</u> TCAACTTCATCAG		
<i>deoC_{EC}_A31K_fw</i>	[PHOS] <u>AAA</u> CTGTGCATCAGGCCAAAACCTCC	RTH	55-75
<i>deoC_{EC}_A31K_rv</i>	GATCACTTCTCGTCGGTGTCGTC		
<i>deoC_{EC}_S181D_fw</i>	[PHOS] <u>GAC</u> GCGGCATCATGATGGAAGTG	RTH	70-80
<i>deoC_{EC}_S181D_rv</i>	TTCCGGCGTCGCGTTCACAGC		
<i>deoC_{EC}_F200V_fw</i>	[PHOS] <u>GTT</u> AAACCGGCGGGCGGCTG	RTH	70-80
<i>deoC_{EC}_F200V_rv</i>	ACCAACGGTTTTTCTACGCCATATCACG		
Lysin → Arginin Mutanten			
<i>deoC_{EC}_K61R_fw</i>	[PHOS] <u>CGT</u> GAGCAGGGCACCCCGGA	RTH**	55-70
<i>deoC_{EC}_K61R_rv</i>	[PHOS] <u>CAG</u> AGTTTTGCGAGCAATCGGGAT		
<i>deoC_{EC}_K160R_fw</i>	[PHOS] <u>CGT</u> GCGGGTGCGGACTTCATC	RTH	55-70
<i>deoC_{EC}_K160R_rv</i>	[PHOS] <u>GAT</u> GGAGATTCAGACGCTTT		

<i>deoC_{EC}_K172R_fw</i>	[PHOS] <u>CG</u> TGTGGCTGTGAACGCGACG	RTH	60-70
<i>deoC_{EC}_K172R_rv</i>	[PHOS] <u>AC</u> CGGTAGAGGTTTTGATGAAGTCCCG		
Mutanten, um die DERA zu monomerisieren			
<i>deoC_{CP}_Y96W_fw</i>	[PHOS] <u>GG</u> GGCGCTGATGAAGTCGATTTAGTCT	RTH	50-70
<i>deoC_{CP}_Y96W_rv</i>	[PHOS] <u>AG</u> CGACAGCAGCACGTGTTTCTG		
<i>deoC_{SH}_Y96W_fw</i>	CAGCAGTTGCAT <u>GG</u> GGCGCCGACGAAG	QC	60-80
<i>deoC_{SH}_Y96W_rv</i>	CTTCGTCGCG <u>CC</u> CCATGCAACTGCTG		
<i>deoC_{TM}_L93E_fw</i>	CGTTGTTGGTTTTCCAG <u>AG</u> GGGAGCGAACGAAAC	QC***	55-75
<i>deoC_{TM}_L93E_rv</i>	GTTTCGTTTCGCTCC <u>CT</u> CTGGAAAACCAACAACG		
<i>deoC_{TM}_E104W_fw</i>	GGACGAAAGCCATT <u>GG</u> GCGATTTTCGCTG	QC**	65-75
<i>deoC_{TM}_E104W_rv</i>	CAGCGAAAATCGCC <u>CA</u> TGGGCTTTCGTCC		
<i>deoC_{TM}_L99E_fw</i>	[PHOS] <u>GAG</u> ACGAAAGCCATTGGGCGATTTTC	RTH**	55-75
<i>deoC_{TM}_L99E_rv</i>	[PHOS]AGTTTCGTTTCGCTCC <u>CA</u> GTGGAAAACC		
<i>deoC_{TM}_L99E-R93E_rv</i>	[PHOS]AGTTTCGTTTCGCTCC <u>CT</u> CTGGAAAACC	RTH	65-80
<i>deoC_{PA}_F61W_fw</i>	GTGGCGGACTTCCCT <u>GG</u> GGGGCCTTGCCAAC	QC	65-80
<i>deoC_{PA}_F61W_rv</i>	GTTGGCAAGGCC <u>CC</u> CAAGGGGAAGTCCGCCAC		
<i>deoC_{PA}_Y156I_fw</i>	TTCGCCGAAGAGGCCAT <u>CG</u> CGCCAGACAGGGA	QC	65-80
<i>deoC_{PA}_Y156I_rv</i>	TCCCTGTCTGGCGG <u>CG</u> ATGGCCTCTTCGGCGAA		
<i>deoC_{PA}_R75L_fw</i>	[PHOS] <u>CTG</u> CTTGCTGAAGTGGCAGATGAGATAGAC	RTH	55-75
<i>deoC_{PA}_R75L_rv</i>	[PHOS]AGAAAACCAAGGCAATTCTGCTGGCCGTTG		
<i>deoC_{PA}_I39A_fw</i>	ATTGCGTAAATCCCGC <u>AT</u> ACGCCCTGTTGT	QC2**	65-80
<i>deoC_{PA}_I39A_rv</i>	ACAACAGGGGCGTATG <u>CG</u> GGGATTTACGCAAT		
Cystein-Mutanten für intermolekulare Disulfidbrücken			
<i>deoC_{EC}_A95C_fw</i>	[PHOS] <u>GCT</u> ACGGTCTGATGAAGTTGACGTTGT	RTH	55-75
<i>deoC_{EC}_A95C_rv</i>	[PHOS] <u>AG</u> ATTGCCGCACGGGTTTCTGCCA		
<i>deoC_{CP}_A95C_fw</i>	ACGTGCTGCTGTCT <u>GT</u> TATGGCGCTGATG	QC2	55-60
<i>deoC_{CP}_A95C_rv</i>	CATCAGCGCCATA <u>ACA</u> GACAGCAGCACGT		
<i>deoC_{SH}_A95C_fw</i>	TCGCGCAGCAGTT <u>TGT</u> TACGGCGCCGACGA	QC2	60-80
<i>deoC_{SH}_A95C_rv</i>	TCGTGGCGCCGTA <u>ACA</u> AACTGCTGCGCGA		

PCRs ohne *Phusion*TM als DNA-Polymerase: **Pfu* ***KaPa-HiFi* ****Phire*

Synthetische Gene

Die synthetischen Gene für die DERA-kodierende DNA-Sequenzen aus *C. psychrerythraea* und *C. bovis* wurden von *GenScript* (NJ, USA) synthetisiert und im pUC57-Vektor geliefert. Über einen Restriktionsverdau mit *NdeI* und *XhoI* und eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 6.1.5) wurde das Gen vom pUC57-Vektor getrennt sowie der leere pET21a(+)-Vektor linearisiert. Die beiden Fragmente wurden dann über eine Ligation (vgl. Kapitel 6.1.2) zusammengefügt.

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

6.1.1 Ortsgerichtete Mutagenese (QuikChange® und Round-the-Horn)

Der gezielte Austausch von Nukleotiden in der DNA-Sequenz erfolgte in dieser Arbeit durch QuikChange®- oder Round-the-Horn-PCR. Bei beiden Methoden wird durch spezielles Primerdesign ein neuer DNA-Strang mit der gewünschten Mutation während der PCR erzeugt. Das ursprüngliche Plasmid wird anschließend über einen *DpnI*-Verdau (vgl. 6.1.2) abgebaut. Als Polymerasen wurden mit der *Phusion*TM, *Pfu*-, *KaPa-HiFi*- und der *Phire*-Polymerase verschiedene Enzyme getestet. Bevorzugt wurde jedoch die *Phusion*TM-Polymerase benutzt, da sie (abgesehen von der teureren *KaPa-HiFi*) am häufigsten zum Ziel führte. Die Mengenangaben der einzelnen Komponenten in dem PCR-Mix wurden den Herstellerangaben entnommen und sind in Tabelle 6-1 aufgeführt.

Tabelle 6-1: Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes*

	Stammlösung	Volumen [μL]	Endkonzentration
dNTPs	10 mM	0.4	0.2 mM
<i>forward</i> -Primer	100 μM	1.0	0.5 μM
<i>reverse</i> -Primer	100 μM	1.0	0.5 μM
Template-DNA	20 ng/ μL	0.1	0.15 ng/ μL
HF-Puffer	5-fach	4.0	1-fach
<i>Phusion</i> TM -Polymerase	2 U/ μL	0.2	0.02 U/ μL
Wasser		13.0	
Summe		20.0	

*spezifische Änderungen für die einzelnen PCRs sind in Tabelle 5-3 dargestellt

Die zeitliche Abfolge der einzelnen PCR-Schritte mit entsprechendem Temperaturprogramm sind in Tabelle 6-2 abgebildet. In der Regel wurde ein Mastermix aus dem 6.5-fachen Volumen der Lösung erstellt. Diese wurde dann für einen entsprechenden Anlagerungs-Temperaturgradienten auf sechs Reaktionsgefäße mit je 20 μL verteilt. Dieser Gradient wurde für Primer mit einem theoretischen Schmelzpunkt $T_m < 60^\circ\text{C}$ auf 50-70 $^\circ\text{C}$, für $T_m=60-65^\circ\text{C}$ auf 55-75 $^\circ\text{C}$ und für $T_m > 65^\circ\text{C}$ auf 60-80 $^\circ\text{C}$ eingestellt. Der theoretische Schmelzpunkt des Primerpaares wurde zuvor mit der „Nearest Neighbour“ Methode des Online Tools

„*OligoCalc*“^[241] ermittelt. Die PCR-Amplifikation wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 6.1.5).

Tabelle 6-2: PCR-Programm für *Phusion*TM-Polymerase

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Initiale Denaturierung	98	30	} 23-35 Zyklen
Denaturierung	98	10	
Anlagerung	50 - 80	30	
Elongation	72	150	
Finale Elongation	72	300	

*für pET21a(+)::*deoC* (ca. 6 kb) als Template

QuikChange[®]

Bei der sog. QuikChange[®]-Methode werden zwei komplementäre Primer erstellt. Diese enthalten in der Mitte der Sequenz die Nukleotide, welche für die einzubauende Aminosäure kodieren. Flankiert wird die Stelle von 12-15 Basen, die identisch zur Template-DNA vor und nach dem zu mutierenden Bereich sind. Somit wird garantiert, dass die Primer spezifisch binden können. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass deren theoretische Schmelztemperatur (s. o.) zwischen 55-65°C lag.

Wie bei einer Standard-PCR benutzt die Polymerase die Template-DNA (in diesem Fall ein zirkuläres Plasmid) als Matrize, um die Nukleotidkette des Primers zu erweitern. Jedoch wird das 3'-Ende nicht mit dem 5'-Anfang verknüpft, sodass ein linearer Strang (komplementär zum zirkularen Template) entsteht, welcher im 3'-Anfangsbereich die gewünschte Mutation enthält. Bindet im zweiten PCR-Zyklus der komplementäre Primer, kann dieser somit nicht verlängert werden, da das Ende des DNA-Strangs bereits erreicht ist. Die Konsequenz ist, dass nur das zirkulare Ursprungsplasmid als Template benutzt werden kann und somit keine exponentielle sondern eine lineare Amplifikation stattfindet. Daher wurde (die vom Hersteller empfohlene) maximale Anzahl von 35 PCR-Zyklen durchgeführt. Nach dem *DpnI*-Verdau hybridisieren die beiden neuen Stränge und die fehlenden Verbindungen zwischen den Enden der DNA-Stränge können nach der Transformation (siehe 6.2.2) in der *E. coli* Zelle geschlossen werden. Abschließend wurde das Plasmid gereinigt (vgl. 6.2.4) und durch Sequenzierung (vgl. 6.1.7) überprüft, ob die Mutation erfolgreich eingebaut wurde.

QuikChange[®] (2 Stufen)

Im Laufe der Promotion wurde das QuikChange[®] Protokoll wie im Folgenden erläutert geändert: Die oben beschriebenen PCR-Lösungen wurden in zwei verschiedene Ansätze aufgeteilt, die jedoch entweder den Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthielten (ansonsten blieben alle

Substanzmengen identisch). Nun wurden zuerst fünf PCR-Zyklen mit den getrennten Primern durchgeführt. Dies sollte verhindern, dass Primer-Dimere zwischen den komplementären Oligonukleotiden gebildet werden. Danach wurden beide Ansätze vereinigt und weitere 18 PCR-Zyklen durchgeführt.

Round-the-Horn^[242]

Wird diese Methode verwendet um Nukleotide auszutauschen (damit, wie hier beschrieben, auf Proteinebene eine Aminosäure mutiert wird), befindet sich die Mutation am 5'-Anfang des Vorwärts-Primers. Der Rückwärts-Primer ist komplementär zu dem Bereich vor der zu mutierenden Stelle. Beide Primer sind am 5'-Ende phosphoryliert und im Gegensatz zur QuikChange® überlappen diese nicht. Dadurch findet eine exponentielle Amplifikation statt. Durch einen Ligationsschritt (vgl. 6.1.2) wird anschließend das 3'-Ende mit dem phosphorylierten 5'-Ende verbunden. Die weiteren Schritte (*DpnI*-Verdau, Transformation, Plasmidreinigung und Sequenzierung) wurden identisch zur QuikChange® Methode durchgeführt (s. o.).

Die Primer wurden entweder phosphoryliert bestellt oder nach Herstellerangaben mit der T4-Polynukleotidkinase am 5'-Ende phosphoryliert (1 h bei 37°C). Die Primerlänge betrug in der Regel zwischen 20-30 Nukleotiden und die Schmelztemperatur lag bei ca. 60°C. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Unterschiede in den Schmelztemperaturen zwischen beiden Primern möglichst gering (< 5°C) war. Die Anzahl der PCR-Zyklen betrug 30.

6.1.2 Ligation und Restriktionsverdau

Für die Ligation wurden (je nach Intensität der Bande auf dem Agarosegel) 2-10 µL des PCR-Produktes mit 2 µL Ligase-Puffer und 1 µL T4-Ligase versetzt, mit Wasser auf 20 µL aufgefüllt und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 20 min bei 65°C erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren. Wurde die QuikChange® Methode zur Erstellung der Mutation verwendet, konnte dieser Schritt ausgelassen werden.

Danach wurden 1 µL *DpnI* zugegeben und der Ansatz 6-16 h bei 37°C inkubiert. Dieses Enzym schneidet nur methylierte DNA-Stränge. Da alle amplifizierten DNA-Stränge im Gegensatz zum Template unmethyliert vorliegen, konnte so das unerwünschte DNA-Template entfernt werden. Im Gegensatz zum Protokoll des Herstellers wurde auf eine Hitzeinaktivierung verzichtet, da Untersuchungen in der Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass so das Verhältnis an mutierten Plasmiden in Bezug auf den Wildtyp erhöht werden kann.

6.1.3 Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob ein lineares DNA-Fragment (i. d. R. eine *deoC*-Gen) erfolgreich in einen Vektor ligiert wurde, wurden Kolonien nach der Transformation als Template für die Kolonie-PCR gewählt. Dafür wurde ein Teil jeder Kolonie jeweils in 10 µL destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurden 4.85 µL dieser Zellsuspension mit 5 µL RedTaq-ReadyMix™ und jeweils 0.075 µL des T7-fw und pET-RP Primers (100 µM) vermengt. Das verwendete PCR-Protokoll ist in Tabelle 6-2 dargestellt. Durch die Wahl der Primer wird der Bereich, in dem sich das eingefügte Gen befinden sollte, vervielfältigt. Anhand der Bandengröße im Agarosegel kann daher abgeleitet werden, ob das gewünschte Gen tatsächlich im Vektor enthalten ist. Das PCR-Programm der Kolonie-PCR ist in Tabelle 6-3 dargestellt.

Tabelle 6-3: Programm für die Kolonie-PCR mit RedTaq-ReadyMix™

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Initiale Denaturierung	98	600	} 30 Zyklen
Denaturierung	98	30	
Anlagerung	55	30	
Elongation	72	80	
Finale Elongation	72	300	

6.1.4 Genisolation aus genomischer DNA

Für die Isolation eines Gens aus genomischer DNA wurde ein ähnliches Protokoll wie bei 6.1 verwendet. Als Polymerase wurde die *Pfu* benutzt, die Anzahl der Zyklen betrug 30 und die Konzentration des Templates wurde auf 20 ng/µL erhöht.

6.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden Agarosegele überwiegend dazu verwendet, um zu überprüfen, ob durch den PCR-basierten Ansatz eine Mutation in das *deoC*-Gen im pET21a(+)-Vektor eingebaut wurde.

Zur Vorbereitung wurden 20-40 mL eines 0.8-1%igen (w/v) Agarosegels angefertigt, indem die entsprechende Menge an Agarose in TAE-Puffer (40 mM TRIS; 18 mM Eisessig, 1 mM EDTA, pH8) gelöst und aufgeköcht wurde, bis eine klare, homogene Lösung entstand. Die Polymerisation wurde durch Abkühlen auf RT initiiert. Zuvor wurde 0.0871% (v/v) Gel Red™ (*Biotium Inc.*, Hayward, CA, USA) zur Detektion der DNA unter UV-Licht zugegeben. Parallel dazu wurden 5 µL der PCR-Proben mit 1 µL Bromphenolblau-Beladungspuffer [0.05% (w/v)]

Bromphenolblau, 100 mM EDTA und 40 % (v/v) Glycerol) vermischt und anschließend 5 μ L auf das Gel aufgetragen. Als Standard wurden 2 μ L 1 kb DNA Ladder von *Fermentas* verwendet. Die elektrophoretische Trennung wurde 20-30 min bei 180V durchgeführt. Konnte der pET21a(+):*deoC*-Vektor erfolgreich in der PCR amplifiziert werden, so war eine Bande der Größe von ca. 6 kb unter UV-Licht zu erkennen.

6.1.6 DNA-Konzentrationsbestimmungen

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion E der Plasmidlösung bei 260 nm und 280 nm in einem Nanodrop bestimmt. Die Extinktion bei 260 nm ist direkt proportional zur DNA-Konzentration, während das Verhältnis von E_{260} und E_{280} Auskunft über die Reinheit der Plasmidlösung in Bezug auf Verunreinigung durch Proteine gibt. Eingesetzt wurden jeweils 1.5 μ L Probelösung. Als Leerwert wurde destilliertes Wasser verwendet.

6.1.7 Sequenzierungen

Um zu überprüfen, ob die gewünschte Mutation in das Plasmid eingebaut wurde, wurde die DERA-kodierende Region des Plasmids von *GATC-Biotech AG* (Köln) oder SeqLab (Göttingen) sequenziert. Die Sequenzierung verläuft nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens nach *Sanger*.^[243] Als Primer wurden der T7-Primer und der pET-RP-Primer verwendet. Ausgewertet wurde die Sequenzierung mit dem *FreeWare* Programm *BioEdit*.

6.2 Mikrobiologisches Arbeiten

6.2.1 Bakterienstämme und Wachstumsmedien

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit *Escherichia coli* Bakterien gearbeitet. Die aus dem *E. coli* K12 Stamm abgeleiteten Bakterienstämme sind in Tabelle 6-4 aufgelistet.

Tabelle 6-4: Übersicht über die verwendeten *E. coli* Stämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F- Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mk+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	<i>Invitrogen</i>
Mach1	F- Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 hsdR</i> (rK-, mk+) Δ <i>recA1398 endA1 tonA</i>	<i>Invitrogen</i>
BL21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal</i> (λ DE3) [<i>dcm</i>] Δ <i>hdsS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHlo</i> Δ <i>EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21</i> Δ <i>in5</i>	<i>New England</i> <i>BioLab</i>

Für die Anzucht von Bakterien als Übernachtskulturen für die Proteinexpression sowie für die Plasmidisolation (vgl. 6.2.3) wurde ausschließlich LB-Medium mit 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt und 1% (w/v) NaCl verwendet. Die Proteinexpression erfolgte in TB-Medium, da dort ein besseres Zellwachstum möglich war. Dieses besteht aus 900 ml 1,2% (w/v) Trypton, 2,4% (w/v) Hefeextrakt, 0,4% (v/v) Glycerin und 100 ml eines Phosphatpuffers aus 0,231% (w/v) KH_2PO_4 und 1,254% (w/v) K_2HPO_4 ; dabei wurden Puffer und Nährmedium separat autoklaviert. Zu allen Medien wurde vor der Inokulation Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ als Antibiotikum zugegeben. Für beide Medien wurden die Substanzen vor dem Autoklavieren in Wasser gelöst. LB-Agar zum Ausplattieren von Bakterienkulturen wurde aus LB-Medium, versetzt mit 1% (w/v) Agar, hergestellt, autoklaviert und in der Mikrowelle erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Das Antibiotikum wurde erst nach dem Abkühlen auf unter 60 °C zugegeben.

Die Expression von markiertem Protein für NMR-Messungen (vgl. 6.3.2) erfolgte im M9-Minimalmedium, welches nach *Sivashanmugam et al.*^[244] hergestellt wurde. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 6-4 aufgelistet. Bei der Herstellung war zu beachten, dass alle hier aufgelisteten Lösungen getrennt autoklaviert (bzw. sterilfiltriert) und erst direkt vor dem Animpfen gemischt wurden. Dabei ist wichtig, die in der Tabelle 6-5 aufgeführte Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Substanzen einzuhalten (da sonst einige Verbindungen als Salze ausfallen).

Tabelle 6-5: Zusammensetzung des M9-Minimalmediums

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
Wasser			155.5 mL
CaCl_2	1 M	200 μM	100 μL
FeCl_3	0.1 M	50 μM	250 μL
CuCl_2	0.1 M	2 μM	10 μL
Na_2MoO_4	0.1 M	2 μM	10 μL
Borsäure	0.1 M	2 μM	10 μL
MnCl_2	1 M	10 μM	5 μL
ZnSO_4	1 M	10 μM	5 μL
CoCl_2	0.2 M	2 μM	5 μL
NiCl_2	0.2 M	2 μM	5 μL
KPi^* , pH7.5	0.2 M	75 mM	187.5 mL
5 % Glucose**	50 g/L	5 g/0.5 L	100 mL
MgSO_4	1 M	5 mM	2.5 mL
NaCl	2 M	10 mM	2.5 mL
$\text{NH}_4\text{Cl}^{**}$	20 g/L	0.5 g/0.5 L	50 mL
Thiamin	20 mg/mL	10 mg/0.5 L	0.5 mL
Biotin	20 mg/mL Ethanol	10 mg/0.5 L	0.5 mL
Ampicillin	100 mg/mL	50 mg/0.5 L	0.5 mL

* $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$

**ggf. ^{13}C -/ ^{15}N -markiert (bei ^{13}C -Glucose nur 2 g)

6.2.2 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen

Herstellung

Für die Herstellung von *E. coli* Zellen wurden 5 mL einer Übernachtskultur in LB-Medium bei 37°C ohne Antibiotika vorbereitet und diese am nächsten Morgen in 100 mL LB-Medium überführt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C bis zu einer OD von 0.4-0.5. Die Kultur wurde für 5 min bei 4°C und 2000g zentrifugiert, das Pellet vorsichtig in 10 mL TFB I Lösung (s. u.) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt - mit einer anschließenden Resuspension in 2.5 mL kalter TFB II Lösung. Nach einer Inkubation von 30min auf Eis erfolgte die Schockfrostung von 50µL Aliquots in flüssigem Stickstoff mit abschließender Lagerung bei -80°C. In einem Kontrollexperiment wurde überprüft, ob die Zellen chemisch kompetent sind (ob sie ein Plasmid aufnehmen können) und sie ohne die im Plasmid enthaltende Ampicillin-Resistenz auf einer mit Ampicillin versetzten Agarplatte (100µg/mL Endkonzentration) nicht wachsen. Dazu wurden parallel zwei Transformationen (s. u.) mit und ohne Plasmid durchgeführt und auf Agarplatten ausplattiert. Die Herstellung der kompetenten Zellen wurde als erfolgreich bewertet, wenn nur die Zellen mit der Plasmid-DNA Kolonien ausgebildet haben.

TFB I: Kaliumacetat (30mM, pH 5.8), RbCl (100mM), CaCl (10mM), MnCl (250mM), Glycerin [15% (w/v)]

TFB II: MOPS (10mM, pH 5.8), CaCl (75mM), RbCl (10mM), Glycerin [15% (w/v)]

Transformation

5-15µL eines PCR-Produktes nach *DpnI*-Verdau (vgl. 6.1) bzw. 50-100ng Plasmid-DNA wurden mit 100µL kompetenten *E. coli* Zellen [DH5α, MachI oder BL21(DE3)] auf Eis vermischt. Nach 30min wurden die Zellen für 90s auf 42°C erhitzt und im Anschluss wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 700µL LB-Medium wurden die Zellen für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2min bei 2000rpm abzentrifugiert, in 100µL LB-Medium gelöst und auf einer LB-Agar-Platte mit Ampicillin (100µg/mL Endkonzentration) ausplattiert.

6.2.3 Anzucht und Langzeitlagerung von Bakterien

5mL LB-Medium mit Ampicillin (100µg/mL Endkonzentration) wurden mit einer Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Übernachtskultur konnte anschließend für die Proteinexpression oder Plasmidisolierung verwendet werden. Für eine Langzeitlagerung wurden zu 800µL der Suspension 200µL 80% steriles Glycerol zugefügt, kurz gevortext und anschließend bei -80°C gelagert.

6.2.4 Plasmidisolation

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte aus 5-10mL einer Übernacht-Kultur von *E. coli*-DH5 α -MachI Zellen mittels eines *innuPREP DNA Mini Kit* (Analytik Jena). Im Unterschied zu den Herstellerangaben wurde im letzten Schritt die DNA mit destilliertem Wasser (2 x 25 μ L) eluiert.

6.3 Proteinexpression und Reinigung

6.3.1 Homo- und heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Für die Proteinexpression wurden 5mL enthaltendes LB-Medium mit *E. coli*-BI21(DE3) Zellen inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in einen 3L-Fernbachkolben mit 1L TB-Medium überführt und bei 25°C mit 125rpm geschüttelt, bis eine OD von 0.5-0.8 erreicht war. Beide Medien wurden vor der Inokulation mit Ampicillin (100mg/ μ L Endkonzentration) versetzt. Um die Proteinexpression zu starten, wurden 100 μ L IPTG (1M, sterilfiltriert) zugegeben und weitere 20-24h bei 25°C inkubiert. Da die psychrophilen Enzyme wärmeempfindlich sind, wurde für deren Expression nach IPTG-Zugabe die Temperatur auf 18°C gesenkt. Zur Zellernte wurden die Zellen für 20min bei 7000g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellmasse bestimmt (10-20g) und diese bei -18°C gelagert.

6.3.2 Proteinexpression im Minimalmedium

Protein-NMR-Experimente wurden mit ¹⁵N- (und ¹³C-) markierten Protein durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass die markierten Chemikalien (¹⁵N-Ammoniumchlorid und ¹³C-Glukose) als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle für die Proteinsynthese genutzt werden, wurde die Expression in einem Minimalmedium (vgl. Tabelle 6-4) durchgeführt.

Für 0.5L Medium wurden 40mL einer Kultur in LB-Medium über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10min bei 4000g, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet vorsichtig in 40mL M9-Medium gelöst. Dieser Schritt wurde wiederholt und die Expression bei 37°C mit einer OD von 0.2-0.3 gestartet. Die Zugabe von IPTG (0.2mM) erfolgte bei einer OD von 0.6-0.8. Die Zellen wurden nach weiteren 24h Inkubation bei 25°C durch 20min Zentrifugation bei 7000g geerntet und bei -18°C gelagert. Das Zellpellet wog zwischen 2-4g.

6.3.3 Zellaufschluss

Die Zellen (je nach erforderlicher Proteinmenge wurden 1-8 g verwendet) wurden im 5-fachen Volumen 20 mM KP_i -Puffer (pH 7.0) gelöst. Bei weniger als 20 mL Gesamtvolumen erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall. Dazu wurden die resuspendierten Zellen auf Eis gekühlt und für 5 min mit Ultraschallpulsen (40 % Power) versetzt. Bei größeren Volumina wurden die Zellen mittels French Press bei 1000 psi aufgeschlossen. In beiden Fällen erfolgte anschließend eine 15-20 min Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C.

6.3.4 Reinigung mittels Poly-Histidin-Tag: IMAC

Die Standardreinigungsmethode für Proteine war die IMAC (*immobilization metal affinity chromatography*). Diese Methode basiert darauf, dass der Poly-6-Histidin-Tag (His-Tag) des Proteins mit den an der Säule immobilisierten Nickel-Kationen wechselwirkt und somit das zu reinigende Protein an die Säule gebunden wird. Andere Proteine und/oder Zellbestandteile können nun durch einen Waschschrift entfernt werden. Die Elution erfolgte mittels Imidazol, welches als kompetitiver Bindungspartner zum Nickel das Protein von der Säule verdrängt. Alle in dieser Arbeit verwendeten DERA-Varianten hatten einen His-Tag am C-Terminus des Enzyms. Bereits in der Dissertation von Frau Dr. Irene Küberl, née Kullartz, konnte gezeigt werden, dass mit dieser Methode eine schnelle Reinigung mit hoher Proteinausbeute möglich ist, ohne dass der His-Tag einen Einfluss auf die spezifische Aktivität der DERA hat.^[160]

Die Nickel-NTA Säule wurde mittels einer Peristaltikpumpe auf 20 mM KP_i -Puffer, pH 7.0 äquilibriert. Anschließend wurde diese mit dem Protein beladen, indem in einem zyklischen Prozess der Überstand aus 6.3.3 (Zellaufschluss) für 15-20 min durch die Säule gepumpt wurde. Die Reinigung erfolgte i. d. R. über ein ÄKTA™-Reinigungssystem. Nach zwei Waschschriften mit 30 mL KP_i -Puffer und 40 mL 30 mM Imidazol (in KP_i , 20 mM, pH 7.0), wurde das Protein mit 250 mM Imidazol eluiert. Die Flussrate betrug dabei konstant 5 mL/min. Der Verlauf der Reinigung konnte mit einem UV-Detektor bei 280 nm verfolgt werden.

6.3.5 Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen

Zum Entfernen des Imidazols aus der IMAC-Reinigung (siehe 6.3.4) oder zum Umpuffern der Proteinlösung wurden PD-10-Säulen (*GE Healthcare*, München) verwendet. Nach der Äquilibrierung der Säule auf den gewünschten Puffer wurde diese mit 2.5 mL des Proteins beladen. Anschließend erfolgte die Elution mit 3.5 mL des gewünschten Puffers.

6.3.6 Reinigung über die Proteingröße: SEC

Die Größenausschlusschromatographie (engl. *size exclusion chromatography*, SEC) wurde im Anschluss einer IMAC-Säule verwendet, um entweder einen besonders hohen Reinheitsgrad für die Proteinkristallographie zu erreichen, oder um die Quartärstruktur des Proteins zu bestimmen. Das Säulenmaterial der *Sephadex S200 pg*-Größenausschlusschromatographiesäule (*GE Healthcare*, München) besteht aus Sepharose, durch welches die zu trennenden Teilchen unterschiedlich schnell diffundieren: Je kleiner sie sind, desto langsamer ist deren Diffusionsgeschwindigkeit. Dies hat zur Folge, dass die Teilchen der Größe nach aufgetrennt werden.

Die Säule mit 120 mL Säulenvolumen wurde an ein *ÄKTA*TM-Reinigungssystem angeschlossen und eine Flussrate von 1 mL/min eingestellt. Die Säule wurde mit 120 mL destilliertem Wasser und anschließend 240 mL des Laufpuffers (100 mM KPi , 150 mM NaCl, pH 7.0) äquilibriert (beide Lösungen wurden vorher für 2 h entgast und über eine PES-Membran mit einer Größe von 0,45 μm filtriert). Danach wurden 2-10 mg Protein über einen 1 mL *Loop* auf die Säule geladen und das Laufpuffervolumen bis zur Elution der Proteinfractionen (Detektion über UV bei 280 nm) gemessen. Die Reinheit des Enzyms erfolgte durch die Integration der Signale. Über den Säulenlauf von fünf kommerziell erhältlichen Standardproteinen mit bekannter Größe (β -Amylase: 200 kDa; Alkohol Dehydrogenase: 150 kDa; Bovin Serum Albumin: 66 kDa; Carbonanhydrase: 29 kDa; Cytochrom C: 12,4 kDa) wurde eine logarithmische Kalibriergerade erstellt, welche zur Bestimmung der Proteingröße der einzelnen Fraktionen diente.

6.3.7 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

VivaSpin-Konzentratoren (20 MWCO 10 kDa) wurden benutzt, um die Proteinlösung aufzukonzentrieren bzw. das Protein von niedermolekularen Verbindungen zu trennen. Dafür wurde die Lösung im VivaSpin bei 4 °C und 8000 g zentrifugiert, bis die gewünschte Konzentration erreicht war. Zuvor wurde der Konzentrator über Zentrifugation auf den gewünschten Puffer äquilibriert.

6.4 Proteinanalytik

6.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde entweder die Absorption bei 280 nm gemessern oder die Methode nach Bradford^[245] verwendet.

Für die Absorption wurde anhand der Proteinsequenz der molare Extinktionskoeffizient bestimmt. Dieser wurde mit dem Absorptionswert multipliziert, um die Konzentration zu errechnen. Da auch viele andere Moleküle/Partikel Licht bei 280 nm absorbieren bzw. streuen, wurde diese Methode nur bei gereinigtem Protein angewandt und der verwendete Puffer als Leerwert benutzt.

Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurden 100 µL der Proteinlösung mit 900 µL Bradford-Reagenz (0.02% (w/v) Coomassie G-250, 5% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Phosphorsäure in wässriger Lösung) und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Absorptionsmessung bei 595 nm. Zur Umrechnung des erhaltenen Wertes in eine Proteinkonzentration wurde zuvor eine Standardgerade aus sechs bekannten Konzentrationen (Dreifachbestimmung) einer BSA-Lösung (5-100 µg/mL) bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels einer Regressionsfunktion (Polynom 2. Grades).

6.4.2 SDS-PAGE

Die Proteinexpression und -reinigung wurden durch SDS-Gelelektrophorese überprüft. Zur Probenvorbereitung wurden ca. 10 µg Proteinmenge auf 60 µL mit Wasser aufgefüllt, 15 µL 5-fach SDS-Puffer (s.u.) zugegeben und für 5 min bei 99°C erhitzt. Für die Detektion von intermolekularen Disulfidbrücken wurde der Probenpuffer ohne SDS verwendet und außerdem kein Hitzeschritt durchgeführt. 10 µL der Lösungen wurden jeweils in die Geltaschen pipettiert. Als Proteinstandard wurden 10 µL *Proteinladder* (RotiMark® 10-150 kDa, Carl Roth) verwendet. Das Gel wurde an eine Elektrophoresekammer angeschlossen und eine konstante Spannung von 180V eingestellt. Nach 45-60 min (wenn die Lauffront das Ende der Kammer erreicht hatte) wurde das Gel für 30 min in Fixierlösung inkubiert, mit Wasser gewaschen und anschließend über Nacht in kolloidalen *Coomassie-Brilliant-Blue* Lösung gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mindestens 8 h in destilliertem Wasser. Die Zusammensetzung aller Lösungen, die zur Gelherstellung bzw. -färbung verwendet wurden, sind im Folgenden dargestellt.

Stammlösungen:

Trenngelpuffer: 1.5 M TRIS/HCl; pH 8.8

Sammelgelpuffer: 0.5 M TRIS/HCl; pH 6.8

SDS Stammlösung: 10% (w/v) Natriumdodecylsulfat

APS Stammlösung: 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung: 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1; Carl-Roth)

Mischlösungen:

Probenpuffer (5x): 10% SDS, 30% Saccharose, 0.1% Bromphenolblau, alle (w/v) in Sammelgelpuffer + 50 mM DTT

Trenngelmischung: 144 mL Aqua dest.; 102 mL Trenngelpuffer; 4 mL SDS Stammlösung

Sammelgelmischung: 157 mL Aqua dest.; 67 mL Sammelgelpuffer; 27 mL SDS Stammlösung

Trenngel (12%): 1.5 mL Acrylamid/Bisacrylamid; 2.25 mL Trenngelmischung; 20 µL APS; 20 µL TEMED
Sammelgel (4.5%): 0.3 mL Acrylamid/Bisacrylamid; 1.71 mL Sammelgelmischung; 20 µL APS; 20 µL TEMED

Radikalstarter (APS) und Katalysator (TEMED) wurden direkt vor dem Gießen hinzugefügt

Gelfärbung:

Fixierlösung: 30% Ethanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v)

Kolloidales Coomassie: 2% H₃PO₄, 5% Al₂(SO₄)₃, 0.02% Coomassie Brilliant Blue G-250 (alle w/v), 10% EtOH (v/v)

6.4.3 Massenspektrometrische Untersuchung der Proteinsequenz

Durch eine massenspektrometrische Untersuchung der Primärsequenz sollte untersucht werden, ob durch die Inkubation der DERA mit Acetaldehyd (3) kovalente Bindungen eingegangen werden. Dazu wurde das Protein für 3 h bei 25 °C mit 300 mM Acetaldehyd (3) inkubiert. Da eine Schiff'sche Base zwischen dem Aldehyd und den Lysin-Resten des Enzyms vermutet wurde, diese aber für eine massenspektrometrische Untersuchung nicht stabil genug ist, wurde anschließend ein Überschuss (400 mM) an Natriumborhydrid zugegeben, um die möglichen Imine zu reduzieren. Weil Natriumborhydrid nur unter basischen Bedingungen stabil ist, wurde die Reaktion in Boratpuffer (200 mM, pH 8.5) durchgeführt.^[246] Anschließend erfolgte die Proteinfällung mit 10% (v/v) einer 70%igen Trichloressigsäure-Stammlösung. Das Pellet wurde zwei Mal mit Aceton gewaschen, getrocknet und in 100 µL TRIS/HCL (100 mM, pH 8.5) mit 8 M Harnstoff im Ultraschallbad gelöst. Der Harnstoff wurde anschließend durch Zugabe von 300 µL TRIS/HCL auf 2 M verdünnt. Nach einem tryptischen Verdau (1 h mit 0.125 mg/mL Trypsin) wurden die Proteinproben mittels eines RP C4 ZipTips Reinigungskits (Millipore) entsalzt und aufkonzentriert. Die abschließende Analyse erfolgte durch ein LC-MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer (Ultrafextreme; Bruker Daltonics).

6.4.4 Circular-Dichroismus (CD)-Spektroskopie

Sekundärstrukturbestimmung

Das gereinigte Protein in 20 mM KP_i-Puffer (pH 7.0) wurde durch einen Sterilfilter (0.45 µm) von Aggregaten befreit und die Konzentration auf 0.2-0.4 mg/mL eingestellt. In einer Quarzküvette mit 0.2 cm Schichtdicke wurde zunächst das CD-Spektrum des Puffers als Leerwert vermessen. Dazu wurde bei einer Temperatur von 20 °C ein Wellenlängen-Scan von 190-250 nm mit einer Geschwindigkeit von 0.5 nm/s durchgeführt, bei der die Elliptizität und die Spannung aufgezeichnet wurden. Anschließend erfolgte die Vermessung der Proteinprobe unter denselben Bedingungen. Das Spektrum wurde insgesamt fünf Mal akkumuliert.

Schmelzpunktbestimmung

Da ein großer Teil der DERA-Sekundärstruktur aus α -Helices besteht, ist das CD-Spektrum durch zwei charakteristische Minima bei 222nm und 208nm gekennzeichnet. Wird das Protein z. B. durch thermische Energie denaturiert, verschwindet dieses Minimum, da die α -Helices zerstört werden. Diese Eigenschaft wurde dazu verwendet, um den Schmelzpunkt und damit die Stabilität der verschiedenen DERA-Varianten zu bestimmen. Dafür wurde ein Temperaturgradient von 25°C bis (maximal) 100°C mit einer Heizrate von 1°C/min verwendet und für jede Temperatur die Elliptizität bei 222nm gemessen. Anschließend wurde der Schmelzpunkt bestimmt, welcher als der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve definiert wurde.

6.4.5 Bestimmung der Enzymaktivität

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde ein indirekter Assay verwendet, da die Produkte der natürlichen DERA-Reaktion photometrisch nicht direkt detektierbar sind. In diesem literaturbekannten Assay katalysiert die DERA die Retro-Aldolreaktion von 2-Desoxy-D-ribose-5-phosphat (DRP) (**4**) zu D-Glyceraldehyd-3-phosphat (G3P) (**5**) und Acetaldehyd (**3**). G3P wird durch den Enzymkomplex GDH/TPI (Glycerol-3-phosphate-Dehydrogenase/Triosephosphat-Isomerase) zuerst isomerisiert und anschließend reduziert.^[87, 247] Bei der Reduktion wird NADH als Kofaktor oxidiert (vgl. Abbildung 6-1). Dies wird photometrisch bei einer Absorptionswellenlänge von 340 nm in einer 1 cm Quarzküvette gemessen.

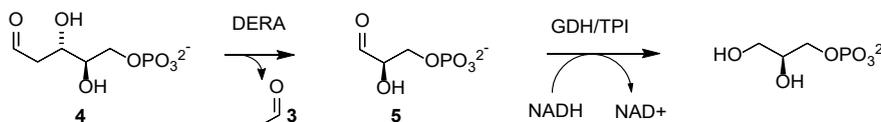


Abbildung 6-1: Reaktionsschema des gekoppelten Assays zur DERA-Aktivitätsbestimmung. Bei der DERA-katalysierten Retro-Aldolreaktion wird neben Acetaldehyd (**3**) D-Glyceraldehyd-3-phosphat (**5**) gebildet. Dies kann nach einer Isomerisierung von TPI durch die GDH unter NADH-Verbrauch reduziert werden, welches wiederum photometrisch verfolgt werden kann.

Der Reaktionsmix bestand aus 0.4mM DRP, 0.15mM NADH, 4U GDH, 11U TPI und 10 μ L DERA Lösung in Triethanolamin-Puffer (100mM, pH 7.0). Die Enzymkonzentration wurde so gewählt, dass maximal 10% des NADH während der Reaktionszeit von 1 min verbraucht wurde, um einen linearen Reaktionsverlauf zu gewährleisten. Vor der Zugabe des Enzyms wurde die Lösung im Photometer auf die entsprechende Temperatur (Standardmessungen bei 25°C) temperiert. Der ΔA -Wert (Absorptionsabnahme pro Minute) wurde über eine Kalibriergerade mit fünf verschiedenen NADH-Konzentrationen ($R^2 = 0,99$; $\epsilon = 5112 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in den Verbrauch an NADH umgerechnet. Um Substanzmengen zu sparen, wurde ein Assay-Volumen

von 400 μL verwendet. Somit entspricht der ΔA -Wert von 0.1 min^{-1} in einer 1 cm Quarzküvette und 0.4 mL Gesamtvolumen einem NADH-Verbrauch von $(0.1 \text{ min}^{-1} \times 0.4 \times 10^{-3} \text{ L}) / (1 \text{ cm} \times 5122 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) = 7.8 \times 10^{-3} \mu\text{mol min}^{-1}$.

Da die GDH/TPI im Überschuss zugegeben wurde, war die DERA-katalysierte Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, sodass der Verbrauch an NADH dem Verbrauch der D5P entsprach. Aus diesem Wert konnte bei bekannter Enzymkonzentration die spezifische Aktivität (U/mg) ermittelt werden, welche definiert ist als die Menge an Substrat (in μmol), welche in einer Minute von einem Milligramm Enzym umgesetzt wird. Aus dem oben errechneten Wert des NADH-Verbrauchs von $7.8 \times 10^{-3} \mu\text{mol min}^{-1}$ ergibt sich also bei einer Enzymmenge von 10 μL mit 0.1 mg/mL eine spezifische Aktivität von 7.8 U/mg.

6.4.6 Aktivitäts-basierte Halbwertszeitmessungen

Die Stabilität der DERA bezüglich Acetaldehyd (3) oder thermischer Inkubation wurde mit dem oben beschriebenen Aktivitätsassay gemessen. In Bezug auf Thermostabilität wurden 900 μL einer KP_i-Puffer-Lösung (20 mM, pH 7.0) auf die entsprechende Temperatur vorgewärmt, 100 μL der 10-fachen Enzymlösung zugegeben und die erste Messung gestartet. Die gemessene Aktivität entsprach dann 100%. Danach wurde in ausgewählten Zeitintervallen die relative Aktivität zum Anfangswert gemessen und anschließend über eine exponentielle Zerfallsfunktion erster Ordnung die Halbwertszeit bestimmt. Die Stabilität bezüglich Acetaldehyd (3) wurde nach dem gleichen Prinzip bestimmt. Dazu wurden 100 μL einer 10-fachen, wässrigen Acetaldehyd-Lösung (am besten zuvor frisch destilliert oder neu geöffnet) mit 900 μL der DERA-Lösung vermischt und anschließend bei 25 °C inkubiert.

6.5 Röntgenkristallstrukturaufklärung

Die Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallstrukturanalytik wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Oliver H. Weiergräber aus dem Institut für Strukturbiochemie im Forschungszentrum Jülich (ICS-6) durchgeführt. Während die Proteine selbstständig gereinigt wurden, sind die Kristallisationen gemeinsam angesetzt worden. Die Datensätze wurden in Grenoble von Dr. Joachim Granzim und Dr. Oliver H. Weiergräber gemessen und die Auswertung des Beugungsmusters erfolgte zum großen Teil von Dr. Oliver H. Weiergräber. In Rahmen ihrer Bachelorarbeit wurden die Reinigung und Kristallisation der DERA aus *S. halifaxensis* zusammen mit Frau Julia Bramski durchgeführt.

6.5.1 Proteinkristallisation

Das Screening für Kristallisationsbedingungen der DERAs wurde bei Raumtemperatur mittels *Sitting-Drop* Dampfdiffusion durchgeführt, bei denen ein Robotersystem (*Freedom EVO*, *Tecan*) benutzt wurde. Erste Kristalle wurden nach 1-3 Tage erhalten. Vor der Kryokühlung wurden die Kristalle von DERA_{EC} und DERA_{CP} in einer Reservoirpuffer-Lösung mit 15 % (v/v) Glycerol (DERA_{CP}) bzw. 7-10 % (v/v) Glycerol (DERA_{EC}) durchtränkt. Die Kristalle von DERA_{SH} wurden aus ihrer Ursprungslösung weiter verarbeitet.

6.5.2 Messung des Diffraktionsmusters

Die Datensätze der Röntgenstrahlen-Diffraktion wurden bei 100K unter Verwendung von ID23-1 und ID29 Strahlenlinien des *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF; Grenoble, Frankreich) durchgeführt. Dieser ist mit PILATUS 6M Detektoren (Dectris) ausgestattet. Die Prozessierung der Daten wurde mit XDS und XSCALE durchgeführt.^[237]

6.5.3 Strukturbestimmung

Die initialen Phasen für DERA_{CP} und DERA_{EC} (monomere Formen) wurden durch molekularen Ersatz mit MOLREP^[238] durchgeführt, bei denen die A-Kette der wt-DERA_{EC} (PDB 1JCL) als Template verwendet wurde. Die ersten Modelle wurden in einem iterativen Prozess optimiert, indem eine abwechselnde, reziproke Phasenverfeinerung in *phenix.refine*^[248] mit einer Strukturänderung und *Coot*^[239] durchgeführt wurde. Das finale Modell von DERA_{CP} (tetragonale Kristallform) diente als Template für die DERA_{CP} (hexagonale Kristallform) und die DERA_{SH}. Die Validierung der Strukturen mit *MolProbity*^[249] lieferten gute Geometrien, bei der sich alle Reste in den erlaubten Geometrien des Ramachandran Plots befanden.

6.6 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

NMR-Analysen wurden ausschließlich im ICS-6 zusammen mit Herrn Dr. Rudolf Hartmann durchgeführt. Die Messung der NMR-Spektren erfolgte durch Herrn Dr. Rudolf Hartmann und die Auswertungen wurden in gemeinschaftlicher Arbeit bearbeitet.

6.6.1 Probenvorbereitung

Für die Protein-NMR-Messungen wurde ausschließlich ¹⁵N- (und ¹³C-) markierte DERA verwendet, welche nach 6.3.2 hergestellt wurde. Nach der Proteinreinigung wurde die

Proteinlösung in 50mM entgasten KP_i-Puffer (pH 6.8) mit 1mM DTT umgepuffert, auf 0.2-0.5mM (TROSY/HSQC) bzw. 1mM (3D-Experimente) aufkonzentriert und 5% D₂O zugegeben. Für Messungen über mehrere Tage wurde zusätzlich Natriumazid (0.05% (w/v)) beigelegt. Anschließend wurden 500µL (bzw. 370µL, wenn ein Shigimi-Röhrchen verwendet wurde) in ein NMR-Röhrchen gegeben. Für die Detektion von Reaktionsprodukten, welche durch eine Inkubation der unmarkierten DERA in ¹³C-markierten Acetaldehyd (3) synthetisiert wurden, wurden diese zuvor über einen Zentrifugalkonzentrator (VivaSpin, vgl. 6.3.7) vom Protein getrennt.

6.6.2 NMR-Messungen

Die NMR-Experimente wurden bei 25 °C in Bruker Avance III HD NMR und Varian VNMRs Instrumenten (600, 700 und 900MHz) durchgeführt, welche mit einem kryogenetischen Z-Achse-Pulsfeldgradienten ausgestattet sind. Für die chemische Verschiebung der ¹H- und ¹³C-Atome wurde 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS) als interner Standard bei 0ppm verwendet. Die ¹⁵N-Verschiebungen wurden indirekt über die Verhältnisse der Frequenzen referenziert.^[250] Die Zuordnung des Proteinrückgrats wurde durch eine Kombination von multidimensionalen NMR Experimenten durchgeführt: 2D (¹H-¹⁵N)-TROSY,^[143] 3D HNCA,^[251] 3D HNCO(CA),^[252] 3D HNCO,^[144] 3D HN(CA)CO^[253] und 3D (¹H-¹⁵N)-HSQC-TOCSY^[180]. Die Rohdaten wurden mit NMRPipe v.8.1^[235] prozessiert und mittels CppNmr v.2.4.^[236] analysiert.

6.7 In-silico-Experimente

6.7.1 Moleküldynamik-Simulationen

Um ein strukturelles Ensemble für die folgenden CNA Berechnungen zu erzeugen, wurden Moleküldynamik (MD)-Simulationen mit Amber14 unter Verwendung des ff14SB Kraftfeldes durchgeführt.^[240] Dabei wurden die Atomkoordinaten der (dimeren) Kristallstrukturen der wt-DERAs aus *E. coli* (1JCL), *T. maritima* (3R12), und *P. aerophilum* (1VCV) aus der Proteindatenbank genommen. Die Strukturen beider psychrophilen DERAs wurden zuvor kristallographisch bestimmt (vgl. 6.5.3). Die Ladung der Systeme wurde durch entsprechende Gegenionen (Natrium oder Chlorid) neutralisiert. Anschließend wurden die Proteine von einer oktaedrischen Box von TIP3P Wassermolekülen^[254] umhüllt, sodass der Minimalabstand zwischen dem Ende der Wasserbox und dem nächsten Proteinatom mindestens 11Å betrug. Nach einer Energieminimierung wurde das System in zwei Schritten äquilibriert. Zuerst wurde die Temperatur linear

innerhalb von 100ps von 0K auf ca. 300K (s. u.) erhöht, bevor in weiteren 100ps der Druck äquilibriert wurde. Die freien MD-Simulationen wurden in 2fs Schritten, bei 300K und mit einer Gesamtlänge von 100ns durchgeführt. Für jede DERA-Variante wurden drei unabhängige Simulationen durchgeführt. Dies wurde durch leicht unterschiedliche Äquilibrationstemperaturen von $T = 299.5\text{K}$, 300.0K und 300.5K gewährleistet. Abgesehen von den ersten 5ns wurde in 40ps Zeitschritten jeweils eine Konformation extrahiert. Daraus resultierten 1125 Konformationen für die ersten und 1250 für die zweiten 50ns. Die Skripte mit allen Parametern für die Minimierung, Äquilibration und die freien MDs sind im Anhang unter 7.4.1 zu finden.

Die Analyse der MD-Trajektorien wurde durch `cpptraj`^[255] als Teil des Softwarepaketes `AmberTools`^[164] durchgeführt. Das Abstandsquadrat der Atome (engl. *root mean square deviation*, RMSD) der C_α -Atome in Bezug auf die Startstruktur wurde als Maß für die strukturelle Ähnlichkeit sowie der Trägheitsradius (engl. *radius of gyration*, RoG) der C_α -Atome für die Kompaktheit verwendet. Des Weiteren wurde das Abstandsquadrat des inneren Produktes (engl. *root mean square inner product*, RMSIP) benutzt, um die Menge der Überlappung zwischen den Konformationsräumen von zwei MD-Simulationen zu bemessen.^[256] Nach einem Protokoll aus der Literatur^[164] wurde zuerst eine prinzipielle Komponentenanalyse der Kovarianzmatrix der C_α -Atome bezogen auf die Fluktuation der Atompositionen durchgeführt. Daraus wurden die RMSIP-Werte zu den ersten zehn Eigenvektoren der prinzipiellen Komponentenanalyse berechnet. Bevor die Kovarianzmatrix bestimmt wurde, wurden die Konformationen superpositioniert, wobei nur die 80% der Reste einbezogen wurden, welche die geringste Abstandsquadratfluktuation (engl. *root mean square fluctuations*, RMSF) hatten, um somit eine falsche Korrelation auszuschließen.^[257-258]

6.7.2 Constraint network analysis (CNA)

In dem Programm CNA wird die DERA als ein artifizielles Netzwerk beschrieben, welches die kovalenten und nicht-kovalenten Interaktionen der einzelnen Atome des Systems miteinander verbindet.^[163] Eine Determination der Rigidität innerhalb des Netzwerks führt dazu, dass dieses in rigide Cluster aufgeteilt wird, welche durch flexible Regionen miteinander verbunden sind. Durch eine Analyse der Abhängigkeit dieser Cluster von der Temperatur kann der Verlust der Rigidität simuliert werden, welcher einer thermischen Entfaltung des Proteins entspricht. Hierbei wurde der Energieterm E_{HB} der Wasserstoffbrücken nach einer modifizierten Version des Potentials nach *Mayo et al.*^[77, 259] berechnet, welcher größer (weniger negativ) als ein definierter *Cutoff*-Wert (E_{cut}) ist. Dieser wurde schrittweise aus dem Netzwerk entfernt. Dabei variierte E_{cut} zwischen -0.1kcalmol^{-1} und -6.0kcalmol^{-1} mit einer Schrittgröße von 0.1kcalmol^{-1} . Da ein linearer Zusammenhang zwischen E_{cut} und der Temperatur T besteht, entspricht der Energiewert

von E_{cut} während der Entfaltungssimulation der Erhöhung der Temperatur von 302K auf 420K (in Schritten von 2K).^[81-82] Die Ergebnisse dieser Analyse konnten direkt auf lokale und globale Eigenschaften der DERA bezüglich Stabilität/Flexibilität übertragen werden.^[212] Konkret bedeutete dies, dass der Phasenübergangspunkt T_p als ein berechneter Schmelzpunkt definiert wurde, in dem der größte rigide Cluster flexibel wird und somit direkt in Verbindung mit der Thermostabilität des Proteins steht.^[81-83] T_p wurde einem Entropiewert H_{type2} zugeordnet, welcher den Grad an Unordnung innerhalb des Netzwerkes während der Entfaltungssimulation der DERA beschreibt. Es wurden H_{type2} ^[81, 212] gegen die Temperatur aufgetragen und in einer doppelt reziproken, sigmoiden Kurve zueinander korreliert. Der Schmelzpunkt bzw. Phasenübergangspunkt T_p entsprach dabei dem Wendepunkt der Kurve, welcher den größten Unterschied in den Werten der Asymptoten hatte.^[83]

Um die lokale Rigidität der verschiedenen DERAs auf einer mikroskopischen Ebene zu verstehen (um z. B. verschiedene Bereiche der Strukturen miteinander vergleichen zu können), wurde eine Stabilitätskarte rc_{ij} erstellt, bei der die rigiden Kontakte zwischen zwei Resten i und j identifiziert werden. Ein solcher Kontakt existiert, wenn beide Reste zu demselben rigiden Cluster gehören. Sie wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, um die Anzahl und Stärke der rigiden Kontakte innerhalb der 3D-Struktur zu visualisieren und die Energien innerhalb bestimmter Regionen (Sekundärstrukturelemente, Dimer-Interface etc.) zu bestimmen. Dabei wurden nur die rigiden Kontakte zwischen Resten betrachtet, welche $\leq 5 \text{ \AA}$ voneinander entfernt sind.^[84]

7 Anhänge

7.1 DNA- und Proteinsequenzen

Im Folgenden sind die DNA-Sequenzen der *deoC*-Gene im pET21a(+)-Vektor, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, dargestellt. Die entsprechenden Aminosäuren sind unterhalb der DNA-Sequenz mit angegeben.

DERA aus *C. psychrerythraea*

```
tacatatgct tgatattaaa gcagtagccc aacgtgcact gtcactgatg gatttaacga gctttaccaa cacggagact
atgtatacag actataatctt cgtcatcggg ttgcacgtga cagtgactac ctaaaattgct cagaatggtt gtgcctctga
>>.....deoC_CP.....>
  m s d i k a v a q r a l s l m d l t s l t n t e t

gaccaagaaa ttattgacct ttgtcgtaa gctaaatcac ctgcccgcga aacggccgct atttgatttt tcccacgctt
ctggttcttt aataactgga aacagcagtt cgatttagtg gacggccgct ttgcccgcga taaacataaa agggctgcgaa
>.....deoC_CP.....>
  d q e i i d l c r q a k s p a g e t a a i c i f p r

tattcctgtg gctaagaagg cgttaaaagc gcaacaaaca cctcacatta aaattgcaac cgtcactaat tttccacagg
ataagacac cgattcttcc gcaattttcg cgttgtttgt ggagtgaat ttaacgttg gcagtgatta aaaggtgtcc
>.....deoC_CP.....>
  f i p v a k k a l k a q q t p h i k i a t v t n f p q

gcaatgacga tcttgatatt gcgtggcagc aaacacgtgc tgctgtcgtt tatggcgtg atgaagtoga tttagtcttt
cgttactgct agaactataa cgcaaccgctc ttgtgcacg acgacagcga ataccgcgac tacttcagct aaatcagaaa
>.....deoC_CP.....>
  g n d d l d i a l a e t r a a v a y g a d e v d l v f

ccttaccgtg cgttaattca gggtaatgag acaattgggt ttgatattgt aaaggtatgt aaacaagcct gtacggcga
ggaatggcac gcaattaatg ccatttactc tgtaaacaa aactatacca tttccatata tttgttcgga catcgccgtt
>.....deoC_CP.....>
  p y r a l i q g n e t i g f d m v k v c k q a c s g

tgctaagctt aaagtcatca ttgaaacagg tgagcttaaa tctgaagaat tgattcgtaa agcgagtga attgctatca
acgattcga tttcagtagt aactttgtcc actogaattt agacttctta actaagcatt tcgctcactt taacgatagt
>.....deoC_CP.....>
  n a k l k v i i e t g e l k s e e l i r k a s e i a i

acgctggcgc cgactttatt aaaacatcga caggtaaaagt agccattaat gccacacctg aagcggctaa agttatgta
tgcaaccgcg gctgaaataa ttttgtagct gtocatttca tcgtaatta cgggtgggac ttcccgatt tcaatacaat
>.....deoC_CP.....>
  n a g a d f i k t s t g k v a i n a t p e a a k v m l

accgtgatta aaaataaaaa tactcgggtg ggatttaaac ctgcaggagg cgttcgtaat gccgatgatg ccgctattta
tggcactaat ttttattttt atgacgccac ctaaatttg gacgtctccc gcaagcatta cggctactac ggcgataaat
>.....deoC_CP.....>
  t v i k n k n t a v g f k p a g g v r n a d d a a i

tcttgattta gcagataata ttttaggtaa tgagtgggca gatgctaact actttcgttt ttggtgctagt agcttactta
agaactaaat cgtctattat aaaatocatt actcaaccgt ctacgattag tgaagcaaaa accacgatca togatgaat
>.....deoC_CP.....>
  y l d l a d n i l g n e w a d a n h f r f g a s s l l

tcagcttatt agatacactt ggacataaaa gtaatactaa gtcacaaagt aactaccacc accaccacca ccaactgagaa
agtogaataa tctatgtgaa cctgtatttt cattatgatt cagtagtcca ttgatggtgg ttggtggtgt ggtgactctt
>.....deoC_CP.....>> His-Tag
  i s l l d t l g h k s n t k s s s n y
```

DERA aus *S. halifaxensis*

```

ttaactttaa gaaggagata tacatatgag cgacttaaaa aaagcagcac aacaagccat tagtctaatg
aattgaaatt ctctctctat atgtatactc gctgaatttt ttctgctgty ttgttcggtg atcagattac
>>.....deoc_SH.....>
      m s d l k k a a q q a i s l m

gatcttacta ctctaaatga cgatgacaca gatcaaaaag tgatcgaact atgtcataaa gctaagacgc
ctagaatgat gagatttact gctactgtgt ctagtttttc actagcttga tacagtattt cgattotgog
>.....deoc_SH.....>
      d l t t l n d d d t d q k v i e l c h k a k t

ctgctggtga cactgctgct atctgtattt accctcgctt tattctattt gcgcgcaaaa ccctaaacga
gacgaccact gtgacgacga tagacataaa tgggagcgaataa ataaggataa cgocgctttt gggatttgct
>.....deoc_SH.....>
      p a g d t a a i c i y p r f i p i a r k t l n

aattggtggc gacgatatta aaatcgctac ggtaactaac ttcccgcacg gtaacgacga tatcgctatc
ttaaccaccg ctgctataat ttttagcgatg ccattgattg aagggcgtgc cattgctgct atagcgatag
>.....deoc_SH.....>
      e i g g d d i k i a t v t n f p h g n d d i a i

gcggtattag aaactcgcgc agcagttgca tacggcgccg acgaagtoga cgtagtgttc ccataaccgcg
cgccataatc ttgagcgcg tcgtcaacgt atgcgcgcgc tgcttcagct gcatacacaag ggtatggcgc
>.....deoc_SH.....>
      a v l e t r a a v a y g a d e v d v v f p y r

cactaatgga aggcaatgaa actgtaggct ttgagcttgt taaggcgtgt aaagaagcct gtggcgaaga
gtgattaact tccgttactt tgacatccga aactcgaaca attccgcaca ttctctcga caccgctctt
>.....deoc_SH.....>
      a l m e g n e t v g f e l v k a c k e a c g e

cactatcctt aaggatgata tcgagctcgg cgtgttagcc gatcctgctc ttattcgtaa agcatctgag
gtgataggaa ttccactagt agctcagacc gcacaatcgg ctaggacgag aataagcatt tcgtagactc
>.....deoc_SH.....>
      d t i l k v i i e s g v l a d p a l i r k a s e

ctatctatcg atcgggcgc agacttcac aagacctcta ctggtaaagt tgctgttaac gcaacccttg
gatagatagc tacgcccgcg tctgaagtag ttctggagat gaccatttca acgacaattg cgttgggaac
>.....deoc_SH.....>
      l s i d a g a d f i k t s t g k v a v n a t l

aagccgctga gatcatgatg actgtgatca gcgaaaagaa ccctaaagtt ggcttcaagc ctgctggcgcg
ttcggcgact ctagtactac tgacactagt cgcttttctt gggatttcaa ccgaagtctg gacgaccgcc
>.....deoc_SH.....>
      e a a e i m m t v i s e k n p k v g f k p a g

cgtaaaagac gctgcggcag ctgcagagtt tttagtggtt gcggcgcgctc ttcttgggtga tgactgggcg
gcattttctg cgacgcccgc gactgtctcaaa aaatccacaa cgccgcgcag aagaaccact actgaccgcg
>.....deoc_SH.....>
      g v k d a a a a a e f l g v a a r l l g d d w a

actctcggca cattccgctt cgtgtctcgc agccttttga ctaacctgct gcatacgett gagctagctg
tgaggacgct gtaaggcaaa gcccacgaagc tcggaaaact gattggacga cgtatgcgaa ctcgatcgac
>.....deoc_SH.....>
      t p a t f r f g a s s l l t n l l h t l e l a

acgcaccaca aggtgcacaa ggttaccacc accaccacca ccaactgagat ccggctgcta acaagcccg
tgctggtgtg ttcaactggtt ccaatggtg tggtggtggt ggtgactcta gcccacgat tgtttcggcg
>.....deoc_SH.....>>      His-Tag
      d a p q g a q g y

```

DERA aus *E. coli*

```

ttaactttaa gaaggagata tacatatgac tgatctgaaa gcaagcagcc tgcgtgcaact gaattgatg
aattgaaatt cttcctctat atgtatactg actagacttt cgttcgctcg acgcacgtga cttaactac
>>.....deoC_EC.....>
      m t d l k a s s l r a l k l m

gacctgacca cctgaaatga cgacgacacc gacgagaaag tgatcgccct gtgtcatcag gcaaaaactc
ctggactggg gggacttact gctgctgtgg ctgctctttc actagcggga cacagtagtc cggttttgag
>.....deoC_EC.....>
      d l t t l n d d d t d e k v i a l c h q a k t

cggtcggcaa taccgcgct atctgtatct atcctcgctt tatcccgatt gtcgcaaaa ctctgaaaga
gccagccgtt atggcggcga tagacataga taggagcga atagggctaa cgagcgttt gagactttct
>.....deoC_EC.....>
      p v g n t a a i c i y p r f i p i a r k t l k

gcagggcacc cggaaatcc gtatcgctac ggtaaccaac ttcccacacg gtaacgacga catcgacatc
cgtcccgtgg ggcctttagg catagcagat ccattggttg aagggtgtgc cattgtgct gttagctgat
>.....deoC_EC.....>
      e q g t p e i r i a t v t n f p h g n d d i d i

gcgctggcag aaaccctgac ggcaatcgcc tacggtgctg atgaagtga cgttgtgttc cgtaccgagc
cgcgaccgtc tttgggacag ccgttagcgg atgccacgac tacttcaact gcaacacaag gcatggcgc
>.....deoC_EC.....>
      a l a e t r a a i a y g a d e v d v v f p y r

cgctgatggc gggtaacgag caggttgggt ttgacctggt gaaagcctgt aaagaggctt gcgcggcagc
gcgactaccg cccattgctc gtccaaccaa aactggacca ctttcggaca ttctccgaa cgcgcgctcg
>.....deoC_EC.....>
      a l m a g n e q v g f d l v k a c k e a c a a

gaatgtactg ctgaaagtga tcatcgaaac cggcgaactg aaagacgaag cgctgatccg taagcgtct
cttacatgac gactttcact agtagctttg gccgcttgac tttctgcttc gcgactaggc atttcgaga
>.....deoC_EC.....>
      a n v l l k v i i e t g e l k d e a l i r k a s

gaaatctcca tcaaagcggg tgcggacttc atcaaacct ctaccgtaa agtggctgtg aacgcgacgc
ctttagaggt agtttcgccc acgcctgaag tagttttgga gatggccatt tcaccgacac ttgcgctgag
>.....deoC_EC.....>
      e i s i k a g a d f i k t s t g k v a v n a t

cggaaagcgc ggcacatcag atggaagtga tccgtgatat gggcgtagaa aaaaccgttg gtttcaaac
gcctttcgag cgcgtagtac taccttcaact aggcactata cccgcacttt ttttgcaac caagtttg
>.....deoC_EC.....>
      p e s a r i m m e v i r d m g v e k t v g f k

ggcggggcgc gtgcgtactg cggaagatgc gcagaaatat ctgcaccattg cagatgaact gttcggtgct
ccgcccgcg cacgcatgac gccttctacg cgtcttata gagcggtaac gtctacttga caagccacga
>.....deoC_EC.....>
      p a g g v r t a e d a q k y l a i a d e l f g a

gactgggcag atgcgcgca ctaccgcttt ggcgcttcca gctgtgtgc aagcctgctg aaagcgtggt
ctgaccgctc tacgcgcagt gatggcgaaa ccgcgaaggt cgcgacaccg ttcggacgac tttcgcgacc
>.....deoC_EC.....>
      d w a d a r h y r f g a s s l l a s l l k a l

gtcagggcga cggtaagagc gccagcagct accaccacca ccaccaccac tgagatccg ctgctaacaa
cagtggcct gccattctcg cgtcgtcoga tgggtgtggt ggtggtggtg actctaggcc gacgattggt
>.....deoC_EC.....>> His-Tag
      g h g d g k s a s s y

```

DERA aus *C. bovis*

```

atatgggtgg tatgatttcg cctttaaccc gtgatcgcgt tgcacoccta atggatgcaa ccttattaac
tataccacc atactaaagc ggaattggg cactagcgca acgtaggaat tacctacggt ggaataattg
>>.....deoC_CB.....>
  m g g m i s p l t r d r v a s l m d a t l l

ccctcaagca actcgtgatg atgttcgtag cttacaacgt accgcagttg atttaggttg cggtgagtt
gggagttcgt tgagcactac tacaagcacc gaatgttgca tggcgtcaac taaatccaac gccacgtcaa
>.....deoC_CB.....>
t p q a t r d d v r s l q r t a v d l g c g a v

tgcgtttcgc cttcgtgatt acctctcgca tgggcaggtc ctggcgaagg ggatgatgca gcaagcccta
acgcaaagcg gaagctacaa tggagacgct acccgtccag gaccagttcc cctactacgt cgttcgggat
>.....deoC_CB.....>
  c v s p s m l p l r w a g p g q g d d a a s p

ctgcaggac tagccctgat cctgcaggtg caactgcagt tcctcctggt cgtgttgcaa ccgttgttg
gagtcctcg atcgggacta ggacgtccac gttgacgtca aggaggacaa gcacaacgtt ggcaacaacc
>.....deoC_CB.....>
  t a g t s p d p a g a t a v p p v r v a t v v

tttctctagc ggtgcacatc aatccttagt taaggcaact gaagcacgat ttgcagttga acaaggtgca
aaaaggatcg ccacgtgtag ttaggaatca attccgttga cttcgtgcta aacgtcaact tgttccacgt
>.....deoC_CB.....>
g f p s g a h q s l v k a t e a r f a v e q g a

gatgaaattg atatggttat tatttttagca aacgcagttg caggggatat gaacgcaatg gtttccgaaa
ctactttaac tataccaata ataaaatcgt ttgcgtcaac gtcccctata cttgcgttac caaaggcttt
>.....deoC_CB.....>
  d e i d m v i i l a n a v a g d m n a m v s e

ttgttactgt tcgtgaagca gttccttttc ctgttgtttt aaaggttatt gttgaatcgg cactgttaac
aacaatgaca agcacttcgt caaggaaaag gacaacaaaa tttccaataa caacttagcc gtgacaattg
>.....deoC_CB.....>
  i v t v r e a v p f p v v l k v i v e s a l l

cgaagaacaa ctgcgaaccg catgccgagc agcacgaact gcagggtgcag attttggttaa gacttcgact
gcttcttgtt gacgcttggc gtacggctcg tcgtgcttga cgtccacgtc taaaacaatt ctgaagctga
>.....deoC_CB.....>
t e e q l r t a c r a a r t a g a d f v k t s t

gggtttcacc ctgcaggtag tgcaactggt gaagcagttc gaattatggc agaagaagtt ggtggggttt
cccaaagtag gacgtccacc acgttgacaa cttcgtcaag ctttaataccg tcttcttcaa ccaccccaa
>.....deoC_CB.....>
  g f h p a g g a t v e a v r i m a e e v g g v

taggggttaa ggcaagcggg gggattcgag attgggcaac tgcagttgca atggttgaag caggggcaac
atccccaatt ccgttcgccc ccctaagctc taaccggttg acgtcaacgt taccaacttc gtcccctgtg
>.....deoC_CB.....>
l g v k a s g g i r d w a t a v a m v e a g a

tcgttaggtt gttagcgcac ctgcacatc tttagcaggt gcacctgac accatoccca coactactga
agcaaatcca caatcgcgtg gagctggata aaatcgtcca cgtggactag tggtagtggt ggtagtgact
>.....deoC_CB.....>
t r l g v s a p r p i l a g a p d

```

His-Tag

DERA aus *T. maritima*

```

tatgatagag tacaggattg aggaggcagt agcgaagtac agagagttct acgagttcaa gcccgtcaga
atactatctc atgtcctaac tctccgtca tgccttcattg tctctcaaga tgctcaagtt cgggcagctc
>>.....deoC_TM.....>
  m i e y r i e e a v a k y r e f y e f k p v r

gaaagcgag gtattgaaga tgtgaaaagt gctatagagc acacgaatct gaaaccgttt gccacaccag
ctttcgcgtc cataacttct acacttttca cgatatctcg tgtgcttaga ctttgcaaaa cgggtgtggtc
>.....deoC_TM.....>
  e s a g i e d v k s a i e h t n l k p f a t p

acgatataaa aaaactctgt cttgaagcaa gggaaaatcg tttccatgga gctctgtgga atccgtgtta
tgctatattt ttttgagaca gaacttcggt ccttttagc aaaggtacct cagacacact taggcacaat
>.....deoC_TM.....>
  d d i k k l c l e a r e n r f h g v c v n p c

tgtgaaactg gctcgtgaag aactcgaag aaccgatgtg aaagtcgtca cggttgttgg ttttccactg
acactttgac cgagcacttc ttgagcttcc ttggctacac tttcagcagt ggcaacaacc aaaaggtgac
>.....deoC_TM.....>
  y v k l a r e e l e g t d v k v v t v v g f p l

ggagcgaacg aaactcggac gaaagcccat gaggcgattt tgcctgttga gaggggagcc gatgagatcg
cctcgttgc tttgagcctg ctttcgggta ctcgcgtaaa agcgacaact ctcacctcgg ctactctagc
>.....deoC_TM.....>
  g a n e t r t k a h e a i f a v e s g a d e i

atatggtcat caacgttggc atgctcaagg caaaggagtg ggagtacggt tacgaggata taagaagtgt
tataccagta gttgcaaccg tacgagttcc gtttcctcac cctcatgcaa atgctcctat attcttca
>.....deoC_TM.....>
  d m v i n v g m l k a k e w e y v y e d i r s

tgtcgaatcg gtgaaaggaa aagttgtgaa ggtgatcctc gaaacgtgct atctggatac ggaagagaag
acagcttagc cactttcctt tcaacaactt ccaactagtag ctttgcaaga tagacctatg ccttctctc
>.....deoC_TM.....>
  v v e s v k g k v v k v i i e t c y l d t e e k

atagcggcgt ggtcatttc caaacttgc ggagctcatt tctggaagac tccacggga tttggaacag
tatcgccga cacagtaag gttgaaaga cctcgagtaa agcacttctg aagtgccct aaacctgtc
>.....deoC_TM.....>
  i a a c v i s k l a g a h f v k t s t g f g t

gagggggcag cgcagaagac gttcatctca tgaatggat cgtgggagat gagatgggtg taaaagcttc
ctcccgcgtg gcgtctctg caagtagagt actttacctc gcacctcta ctctaccac attttcgaag
>.....deoC_TM.....>
  g g a t a e d v h l m k w i v g d e m g v k a

cggagggatc agaactctcg aggacgtgt taaaatgatc atgtacgggt ctgatagaat aggaacgagt
gcctccctag tcttgaagc tctcgcgaca attttactag tacatgccac gactatctta tcttgcctc
>.....deoC_TM.....>
  s g g i r t f e d a v k m i m y g a d r i g t s

tcgggagtta agatcgttca ggggggagaa gagagatag gaggtcacca ccaccaccac cactgagaat
agccctcaat tctagcaagt cccccctctt ctctctatac ctccagtgtt ggtggtggtg gtgactcta
>.....deoC_TM.....>> His-Tag
  s g v k i v q g g e e r y g g

```

DERA aus *P. aerophilum*

```

atgatacatt tagtagacta cgcgcttctc aagccgtatc tcacagtaga tgaagcagtc gccggggctc
tactatgtaa atcatctgat gcgcgaagag ttcggcatag agtgtcatct acttcgtcag cggccccgag
>>.....deoC_PA.....>
  m i h l v d y a l l k p y l t v d e a v a g a

gcaaggcgga ggagctgggc gtcgcgcgct attgcgtaaa tccatatac gccctgttg ttgcgccttt
cgttccgctt cctcgaccgc cagcgccgca taacgcattt aggtatatg cggggacaac aagccgaaa
>.....deoC_PA.....>
  r k a e e l g v a a y c v n p i y a p v v r p

gttgcggaaa gtaaagctct gogtagtggc ggacttcccc ttggggcct tgccaacggc cagcagaatt
caacgccttt catttcgaga cgcacaccgc cctgaagggg aaacccggga acggttgccg gtcgtcttaa
>.....deoC_PA.....>
l l r k v k l c v v a d f p f g a l p t a s r i

gccttggttt ctaggcttgc tgaagtggca gatgagatag acgtggtggc gcctataggc ctogtgaat
cggaaccaa gatccgaacg acttcaccgt ctactctatc tgcaccaccg cggatatccg gagcacttta
>.....deoC_PA.....>
  a l v s r l a e v a d e i d v v a p i g l v k

cgcggaggtg ggccgaggtg agaagggact taataagcgt tgtgggtgcc gcaggcgga gagtggtaa
gcgcctccac ccggctccac tcttccctga attattcgca acacccacgg cgtccgccct ctcaccattt
>.....deoC_PA.....>
  s r r w a e v r r d l i s v v g a a g g r v v

ggtaatcaca gaggagcctt atctaagga tgaggagagg tatacgttt acgacattat tgacagggct
ccattagtgt ctctcgaa tagattccct actcctctcc atatcgaaa tgctgtaata acgtctccga
>.....deoC_PA.....>
k v i t e e p y l r d e e r y t l y d i i a e a

ggggcccact ttataaaaag ctccaactgga ttgcgcgaag aggcctacgc gcccagacag gaaatcctg
ccccgggtga aatatttttc gaggtgacct aagcggcttc tccggatgcg gcggtctgtc ctttaggac
>.....deoC_PA.....>
  g a h f i k s s t g f a e e a y a a r q g n p

tacactcaac gccggagagg gcggcgcaa ttgcccgcta cataaaagag aaggggtata gactgggggt
atgtgagttg cggcctctcc gcgcgcggtt aacggcgat gtattttctc ttcccatac ctgaccccc
>.....deoC_PA.....>
  v h s t p e r a a a i a r y i k e k g y r l g

gaaaatggcg ggggggatta ggacaagga gcaggcaaag gccattgttg acgccattgg atggggcgag
ctttaccgc cccccctaat cctgttccct cgtccgtttc cggtacaac tgcgtaacc taccocgctc
>.....deoC_PA.....>
v k m a g g i r t r e q a k a i v d a i g w g e

gacccagccc gcgtcaggct ggggacgtcc acccagagg ctcttctaca ccaccaccac caccactgag
ctgggtcggg cgcagtccga ccctgcagg tgggtctcc gagaagatgt ggtggtggtg gtggtgactc
>.....deoC_PA.....>> His-Tag
  d a r v r l t s t e a l l

```

7.2 Reinigungschromatogramme

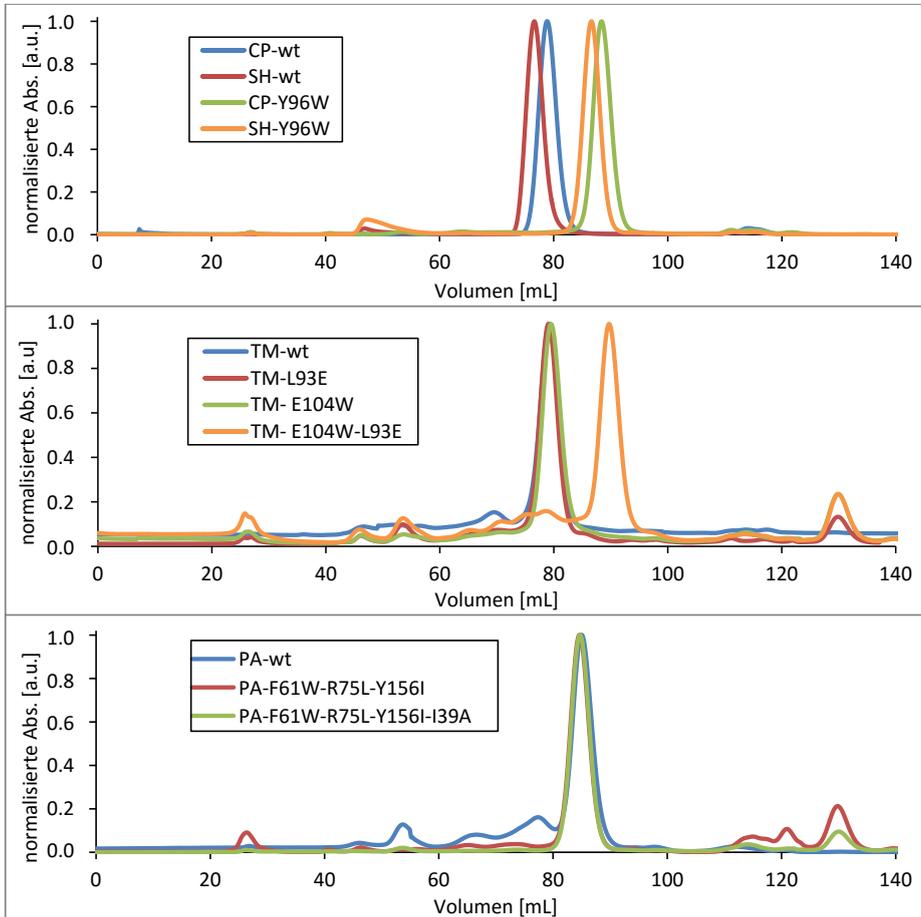


Abbildung 7-1: Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie der extremophilen DERAs (Wildtyp sowie verschiedene Mutanten), um deren Quartärstruktur zu bestimmen. Im oberen Diagramm wurden beide psychrophilen DERAs untersucht, während in der Mitte (*T. maritima*) und unten (*P. aerophilum*) die Chromatogramme der hyperthermophilen Enzyme abgebildet sind. Da monomere Enzyme im Vergleich zu ihren dimeren Pendanten einen längeren Säulenlauf haben, kann man schon im Diagramm durch den direkten Vergleich der verschiedenen Mutanten zum Wildtyp erkennen, welche Proteine monomerisiert werden konnten.

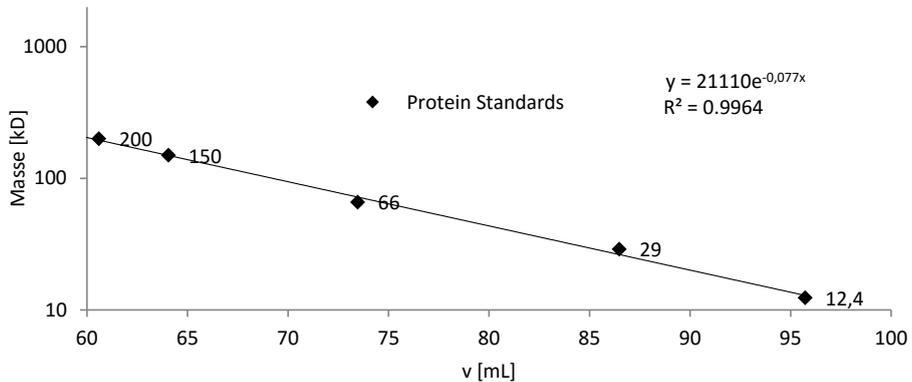


Abbildung 7-2: Kalibriergerade zur Bestimmung des Molekulargewichts der DERA-Varianten mittels SEC. Durch eine logarithmische Auftragung konnte eine lineare Beziehung zwischen den Proteinmassen und den Retentionszeiten ermittelt werden.

Tabelle 7-1: Molekulargewichte und Quartärstruktur der verschiedenen DERA-Varianten, welche durch SEC bestimmt wurden.

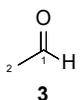
Quelle	DERA Variante		Masse [kDa]		Quartäre Struktur
	Mutante		<i>in vitro</i> (SEC)	berechnet	
EC	wt		48.32	56.6	Dimer
	K58E		33.60		Intermediat
	K58E-Y96W		24.68		Monomer
	Y96W		23.45		Monomer
CP	wt		47.69	56.6	Dimer
	Y96W		22.70		Monomer
SH	wt		56.53	56.2	Dimer
	Y96W		26.09		Monomer
PA	wt		29.30	50.7	Dimer
	61W-Y156I		29.76		Dimer
	F61W-R75L-Y156I		30.53		Dimer
	F61W-R75L-Y156I-I39A		30.36		Dimer
TM	wt		46.42	56.2	Dimer
	L93E		45.00		Dimer
	E104W		46.49		Dimer
	L93E-E104W		20.50		Monomer

7.3 NMR-Spektren

Die original NMR-Spektren, welche zur Signalzuordnung der niedermolekularen Verbindungen (7.3.1) und des Protein-Rückgrats (7.3.2) verwendet wurden, werden in den folgenden

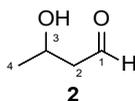
Abschnitten nicht gezeigt, da im ersten Fall die Spektren aus einem Substanzgemisch mit deutlich unterschiedlichen Signalhöhen gezeigt werden. Daher waren die Signale nur unter Verwendung unterschiedlicher Skalierung der Intensitäten zuzuordnen. Dies ist in einem Textdokument schwer darstellbar. Für die Zuordnung des Proteinrückgrats wurden ausschließlich 3D-Spektren aufgezeichnet, weswegen sich die Frage nach der Darstellung in einem Textdokument erübrigt. Die hier aufgeführten Daten sind also die chemische Verschiebungen und (im Fall der niedermolekularen Verbindungen) deren Aufspaltung, welche den entsprechenden Atomen zugeordnet wurden.

7.3.1 NMR-Zuordnung der Reaktionsprodukte der DERA-Reaktion mit Acetaldehyd



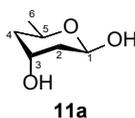
^1H NMR (600 MHz, H_2O): δ (ppm) = 2.24 (d, $^3J_{1,2} = 3.0$ Hz, 3 H, 2-H), 9.68 (q, $^3J_{1,2} = 3.0$ Hz, 1 H, 1-H)

^{13}C NMR (151 MHz, H_2O): δ (ppm) = 32.85 (C-2), 209.49 (C-1)



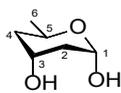
^1H NMR (600 MHz, H_2O): δ (ppm) = 1.26 (d, $^3J_{4,3} = 6.4$ Hz, 3 H, 4-H), 2.66 (ddd, $^2J_{2a,2b} = 16.9$ Hz, $^3J_{2a,3} = 7.8$ Hz, $^3J_{2a,1} = 2.7$ Hz, 1 H, 2-H_a), 2.71 (ddd, $^2J_{2b,2b} = 16.9$ Hz, $^3J_{2b,3} = 4.6$, $^3J_{2b,1} = 1.7$ Hz, 1 H, 2-H_b), 4.41 (m*, 1 H, 3-H), 9.71 (dd, $^3J_{1,2a} = 2.7$ Hz, $^3J_{1,2b} = 1.7$ Hz, 1 H, 1-H)

^{13}C NMR (151 MHz, H_2O): δ (ppm) = 24.89 (C-4), 54.20 (C-2), 65.64 (C-3), 209.43 (C-1)



^1H NMR (600 MHz, H_2O): δ (ppm) = 1.21 (d, $^3J_{6,5} = 6.3$ Hz, 3 H, 6-H), 1.46 (ddd, $^2J_{4ax,4eq} = 14.5$ Hz, $^3J_{4ax,5} = 11.7$ Hz, $^3J_{4ax,3} = 3.0$ Hz, 1 H, 4-H_{ax}), 1.54 (ddd, $^2J_{2ax,2eq} = 13.6$ Hz, $^3J_{2ax,1} = 10.2$ Hz, $^3J_{2ax,3} = 3.0$ Hz, 2 H, 2-H_{ax}), 1.68 (dddd, $^2J_{4eq,4ax} = 14.5$ Hz, $^3J_{4eq,3} = 3.0$ Hz, $^3J_{4eq,5} = 2.2$ Hz, $^4J_{4eq,2eq} = 2.2$ Hz, 1 H, 4-H_{eq}), 1.93 (dddd, $^2J_{2eq,2ax} = 13.6$ Hz, $^3J_{2eq,3} = 3.0$ Hz, $^3J_{2eq,1} = 2.2$ Hz, $^4J_{2eq,4eq} = 2.2$ Hz, 1 H, 2-H_{eq}), 4.05 (dq, $^3J_{5,4ax} = 11.7$ Hz, $^3J_{5,6} = 6.3$ Hz, $^3J_{5,4eq} = 2.2$ Hz, 1 H, 5-H), 4.31 (q, $^3J_{3,2+4} = 3.0$ Hz, 1 H, 3-H), 5.10 (dd, $^3J_{1,2ax} = 10.2$ Hz, $^3J_{1,2eq} = 2.2$ Hz, 1 H, 1-H)

^{13}C NMR (151 MHz, H_2O): δ (ppm) = 23.12 (C-6), 40.73 (C-4), 40.82 (C-2), 67.72 (C-3), 70.12 (C-5), 94.58 (C-1)

**11b**

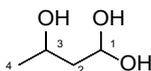
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, H_2O): δ (ppm) = 1.20 (d, $^3J_{6,5} = 6.4$ Hz, 3 H, 6-H), 1.64 (ddd, $^2J_{4\text{ax},4\text{eq}} = 13.6$ Hz, $^3J_{4\text{ax},5} = 10.1$ Hz, $^3J_{4\text{ax},3} = 3.3$ Hz, 1 H, 4- H_{ax}), 1.78 (m, $^2J_{4\text{eq},4\text{ax}} = 13.6$ Hz, $^3J_{4\text{eq},3} = 4.0$ Hz, $^3J_{4\text{eq},5} = 3.0$ Hz, 1 H, 4- H_{eq}), 1.78 (m*, $^2J_{2\text{ax},2\text{eq}} = X^*$ Hz, $^3J_{2\text{ax},1} = X^*$ Hz, $^3J_{2\text{ax},3} = 3.0$ Hz, 1 H, 2- H_{ax}), 1.93 (dddd, $^2J_{2\text{eq},2\text{ax}} = X^*$ Hz, $^3J_{2\text{eq},3} = 3.0$ Hz, $^3J_{2\text{eq},1} = X^*$ Hz, $^4J_{2\text{eq},4\text{eq}} = X^*$ Hz, 1 H, 2- H_{eq}), 4.40 (dq, $^3J_{5,4\text{ax}} = 10.1$ Hz, $^3J_{5,6} = 6.4$ Hz, $^3J_{5,4\text{eq}} = 3.0$ Hz, 1 H, 5-H), 4.21 (qui, $^3J_{3,2+4} = 4.0$ Hz, 1 H, 3-H), 5.25 (dd, $^3J_{1,2} = 3.4$ Hz, 1 H, 1- H_{eq})

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, H_2O): δ (ppm) = 23.12 (C-6), 38.32 (C-2), 40.70 (C-4), 64.23 (C-5), 66.34 (C-3), 94.17 (C-1)

**12**

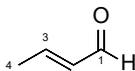
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, H_2O): δ (ppm) = 1.33 (d, $^3J_{2,1} = 5.2$ Hz, 3 H, 2-H), 5.25 (q, $^3J_{2,1} = 5.2$ Hz, 1 H, 1-H)

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, H_2O): δ (ppm) = 25.92 (C-2), 91.00 (C-1)

**13**

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, H_2O): δ (ppm) = 1.21 (d, $^3J_{4,3} = 6.3$ Hz, 3 H, 4-H), 1.73 (m*, 1 H, 2-H), 1.79 (m*, 1 H, 2-H), 3.39 (m*, 1 H, 3-H), 5.18 (dd, $^3J_{1,2\text{a}} = 6.6$ Hz, $^3J_{1,2\text{b}} = 5.0$ Hz, 1 H, 1-H)

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, H_2O): δ (ppm) = 25.00 (C-4), 48.37 (C-2), 67.40 (C-3), 91.76 (C-1)

**1**

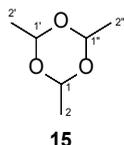
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, H_2O): δ (ppm) = 2.05 (dd, $^3J_{4,3} = 6.8$ Hz, $^4J_{4,2} = 1.6$ Hz, 3 H, 4-H), 6.22 (ddq, $^3J_{2,3} = 15.4$ Hz, $^3J_{2,1} = 8.3$ Hz, $^4J_{2,4} = 1.6$ Hz, 1 H, 2-H), 7.20 (dq, $^3J_{3,2} = 15.4$ Hz, $^3J_{3,4} = 6.8$ Hz, 1 H, 3-H), 9.37 (d, $^3J_{1,2} = 8.3$ Hz, 1 H, 1-H)

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, H_2O): δ (ppm) = 21.15 (C-4), 135.8 (C-2), 162.9 (C-3), 201.9 (C-1)

**14**

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, H_2O): δ (ppm) = 1.91 (s, 3 H, 2-H)

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, H_2O): δ (ppm) = 25.95 (C-2), 184.08 (C-1)



^1H NMR (600 MHz, H_2O): δ (ppm) = 1.37 (d, $^3J_{2,1} = 5.2$ Hz, 3 H, 2-H), 5.27 (q, $^3J_{1,2} = 5.2$ Hz, 1 H, 1-H)

^{13}C NMR (151 MHz, H_2O): δ (ppm) = 22.20 (C-2), 101.70 (C-1)

*Kopplungskonstanten konnten auf Grund von Signalüberlappungen nicht bestimmt werden.

7.3.2 Chemische Verschiebungen der Rückgrat-Zuordnung der DERA

Tabelle 7-2: Chemische Verschiebung der H_N , N_H , C_O und C_A -Atome der monomeren DERA

Nr.	Aminosäure	Chemische Verschiebung [ppm]			
		H	N	CO	CA
1	Met	-	-	-	-
2	Thr	-	-	-	-
3	Asp	-	-	-	-
4	Leu	8.71	124.50	179.78	56.32
5	Lys	8.52	123.00	178.10	61.21
6	Ala	8.15	122.23	181.84	55.34
7	Ser	8.45	113.22	176.05	61.78
8	Ser	7.88	118.19	174.70	62.80
9	Leu	7.70	122.36	177.43	57.70
10	Arg	7.26	116.59	178.49	59.34
11	Ala	8.39	117.12	178.48	55.17
12	Leu	7.78	119.18	179.03	60.28
13	Lys	7.17	114.90	176.45	57.75
14	Leu	7.47	116.46	177.49	53.48
15	Met	7.77	119.69	175.46	59.23
16	Asp	9.12	124.03	175.73	52.81
17	Leu	8.42	128.83	176.56	56.72
18	Thr	8.33	125.64	175.10	64.19
19	Thr	8.26	122.05	171.08	62.82
20	Leu	8.62	133.13	175.94	52.80
21	Asn	8.75	122.15	176.82	52.06
22	Asp	9.29	123.52	176.33	57.00
23	Asp	8.19	114.86	176.46	52.29
24	Asp	7.30	119.96	175.21	57.35
25	Thr	6.29	107.42	174.57	58.64
26	Asp	9.04	121.46	177.64	58.21
27	Glu	8.51	116.75	179.41	60.45
28	Lys	7.59	120.35	179.32	58.77
29	Val	7.74	122.31	177.72	67.02
30	Ile	8.84	124.14	177.55	66.60
31	Ala	7.54	119.41	180.37	55.24
32	Leu	7.73	122.39	178.74	58.30
33	Cys	8.08	115.26	177.52	64.62
34	His	7.75	115.97	177.77	56.39

35	Gln	8.03	119.77	175.79	57.85
36	Ala	7.30	118.26	175.58	53.75
37	Lys	6.74	117.11	174.99	53.70
38	Thr	7.56	116.79	175.46	60.67
39	Pro	-	-	-	-
39	Pro	-	-	177.28	64.52
40	Val	7.53	105.81	174.36	59.49
41	Gly	7.00	108.44	172.70	43.86
42	Asn	8.66	120.07	176.90	51.72
43	Thr	8.01	110.42	173.28	62.60
44	Ala	7.33	121.80	179.61	55.04
45	Ala	8.65	116.92	178.01	50.99
46	Ile	8.49	114.38	173.84	59.03
47	Cys	8.39	123.30	172.17	57.05
48	Ile	7.83	119.70	175.93	58.96
49	Tyr	9.14	121.38	175.98	59.29
50	Pro	-	-	176.93	65.80
51	Arg	7.28	110.02	176.34	56.02
52	Phe	7.35	117.19	174.62	57.55
53	Ile	7.82	120.31	174.19	68.14
54	Pro	-	-	180.20	67.06
55	Ile	7.88	117.36	178.73	61.82
56	Ala	8.32	129.52	178.51	52.21
57	Arg	9.10	118.86	179.58	59.44
58	Glu	7.84	117.81	178.61	59.23
59	Thr	8.04	117.79	177.17	67.36
60	Leu	8.77	121.97	178.15	57.97
61	Lys	7.75	118.69	180.74	60.16
62	Glu	8.43	121.73	177.97	59.49
63	Gln	7.64	112.49	175.98	54.34
64	Gly	7.94	109.03	174.91	46.11
65	Thr	8.44	107.69	174.21	57.59
66	Pro	-	-	176.59	64.26
67	Glu	10.02	121.31	177.47	57.23
68	Ile	7.10	124.23	174.27	64.34
69	Arg	7.83	127.61	175.09	55.14
70	Ile	9.89	118.36	174.64	61.56
71	Ala	9.30	131.44	174.64	48.80
72	Thr	7.49	113.13	171.96	58.53
73	Val	7.46	111.16	175.54	56.92
74	Thr	8.16	108.32	174.21	59.58
75	Asn	9.70	123.36	174.50	53.81
76	Phe	8.60	115.92	174.06	54.84
77	Pro	-	-	174.89	64.60
78	His	6.68	120.23	177.06	56.49
79	Gly	7.84	108.21	175.55	48.93
80	Asn	10.33	122.42	173.95	53.49
81	Asp	7.80	114.43	174.04	52.56
82	Asp	6.93	116.81	177.35	53.36
83	Ile	8.72	129.52	176.20	66.09
84	Asp	7.89	118.41	180.10	58.06
85	Ile	7.99	121.74	177.74	64.13
86	Ala	7.63	122.28	180.78	55.94
87	Leu	9.20	120.84	178.32	57.85
88	Ala	8.34	123.63	182.19	55.91

89	Glu	8.90	118.82	180.26	60.02
90	Thr	8.22	120.21	175.50	68.62
91	Arg	9.24	121.02	179.66	60.82
92	Ala	8.28	122.98	179.08	55.03
93	Ala	8.30	121.68	179.34	55.94
94	Ile	8.11	118.34	180.22	65.79
95	Ala	8.12	125.00	180.15	55.15
96	Trp	8.44	118.43	176.60	59.72
97	Gly	7.67	102.95	173.92	44.99
98	Ala	7.72	120.79	176.57	54.08
99	Asp	8.97	116.41	176.57	56.51
100	Glu	7.95	116.95	174.01	53.63
101	Val	9.00	122.45	171.85	61.29
102	Asp	9.23	129.39	174.19	51.90
103	Val	8.99	122.51	174.56	58.56
104	Val	7.28	124.82	174.42	63.26
105	Phe	9.20	129.06	179.50	56.47
106	Pro	-	-	174.98	61.03
107	Tyr	9.13	128.92	177.64	60.46
108	Arg	8.62	125.64	180.32	60.04
109	Ala	7.79	124.00	180.12	55.12
110	Leu	7.47	118.97	180.92	58.35
111	Met	8.50	120.68	176.75	59.94
112	Ala	7.53	119.64	177.58	52.21
113	Gly	7.97	106.64	173.67	45.28
114	Asn	8.48	120.59	174.61	51.71
115	Glu	8.44	122.32	177.65	57.52
116	Gln	8.34	121.55	178.12	58.26
117	Val	7.73	118.06	176.06	64.90
118	Gly	7.31	108.83	174.19	48.54
119	Phe	7.04	121.25	176.20	61.46
120	Asp	8.71	118.17	179.35	57.58
121	Leu	8.90	122.89	178.58	60.86
122	Val	7.86	119.61	176.76	68.02
123	Lys	8.67	120.32	178.67	59.69
124	Ala	7.97	119.78	181.38	55.13
125	Cys	7.86	115.66	176.76	64.74
126	Lys	9.54	123.37	177.34	58.37
127	Glu	8.53	119.54	179.97	59.93
128	Ala	7.19	120.03	179.93	54.89
129	Cys	8.16	116.86	177.74	64.74
130	Ala	9.75	123.81	181.38	55.36
131	Ala	7.19	118.57	177.48	54.28
132	Ala	7.30	119.00	175.95	50.93
133	Asn	7.85	115.35	173.46	54.89
134	Val	8.12	121.27	175.90	61.11
135	Leu	7.31	126.81	174.51	55.09
136	Leu	10.11	125.34	176.70	53.36
137	Lys	10.33	126.52	175.45	52.93
138	Val	8.17	120.44	174.92	61.36
139	Ile	9.69	128.20	176.08	60.26
140	Ile	7.86	119.78	171.81	62.55
141	Glu	7.06	118.96	177.05	54.48
142	Thr	8.87	115.17	177.66	66.21
143	Gly	9.58	110.87	175.65	45.84

144	Glu	7.23	116.16	177.45	56.30
145	Leu	7.63	118.57	180.16	58.41
146	Lys	7.97	109.40	176.49	62.88
147	Asp	9.39	124.91	176.94	54.24
148	Glu	9.18	128.12	177.38	60.48
149	Ala	8.64	119.71	181.61	55.49
150	Leu	7.43	118.16	178.43	57.33
151	Ile	8.20	120.96	179.63	66.07
152	Arg	8.68	121.02	177.83	60.83
153	Lys	8.03	119.60	177.95	58.57
154	Ala	8.83	119.56	180.73	55.39
155	Ser	7.74	115.51	174.02	64.19
156	Glu	8.58	123.05	178.71	59.93
157	Ile	8.92	119.01	177.66	65.94
158	Ser	7.74	113.28	175.56	64.22
159	Ile	8.25	122.12	180.50	66.34
160	Lys	9.02	123.13	178.29	60.18
161	Ala	8.21	119.69	176.41	53.13
162	Gly	7.45	102.38	173.81	44.67
163	Ala	8.29	120.74	176.15	54.59
164	Asp	8.51	117.65	176.29	56.04
165	Phe	8.26	117.10	176.06	56.27
166	Ile	8.65	113.36	172.23	60.59
167	Lys	9.15	127.00	177.35	52.63
168	Thr	8.12	113.53	178.07	66.37
169	Ser	6.19	109.81	172.88	58.91
170	Thr	10.28	112.39	177.83	63.23
171	Gly	7.41	107.40	174.98	45.81
172	Lys	8.28	116.67	176.05	54.09
173	Val	6.84	110.90	175.81	59.45
174	Ala	8.37	122.09	178.46	55.77
175	Val	8.05	117.96	174.46	62.25
176	Asn	8.35	128.44	173.03	52.59
177	Ala	7.46	124.07	177.23	55.34
178	Thr	7.12	108.77	174.10	59.27
179	Pro	-	-	178.72	65.35
180	Glu	8.72	117.57	179.08	60.77
181	Ser	8.28	116.63	176.14	61.84
182	Ala	8.45	123.16	178.07	54.82
183	Arg	8.04	117.40	177.01	60.50
184	Ile	7.51	116.47	177.67	65.39
185	Met	7.64	115.37	178.07	60.56
186	Met	8.02	115.58	177.82	60.57
187	Glu	8.50	119.27	178.45	60.21
188	Val	7.61	119.74	177.66	67.26
189	Ile	7.16	119.09	177.65	65.63
190	Arg	8.05	117.79	180.73	59.29
191	Asp	9.71	123.34	179.08	57.55
192	Met	8.65	116.44	176.87	57.27
193	Gly	8.09	109.10	177.31	47.06
194	Val	7.67	110.07	175.37	60.60
195	Glu	9.48	123.57	177.68	59.12
196	Lys	8.71	117.47	181.26	59.29
197	Thr	7.84	109.67	173.72	61.82
198	Val	8.10	125.79	173.51	61.88

199	Gly	7.85	107.56	172.57	43.57
200	Phe	8.48	118.99	171.62	56.34
201	Lys	7.17	125.51	172.20	50.53
202	Pro	-	-	174.69	62.14
203	Ala	7.81	124.97	175.56	51.12
204	Gly	7.50	109.51	173.88	45.41
205	Gly	9.20	111.77	174.22	46.34
206	Val	8.86	124.01	175.24	62.59
207	Arg	9.06	125.48	176.06	57.74
208	Thr	7.99	108.38	174.76	58.51
209	Ala	8.74	123.33	179.88	55.06
210	Glu	9.48	120.06	179.13	61.00
211	Asp	8.12	121.38	178.17	57.60
212	Ala	7.94	120.51	178.72	55.74
213	Gln	7.75	115.99	177.97	59.72
214	Lys	7.67	119.68	179.42	59.61
215	Tyr	8.07	117.39	180.86	63.73
216	Leu	8.24	122.06	177.78	57.95
217	Ala	8.17	120.11	180.94	55.11
218	Ile	7.29	117.52	177.19	65.27
219	Ala	6.86	121.27	178.47	55.69
220	Asp	8.51	117.55	179.46	56.72
221	Glu	7.90	120.40	178.04	58.87
222	Leu	7.69	118.01	178.79	57.45
223	Phe	8.17	113.66	176.89	57.24
224	Gly	7.43	110.14	174.66	44.66
225	Ala	8.59	122.15	177.50	54.40
226	Asp	8.20	113.94	176.60	54.32
227	Trp	7.42	121.85	176.97	61.58
228	Ala	8.19	117.57	174.97	53.44
229	Asp	7.85	123.98	176.47	52.11
230	Ala	8.59	118.67	178.50	55.19
231	Arg	7.45	115.12	173.17	53.74
232	His	7.78	114.07	171.35	56.45
233	Tyr	8.71	126.33	173.93	57.24
234	Arg	7.33	119.78	175.41	52.14
235	Phe	7.82	112.51	176.94	57.52
236	Gly	9.14	111.63	171.92	47.64
237	Ala	7.59	127.37	175.15	52.02
238	Ser	9.27	114.73	-	59.29
239	Ser	-	-	174.90	61.30
240	Leu	7.99	121.60	177.40	56.46
241	Leu	7.62	117.12	177.50	59.07
242	Ala	7.81	118.79	180.77	55.38
243	Ser	7.31	113.20	178.28	61.34
244	Leu	8.43	120.74	178.64	57.89
245	Leu	8.45	116.58	179.88	58.31
246	Lys	7.99	120.46	180.49	59.69
247	Ala	7.80	123.34	179.01	54.88
248	Leu	7.54	115.35	176.80	54.88
249	Gly	7.81	107.39	174.30	45.80
250	His	8.37	120.11	175.02	55.97
251	Gly	8.46	109.69	173.50	45.36
252	Asp	8.27	118.96	177.27	54.07
253	Gly	8.60	109.33	174.30	45.74

254	Lys	8.21	120.78	176.89	56.43
255	Ser	8.46	116.87	174.55	58.36
256	Ala	8.44	126.11	177.71	52.69
257	Ser	-	-	-	-
258	Ser	-	-	-	-
259	Tyr	-	-	-	-
260	His	-	-	-	-
261	His	-	-	-	-
262	His	-	-	-	-
263	His	-	-	-	-
264	His	-	-	-	-
265	His	-	-	-	-

7.4 *In-silico*-Skripte und Kontrollanalytik

7.4.1 MD-Simulationen: *Input*-Skripte

Für die Minimierung, Äquilibration und Durchführung der MD-Simulationen wurden für alle fünf DERAs dieselben *Input*-Skripte verwendet. Lediglich die Anzahl der Reste, welche in der Minimierung und Äquilibration festgehalten wurden, wurden entsprechend der Proteingröße angepasst. Für die folgenden Skripte wurde beispielhaft die DERA_{EC} mit 503 Aminosäuren plus 4 weitere Reste durch die Acetylierung an beiden N-Termini und die Amidierung am den C-Termini ausgewählt.

Minimierung (2 Zyklen):

Die Minimierung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurde der Wert für X auf 25.0 gesetzt und im zweiten auf 5.0.

```
NVT MD w/ position restraints (X kcal/molA) and PME (sander)
&cntrl
  nmropt = 0,
  ntx    = 7,      irect = 1,      ntrx   = 1,      nt xo  = 1,
  ntpr   = 50,    ntwx  = 50,    ntwv   = 0,      nt we  = 0,
  ioutfm = 0,    ntwprt = 0,
  ntf    = 2,    ntb    = 1,      dielc  = 1,      igb    = 0,
  cut    = 8.0,  nsnb  = 10,
  ipol   = 0,
  ibelly = 0,    ntr    = 1,
  imin   = 0,
  maxcyc = 2500,
  ncyc   = 50,
  ntmin  = 1,    dx0    = 0.1,    drms   = 0.0001,
  nstlim = 10000,
  nscm   = 0,
  t      = 100.0, dt      = 0.001,
  temp0  = 300.0, tempi   = 300.0,
```

```

ig      = 71277,
ntt     = 1,
tautp  = 0.5,
vlimit = 20.0,
ntp    = 0,      pres0 = 1.0,      comp  = 44.6,
taup   = 0.5,
ntc    = 2,      tol    = 0.000001,
jfastw = 0,
ivcap  = 0,      fcap   = 1.5,
&end
&ewald
order  = 4,      ew_type = 0,
dsum_tol= 0.00001, use_pme = 1,
&end
Hold the solutes fixed
X
RES 1 507
END
END

```

Temperaturäquilibrierung (1 Zyklus):

```

NVT MD w/o position restraints and PME (sander)
&cntrl
nmropt = 0,
ntx    = 5,      irect = 1,      ntrx  = 1,      nt xo = 1,
ntpr   = 10000, ntwx   = 10000  ntwv  = 0,      ntwe  = 0,
ntwr   = 1000000,
ioutfm = 0,      ntwprt = 0,
ntf    = 2,      ntb    = 1,      dielc = 1,      igb   = 0,
cut    = 8.0,   nsnb  = 10,
ipol   = 0,
ibelly = 0,      ntr    = 0,
imin   = 0,
maxcyc = 2500,
ncyc   = 50,
ntmin  = 1,      dx0   = 0.1,      drms  = 0.0001,
nstlim = 500000,
nscm   = 0,
t      = 300,    dt     = 0.002,
temp0  = 300.0, tempi  = 300.0,
ig     = 71277,
ntt    = 1,
tautp  = 10.0,
ntp    = 0,      pres0 = 1.0,      comp  = 44.6,
taup   = 0.5,
ntc    = 2,      tol    = 0.000001,
iwrap  = 1,
&end

```

Druckäquilibrierung (6 Zyklen):

In 6 Schritten wurde der Wert von X linear von 5.0 auf 0 gesenkt.

```

NVT MD w/ position restraints (X kcal/molA) and PME (sander)
&cntrl
nmropt = 0,
ntx    = 7,      irect = 1,      ntrx  = 1,      nt xo = 1,
ntpr   = 50,    ntwx   = 50,    ntwv  = 0,      ntwe  = 0,
ioutfm = 0,      ntwprt = 0,
ntf    = 2,      ntb    = 1,      dielc = 1,      igb   = 0,
cut    = 8.0,   nsnb  = 10,

```

```

ipol = 0,
ibelly = 0,      ntr = 1,
imin = 0,
maxcyc = 2500,
ncyc = 50,
ntmin = 1,      dx0 = 0.1,      drms = 0.0001,
nstlim = 10000,
nscm = 0,
t = 100.0,      dt = 0.001,
temp0 = 300.0,  tempi = 300.0,
ig = 71277,
ntt = 1,
tautp = 0.5,
vlimit = 20.0,
ntp = 0,        pres0 = 1.0,      comp = 44.6,
taup = 0.5,
ntc = 2,        tol = 0.000001,
jfastw = 0,
ivcap = 0,      fcap = 1.5,
&end
&ewald
order = 4,      ew_type = 0,
dsum_tol= 0.00001, use_pme = 1,
&end
Hold the solutes fixed
X.0
RES 1 507
END
END

```

Freie MD-Simulationen (100 Zyklen)

Diese wurden in Schritten von 1 ns durchgeführt. Das im Folgenden gezeigte Skript wurde so oft wiederholt, bis die gewünschte Simulationslänge erreicht war.

```

NVT MD w/o position restraints and PME (sander)
&cntrl
nmropt = 0,
ntx = 5,        irect = 1,      ntrx = 1,      nt xo = 1,
ntpr = 10000,  ntwx = 10000  ntwv = 0,      nt we = 0,
ntwr = 1000000,
ioutfm = 0,    ntwprt = 0,
ntf = 2,       ntb = 1,      dielc = 1,    igb = 0,
cut = 8.0,     nsnb = 10,
ipol = 0,
ibelly = 0,    ntr = 0,
imin = 0,
maxcyc = 2500,
ncyc = 50,
ntmin = 1,     dx0 = 0.1,    drms = 0.0001,
nstlim = 500000,
nscm = 0,
t = 300,       dt = 0.002,
temp0 = 300.0,  tempi = 300.0,
ig = 71277,
ntt = 1,
tautp = 10.0,
ntp = 0,       pres0 = 1.0,   comp = 44.6,
taup = 0.5,
ntc = 2,       tol = 0.000001,
iwrap = 1,
&end

```

7.4.2 MD-Simulationen: RMSD, Trägheitsradius und RMSIP Diagramme

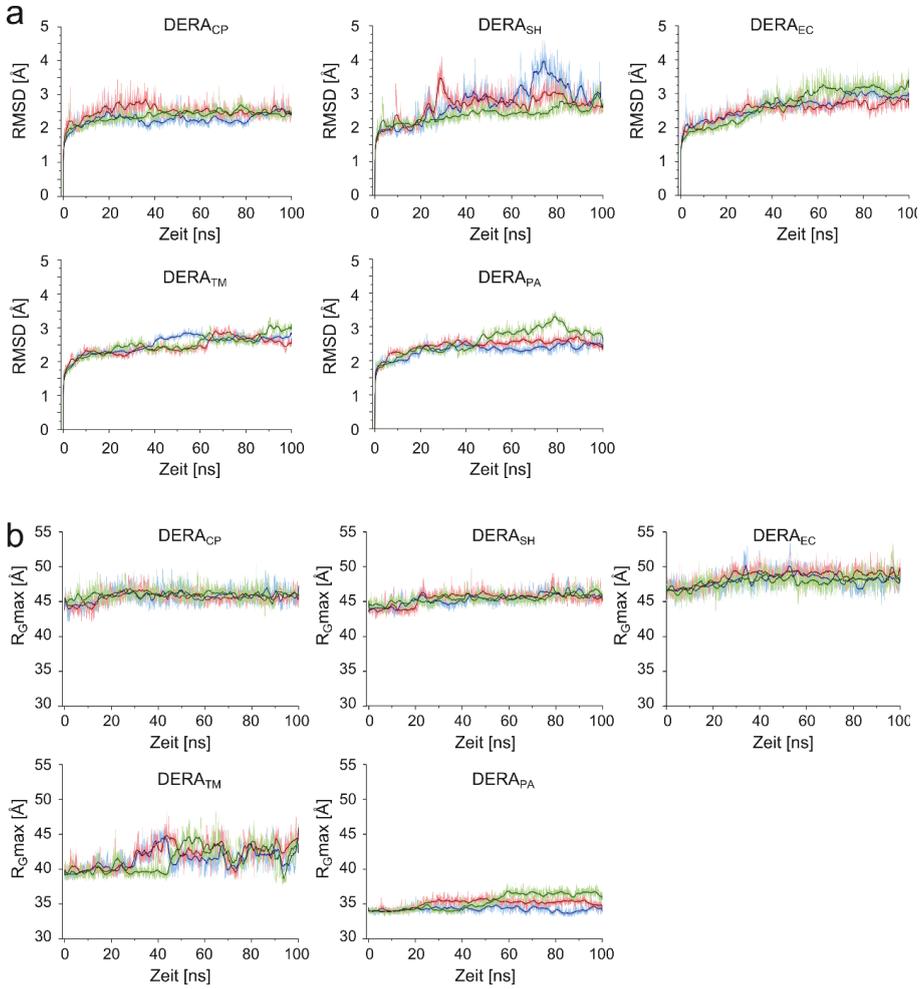


Abbildung 7-3: (a) RMSD-Werte in Bezug auf die Startstruktur und (b) Trägheitsradius (R_G) für die C_α -Atome, berechnet aus (3) unabhängigen MD-Simulationen der verschiedenen DERAs. Insgesamt wurden 5000 Konformationen über einen Zeitraum von 100 ns einbezogen. Die dunkleren Linien stellen den gleitenden Durchschnitt über 100 Konformationen dar.

Tabelle 7-3: Abstandsquadrat des inneren Produktes (RMSIP). Der Wert wurde über die ersten zehn prinzipiellen Komponenten für die entsprechenden Paare von unabhängigen MD-Simulationen der verschiedenen DERAs ermittelt.*

Quelle	DERA _{CP}			DERA _{SH}			DERA _{EC}			DERA _{TM}			DERA _{PA}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1.00	0.75	0.77	1.00	0.79	0.75	1.00	0.69	0.71	1.00	0.67	0.63	1.00	0.75	0.68
2	0.75	1.00	0.77	0.79	1.00	0.78	0.69	1.00	0.73	0.67	1.00	0.68	0.75	1.00	0.66
3	0.77	0.77	1.00	0.75	0.78	1.00	0.71	0.73	1.00	0.63	0.68	1.00	0.68	0.66	1.00

*RMSIP Werte liegen zwischen null und eins. Der Wert von eins bedeutet eine vollständige Überlappung zwischen den Sub-Konformationsräumen und eine null heißt, dass beide komplett unabhängig sind. Die Submatrizen sind in einer Diagonalen symmetrisch zu sich selbst im Vergleich mit eine MD Trajektorie.

7.4.3 CNA-Berechnungen: Gauß-Verteilung der Übergangszustände

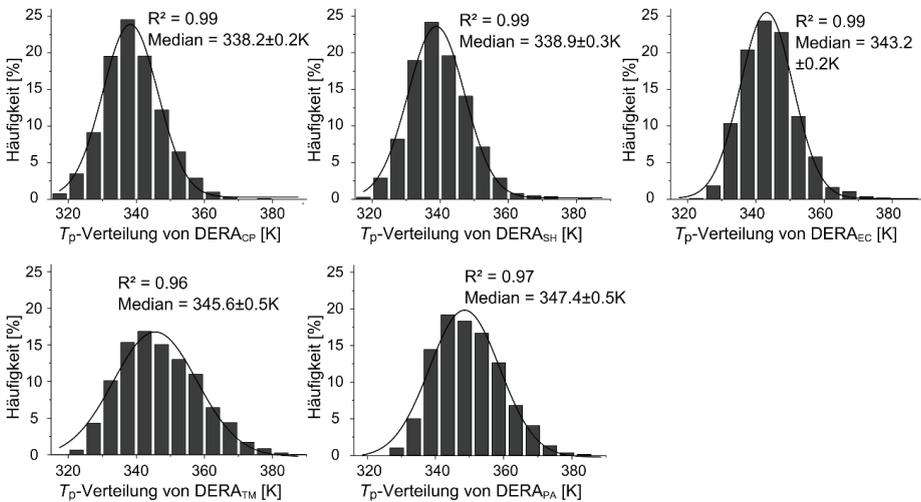


Abbildung 7-4: Verteilung der durch CNA berechneten Übergangszustände T_p , welche aus den MD-generierten Ensembles ermittelt wurde. Die schwarzen Kurven zeigen die Verteilung der Gauß-Funktionen mit Korrelationskoeffizient (R^2) und den Median mit Standardfehler.

Danksagungen

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Jörg Pietruszka. Ich konnte mir kein spannenderes und methodisch vielfältigeres Thema vorstellen als das Projekt, welches er mir zur Verfügung gestellt hat. Besonders bewundert habe ich das entgegengebrachte Vertrauen, welches mir u. a. ermöglicht hat, neue Wege zu gehen und ganz unkompliziert in Methoden einzusteigen, welche im IBOC nicht verwendet werden. Ich hatte immer das Gefühl, dass ich es bin, der das Projekt entwickelt, aber auch immer auf seine Unterstützung zählen kann. Diesbezüglich war es für mich gleichermaßen erfreulich als auch rätselhaft, dass ich jederzeit ohne Terminabsprache zu ihm mit Fragen oder Problemen jeder Art kommen konnte und er die Zeit gefunden hat, mit mir darüber zu diskutieren. Auch wenn damit natürlich nicht immer alle Probleme gelöst werden konnten, bin ich jedes Mal zufrieden aus dem Büro gegangen.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt gleichermaßen Dr. Rudolf Hartmann und Dr. Oliver Weiergräber vom ICS-6, die mich nicht nur in die beiden hochkomplexen Methoden der (Protein)-NMR-Spektroskopie und Proteinkristallographie eingeführt und mich begleitet haben, sondern mit denen ich gemeinsam tolle Ergebnisse erzielt habe. Während Rudi in den knapp drei Jahren wirklich keinen Versuch ausgelassen hat, der Problemlösung näher zu kommen (einen fähigeren NMR-Experten werde ich wohl so schnell nicht wieder finden), hat Oliver neben der Kristallisation auch bei dem Schreiben der Manuskripte sehr geholfen. Ein Dankeschön ist hier eigentlich viel zu wenig, da das Projekt letztendlich von uns gemeinsam erfolgreich beendet wurde und ich nur die Ehre habe, meinen Namen über diese Dissertation zu schreiben. Natürlich wäre dies nicht durchführbar gewesen, wenn der Leiter des Instituts, Prof. Dieter Willbold, mir die Arbeit in seinem Institut nicht ermöglicht und in unseren Meetings Feedback gegeben hätte. Auch auf weitere Mitarbeiter des ICS-6 konnte ich jederzeit zählen. Dr. Melanie Schwarten hat mir bei der Rückgrat-Zuordnung der DERA geholfen und Dr. Philipp Neudecker hat in den Projekttreffen viele neue Anregungen gegeben.

Auch mein Zweitgutachter Prof. Holger Gohlke hatte einen großen Anteil an dem Projekt. Seine Rolle ging weit über die eines Zweitgutachters hinaus, da er in vielen Diskussion mit mir über das Thema gesprochen und mir auch ermöglicht hat, bei ihm im Institut einmal die Seite zu wechseln und Computerberechnungen durchzuführen. Ich freue mich schon auf die weitere Zusammenarbeit. Dr. Christopher Pflieger stand mir bei den Analysen immer zur Seite und Dank der Berechnungen von Daniel Ciupka konnten wir die Thermostabilität der DERA erhöhen.

Im IBOC (manchmal war ich dann doch auch da) gilt mein erster Dank meiner Laborpartnerin Carolin Bisterfeld. Im Nachhinein ist es interessant zu beobachten, dass - obwohl wir uns beide mit demselben Protein beschäftigten - wir uns zwar in unserer Anfangszeit regelmäßig ausgetauscht und geholfen haben, aber doch jeder auf das eigene Projekt fokussiert war. Im

letzten halben Jahr hat sich das grundlegend geändert und wir haben in einer super Teamarbeit unsere Schwerpunkte (Strukturbiochemie und organische Chemie) so gut verknüpfen können, dass drei gemeinsame Publikationen daraus entstanden sind. Ich denke, darauf können wir beide stolz sein! Besonders hervorheben möchte ich auch, dass sie meine Arbeit in Rekordzeit korrekturgelesen und mir somit mit konstruktiver Kritik bei der Fertigstellung geholfen hat. In den meisten von meinen Projekten war auch Dr. Thomas Classen involviert, der mir gerade auch bei den strukturebiologischen Fragestellungen geholfen hat. Bei den Klonierungen (und vielen weiteren Aufgaben) im Labor war es jederzeit möglich, Beatrix Paschold um Unterstützung zu bitten, die immer bereit war, mir zu helfen. Bezüglich meiner ehemaligen Bachelorstudentin Julia Bramski freut es mich besonders, dass sie nicht nur eine Bereicherung für mein Projekt war, sondern ich vielleicht auch einen kleinen Teil dazu beitragen konnte, dass sie jetzt in ihrer Masterarbeit mein Projekt fortsetzt.

Wenn ich wie so oft etwas frustriert war oder einfach einmal meine Ruhe brauchte, konnte ich jederzeit in die „Oase“ Raum 308 flüchten, die mir Zeit und Raum zum Auftanken gegeben hat. Namentlich möchte ich da ganz besonders Benjamin Lauinger, Claudia Holec und Andreas Klein hervorheben, die alle drei (neben ihrer fachlichen Kompetenz in zahllosen Diskussionen) auf ganz unterschiedliche Weise hervorragende Motivationskünstler sind und mir beigebracht haben, vieles auch mal einfach nicht so ernst zu nehmen und mich wieder aufzubauen. Ähnliches gilt übrigens auch für Vera Ophoven, die auf ihre ganz besondere Art immer wusste, was in mir vorgeht und einen großen Anteil daran hat, dass ich trotz Tiefschlägen immer durchgehalten habe. Natürlich gilt mein Dank auch dem ganzen IBOC-Team. Es ist nicht selbstverständlich, dass wir trotz (oder vielleicht gerade) wegen einer solchen Themenbreite ein solches Interesse haben, was die Projekte der Kollegen und Kolleginnen angeht. Dies spiegelte sich u. a. in langen und produktiven Diskussionen im Seminar wider. Das solltet ihr genauso beibehalten!

Mein Stipendienprogramm iGRASP_{seed} war für mich mehr als nur ein Geldgeber. Gerade die regelmäßigen Treffen (*Protein Science School, Retreats*), welche auf den ersten Blick manchmal als zeitliche Belastung angesehen werden könnten, waren für mein Projekt sehr hilfreich und haben des Weiteren den Blick für andere Themengebiete fernab der bioorganischen Chemie eröffnet. Hier möchte ich Dr. Martina Holz, Dr. Jessica Mötter und Dr. Jennifer Pahlke für die tolle Koordination danken.

Zum Schluss möchte ich noch mit Bernhard und Gabriele zwei Personen aus meinem persönlichen Umfeld danken, die mich auf wissenschaftlicher und im Fall von Gabriele nicht-wissenschaftlicher Ebene durch die sicher nicht ganz einfache Anfangszeit geführt und mir gezeigt haben, was ich leisten kann und dass ich auch dieser Aufgabe gewachsen bin. Ohne eure Hilfe hätte ich es wahrscheinlich nicht bis hierhin geschafft. Tausend Dank dafür!

Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die vorliegende Dissertation wurde ausschließlich an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt. Es wurde zuvor kein weiterer Promotionsversuch unternommen.



Markus Dick

Düsseldorf, den 27. Juli 2016

Literaturverzeichnis

- [1] L. Pauling, *Chem. Phys. Lett.* **1946**, *24*, 1375-1377; 'Molecular Architecture and Biological Reactions'.
- [2] S. A. Benner, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 789-806; 'Enzyme-Kinetics and Molecular Evolution'.
- [3] D. J. Pollard, J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 66-73; 'Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now'.
- [4] M. Arroyo, C. Acebal, I. de la Mata, *Arbor* **2014**, *190*, 11; 'Biocatalysis and Biotechnology'.
- [5] M. G. Tozzi, M. Camici, L. Mascia, F. Sgarrella, P. L. Ipata, *FEBS J.* **2006**, *273*, 1089-1101; 'Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism'.
- [6] C. F. Barbas, Y. F. Wang, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2013-2014; 'Deoxyribose-5-phosphate aldolase as a synthetic catalyst'.
- [7] W. A. Greenberg, A. Varvak, S. R. Hanson, K. Wong, H. J. Huang, P. Chen, M. J. Burk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 5788-5793; 'Development of an efficient, scalable, aldolase-catalyzed process for enantioselective synthesis of statin intermediates'.
- [8] A. Rucigaj, M. Krajnc, *Chem. Eng. J.* **2015**, *259*, 11-24; 'Kinetic modeling of a crude DERA lysate-catalyzed process in synthesis of statin intermediates'.
- [9] P. Clapes, W. D. Fessner, G. A. Sprenger, A. K. Samland, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 154-167; 'Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases'.
- [10] G. Feron, G. Mauvais, F. Martin, E. Semon, C. Blin-Perrin, *Lett. Appl. Microbiol.* **2007**, *45*, 29-35; 'Microbial production of 4-hydroxybenzylidene acetone, the direct precursor of raspberry ketone'.
- [11] P. Hoffee, O. M. Rosen, B. L. Horecker, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 1512-1516; 'The Mechanism of Action of Aldolases. VI. Crystallization of Deoxyribose 5-Phosphate Aldolase and the Number of Active Sites'.
- [12] S. Jennewein, M. Schurmann, M. Wolberg, I. Hilker, R. Luiten, M. Wubbolts, D. Mink, *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 537-548; 'Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase'.
- [13] M. E. Guazzaroni, R. Silva-Rocha, R. J. Ward, *Microb. Biotechnol.* **2015**, *8*, 52-64; 'Synthetic biology approaches to improve biocatalyst identification in metagenomic library screening'.
- [14] L. Ufarte, G. Potocki-Veronese, E. Laville, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 10; 'Discovery of new protein families and functions: new challenges in functional metagenomics for biotechnologies and microbial ecology'.
- [15] K. Takai, K. Nakamura, T. Toki, U. Tsunogai, M. Miyazaki, J. Miyazaki, H. Hirayama, S. Nakagawa, T. Nunoura, K. Horikoshi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 10949-10954; 'Cell proliferation at 122 degrees C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation'.
- [16] X. X. Zhou, Y. B. Wang, Y. J. Pan, W. F. Li, *Amino Acids* **2008**, *34*, 25-33; 'Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins'.
- [17] N. Kannan, S. Vishveshwara, *Protein Eng.* **2000**, *13*, 753-261; 'Aromatic clusters: a determinant of thermal stability of thermophilic proteins'.
- [18] D. Perl, F. X. Schmid, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 39-44; 'Some like it hot: The molecular determinants of protein thermostability'.
- [19] J. S. Byun, J. K. Rhee, N. D. Kim, J. Yoon, D. U. Kim, E. Koh, J. W. Oh, H. S. Cho, *BMC Struct. Biol.* **2007**, *7*, 47; 'Crystal structure of hyperthermophilic esterase EstE1 and the relationship between its dimerization and thermostability properties'.

- [20] W. T. Li, J. W. Shriver, J. N. Reeve, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 812-817; 'Mutational analysis of differences in thermostability between histones from mesophilic and hyperthermophilic archaea'.
- [21] P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 7276-7280; 'Detection of Specific Polymerase Chain-Reaction Product by Utilizing the 5'-3' Exonuclease Activity of *Thermus-Aquaticus* DNA-Polymerase'.
- [22] L. K. Zhang, M. Y. Kang, J. J. Xu, Y. C. Huang, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *99*, 6585-6597; 'Archaeal DNA polymerases in biotechnology'.
- [23] H. S. Toogood, I. N. Taylor, R. C. Brown, S. J. C. Taylor, R. McCague, J. A. Littlechild, *Biocatal. Biotransform.* **2002**, *20*, 241-249; 'Immobilisation of the Thermostable I -aminoacylase from *Thermococcus litoralis* to Generate a Reusable Industrial Biocatalyst'.
- [24] M. E. Bruins, A. E. M. Janssen, R. M. Boom, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2001**, *90*, 155-186; 'Thermozymes and their applications - A review of recent literature and patents'.
- [25] J. Gomes, W. Steiner, *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, *42*, 223-235; 'The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes'.
- [26] K. Egorova, G. Antranikian, *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 649-655; 'Industrial relevance of thermophilic Archaea'.
- [27] J. E. Graham, M. E. Clark, D. C. Nadler, S. Huffer, H. A. Chokhawala, S. E. Rowland, H. W. Blanch, D. S. Clark, F. T. Robb, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 375; 'Identification and characterization of a multidomain hyperthermophilic cellulase from an archaeal enrichment'.
- [28] A. D. Frock, R. M. Kelly, *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2012**, *1*, 363-372; 'Extreme thermophiles: moving beyond single-enzyme biocatalysis'.
- [29] T. D. Brock, K. M. Brock, R. T. Belly, R. L. Weiss, *Arch. Mikrobiol.* **1972**, *84*, 54-68; 'Sulfolobus: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature'.
- [30] B. Cobucci-Ponzano, G. Perugino, M. Rossi, M. Moracci, *Protein Eng. Des. Sel.* **2011**, *24*, 21-26; 'Engineering the stability and the activity of a glycoside hydrolase'.
- [31] E. Campbell, I. R. Wheeldon, S. Banta, *Biotechnol. Adv.* **2010**, *107*, 763-774; 'Broadening the Cofactor Specificity of a Thermostable Alcohol Dehydrogenase Using Rational Protein Design Introduces Novel Kinetic Transient Behavior'.
- [32] D. F. Rodrigues, J. M. Tiedje, *Appl. Environ. Microb.* **2008**, *74*, 1677-1686; 'Coping with our cold planet'.
- [33] E. I. Friedmann, *Science* **1982**, *215*, 1045-1053; 'Endolithic microorganisms in the antarctic cold desert'.
- [34] S. C. Cary, I. R. McDonald, J. E. Barrett, D. A. Cowan, *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 129-138; 'On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils'.
- [35] T. Collins, S. D'Amico, J. C. Marx, G. Feller, C. Gerday, in *Cold-adapted enzymes*, **2007**.
- [36] G. Feller, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 648-662; 'Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes'.
- [37] C. Struvay, G. Feller, *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 11643-11665; 'Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes'.
- [38] G. Feller, *Scientifica (Cairo)* **2013**, *2013*, 512840; 'Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology'.
- [39] D. C. Demirjian, F. Moris-Varas, C. S. Cassidy, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 144-151; 'Enzymes from extremophiles'.
- [40] K. V. Ramana, L. Singh, R. K. Dhaked, *J. Sci. Ind. Res.* **2000**, *59*, 87-101; 'Biotechnological application of psychrophiles and their habitat to low-temperature'.

-
- [41] G. J. Gopal, A. Kumar, *Protein J.* **2013**, *32*, 419-425; 'Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*'.
- [42] G. Georgiou, P. Valax, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7*, 190-197; 'Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*'.
- [43] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185-194; 'Engineering the third wave of biocatalysis'.
- [44] H. R. Xiong, F. Fenel, M. Leisola, O. Turunen, *Extremophiles* **2004**, *8*, 393-400; 'Engineering the thermostability of *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II by combination of disulphide bridges'.
- [45] S. P. Voutilainen, H. Boer, M. Alapuranen, J. Janis, J. Vehmaanpera, A. Koivula, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *83*, 261-272; 'Improving the thermostability and activity of *Melanocarpus albomyces* cellobiohydrolase Cel7B'.
- [46] D. Choudhury, S. Biswas, S. Roy, J. K. Dattagupta, *Protein Eng. Des. Sel.* **2010**, *23*, 457-467; 'Improving thermostability of papain through structure-based protein engineering'.
- [47] H. P. Xue, J. G. Zhou, C. You, Q. Huang, H. Lu, J. Ind. Microbiol. *Biotechnol.* **2012**, *39*, 1279-1288; 'Amino acid substitutions in the N-terminus, cord and alpha-helix domains improved the thermostability of a family 11 xylanase XynR8'.
- [48] V. N. Balaji, A. Mobasser, S. N. Rao, *BBRC* **1989**, *160*, 109-114; 'Modification of protein stability by introduction of disulfide bridges and prolines: Geometric criteria for mutation sites'.
- [49] O. Bogin, M. Peretz, Y. Hacham, Y. Korkhin, F. Frolov, A. J. Kalb, Y. Burstein, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1156-1163; 'Enhanced thermal stability of *Clostridium beijerinckii* alcohol dehydrogenase after strategic substitution of amino acid residues with prolines from the homologous thermophilic *Thermoanaerobacter brockii* alcohol dehydrogenase'.
- [50] P. C. Cirino, K. M. Mayer, D. Umeno, *Methods Mol. Biol.* **2003**, *231*, 3-9; 'Generating mutant libraries using error-prone PCR'.
- [51] W. P. C. Stemmer, *Nature* **1994**, *370*, 389-391; 'Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling'.
- [52] C. A. Denard, H. Q. Ren, H. M. Zhao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 55-64; 'Improving and repurposing biocatalysts via directed evolution'.
- [53] T. Narancic, R. Davis, J. Nikodinovic-Runic, K. E. O'Connor, *Biotechnol. Lett.* **2015**, *37*, 943-954; 'Recent developments in biocatalysis beyond the laboratory'.
- [54] M. Wang, T. Si, H. M. Zhao, *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 117-125; 'Biocatalyst development by directed evolution'.
- [55] M. Widersten, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 42-47; 'Protein engineering for development of new hydrolytic biocatalysts'.
- [56] E. G. Hibbert, P. A. Dalby, *Microb. Cell Fact.* **2005**, *4*, 29; 'Directed evolution strategies for improved enzymatic performance'.
- [57] C. Schmidt-Dannert, F. H. Arnold, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 135-136; 'Directed evolution of industrial enzymes'.
- [58] M. T. Reetz, J. D. Carballeira, A. Vogel, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2006**, *45*, 7745-7751; 'Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability'.
- [59] G. Kiss, N. Celebi-Olcum, R. Moretti, D. Baker, K. N. Houk, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2013**, *52*, 5700-5725; 'Computational Enzyme Design'.
- [60] J. Damborsky, J. Brezovsky, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 8-16; 'Computational tools for designing and engineering enzymes'.

- [61] A. R. Leach, in *Molecular Modelling: Principles and Applications* 2. Auflage ed., Prentice Hall, **2001**.
- [62] S. A. Adcock, J. A. McCammon, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1589-1615; 'Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins'.
- [63] M. Karplus, J. A. McCammon, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 646-652; 'Molecular dynamics simulations of biomolecules'.
- [64] M. Purmonen, J. Valjakka, K. Takkinen, T. Laitinen, J. Rouvinen, *Protein Eng. Des. Sel.* **2007**, *20*, 551-559; 'Molecular dynamics studies on the thermostability of family 11 xylanases'.
- [65] A. R. Sigtryggsdottir, E. Papaleo, S. H. Thorbjarnardottir, M. M. Kristjansson, *BBA-Proteins Proteom.* **2014**, *1844*, 705-712; 'Flexibility of cold- and heat-adapted subtilisin-like serine proteinases evaluated with fluorescence quenching and molecular dynamics'.
- [66] V. Spiwok, P. Lipovova, T. Skalova, J. Duskova, J. Dohnalek, J. Hasek, N. J. Russell, B. Kralova, *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 485-497; 'Cold-active enzymes studied by comparative molecular dynamics simulation'.
- [67] J. K. Blum, M. D. Ricketts, A. S. Bommarius, *J. Biotechnol.* **2012**, *160*, 214-221; 'Improved thermostability of AEH by combining B-FIT analysis and structure-guided consensus method'.
- [68] B. Borgo, J. J. Havranek, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 1494-1499; 'Automated selection of stabilizing mutations in designed and natural proteins'.
- [69] B. Halle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 1274-1279; 'Flexibility and packing in proteins'.
- [70] C. Boede, I. A. Kovacs, M. S. Szalay, R. Palotai, T. Korcsmaros, P. Csermely, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 2776-2782; 'Network analysis of protein dynamics'.
- [71] N. V. Dokholyan, L. Li, F. Ding, E. I. Shakhnovich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 8637-8641; 'Topological determinants of protein folding'.
- [72] L. H. Greene, V. A. Higman, *J. Mol. Biol.* **2003**, *334*, 781-791; 'Uncovering network systems within protein structures'.
- [73] J. Heringa, P. Argos, *J. Mol. Biol.* **1991**, *220*, 151-171; 'Side-chain clusters in protein structures and their role in protein folding'.
- [74] J. Heringa, P. Argos, M. R. Egmond, J. Devlieg, *Protein Eng.* **1995**, *8*, 21-30; 'Increasing thermal stability of subtilisin from mutations suggested by strongly interacting side-chain clusters'.
- [75] M. Vendruscolo, N. V. Dokholyan, E. Paci, M. Karplus, *Phys. Rev. E* **2002**, *65*; 'Small-world view of the amino acids that play a key role in protein folding'.
- [76] D. J. Jacobs, A. J. Rader, L. A. Kuhn, M. F. Thorpe, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2001**, *44*, 150-165; 'Protein flexibility predictions using graph theory'.
- [77] A. J. Rader, B. M. Hespeneheide, L. A. Kuhn, M. F. Thorpe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 3540-3545; 'Protein unfolding: rigidity lost'.
- [78] W. Whiteley, *PB* **2005**, *2*, S116-S126; 'Counting out to the flexibility of molecules'.
- [79] D. J. Jacobs, B. Hendrickson, *J. Comput. Phys.* **1997**, *137*, 346-365; 'An algorithm for two-dimensional rigidity percolation: The pebble game'.
- [80] C. Pflieger, P. C. Rathi, D. L. Klein, S. Radestock, H. Gohlke, *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 1007-1015; 'Constraint network analysis (CNA): A python software package for efficiently linking biomacromolecular structure, flexibility, (thermo-)stability, and function'.
- [81] S. Radestock, H. Gohlke, *Eng. Life Sci.* **2008**, *8*, 507-522; 'Exploiting the link between protein rigidity and thermostability for data-driven protein engineering'.
- [82] S. Radestock, H. Gohlke, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2011**, *79*, 1089-1108; 'Protein rigidity and thermophilic adaptation'.
- [83] P. C. Rathi, S. Radestock, H. Gohlke, *J. Biotechnol.* **2012**, *159*, 135-144; 'Thermostabilizing mutations preferentially occur at structural weak spots with a high mutation ratio'.

- [84] P. C. Rath, K. E. Jaeger, H. Gohlke, PLOS One **2015**, *10*, e0130289; 'Structural Rigidity and Protein Thermostability in Variants of Lipase A from *Bacillus subtilis*'.
- [85] M. Brovotto, D. Gamemara, P. S. Mendez, G. A. Seoane, Chem. Rev. **2011**, *111*, 4346-4403; 'C-C Bond-Forming Lyases in Organic Synthesis'.
- [86] J. A. Littlechild, H. C. Watson, Trends Biochem. Sci. **1993**, *18*, 36-39; 'A data-based reaction mechanism for type I fructose bisphosphate aldolase'.
- [87] A. Heine, G. DeSantis, J. G. Luz, M. Mitchell, C. H. Wong, I. A. Wilson, Science **2001**, *294*, 369-374; 'Observation of covalent intermediates in an enzyme mechanism at atomic resolution'.
- [88] S. M. Zgiby, G. J. Thomson, S. Qamar, A. Berry, Eur. J. Biochem. **2000**, *267*, 1858-1868; 'Exploring substrate binding and discrimination in fructose-1,6-bisphosphate and tagatose 1,6-bisphosphate aldolases'.
- [89] W. D. Fessner, A. Schneider, H. Held, G. Sinerius, C. Walter, M. Hixon, J. V. Schloss, Angew. Chem.-Int. Edit. **1996**, *35*, 2219-2221; 'The mechanism of class II, metal-dependent aldolases'.
- [90] W. D. Fessner, G. Sinerius, A. Schneider, M. Dreyer, G. E. Schulz, J. Badia, J. Aguilar, Angew. Chem.-Int. Edit. **1991**, *30*, 555-558; 'Diastereoselective Enzymatic Aldol Additions: L-Rhamnulose and L-Fuculose 1-Phosphate Aldolases from *E. coli*'.
- [91] T. Conway, FEMS Microbiol. Rev. **1992**, *9*, 1-27; 'The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology'.
- [92] M. J. Walters, V. Srikanthasan, A. R. McEwan, J. H. Naismith, C. A. Fierke, E. J. Toone, Bioorg. Med. Chem. **2008**, *16*, 710-720; 'Characterization and crystal structure of *Escherichia coli* KDPGal aldolase'.
- [93] R. Florio, M. L. di Salvo, M. Vivoli, R. Contestabile, BBA-Proteins Proteom. **2011**, *1814*, 1489-1496; 'Serine hydroxymethyltransferase: A model enzyme for mechanistic, structural, and evolutionary studies'.
- [94] J. Q. Liu, T. Dairi, N. Itoh, M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, J. Mol. Catal. B-Enzym. **2000**, *10*, 107-115; 'Diversity of microbial threonine aldolases and their application'.
- [95] E. Racker, J. Biol. Chem. **1952**, *196*, 347-365; 'Enzymatic synthesis and breakdown of deoxyribose phosphate'.
- [96] O. M. Rosen, B. L. Horecker, P. Hoffee, J. C. Speck, J. Am. Chem. Soc. **1964**, *86*, 2092-8; 'Acetaldehyde-2-Deoxy-D-ribose 5-Phosphate Aldolase Complex: Comparison of the Product Obtained on Borohydride Reduction and Hydrolysis with Synthetic N6-Ethyllysine'.
- [97] P. Valentin-Hansen, F. Boetius, K. Hammer-Jespersen, I. Svendsen, Eur. J. Biochem. **1982**, *125*, 561-566; 'The primary structure of *Escherichia coli* K12 2-deoxyribose 5-phosphate aldolase. Nucleotide sequence of the deoC gene and the amino acid sequence of the enzyme'.
- [98] W. Müller-Esterl, in *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 2. Auflage ed., Spektrum Akademischer Verlag, **2010**.
- [99] A. Heine, J. G. Luz, C. H. Wong, I. A. Wilson, J. Mol. Biol. **2004**, *343*, 1019-1034; 'Analysis of the class I aldolase binding site architecture based on the crystal structure of 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase at 0.99 angstrom resolution'.
- [100] G. DeSantis, J. Liu, D. P. Clark, A. Heine, I. A. Wilson, C. H. Wong, Bioorg. Med. Chem. **2003**, *11*, 43-52; 'Structure-based mutagenesis approaches toward expanding the substrate specificity of D-2-deoxyribose-5-phosphate aldolase'.
- [101] H. J. M. Gijzen, C. H. Wong, J. Am. Chem. Soc. **1994**, *116*, 8422-8423; 'Unprecedented Asymmetric Aldol Reactions with Three Aldehyde Substrates Catalyzed by 2-Deoxyribose-5-phosphate Aldolase'.
- [102] P. R. Hebert, J. M. Gaziano, K. S. Chan, C. H. Hennekens, JAMA-J. Am. Med. Assoc. **1997**, *278*, 313-321; 'Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality - An overview of randomized trials'.

- [103] J. J. Liu, C. H. Wong, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2002**, *41*, 1404-1407; 'Aldolase-catalyzed asymmetric synthesis of novel pyranose synthons as a new entry to heterocycles and epothilones'.
- [104] H. Sakuraba, K. Yoneda, K. Yoshihara, K. Satoh, R. Kawakami, Y. Uto, H. Tsuge, K. Takahashi, H. Hori, T. Ohshima, *Appl. Environ. Microb.* **2007**, *73*, 7427-7434; 'Sequential aldol condensation catalyzed by hyperthermophilic 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase'.
- [105] Q. Y. Wang, R. Chen, P. F. Du, H. L. Wu, X. L. Pei, B. Yang, L. H. Yang, L. F. Huang, J. H. Liu, T. Xie, *Afr. J. Biotechnol.* **2010**, *9*, 2898-2905; 'Cloning and characterization of thermostable-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase from *Hyperthermus butylicus*'.
- [106] X. P. Yin, Q. Y. Wang, S. J. Zhao, P. F. Du, K. L. Xie, P. Jin, T. Xie, *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 16260-16266; 'Cloning and characterization of a thermostable 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase from *Aciduliprofundum boonei*'.
- [107] F. Sgarrella, A. Del Corso, M. G. Tozzi, M. Camici, *BBA-Protein Struct. M.* **1992**, *1118*, 130-133; 'Deoxyribose 5-phosphate aldolase of *Bacillus cereus*: purification and properties'.
- [108] H. Sakuraba, H. Tsuge, I. Shimoya, R. Kawakami, S. Goda, Y. Kawarabayasi, N. Katunuma, H. Ago, M. Miyano, T. Ohshima, *J. Bol. Chem.* **2003**, *278*, 10799-10806; 'The first crystal structure of archaeal aldolase. Unique tetrameric structure of 2-deoxy-d-ribose-5-phosphate aldolase from the hyperthermophilic archaea *Aeropyrum pernix*'.
- [109] T. K. Han, Z. Zhu, M. L. Dao, *Curr. Microbiol.* **2004**, *48*, 230-236; 'Identification, molecular cloning, and sequence analysis of a deoxyribose aldolase in *Streptococcus mutans* GS-5'.
- [110] N. K. Lokanath, I. Shiromizu, N. Ohshima, Y. Nodake, M. Sugahara, Yokoyama S, S. Kuramitsu, M. Miyano, N. Kunishima, *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 1816-1823; 'Structure of aldolase from *Thermus thermophilus* HB8 showing the contribution of oligomeric state to thermostability'.
- [111] N. Rashid, H. Imanaka, T. Imanaka, *J. Chem. Soc. Pakistan* **2008**, *30*, 740-749; 'An archaeal 2-deoxyribose 5-phosphate aldolase that exhibits closer homology to bacteria rather than archaea'.
- [112] Y. M. Kim, Y. H. Chang, N. S. Choi, Y. Kim, J. J. Song, J. S. Kim, *Protein Expr. Purif.* **2009**, *68*, 196-200; 'Cloning, expression, and characterization of a new deoxyribose 5-phosphate aldolase from *Yersinia* sp EA015'.
- [113] J. S. Kim, N. S. Choi, Y. O. Kim, D. H. Son, Y. H. Chang, J. J. Song, J. S. Kim, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *20*, 995-1000; 'Expression and Characterization of a Novel Deoxyribose 5-Phosphate Aldolase from *Paenibacillus* sp. EA001'.
- [114] I. Kullartz, J. Pietruszka, *J. Biotechnol.* **2012**, *161*, 174-180; 'Cloning and characterisation of a new 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase from *Rhodococcus erythropolis*'.
- [115] Z. Y. You, Z. Q. Liu, Y. G. Zheng, Y. C. Shen, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *40*, 29-39; 'Characterization and application of a newly synthesized 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase'.
- [116] M. H. Woo, M. S. Kim, N. Chung, J. S. Kim, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2014**, *57*, 655-660; 'Expression and Characterization of a Novel 2-Deoxyribose-5-phosphate Aldolase from *Haemophilus influenzae* Rd KW20'.
- [117] H. Fei, G. Xu, J. P. Wu, L. R. Yang, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2015**, *116*, 148-152; 'Improving the acetaldehyde tolerance of DERA(SEP) by enhancing the rigidity of its protein structure'.
- [118] X. H. Jiao, J. Pan, G. C. Xu, X. D. Kong, Q. Chen, Z. J. Zhang, J. H. Xu, *Catal. Sci. Technol.* **2015**; 'Efficient synthesis of a statin precursor in high space-time yield by a new aldehyde-tolerant aldolase identified from *Lactobacillus brevis*'.
- [119] K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass* **1988**, *16*, 99-111; 'Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure'.

- [120] S. E. Ong, M. Mann, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 252-262; 'Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative'.
- [121] P. Baldi, S. Brunak, P. Frasconi, G. Soda, G. Pollastri, *Bioinformatics* **1999**, *15*, 937-946; 'Exploiting the past and the future in protein secondary structure prediction'.
- [122] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *BBA-Proteins Proteom.* **2005**, *1751*, 119-139; 'How to study proteins by circular dichroism'.
- [123] L. Whitmore, B. A. Wallace, *Biopolymers* **2008**, *89*, 392-400; 'Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases'.
- [124] N. J. Greenfield, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2527-2535; 'Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions'.
- [125] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235-242; 'The Protein Data Bank'.
- [126] F. J. Giessibl, *Rev. Mod. Phys.* **2003**, *75*, 949-983; 'Advances in atomic force microscopy'.
- [127] M. van Heel, B. Gowen, R. Matadeen, E. V. Orlova, R. Finn, T. Pape, D. Cohen, H. Stark, R. Schmidt, M. Schatz, A. Patwardhan, *Q. Rev. Biophys.* **2000**, *33*, 307-369; 'Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution'.
- [128] M. Cox, J. Doudna, M. O'Donnell, in *Molecular Biology: Principles and Practice*, W. H. Freeman, **2011**.
- [129] M. Benvenuti, S. Mangani, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1633-1651; 'Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography'.
- [130] J. Drenth, in *Principles of Protein X-Ray Crystallography*, 3rd edition ed., Springer, **2007**.
- [131] J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff, D. C. Phillips, *Nature* **1958**, *181*, 662-666; 'Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis'.
- [132] H. Friebolin, in *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung* 5. Auflage ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2013**.
- [133] F. A. L. Anet, A. J. R. Bourn, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5250-5251; 'Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments from Nuclear Overhauser Effects¹'.
- [134] S. J. Leach, G. Némethy, H. A. Scheraga, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *75*, 207-215; 'Use of proton Nuclear Overhauser Effects for the determination of the conformations of amino acid residues in oligopeptides'.
- [135] V. Tugarinov, V. Kanelis, L. E. Kay, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 749-754; 'Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy'.
- [136] G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1982**, *155*, 347-366; 'Sequential resonance assignments in protein ¹H nuclear magnetic resonance spectra'.
- [137] M. P. Williamson, T. F. Havel, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 295-315; 'Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry'.
- [138] A. J. Baldwin, L. E. Kay, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 808-814; 'NMR spectroscopy brings invisible protein states into focus'.
- [139] L. E. Kay, *J. Magn. Reson.* **2005**, *173*, 193-207; 'NMR studies of protein structure and dynamics'.
- [140] P. R. L. Markwick, T. Malliavin, M. Nilges, *PLoS Comput. Biol.* **2008**, *4*, 7; 'Structural Biology by NMR: Structure, Dynamics, and Interactions'.
- [141] A. Mittermaier, L. E. Kay, *Science* **2006**, *312*, 224-228; 'Review - New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics'.
- [142] G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185-189; 'Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy'.

- [143] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wuthrich, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **1997**, *94*, 12366-12371; 'Attenuated T-2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution'.
- [144] L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, J. Magn. Reson. **1990**, *89*, 496-514; 'Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins'.
- [145] V. Higman, '*Protein NMR - A Practical Guide*', Retrieved November 10, **2015**, from <http://www.protein-nmr.org.uk/>.
- [146] D. P. Frueh, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. **2014**, *78*, 47-75; 'Practical aspects of NMR signal assignment in larger and challenging proteins'.
- [147] C. S. Johnson, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. **1999**, *34*, 203-256; 'Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications'.
- [148] G. A. Morris, eMagRes **2009**, *9*, 35-44; 'Diffusion-Ordered Spectroscopy'.
- [149] R. Hoffmann, '*Diffusion NMR*', Retrieved December 15, **2015**, from <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/other/diff/diff.html>.
- [150] D. A. Snyder, M. Chantova, S. Chaudhry, J. Magn. Reson. **2015**, *255*, 44-50; 'Analysis of ligand-protein exchange by Clustering of Ligand Diffusion Coefficient Pairs (CoLD-CoP)'.
- [151] J. P. Ribeiro, M. Palczewska, S. Andre, F. J. Canada, H. J. Gabius, J. Jimenez-Barbero, B. Mellstrom, J. R. Naranjo, D. J. Scheffers, P. Groves, Anal. Biochem. **2010**, *396*, 117-123; 'Diffusion nuclear magnetic resonance spectroscopy detects substoichiometric concentrations of small molecules in protein samples'.
- [152] T. D. Schneider, R. M. Stephens, Nucleic Acids Res. **1990**, *18*, 6097-6100; 'Sequence logos: a new way to display consensus sequences'.
- [153] G. E. Crooks, G. Hon, J. M. Chandonia, S. E. Brenner, Genome Res. **2004**, *14*, 1188-1190; 'WebLogo: A sequence logo generator'.
- [154] S. A. Maves, S. G. Sligar, Protein Sci. **2001**, *10*, 161-168; 'Understanding thermostability in cytochrome P450 by combinatorial mutagenesis'.
- [155] M. W. Pantoliano, E. C. Petrella, J. D. Kwasnoski, V. S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B. A. Springer, P. Lane, F. R. Salemme, J. Biomol. Screen. **2001**, *6*, 429-440; 'High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery'.
- [156] B. A. Methe, K. E. Nelson, J. W. Deming, B. Momen, E. Melamud, X. Zhang, J. Moulton, R. Madupu, W. C. Nelson, R. J. Dodson, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, A. S. Durkin, R. T. DeBoy, J. F. Kolonay, S. A. Sullivan, L. Zhou, T. M. Davidsen, M. Wu, A. L. Huston, M. Lewis, B. Weaver, J. F. Weidman, H. Khouri, T. R. Utterback, T. V. Feldblyum, C. M. Fraser, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **2005**, *102*, 10913-10918; 'The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses'.
- [157] M. Fuhrmann, A. Hausherr, L. Ferbitz, T. Schodl, M. Heitzer, P. Hegemann, Plant Mol. Biol. **2004**, *55*, 869-881; 'Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene'.
- [158] J. S. Zhao, D. Manno, C. Leggiadro, D. O'Neil, J. Hawari, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **2006**, *56*, 205-212; '*Shewanella halifaxensis* sp. nov., a novel obligately respiratory and denitrifying psychrophile'.
- [159] J. S. Zhao, Y. H. Deng, D. Manno, J. Hawari, PLoS One **2010**, *5*, 22; '*Shewanella* spp. Genomic Evolution for a Cold Marine Lifestyle and In-Situ Explosive Biodegradation'.
- [160] I. Kullartz: '*Acetaldehyd-abhängige Aldolasen (DERA) in der organischen Chemie*', Diss, Düsseldorf university press (Düsseldorf), **2013**.

- [161] R. Huber, T. A. Langworthy, H. Koenig, M. Thomm, C. R. Woese, U. B. Sleytr, K. O. Stetter, *Arch. Microbiol.* **1986**, *144*, 324-333; 'Thermotoga maritima sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C'.
- [162] P. Volkl, R. Huber, E. Drobner, R. Rachel, S. Burggraf, A. Trincone, K. O. Stetter, *Appl. Environ. Microb.* **1993**, *59*, 2918-2926; 'Pyrobaculum aerophilum sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum'.
- [163] D. J. Jacobs, A. J. Rader, L. A. Kuhn, M. F. Thorpe, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2001**, *44*, 150-165; 'Protein flexibility predictions using graph theory'.
- [164] A. Amadei, A. B. M. Linssen, H. J. C. Berendsen, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1993**, *17*, 412-425; 'Essential dynamics of proteins'.
- [165] M. M. Gromiha, M. Oobatake, A. Sarai, *Biophys. Chem.* **1999**, *82*, 51-67; 'Important amino acid properties for enhanced thermostability from mesophilic to thermophilic proteins'.
- [166] B. Hazes, B. W. Dijkstra, *Protein Eng.* **1988**, *2*, 119-125; 'Model-building of disulfide bonds in proteins with known 3-dimensional structure'.
- [167] Z. Wang, J. Moul, *Hum. Mutat.* **2001**, *17*, 263-270; 'SNPs, protein structure, and disease'.
- [168] A. Merz, M. C. Yee, H. Szadkowski, G. Pappenberger, A. Cramer, W. P. C. Stemmer, C. Yanofsky, K. Kirschner, *Biochemistry* **2000**, *39*, 880-889; 'Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures'.
- [169] N. Jourdain, R. P. Carlón, J.-L. Reymond, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9415-9418; 'A stereoselective fluorogenic assay for aldolases: Detection of an anti-selective aldolase catalytic antibody'.
- [170] G. Feller, **2013**, *2013*, 28; 'Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology'.
- [171] L. Chen, D. P. Dumas, C. H. Wong, **1992**, *114*, 741-748; 'Deoxyribose 5-phosphate aldolase as a catalyst in asymmetric aldol condensation'.
- [172] G. DeSantis, J. Liu, D. P. Clark, A. Heine, I. A. Wilson, C.-H. Wong, *Bioorg Med Chem* **2003**, *11*, 43-52; 'Structure-based mutagenesis approaches toward expanding the substrate specificity of D-2-deoxyribose-5-phosphate aldolase'.
- [173] R. S. Spolar, J. H. Ha, M. T. Record, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 8382-8385; 'Hydrophobic effect in protein folding and other noncovalent processes involving proteins'.
- [174] J. M. Yon, J. M. Betton, *Biol. Cell* **1991**, *71*, 17-23; 'Protein folding in vitro and in the cellular environment'.
- [175] T. K. Harris, G. J. Turner, *IUBMB Life* **2002**, *53*, 85-98; 'Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites'.
- [176] M. R. Wilkins, I. Lindskog, E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, D. F. Hochstrasser, R. D. Appel, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 403-408; 'Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS - A World-Wide-Web-accessible tool'.
- [177] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, W. M. R., R. D. Appel, A. Bairoch, in *Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server*, Humana Press, **2005**.
- [178] M. Bieri, A. H. Kwan, M. Mobli, G. F. King, J. P. Mackay, P. R. Gooley, *FEBS J.* **2011**, *278*, 704-715; 'Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist: beyond macromolecular solution structure determination'.
- [179] S. Grzesiek, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1992**, *99*, 201-207; 'An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins'.
- [180] D. Marion, P. C. Driscoll, L. E. Kay, P. T. Wingfield, A. Bax, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Biochemistry* **1989**, *28*, 6150-6156; 'Overcoming the overlap problem in the assignment of proton NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear proton-nitrogen-15 Hartmann-Hahn-multiple quantum coherence and nuclear Overhauser-multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1.β'.

- [181] Y. Shen, A. Bax, J. Biomol. NMR **2007**, *38*, 289-302; 'Protein backbone chemical shifts predicted from searching a database for torsion angle and sequence homology'.
- [182] N. E. Hafsa, D. S. Wishart, J. Biomol. NMR **2014**, *60*, 131-146; 'CSI 2.0: a significantly improved version of the Chemical Shift Index'.
- [183] W. Kabsch, C. Sander, Biopolymers **1983**, *22*, 2577-2637; 'Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features'.
- [184] H. Tochio, F. Hung, M. Li, D. S. Bredt, M. J. Zhang, J. Mol. Biol. **2000**, *295*, 225-237; 'Solution structure and backbone dynamics of the second PDZ domain of postsynaptic density-95'.
- [185] A. Scheithauer, E. von Harbou, H. Hasse, T. Grutzner, C. Rijksen, D. Zollinger, W. R. Thiel, AICHE J. **2015**, *61*, 177-187; 'H-1- and C-13-NMR Spectroscopic Study of Chemical Equilibria in the System Acetaldehyde plus Water'.
- [186] T. Brand, E. J. Cabrita, S. Berger, in *Theory and Application of NMR Diffusion Studies*, Springer, **2006**.
- [187] V. V. Krishnan, J. Magn. Reson. **1997**, *124*, 468-473; 'Determination of Oligomeric State of Proteins in Solution from Pulsed-Field-Gradient Self-Diffusion Coefficient Measurements. A Comparison of Experimental, Theoretical, and Hard-Sphere Approximated Values'.
- [188] D. C. Wilton, Biochem. J. **1976**, *153*, 495-497; 'Acrolein, an irreversible active-site-directed inhibitor of deoxyribose 5-phosphate aldolase?'.
- [189] B. Shoulders, S. C. Welch, J. Chem. Ed., **1987**, *64*, 915-918; 'A Very Brief, Rapid, Simple, and Unified Method for Estimating Carbon-13 NMR Chemical Shifts'.
- [190] J. A. Digits, H. J. Pyun, R. M. Coates, P. J. Casey, J. Bol. Chem. **2002**, *277*, 41086-41093; 'Stereospecificity and kinetic mechanism of human prenylcysteine lyase, an unusual thioether oxidase'.
- [191] P. J. Thornalley, Biochem. Soc. Trans. **2003**, *31*, 1343-1348; 'Glyoxalase I – structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation'.
- [192] R. G. Pearson, J. Am. Chem. Soc. **1963**, *85*, 3533-3539; 'Hard and Soft Acids and Bases'.
- [193] K. Miyazaki, M. Takenouchi, H. Kondo, N. Noro, M. Suzuki, S. Tsuda, J. Biol. Chem. **2006**, *281*, 10236-10242; 'Thermal stabilization of Bacillus subtilis family-11 xylanase by directed evolution'.
- [194] Q. A. T. Le, J. C. Joo, Y. J. Yoo, Y. H. Kim, Biotechnol. Adv. **2012**, *109*, 867-876; 'Development of thermostable Candida antarctica lipase B through novel in silico design of disulfide bridge'.
- [195] J. S. Wei, Y. Zhou, T. Xu, B. R. Lu, Appl. Biochem. Biotechnol. **2010**, *162*, 116-126; 'Rational design of catechol-2, 3-dioxygenase for improving the enzyme characteristics'.
- [196] C. M. Cho, A. Mulchandani, W. Chen, Appl. Environ. Microb. **2002**, *68*, 2026-2030; 'Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents'.
- [197] E. Papaleo, M. Olufsen, L. De Gioia, B. O. Brandsdal, J. Mol. Graphics Modell. **2007**, *26*, 93-103; 'Optimization of electrostatics as a strategy for cold-adaptation: A case study of cold- and warm-active elastases'.
- [198] B. B. Xie, F. Bian, X. L. Chen, H. L. He, J. Guo, X. Gao, Y. X. Zeng, B. Chen, B. C. Zhou, Y. Z. Zhang, J. Bol. Chem. **2009**, *284*, 9257-9269; 'Cold adaptation of zinc metalloproteases in the thermolysin family from deep sea and arctic sea ice bacteria revealed by catalytic and structural properties and molecular dynamics: new insights into relationship between conformational flexibility and hydrogen bonding'.
- [199] M. Tiberti, E. Papaleo, J. Struct. Chem. **2011**, *174*, 69-83; 'Dynamic properties of extremophilic subtilisin-like serine-proteases'.

- [200] E. Papaleo, L. Riccardi, C. Villa, P. Fantucci, L. De Gioia, *BBA-Proteins Proteom.* **2006**, *1764*, 1397-1406; 'Flexibility and enzymatic cold-adaptation: A comparative molecular dynamics investigation of the elastase family'.
- [201] E. Papaleo, G. Renzetti, G. Invernizzi, B. Asgeirsson, *BBA-Gen. Subjects* **2013**, *1830*, 2970-2980; 'Dynamics fingerprint and inherent asymmetric flexibility of a cold-adapted homodimeric enzyme. A case study of the *Vibrio* alkaline phosphatase'.
- [202] S. Ye, E. J. Goldsmith, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 740-745; 'Serpins and other covalent protease inhibitors'.
- [203] M. Lecomte, O. Laneuville, C. Ji, D. L. Dewitt, W. L. Smith, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 13207-13215; 'Acetylation of Human Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2 (Cyclooxygenase-2) by Aspirin'.
- [204] C. Contreras-Martel, V. Job, A. M. Di Guilmi, T. Vernet, O. Dideberg, A. Dessen, *J. Mol. Biol.* **2006**, *355*, 684-696; 'Crystal structure of penicillin-binding protein 1a (PBP1a) reveals a mutational hotspot implicated in beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*'.
- [205] N. V. Grishin, A. L. Osterman, H. B. Brooks, M. A. Phillips, E. J. Goldsmith, *Biochemistry* **1999**, *38*, 15174-15184; 'X-ray structure of ornithine decarboxylase from *Trypanosoma brucei*: The native structure and the structure in complex with alpha-difluoromethylonlithine'.
- [206] G. A. Sellek, J. B. Chaudhuri, *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 471-482; 'Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles'.
- [207] S. H. Krishna, *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 239-267; 'Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media'.
- [208] J. A. Littlechild, *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, *39*, 155-158; 'Thermophilic archaeal enzymes and applications in biocatalysis'.
- [209] B. Franken, T. Eggert, K. E. Jaeger, M. Pohl, *BMC Biochem.* **2011**, *12*, 13; 'Mechanism of acetaldehyde-induced deactivation of microbial lipases'.
- [210] C. A. Staab, T. Hartmanova, Y. El-Hawari, B. Ebert, M. Kisiela, V. Wsol, H. J. Martin, E. Maser, *Chem. Biol. Interact.* **2011**, *191*, 95-103; 'Studies on reduction of S-nitrosoglutathione by human carbonyl reductases 1 and 3'.
- [211] C. Pflieger, H. Gohlke, *Structure* **2013**, *21*, 1725-1734; 'Efficient and Robust Analysis of Biomacromolecular Flexibility Using Ensembles of Network Topologies Based on Fuzzy Noncovalent Constraints'.
- [212] C. Pflieger, S. Radestock, E. Schmidt, H. Gohlke, *J. Comput. Chem.* **2013**, *34*, 220-233; 'Global and Local Indices for Characterizing Biomolecular Flexibility and Rigidity'.
- [213] D. Suplatov, E. Kirilin, V. Takhaveev, V. Svedas, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2014**, *32*, 1752-1758; 'Zebra: a web server for bioinformatic analysis of diverse protein families'.
- [214] E. Chovancova, A. Pavelka, P. Benes, O. Strnad, J. Brezovsky, B. Kozlikova, A. Gora, V. Sustr, M. Klvana, P. Medek, L. Biedermannova, J. Sochor, J. Damborsky, *PLoS Comput. Biol.* **2012**, *8*, e1002708; 'CAVER 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures'.
- [215] J. Tian, P. Wang, L. Huang, X. Chu, N. Wu, Y. Fan, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 2997-3006; 'Improving the thermostability of methyl parathion hydrolase from *Ochrobactrum* sp. M231 using a computationally aided method'.
- [216] B. J. Sullivan, T. Nguyen, V. Durani, D. Mathur, S. Rojas, M. Thomas, T. Syu, T. J. Magliery, *J. Mol. Biol.* **2012**, *420*, 384-399; 'Stabilizing proteins from sequence statistics: the interplay of conservation and correlation in triosephosphate isomerase stability'.
- [217] M. Khabiri, B. Minofar, J. Brezovsky, J. Damborsky, R. Ettrich, *J. Mol. Model.* **2013**, *19*, 4701-4711; 'Interaction of organic solvents with protein structures at protein-solvent interface'.

- [218] M. P. Blakeley, P. Langan, N. Niimura, A. Podjarny, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 593-600; 'Neutron crystallography: opportunities, challenges, and limitations'.
- [219] M. P. Blakeley, S. S. Hasnain, S. V. Antonyuk, *IUCr* **2015**, *2*, 464-474; 'Sub-atomic resolution X-ray crystallography and neutron crystallography: promise, challenges and potential'.
- [220] T. Tamada, M. Adachi, *Radioisotopes* **2010**, *59*, 299-308; 'Fundamentals and Applications of Neutron Diffraction (Applications 12). Structure Determination of Drug Target Proteins by Neutron Crystallography'.
- [221] J. R. Lakowicz, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd edition ed., Springer, **2011**.
- [222] L. A. Wallace, N. Sluis-Cremer, H. W. Dirr, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5320-5328; 'Equilibrium and kinetic unfolding properties of dimeric human glutathione transferase A1-1'.
- [223] J. Bramski: '*Biochemische Charakterisierung neuer Acetaldehyd-abhängiger Aldolasen aus psychrophilen Organismen*', Bachelor Thesis, (Düsseldorf), **2014**.
- [224] E. Banachowicz, *BBA - Proteins Proteom.* **2006**, *1764*, 405-413; 'Light scattering studies of proteins under compression'.
- [225] D. I. Svergun, M. H. J. Koch, *Rep. Prog. Phys.* **2003**, *66*, 1735-1782; 'Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution'.
- [226] P. Zipper, H. Durchschlag, *Radiat. Environ. Biophys.* **1980**, *18*, 99-121; 'Small-angle X-ray scattering studies on the X-ray induced aggregation of malate synthase'.
- [227] K. Yoshida, Y. Fukushima, T. Yamaguchi, *J. Mol. Liq.* **2014**, *189*, 1-8; 'A study of alcohol and temperature effects on aggregation of beta-lactoglobulin by viscosity and small-angle X-ray scattering measurements'.
- [228] J. Farjon, J. Boisbouvier, P. Schanda, A. Pardi, J. P. Simorre, B. Brutscher, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8571-8577; 'Longitudinal-relaxation-enhanced NMR experiments for the study of nucleic acids in solution'.
- [229] P. Galletti, E. Emer, G. Gucciardo, A. Quintavalla, M. Pori, D. Giacomini, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4117-4123; 'Chemoenzymatic synthesis of (2S)-2-arylpropanols through a dynamic kinetic resolution of 2-arylpropanals with alcohol dehydrogenases'.
- [230] C. W. G. Au, S. G. Pyne, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7097-7099; 'Asymmetric synthesis of anti-1,2-amino alcohols via the Borono-Mannich reaction: A formal synthesis of (-)-swainsonine'.
- [231] H. Iding, P. Siegert, K. Mesch, M. Pohl, *BBA-Protein Struct. M.* **1998**, *1385*, 307-322; 'Application of alpha-keto acid decarboxylases in biotransformations'.
- [232] K. E. Kabir, A. R. Khan, M. A. Mosaddik, *J. Appl. Entomol.* **2003**, *127*, 112-115; 'Goniothalamine - a potent mosquito larvicide from *Bryonopsis laciniosa* L'.
- [233] A. de Fatima, L. K. Kohn, J. E. de Carvalho, R. A. Pilli, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 622-631; 'Cytotoxic activity of (S)-goniothalamine and analogues against human cancer cells'.
- [234] A. de Fatima, L. V. Modolo, L. S. Conegero, R. A. Pilli, C. V. Ferreira, L. K. Kohn, J. E. de Carvalho, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 3371-3384; 'Styryl lactones and their derivatives: Biological activities, mechanisms of action and potential leads for drug design'.
- [235] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 277-293; 'NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes'.
- [236] W. F. Vranken, W. Boucher, T. J. Stevens, R. H. Fogh, A. Pajon, M. Llinas, E. L. Ulrich, J. L. Markley, J. Ionides, E. D. Laue, *Proteins* **2005**, *59*, 687-696; 'The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline'.
- [237] W. Kabsch, *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 125-132; 'XDS'.
- [238] A. Vagin, A. Teplyakov, *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 1022-1025; 'MOLREP: an automated program for molecular replacement'.

- [239] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486-501; 'Features and development of coot'.
- [240] D. A. Case, V. Babin, J. Berryman, R. M. Betz, Q. Cai, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham III, T. A. Darden, R. E. Duke, H. Gohlke, A. W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. M. Merz, F. Paesani, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C. L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, P. A. Kollman, **2014**; 'Amber 14'.
- [241] W. A. Kibbe, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W43-46; 'OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator'.
- [242] C. Follo, C. Isidorol, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2008**, *49*, 175-183; 'A fast and simple method for simultaneous mixed site-specific mutagenesis of a wide coding sequence'.
- [243] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 5463-5467; 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors'.
- [244] A. Sivashanmugam, V. Murray, C. X. Cui, Y. H. Zhang, J. J. Wang, Q. Q. Li, *Protein Sci.* **2009**, *18*, 936-948; 'Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*'.
- [245] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254; 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding'.
- [246] I. Rayment, *Method. Enzymol.* **1997**, *276*, 171-179; 'Reductive alkylation of lysine residues to alter crystallization properties of proteins'.
- [247] P. C. Nicholas, *Biochem. Soc. Trans.* **1988**, *16*, 753-754; 'Determination of fructose-1,6-diphosphate aldolase activity with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and diformazan formation'.
- [248] P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkoczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L. W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, P. H. Zwart, *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213-221; 'PHENIX: a comprehensive python-based system for macromolecular structure solution'.
- [249] V. B. Chen, W. B. Arendall, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 12-21; 'MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography'.
- [250] D. S. Wishart, C. G. Bigam, A. Holm, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 67-81; '¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects'.
- [251] M. Ikura, L. E. Kay, A. Bax, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4659-4667; 'A novel approach for sequential assignment of proton, carbon-13, and nitrogen-15 spectra of larger proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin'.
- [252] A. Bax, M. Ikura, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 99-104; 'An efficient 3D NMR technique for correlating the proton and ¹⁵N backbone amide resonances with the alpha-carbon of the preceding residue in uniformly ¹⁵N/¹³C enriched proteins'.
- [253] R. T. Clubb, V. Thanabal, G. Wagner, *J. Magn. Reson. (1969)* **1992**, *97*, 213-217; 'A constant-time three-dimensional triple-resonance pulse scheme to correlate intraresidue ¹HN, ¹⁵N, and ¹³C' chemical shifts in ¹⁵N/¹³C-labelled proteins'.
- [254] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926; 'Comparison of simple potential functions for simulating liquid water'.
- [255] D. R. Roe, T. E. Cheatham, *J Chem Theory Comput* **2013**, *9*, 3084-3095; 'PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data'.

- [256] S. P. Tiwari, E. Fuglebakk, S. M. Hollup, L. Skjaerven, T. Cragolini, S. H. Grindhaug, K. M. Tekle, N. Reuter, *BMC Bioinformatics* **2014**, *15*, 427; 'WEBnm@ v2.0: Web server and services for comparing protein flexibility'.
- [257] W. F. van Gunsteren, P. H. Hunenberger, A. E. Mark, P. E. Smith, I. G. Tironi, *Comput Phys Commun.* **1995**, *91*, 305-319; 'Computer-simulation of protein motion'.
- [258] M. Karplus, T. Ichiye, *J. Mol. Biol.* **1996**, *263*, 120-122; 'Comment on a "fluctuation and cross correlation analysis of protein motions observed in nanosecond molecular dynamics simulations"'.
- [259] B. I. Dahiyat, D. B. Gordon, S. L. Mayo, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1333-1337; 'Automated design of the surface positions of protein helices'.