

**Untersuchungen zur
Struktur und Funktion der lecithinabhängigen
(R)-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase**

Dem Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern zur Erlangung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ eingereichte

Dissertation

(D 386)

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Markus Jehl

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

Kaiserslautern 2002

Die vorliegende Arbeit wurde im Fachbereich Chemie, Abteilung Biochemie der Universität Kaiserslautern im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. W. E. Trommer in der Zeit von August 1999 bis Dezember 2002 durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. E. Trommer für die Überlassung des interessanten Themas sowie für seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Bei Prof. Dr. McIntyre und den Kollegen vom Department of Molecular Biology der Vanderbilt Universität in Nashville/ TN, USA möchte ich mich bedanken, die mich bei allen Problemen hilfreich unterstützt haben.

Priv. Doz. Dr. Pia Vogel und Dr. J.G. Wise danke ich für die Unterstützung dieses Themas.

Ebenso danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen aus dem Arbeitskreis für ihre stete Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung.

Meinen Eltern

1	Einleitung.....	1
1.1	R-(3)-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (BDH).....	1
1.1.1	Historie.....	1
1.1.2	Metabolismus und Funktion der BDH.....	2
1.1.3	Biosynthese der BDH und Regulation der Aktivität.....	4
1.1.4	Lipidabhängigkeit der BDH.....	4
1.1.5	Die NAD(H)-Bindung.....	6
1.1.6	Die Struktur der BDH.....	7
1.2	Fluoreszenz.....	10
1.2.1	Energie-Transfer.....	10
1.2.2	Fluorophore.....	11
1.3	ESR-Spektroskopie.....	14
1.3.1	Zeeman-Aufspaltung.....	14
1.3.2	Hyperfein-Aufspaltung.....	15
1.3.3	Relaxationsmechanismen.....	16
1.3.4	Anisotropie.....	16
1.3.5	Polaritätseffekte.....	18
1.3.6	Site-directed spin labeling.....	18
2	Problemstellung.....	20
3	Ergebnisse und Diskussion.....	22
3.1	Design neuer BDH-Mutanten.....	22
3.1.1	Konstruktion der Plasmide pBDH-C69A/Y202C/C242A, pBDH-Y202C/C242A, pBDH-C69A/Y202C.....	22
3.1.2	Identifizierung der klonierten Plasmide.....	23
3.2	Expression, Isolierung und Aufreinigung von HisBDH.....	25
3.3	ESR-Spektroskopische Untersuchungen von BDH-Mutanten.....	27
3.3.1	Spinmarkierung von BDH-Mutanten.....	27
3.3.2	Abstandsbestimmungen.....	28
3.4	Fluoreszenzstudien von BDH-Mutanten.....	37
3.4.1	Fluoreszenzmarkierung von BDH-Mutanten.....	37
3.4.2	RET-Studien an BDH-Mutanten.....	37
3.4.3	NADH-Titrationsstudien von HH-BDH im Vergleich mit BH-BDH.....	43
3.5	Studien zur C-terminalen Domäne.....	52
3.5.1	Konstruktion der Plasmide pBDH-W276R und pBDH-W276C.....	52

3.5.2	Identifizierung der klonierten Plasmide	53
3.5.3	Expression, Isolierung und Aufreinigung der W276R-Mutante	54
3.5.4	ESR-Spektroskopische Untersuchung der W276C-Mutante	55
4	Zusammenfassung	58
5	Material und Methoden	62
5.1	Material	62
5.1.1	E. coli Stämme	62
5.1.2	Plasmide und Vektoren	62
5.1.3	Oligonukleotide und Sequenzierung	63
5.1.4	Enzyme	64
5.1.5	Medien	64
5.1.6	Chemikalien	64
5.1.7	Weitere Materialien	65
5.1.8	Geräte	65
5.2	Kultivierung und Lagerung	66
5.2.1	Autoklavieren	66
5.2.2	Flüssigmedien (Sambrook <i>et al.</i>)	66
5.2.3	Festmedien	67
5.2.4	Kulturbedingungen	67
5.2.4.1	Flüssigmedium:	67
5.2.4.2	Festmedium:	67
5.2.4.3	Glycerinkulturen:	67
5.2.5	Wachstumsmessungen	68
5.3	Allgemeine Arbeitsmethoden	68
5.3.1	Herstellung kompetenter Zellen	68
5.3.2	Transformation von Plasmid-DNA	69
5.3.3	Plasmidpräparationen	69
5.3.4	Restriktionsverdau von DNA mit Endonukleasen	71
5.3.5	Agarosegelelektrophorese	72
5.3.6	DNA-Größenstandards	73
5.3.7	Konzentrationsbestimmung von DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	74
5.3.8	Elution von DNA aus Agarosegelen	74
5.3.9	Ligation von DNA-Fragmenten	74
5.4	Klonierung der Plasmide	75

5.4.1	Konstruktion des Plasmids pBDH-Y202C.....	75
5.4.2	Konstruktion des Plasmids pBDH-Y202C/C242A.....	78
5.4.3	Konstruktion des Plasmids pBDH-C69A/Y202C.....	79
5.4.4	Konstruktion des Plasmids pBDH-W276R.....	81
5.4.5	Konstruktion des Plasmids pBDH-W276C.....	82
5.5	Expression und Isolierung von HisBDH.....	83
5.6	BDH-Aktivitätstest.....	85
5.7	Herstellung der Liposomen (Cortese <i>et al.</i>).....	86
5.8	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	86
5.9	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	87
5.10	Western Blotting.....	87
5.11	ESR-Spektroskopie.....	88
5.11.1	Geräte und Parameter.....	88
5.11.2	Durchführung der ESR-Messungen.....	89
5.12	Fluoreszenz-Spektroskopie.....	90
5.12.1	Durchführung fluorimetrischer NADH-Titrationen.....	90
5.12.2	Anisotropie-Messungen.....	91
5.13	CD-Messungen.....	92
6	Anhang.....	93
6.1	Restriktionskarten benutzter pUC-Plasmide:.....	93
6.2	Restriktionskarte des Wildtyps im pET-System:.....	95
7	Abkürzungen.....	96
8	Literatur.....	97

1 Einleitung

1.1 R-(3)-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (BDH)

1.1.1 Historie

Zu Beginn des letzten Jahrhunderts wurde in tierischem Gewebe eine reversible Oxidation von R-3-Hydroxybutyrat zu Acetoacetat beschrieben (Dakin, 1910; Dakin, 1909; Blum, 1910). Über die Eigenschaften und die intrazelluläre Verteilung der für diese Reaktion verantwortlichen Dehydrogenase blieb jedoch lange Zeit wenig bekannt. Green beschrieb eine stereospezifische und NAD-bindende Dehydrogenase in Schweineherzmitochondrien (Green *et al.*, 1937), später auch in den Mitochondrien der Leber und im Herzmuskel (Lehninger *et al.*, 1949; Lehninger *et al.*, 1960; Fleischer *et al.*, 1966; Gaudemer *et al.*, 1975). Die Isolierung der BDH bereitete auf Grund der hohen Membranaffinität (Lehninger *et al.*, 1960; Fleischer *et al.*, 1966) große Probleme. Erst als klar war, dass das Enzym unter physiologischen Bedingungen nur in Anwesenheit von lecithinhaltigen, mitochondrialen Phospholipiden aktiv ist (Jurtshuk *et al.*, 1961), gelang es durch Cholat-Behandlung (Sekuzu *et al.*, 1963) bzw. Phospholipid-Hydrolyse mit Phospholipase A₂ das Enzym zu solubilisieren (Nielsen *et al.*, 1973). Bock und Fleischer konnten zum ersten mal aus Rinderherzmitochondrien das Enzym in homogen aufgereinigter Form isolieren (Bock&Fleischer, 1975). Ihre Isolierungsmethode basierte auf Hydrolyse der Phospholipide durch Phospholipase A₂, Adsorption des Enzyms an speziellen porigen Glaskügelchen und nachfolgendes Ablösen des Apoenzyms mit Lithiumbromid. 1987 wurde eine verbesserte Methode zur Isolierung der BDH aus Rinderherzmitochondrien beschrieben (McIntyre *et al.*, McIntyre *et al.*, 1987). 1990 gelang die Isolierung des Enzyms aus Rattenlebermitochondrien (Zhang&Churchill, 1990). Darüber hinaus konnte die BDH auch aus Rattenhirnmitochondrien (Zhang *et al.*, 1990) und Dromedarlebermitochondrien (Nasser *et al.*, 2002) isoliert werden. Erst 1992 ist es gelungen, die Primärstrukturen des Enzyms aus Menschenherz und Rattenleber aufzuklären (Marks *et al.*, 1992; Churchill *et al.*, 1992). Humane BDH wurde in Insektenzellen (SF9, *Spodoptera fugiperda*) exprimiert, indem diese mit BDH-cDNA in Baculoviren beimpft wurden (Green *et al.*, 1996). Die exprimierte BDH konnte nur wenig aufgereinigt in geringer Ausbeute und unter erheblichen Aktivitäts-

verlusten isoliert werden. Kürzlich wurde ein Plasmid kloniert (Chelius *et al.*, 2000), das die Expression humaner BDH als Fusionspeptid in *E. coli* erlaubt. Das N-terminale Fusionspeptid enthält einen Hexahistidin-Tag zur Aufreinigung des Enzyms mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie sowie eine Enterokinaseschnittstelle, um das Fusionspeptid abspalten zu können. Das isolierte Enzym ist katalytisch aktiv und die kinetischen Parameter sind den Parametern der Enzyme aus Rattenleber (Zhang *et al.*, 1990; Zhang und Churchill, 1990) oder Rinderherz (McIntyre *et al.*, 1988) nahezu identisch.

1.1.2 Metabolismus und Funktion der BDH

Die BDH katalysiert die reversible Umwandlung von R-3-Hydroxybutyrat (R-BOH) zu Acetoacetat (Acac) in Gegenwart des Coenzym NAD (Abb. 1.1).

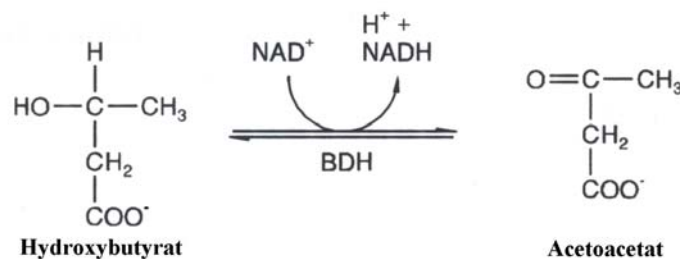


Abb. 1.1 Reversible Umsetzung von Hydroxybutyrat zu Acetoacetat.

Acetyl-CoA, das beim Fettsäureabbau und der Pyruvatoxidation entsteht, wird in den Mitochondrien der Leber in die Ketonkörper Hydroxybutyrat und Acetoacetat umgewandelt. Diese Umwandlung wird als Ketogenese bezeichnet und ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

Das Verhältnis von Hydroxybutyrat und Acetoacetat hängt vom NADH/NAD^+ -Verhältnis in den Mitochondrien ab. Acetoacetat unterliegt einer langsamen, spontanen Decarboxylierung zu Aceton, was im Atem von Personen, die einen hohen Acetoacetatspiegel besitzen, wahrgenommen werden kann.

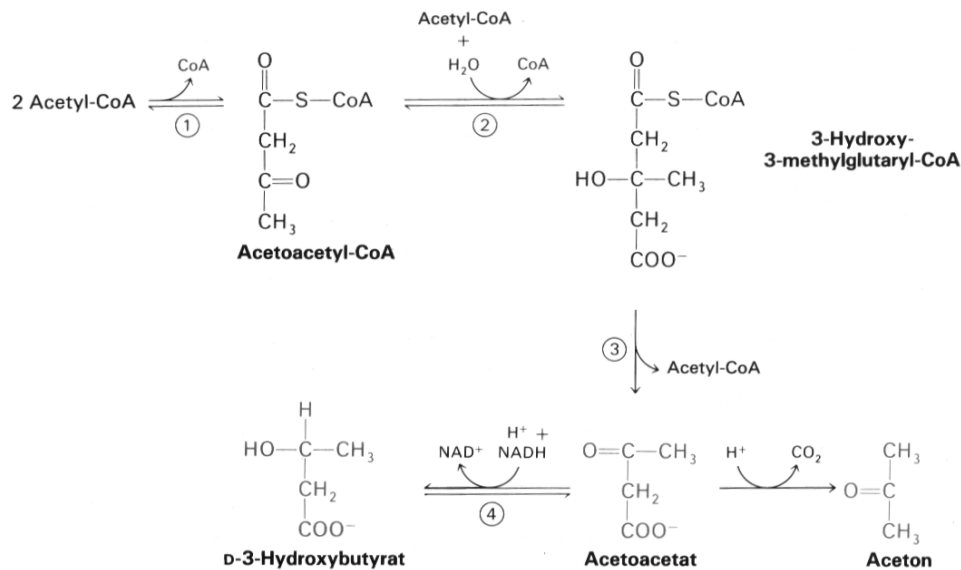


Abb. 1.2 Bildung von Acetoacetat, Hydroxybutyrat und Aceton aus Acetyl-CoA in der Leber. Die Reaktionen werden von folgenden Enzymen katalysiert: 1) 3-Ketothiolase, 2) Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthetase, 3) HMG-CoA-spaltendes Enzym, 4) D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase

Hydroxybutyrat und Acetoacetat werden von der Leber in den Blutkreislauf abgegeben und als alternative Brennstoffe von den peripheren Geweben genutzt. Die Energiegewinnung aus Acetoacetat wird im Herzmuskel und in der Nierenrinde derjenigen aus Glucose bevorzugt. Die Leber hingegen kann die von ihr gebildeten Ketonkörper selbst nicht verwerten, da sie die zur Aktivierung des Acetoacetats notwendige CoA-Transferase nicht besitzt (siehe Abb. 1.3) und kann somit den anderen Organen die Ketonkörper zur Verfügung stellen.

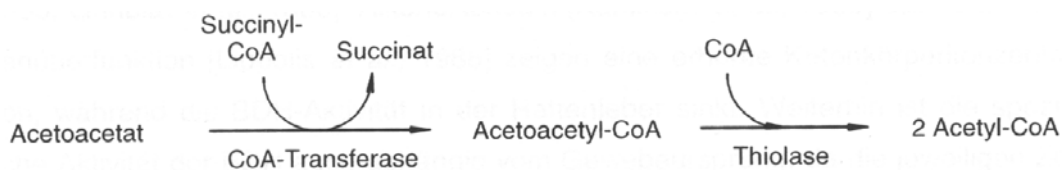


Abb. 1.3 Energetische Verwertung von Acetoacetat als Brennstoff.

Sowohl für das Gehirn als auch den arbeitenden Muskel ist die Glucose der Energielieferant der Wahl. Der Körper verfügt jedoch über weniger als einen Tagesvorrat an Kohlenhydraten. Während längeren Hungerperioden kommt dem Ketonkörperstoffwechsel eine wichtige Bedeutung zur Energiegewinnung zu, da nun kaum noch Glucose zur Verfügung steht. Durch die ständig ablaufende Gluconeogenese ist der Oxalacetatvorrat der Leber erschöpft, so dass die Leber nur noch in geringem Maße in der Lage ist, Acetyl-CoA über den Citronensäurezyklus abzubauen. Statt dessen wandelt sie Acetyl-CoA in Ketonkörper um. Nach einer ca. 40 tägigen Hungerperiode werden ca. 70% des Energiebedarfs durch die Ketonkörper abgedeckt.

Acetoacetat wird durch Aktivierung zu Acetyl-CoA, das wiederum in den Citratzyklus eingeschleust werden kann, energetisch verwertet (Abb. 1.3).

1.1.3 Biosynthese der BDH und Regulation der Aktivität

Die BDH wird als Precursor, der etwa 5 kDa schwerer ist als das aktive Enzym, im Cytosol an freien Polysomen synthetisiert (Coquard *et al.*, 1982; Mihara *et al.*, 1982; Kante *et al.*, 1987). Dieser wird durch eine Matrix-Protease in den Mitochondrien abgespalten. Das aktive Fragment inseriert in die Mitochondrienmembran (Bedetti *et al.*, 1987; Kante *et al.*, 1987).

1991 wurde in einer ersten Studie über die Identifizierung eines Rattenleber-cDNA-Klons, sowie die Isolierung und Charakterisierung eines BDH- β -Galaktosidase Fusionsproteins, das Phosphatidylcholin-abhängige BDH-Aktivität zeigte, berichtet (Churchill *et al.*, 1991). Marks leitete 1992 die komplette Aminosäuresequenz des Menschenherzenzyms aus cDNA-Klone ab (Marks *et al.*, 1992). Die reife Form des Enzyms besteht aus 297 Aminosäuren und zeigt 89% Homologie zum Rinderherzenzym auf.

Die Regulation der BDH-Aktivität ist nicht geklärt. Unter Bedingungen wie Hunger (Sultan *et al.*, 1987; Kante *et al.*, 1990), Diabetes (Churchill *et al.*, 1983), Alkoholkonsum (Kaminsky & Kosenko, 1988) oder Schilddrüsenüberfunktion (Lippolis *et al.*, 1990) steigt die Ketonkörperkonzentration an, die BDH-Aktivität nimmt aber in der Rattenleber ab. Bei hyperthyroiden Ratten wurde analog zu diabetischen Tieren eine verringerte zelluläre BDH-Konzentration festgestellt (Churchill *et al.*, 1983).

1.1.4 Lipidabhängigkeit der BDH

Die BDH zeichnet sich durch eine hochspezifische und nahezu absolute Lecithinabhängigkeit aus (Sekuzu *et al.*, 1963; Jurtshuk *et al.*, 1963; Fleischer *et al.*, 1966). Feste und produktive Coenzymbindung sind von der Anwesenheit von Lecithinen in der Membran abhängig. Das lipidfreie Enzym, die sogenannte ApoBDH bzw. ApoEnzym, inseriert spontan und unidirektionell in Phospholipid-Vesikel (McIntyre *et al.*, 1979; Deese *et al.*, 1985; Maurer *et al.*, 1985). Mit mitochondrialen Phospholipid-Vesikeln (MPL) lässt sich das ApoEnzym mit optimaler Effizienz und Aktivität reaktivieren. Synthetische Phospholipid-Vesikel aktivieren das Enzym ebenfalls, jedoch erst die ternäre Mischung aus Phosphatidylcholin (PC) mit Phosphatidylethanolamin (PE) und Diphosphatidylglycerin (DPG) im Verhältnis 5:4:1 ergibt optimale Aktivität und Effizienz (Gazotti *et al.*, 1975; Isaacson *et al.*, 1979).

Um strukturelle Besonderheiten der Lecithine bzgl. der Reaktivierung von ApoBDH zu untersuchen, wurden eine Vielzahl von Lecithinanaloga synthetisiert (Isaacson *et al.*, 1979; Berrez *et al.*, 1984). Die Studien ergaben, dass die ApoBDH keine spezifische Struktur im hydrophoben Bereich der Lecithine benötigt, da D und L Stereoisomere das Enzym gleichermaßen reaktivieren. Außerdem wird die ApoBDH durch unterschiedliche Alkylphosphorylcholine und Phosphonoanaloga aktiviert. Des Weiteren wurde aufgezeigt, dass der Sauerstoff zwischen dem Phosphor und der Cholingruppe für die Aktivität essentiell ist. Die Ethylgruppe des Cholins kann ohne Aktivitätsverlust durch einen Propyl- oder Butylrest ersetzt werden. Dagegen lässt sich das Enzym nicht mehr reaktivieren, wenn an dieser Position ein Isopropylrest eingebaut wird (sterische Hinderung). Die quaternäre Ammoniumgruppe in den Lecithinen ist essentiell für die Reaktivierung von ApoBDH. Eine Variation der N-Methylgruppen ergab, dass maximal zwei Methylgruppen durch N-Ethylgruppen ersetzt werden können.

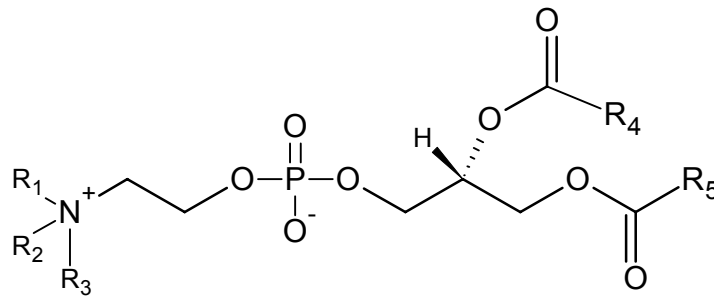


Abb. 1.4 Grundstruktur des Phosphatidylcholins (PC) mit den variablen Fettsäureresten R_1 und R_2 .

Obwohl hinsichtlich der Aktivierung des ApoEnzyms durch Lecithine keine spezifische Struktur im hydrophoben Bereich erforderlich ist, ist gerade dieser Bereich für die Bindungsaffinität und schließlich für die Aktivierung des Enzyms von entscheidender Bedeutung. Die Kettenlänge der Alkylreste ist für die Bindungsaffinität sehr wichtig. Je länger die Kettenlänge der beiden Fettsäureacylreste ist, desto größer ist die Bindungsaffinität (Bock *et al.*, 1975). Das Optimum der Bindungsaffinität wird bei einer Lipidkettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen (Maurer *et al.*, 1985) erreicht. Falls die Lipidkettenlänge nicht mindestens über 6 Kohlenstoffatome verfügt, ist das ApoEnzym nicht mehr reaktivierbar (Cortese *et al.*, 1982).

Das solubilisierte Enzym liegt in Lösung hochassoziiert vor. Das aufgereinigte mit Phospholipiden rekonstituierte sowie das native Enzym in mitochondrialen Membranen liegen vermutlich als Tetramere vor. Aber auch in nicht aktivierenden Liposomen zeigt die BDH die gleiche tetramere Struktur (McIntyre *et al.*, 1983). ApoBDH kann auch durch kurz-kettige, wasserlös-

liche Lecithine, wie z.B. Dihexanoyl-Phosphatidylcholin reaktiviert werden. Des weiteren ist die Bilayerstruktur für die Reaktivierung nicht essentiell.

Für die Aktivierung des ApoEnzyms durch lösliche Lecithine wird ein nicht kooperatives Modell mit zwei identischen, nicht wechselwirkenden Bindungsstellen diskutiert (Cortese *et al.*, 1982; Cortese & Vidal, 1983). Von Sandermann (Sandermann *et al.*, 1986) und Cortese&Fleischer (Cortese&Fleischer, 1987) werden für die Aktivierung durch Bilayer kooperative Wechselwirkungen zwischen zwei unterschiedlichen Lecithin-Bindungsstellen vorgeschlagen. Zur Interpretation beider Modelle wurde vorgeschlagen (Cortese *et al.*, 1989), dass Phosphatidylcholin als essentieller allosterischer Aktivator wirkt. Rudi postulierte ebenfalls einen tetrameren Komplex, der zwei identische aktive Zentren besitzt, wobei die tetramere Einheit bereits in nicht PC-haltigen Lipidmembranen gebildet wird (Rudi *et al.*, 1989). Lecithine sind für feste und produktive Coenzymbindung erforderlich. Die Affinität des Coenzym erhöht sich dabei um das 50fache. Umgekehrt führt die Bildung von Enzym/ Coenzym-Komplexen zu einer Erhöhung der Wechselwirkung der BDH mit Phosphatidylcholinen. Gebundenes Phosphatidylcholin steht dabei im raschen Austausch mit der bulk-Phase (Klein *et al.*, 1996).

Ein Sequenzvergleich der Aminosäuren mit anderen Proteinen offenbarte, dass der C-terminale Bereich keine Homologie mit irgendeiner bekannten Sequenz zeigt. Untersuchungen führen zu der Vermutung, dass in diesem einzigartigen Bereich der BDH die Lecithin-Bindungsstelle lokalisiert ist (Green *et al.*, 1996 und Langston *et al.*, 1996).

1.1.5 Die NAD(H)-Bindung

Durch kinetische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl die durch die membrangebundene als auch die durch den gelösten BDH-Komplex katalysierte Reaktion einem geordneten Bi-Bi-Reaktionsmechanismus folgt (Nielsen *et al.*, 1973): Zunächst bindet das Coenzym, dann das Substrat an das Enzym. Nach erfolgter Katalyse verlässt das Coenzym erst nach Freigabe des Produktes den Enzymkomplex (Velick, 1961):

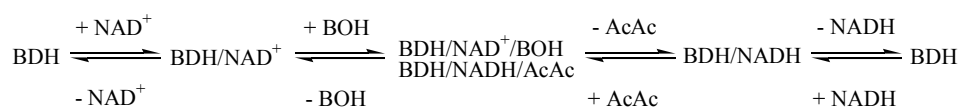


Abb. 1.5 Bi-Bi-Mechanismus der BDH-Katalyse nach Nielsen *et al.*, 1973.

Die ersten Studien der NADH-Bindung am BDH/ MPL-Komplex ergaben eine Dissoziationskonstante von 6-10 μM und eine Stöchiometrie von 0.5 mol NAD pro mol BDH-Monomer (Fleischer *et al.*, 1974; Gazzotti *et al.*, 1974).

In Gegenwart des Coenzyms konnten nur zwei von vier freien SH-Gruppen des Tetramers durch N-Ethylmaleimid modifiziert werden (McIntyre *et al.*, 1984; Fleer *et al.*, 1984). Daraus wurde eine sogenannte *half-site*-Reaktivität für das BDH-Tetramer gefolgert: Das Enzym besteht aus zwei funktionellen dimeren Untereinheiten, welche jeweils ein Molekül NAD binden können.

1.1.6 Die Struktur der BDH

Nachdem 1992 die Aminosäuresequenzen der BDH aus Rattenleber (Churchill *et al.*, 1992) und Menschenherz (Marks *et al.*, 1992) veröffentlicht wurden, konnte das Enzym aufgrund sequentieller und funktioneller Ähnlichkeiten in die Enzymfamilie der Kurzketten-Dehydrogenasen (Short-chain Dehydrogenase/ Reductase, SDR) eingeordnet werden.

Die ersten Untersuchungen an Dehydrogenasen diesen Typs wurden an prokaryotischer Ribitol-Dehydrogenase (Moore *et al.*, 1978) und an Drosophila-Alkohol-Dehydrogenase (Schwartz&Jörnvall, 1976) durchgeführt. Die Proteine wurden aber damals noch nicht als Familie erkannt, da fundamentale Unterschiede zwischen Insekten- und Leber-Alkohol-Dehydrogenasen gefunden wurden (Jörnvall *et al.*, 1995; Filling *et al.*, 2002). Das Konzept der SDR wurde etabliert als ein entscheidendes Muster der beiden Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) Typen sich auch auf andere Dehydrogenasen anwenden ließ (Jörnvall *et al.*, 1981). Bis heute wurden über 60 Vertreter dieser Familie klassifiziert (Jörnvall *et al.*, 1995). Da sich herausstellte, dass neben den Alkohol-Dehydrogenasen auch andere Dehydrogenasen Charakteristika von SDR besitzen, wurde die SDR-Familie erweitert. Zu dieser erweiterten Familie gehören heute Oxidoreduktasen, Lyasen und Isomerasen.

SDR besitzen untereinander eine Sequenzhomologie von 10-30%, ihre Strukturen hingegen zeigen eine hohe Ähnlichkeit (Jörnvall *et al.*, 1995). Die SDR setzen sich aus Untereinheiten zusammen, die aus etwa 250 Aminosäuren aufgebaut sind. Das GlyXXXGlyXGly-Segment ist charakteristisch für die Coenzymbindung in Dehydrogenasen (Rossmann *et al.*, 1975). Bei der BDH handelt es sich dabei um Gly16, Gly20 und Gly22 (Persson *et al.*, 1991). In der Region des aktiven Zentrums von SDR sind drei Aminosäuren konserviert. Bei der BDH wären dies vermutlich Ser149, Tyr162 und Lys166 (Persson *et al.*, 1991). Die ersten 200 Aminosäuren sind wahrscheinlich durch ein alternierendes α -Helix- β -Faltblatt-Muster charakterisiert.

Die C-terminale Region schließt wahrscheinlich die Substrat- und PC-Bindungsstelle mit ein (Marks *et al.*, 1992).

Mittlerweile wurden Strukturen von einigen Mitgliedern der SDR-Familie gelöst (Filling *et al.*, 2002). Aufbauend auf der Struktur der $3\alpha/20\beta$ -HSD (Gosh *et al.*, 1991, 1994) erstellte Moeller für den Sequenzabschnitt von Glu5 bis Gly193 ein tetrameres Strukturmodell für die BDH aus Menschenherz. In diesem Bereich besteht zwischen beiden Enzymen eine Sequenzhomologie mit 25% Identität. Der C-Terminus des Enzyms weist eine geringe Sequenzhomologie zu anderen SDR auf, so dass für diesen Bereich keine Strukturvorhersage gemacht werden konnte. Das Strukturmodell des Tetramers ist in Abbildung 1.6 mit eingelagertem Coenzym und Substrat dargestellt.



Abb. 1.6 Bändermodell des BDH-Tetramers mit eingelagerten (R)-3-Hydroxybutyrat- und NAD⁺-Molekülen.

Das tetramere Strukturmodell lässt eine räumliche Nähe jeweils zweier Untereinheiten vermuten. Die beiden Dimere sind durch eine Lücke voneinander getrennt, so dass Teile der C-Termini sich in die Lücke erstrecken und somit Wechselwirkungen zwischen den Dimeren übernehmen können. Wenn das Tetramer mit einer Seite an die Membran assoziiert ist, können Coenzym und Substrat nur von der anderen Seite her eingelagert werden (Moeller, 1996). Diese Hypothese wäre mit der Feststellung in Einklang, dass von vier aktiven Zentren des Tetramers nur zwei das Coenzym binden können (Rudy *et al.*, 1989).

Das Modell liefert wichtige Erkenntnisse über die im Menschenherzenzym enthaltenen Cysteinreste. Da Cystein 17 und 40 sehr nahe beieinander liegen, bilden beide innerhalb eines Monomers wahrscheinlich eine Disulfidbrücke. Interessant ist die Nähe der Cysteine 163 und 175 verschiedener Untereinheiten zueinander. Wahrscheinlich sind jeweils zwei Monomere über Disulfidbrücken miteinander verbunden (Moeller, 1996). Die verbleibenden Cysteine 69 und 242 verfügen über freie Sulfhydrylgruppen. Cystein 69 liegt nahe der Kontaktstelle zweier Untereinheiten in der Nähe der Nukleotidbindungsstelle und ist weniger reaktiv als das Cystein 242 (Marks *et al.*, 1992; Dalton *et al.*, 1993). Sulfhydrylgruppen-Modifizierungsexperimente (McIntyre *et al.*, 1984; Dalton *et al.*, 1993) und auch die Beobachtung, dass nur zwei Coenzyme pro Tetramer binden (Rudy *et al.*, 1989), untermauern das Modell. Des weiteren wurde für die BDH ein für die SDR diskutierter Reaktionsmechanismus nach McKinley-McKee angenommen (Abb. 1.7). Das Katalysemodell basiert auf einem strikt konservierten Tyr162-Rest und einem weitgehend konservierten Lys166-Rest (Nummerierung bezieht sich auf die BDH).

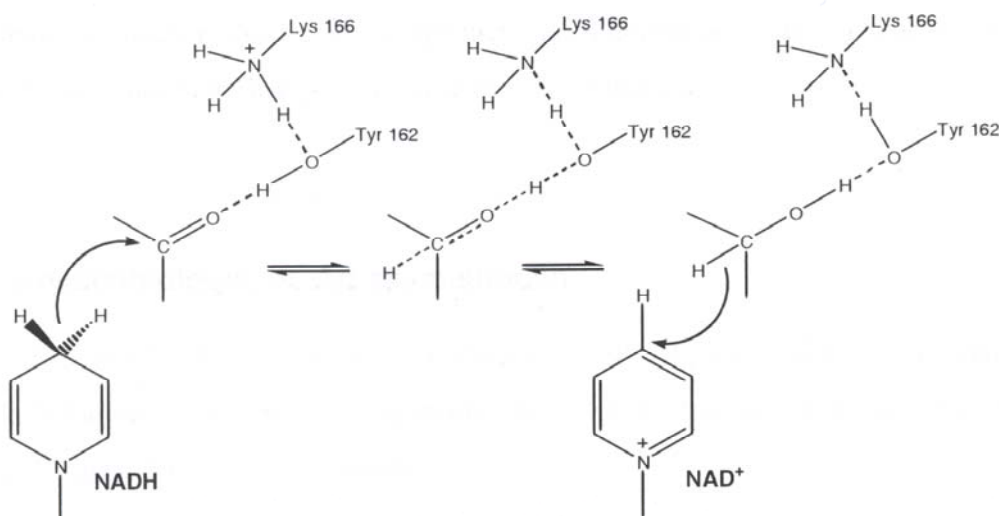


Abb. 1.7 Reaktionsmechanismus der Kurzketten-Dehydrogenasen/ Reduktasen (nach McKinley-McKee *et al.*, 1991).

1.2 Fluoreszenz

1.2.1 Energie-Transfer

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ist eine distanzabhängige Wechselwirkung zwischen den elektronischen Zuständen zweier Fluorophore, wobei die Energie des angeregten Zustands eines Donors auf einen Akzeptor übertragen wird. Dieser Prozess verläuft ohne Beteiligung von Photonen und ist das Resultat von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Donor und Akzeptor (Förster, 1948). Die Rate des Energietransfers hängt entscheidend von dem Ausmaß der spektralen Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors ab (Abb. 1.8).

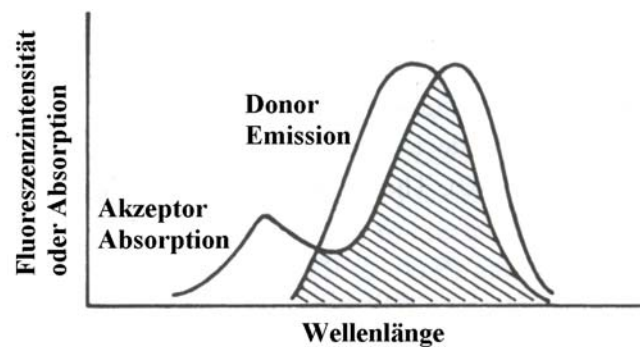


Abb. 1.8 Schematische Darstellung der spektralen Überlappung (gestrichelt) zwischen Donoremission und Akzeptorabsorption für Resonanz-Energie-Transfer (Quelle: Lakowicz, 1999).

Für die Effizienz einer Energieübertragung sind Quantenausbeute, die relative Orientierung der Übergangsdipole von Donor und Akzeptor sowie der Abstand zwischen Donor und Akzeptor von Bedeutung. Sie ergibt sich aus

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{23} [k^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)]$$

mit k^2 Dipol Orientierungsfaktor von Donor und Akzeptor, n Brechungsindex, $J(\lambda)$ Überlappungsintegral, Q_D Fluoreszenz Quantenausbeute des Donors, R_0 Förster-Radius

Der Abstand bei dem 50% Energietransfer-Effizienz vorliegt (50% der angeregten Donormolekülen werden durch RET deaktiviert), wird als Förster-Radius R_0 definiert. Die Größe von R_0 hängt von spektralen Eigenschaften des Donor-/ Akzeptorpaars ab.

Eine herausragende Anwendung von Resonanz-Energie-Transfer ist die Bestimmung der Entfernung von gelabelten Positionen in Proteinen, die bis zu 90Å betragen können. Dazu werden Proteine kovalent mit einem Donor und einem Akzeptor gelabelt. Neben einer Vielzahl extrinsischer Fluorophore werden auch intrinsische Fluorophore genutzt.

1.2.2 Fluorophore

Intrinsische Fluorophore

Die intrinsische Proteinfluoreszenz stammt von den aromatischen Aminosäuren Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Phenylalanin (Phe) (Abb. 1.9).

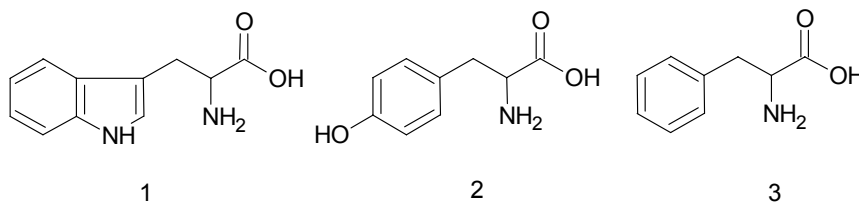


Abb. 1.9 Fluoreszierende Aminosäuren: 1 Tryptophan, 2 Tyrosin, 3 Phenylalanin.

Die Indolgruppe des Tryptophan-Restes ist die dominante Quelle der UV-Absorption und Emission von Proteinen. Die Emission der Tyrosine ist in nativen Proteinen oft gelöscht, was auf eine Wechselwirkung mit benachbarten Amino- und Carbonylgruppen oder auch Energietransfer zum Tryptophan zurückgeführt werden kann (Weber *et al.*, 1964). Denaturierung von Proteinen resultiert in einer Erhöhung der Tyrosin-Emission. Eine auf Phenylalanin zurückführende Emission wird praktisch nur beobachtet, wenn das zu untersuchende Protein keine Tryptophane und Tyrosine enthält.

Tryptophane werden als Reportergruppen für Konformationsänderungen in Proteinen benutzt. Die Insertion von Proteinen in Membranen lässt sich durch eine Blauverschiebung des Emissionsmaximums und eine Erhöhung der Quantenausbeute beobachten (Surewicz&Epad, 1984; Killian *et al.*, 1990).

Des weiteren zählen zu den natürlichen Fluorophoren das Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), die Flavin-Coenzyme Flavinadenindinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) sowie Riboflavin.

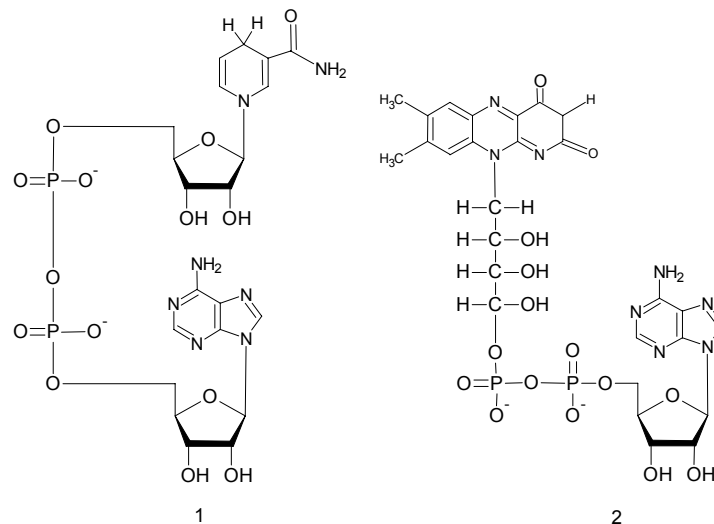


Abb. 1.10 Intrinsische biochemische Fluorophore: 1 NADH, 2 FAD.

NADH ist stark fluoreszierend. Es zeigt ein Absorptionsmaximum bei 340nm und ein Emissionsmaximum bei 460nm. Die oxidierte Form fluoresziert nicht. In Lösung liegt das Coenzym in der stacked-Form vor, wobei der Nicotinamidring mit dem Adeninring wechselwirkt. Bei Bindung des Coenzym an ein Protein entfaltet sich das NADH in die elongated-Form, wobei der Kontakt zwischen Nicotinamid und Adenin verhindert wird.

Flavin-Verbindungen absorbieren Licht bei 450nm und emittieren bei 525nm. Im Gegensatz zu NADH ist die oxidierte und nicht die reduzierte Form der Flavine fluoreszierend. Wie im Fall von NADH wird auch die Flavin-Fluoreszenz durch Adenin gelöscht. Im Gegensatz zum NADH ist die Fluoreszenz des am Protein gebundenen Flavinadenindinukleotids gering.

Extrinsische Fluorophore

Wenn für eine bestimmte Aufgabe keine intrinsischen Fluorophore geeignet sind, bietet sich die Möglichkeit extrinsische Fluorophore, die über die erforderlichen spektralen Eigenschaften verfügen, in das zu untersuchende System einzubauen. Die fluoreszierenden Moleküle können kovalent an Proteine binden oder an diese assoziieren. Von den zahllosen Fluorophoren seien hier das von Weber 1951 beschriebene Dansylchlorid (DNS-Cl) oder das heute gebräuchliche Fluorescein erwähnt, die der Gruppe der kovalent bindenden Fluorophoren angehören. Zur anderen Gruppe gehört beispielsweise das von Weber beschriebene 1-Anilino-8-naphthalinsulfonat (ANS) (Weber *et al.*, 1961).

Um Wechselwirkungen von Proteinen mit Membranen zu detektieren stehen eine große Reihe fluoreszierender Lipidanaloga zur Auswahl. Membrane können mit z.B. mit 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) oder auch Phospholipidanaloga wie Pyrenyl-PC gelabelt werden.

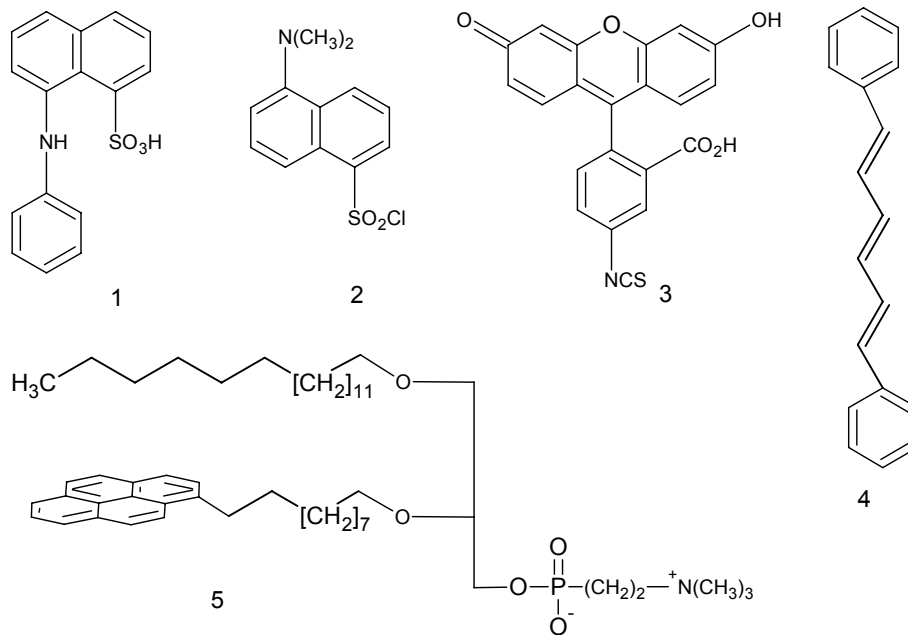


Abb. 1.11 Strukturen einiger extrinsischer Fluorophoren. 1 1-Anilino-8-naphthalinsulfat, 2 Dansylchlorid, 3 Fluoresceinisothiocyanat, 4 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien, 5 Pyrenyl-PC.

Anisotropiemessungen sind weit verbreitet in biochemischen Anwendungen der Fluoreszenz. Sie liefern Aussagen über Größe, Form und Beweglichkeit von Proteinen oder geben Auskunft über die Starre unterschiedlicher molekularer Umgebungen. Des Weiteren wurden sie genutzt, um Protein-Protein Assoziierungen und Fluidität von Membranen zu messen.

Die Anisotropiemessungen beruhen auf dem Prinzip der photoselektiven Anregung von Fluorophoren durch polarisiertes Licht. Fluorophoren absorbieren bevorzugt Photonen, deren elektrischer Feldvektor parallel zum Übergangsmoment des Fluorophors ausgerichtet ist. In einer isotropen Lösung sind die Fluorophoren zufällig orientiert. Nach Anregung mit polarisiertem Licht werden diejenigen Fluorophoren-Moleküle selektiv angeregt, deren Übergangsdipol der Absorption parallel zu dem elektrischen Vektor der Anregung ist. Diese selektive Anregung resultiert in eine partiell orientierte Fluorophorenpopulation (Photoselektion) und in eine partiell polarisierte Fluoreszenzemission. Letztendlich basiert das Phänomen auf der Existenz von Übergangsmomenten für Absorption und Emission, welche entlang spezifischer Richtungen innerhalb der Fluorophorenstruktur liegen. Die Anisotropie r wird definiert durch

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}},$$

wobei I_{\parallel} und I_{\perp} die Fluoreszenzintensitäten des vertikalen (\parallel) und horizontalen (\perp) polarisierten Lichtes repräsentieren, wenn die Probe mit vertikal polarisiertem Licht angeregt wird.

Ein Phänomen das die Anisotropie vermindern kann, ist die Rotationsdiffusion. Sie tritt während der Lebenszeit des angeregten Zustandes auf und ist von der Viskosität der Lösung, Temperatur, Größe und Form des rotierenden Moleküls abhängig. Aber auch Energietransfer zwischen Fluorophoren resultiert in einer Minderung der Anisotropiewerte.

1.3 ESR-Spektroskopie

Die Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR-Spektroskopie) hat eine breite Anwendung in biochemischen und biomedizinischen Fragestellungen gefunden. Sie stellt ein hoch spezifisches Werkzeug zur Detektion freier Radikalspezies mit ihren paramagnetischen Eigenschaften dar. Dabei wird bei dieser Form der Spektroskopie die Absorption von Mikrowellenstrahlung durch paramagnetische Substanzen in einem Magnetfeld gemessen. Von besonderem Interesse sind

- Radikalintermediate in metabolischen Reaktionen
- natürlich vorkommende paramagnetische Spezies (Übergangsmetalle)
- Spin-Labeling

Da das natürliche Vorkommen paramagnetischer Eigenschaften in biologischen Systemen gering ist, ist das künstliche Einführen von Spin-Labeln von herausragender Bedeutung.

1.3.1 Zeeman-Aufspaltung

Aufgrund des magnetischen Moments eines Elektrons, bzw. eines paramagnetischen Systems, ist es möglich, über ein äußeres Magnetfeld die Zeeman-Aufspaltung der entarteten Energieniveaus zu erreichen. Befindet sich ein Molekül mit ungepaartem Elektron in einem Magnetfeld, so ergeben sich für den Elektronenspin zwei Möglichkeiten der Einstellung, nämlich parallel oder anti-parallel zur Richtung des Magnetfeldes. Das ungepaarte Elektron kann nur zwei diskrete Energiezustände besetzen. Der Abstand der beiden Energieniveaus im Magnetfeld B_0 beträgt

$$\Delta E = g_e \beta_e B_0$$

mit $g_e = g$ -Faktor (2.002319 für ein freies Elektron), β_e Bohr'sches Magneton.

Daraus folgt die Resonanzbedingung

$$h\nu = g_e \beta_e B_0$$

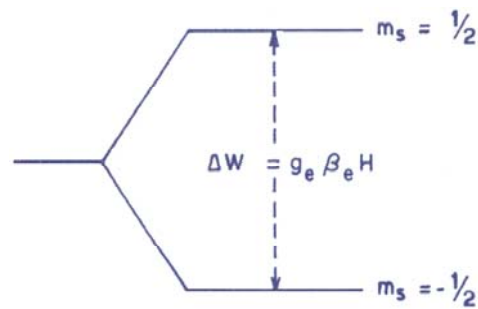


Abb. 1.12 Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus im homogenen Magnetfeld B_0 (Berliner, 1976)

1.3.2 Hyperfein-Aufspaltung

Zusätzlich zur Zeeman-Aufspaltung können die Energieniveaus weiter aufgespalten werden. Hierbei handelt es sich um die Hyperfeinstruktur. Sie entsteht durch die Wechselwirkung des magnetischen Spinnmoments des Elektrons mit den magnetischen Momenten der Atomkerne. Der Kernspin kann $2I+1$ -Einstellungen zum externen Magnetfeld einnehmen. Im Falle der Nitroxid-Radikale erhält man ein Spektrum aus drei Linien, da ^{14}N einen Kernspin von $I=1$ hat.

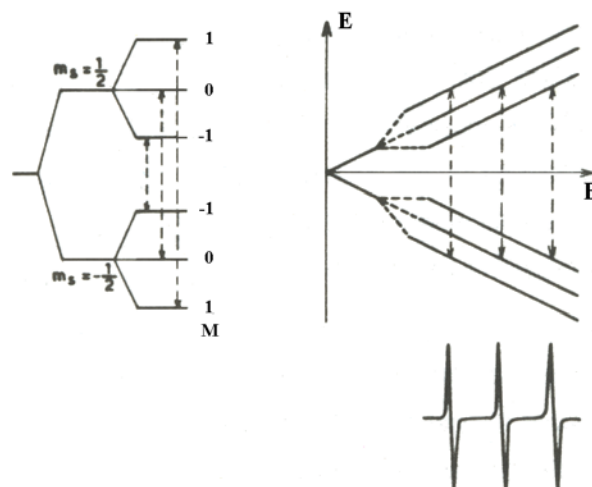


Abb. 1.13 links: Hyperfein-Aufspaltung durch Wechselwirkung eines ungepaarten Elektrons ($S=1/2$) mit den magnetischen Momenten eines Kernspins ($I=1$) (Berliner, 1976); rechts: Abhängigkeit der Energieniveaus von der Feldstärke und das simulierte ESR-Spektrum.

Der Abstand der Absorptionslinien ist gleich der Energiedifferenz der Zeeman-Aufspaltung und wird als (Hyperfein-)Kopplungskonstante A bezeichnet. Sie ist charakteristisch für die Kern-Elektron-Wechselwirkung. Der g -Faktor bildet einen Proportionalitätsfaktor zwischen Frequenz und der Feldstärke und bestimmt die Lage des Spektrums im Feld.

1.3.3 Relaxationsmechanismen

Wenn eine Probe mit Mikrowellen bestrahlt wird, absorbiert sie Energie von diesem Feld und wird in ein höheres Energieniveau angeregt. Gleichzeitig tritt eine stimulierte Emission auf. Die Intensität der beiden Prozesse ist proportional zu der jeweiligen Population der beiden Energieniveaus. Das Populationsverhältnis wird durch die Boltzmann-Verteilung beschrieben

$$\frac{n_+}{n_-} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right)$$

mit der Boltzmann-Konstanten k und der Temperatur T . Bei Raumtemperatur ist die Besetzungszahl für den energieärmeren Zustand wenig größer als diejenige für den energiereicheren Zustand, da ΔE nur wenig größer ist als kT . Durch Absorption wird das Besetzungsverhältnis angeglichen. Dem Absorptions- und Emissions-Prozess wirken Relaxationsmechanismen entgegen, welche das System wieder in den Gleichgewichtszustand zurückbringen, nachdem es durch Absorption von Strahlung gestört wurde.

Elektronen können durch Abgabe von Energie in Form von thermischer Energie an die Umgebung strahlungslos vom energetisch höheren Zustand in den tieferen übergehen. Dieser Vorgang wird als Spin-Gitter- oder longitudinale Relaxation bezeichnet. Die Zeit, die das System benötigt, um auf $\frac{1}{e}$ der ursprünglichen Verteilung zurückzukehren, wird als Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 bezeichnet.

Ein weiterer Relaxationsmechanismus ist die Spin-Spin- oder transversale-Relaxation. Bei diesem Prozess tauschen benachbarte Moleküle ihren Spinzustand aus. Im Gegensatz zur Spin-Gitter-Relaxation wird hierbei das Boltzmann Besetzungsverhältnis nicht geändert, aber die Lebensdauer eines Spinzustands. Die Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 ist die mittlere Lebensdauer von angeregten Spinzuständen, welche ausschließlich durch Spin-Austausch in den Grundzustand zurückkehren. Dieser Prozess verkürzt die Lebensdauer der Zustände und führt zur Verbreiterung von Spektrallinien aufgrund des Heisenberg'schen Prinzips.

1.3.4 Anisotropie

Nitroxid-Radikale verfügen über ein ungepaartes Elektron, das sich in einem $2p\pi$ -Orbital des Stickstoffatoms befindet. Dieses Elektron geht eine anisotrope Kopplung mit einem äußeren Magnetfeld und dem Magnetfeld, das durch das magnetische Moment des Stickstoffkerns verursacht wird, ein. Je nachdem in welcher Richtung der x-, y- und z-Achse das äußere

Magnetfeld einwirkt, verändern sich die ESR-Spektren. Dieses anisotrope Verhalten ist am Beispiel des Di-tert-Butylnitroxid in einem Einkristall in Abbildung 1.14 dargestellt.

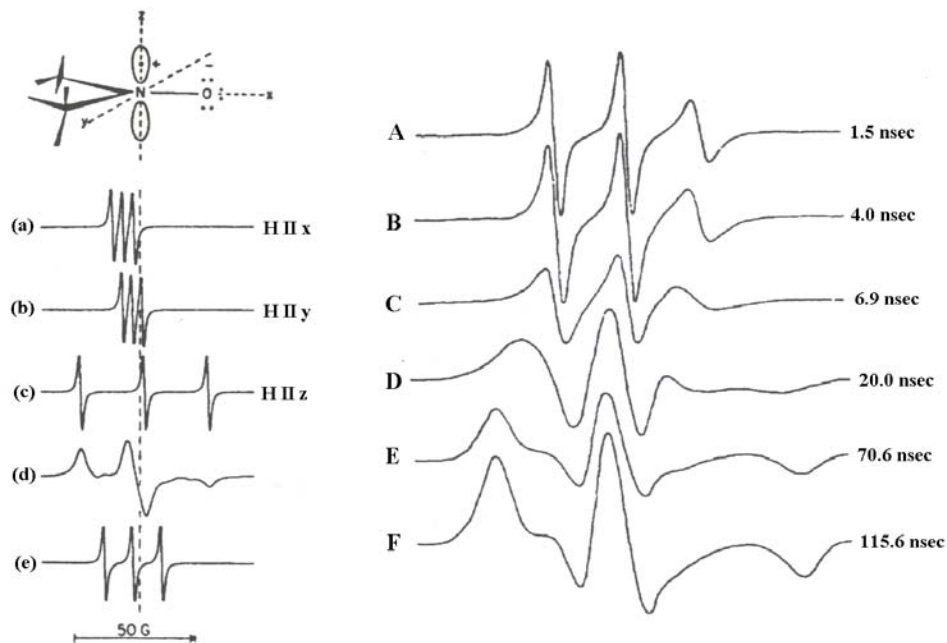


Abb. 1.14 links: ESR-Spektren des Di-tert-Butylnitroxids in einem Wirtskristall: (a-c) Magnetfeld in Richtung der x-, y- und z-Achse des Kristalls, (d) Pulverspektrum, (e) isotropes Spektrum; rechts (A-F): ESR-Spektren des N-Oxyl-2,2',6,6'-Tetramethyl-4-Piperidinols in Lösung steigender Viskosität.

Das Pulverspektrum (Abb. 1.14 d, links) setzt sich aus der Superposition von Spektren aller Orientierungen zusammen, da in diesen Proben die Moleküle zufällige Orientierungen einnehmen. Befinden sich die Radikale in einer niedrig viskosen Lösung, erhält man ein isotropes Spektrum. In solchen Lösungen rotieren die Proben mit Rotationskorrelationszeiten von etwa 10^{-11} s. Aus diesem Grund wird die Anisotropie ausgemittelt. Das Lösungsspektrum (e) setzt sich aus drei scharfen Linien zusammen.

Werden ESR-Messungen in viskosen Lösungen durchgeführt, so verringert sich die Rotationsgeschwindigkeit bzw. die Beweglichkeit der Nitroxidmoleküle und die Spektren nehmen eine zunehmend asymmetrische Form an. Während ein isotropes Spektrum aus drei scharfen Linien besteht, nimmt mit zunehmender Rotationskorrelationszeit τ_R die Höhe des Hochfeldsignals ab und die Breite der Banden zu (Abb. 1.14 A-F, rechts).

τ_R ist die Zeit, in der derjenige Anteil $\frac{1}{e}$ der Moleküle, die um einen bestimmten Winkel aus ihrer Gleichgewichtslage gedreht wurden wieder ihre Ausgangslage erreichen. Die Linienform wird durch Rotationskorrelationszeiten, die länger als 10^{-7} s sind, praktisch nicht mehr geändert.

1.3.5 Polaritätseffekte

Nitroxid-Radikale sind sensitiv bzgl. der Natur des Mediums in dem sie gelöst sind. Diese Beobachtung lässt sich dadurch begründen, dass die magnetischen Parameter einer jeden Radikalspezies sehr sensitive Funktionen der elektronischen Verteilung im Molekül sind und sie werden somit durch Veränderungen in ihrer Umgebung beeinflusst. Bei Nitroxid-Radikalen hängt die Hyperfeinkopplungskonstante von der Elektronendichte am Stickstoff ab. In polarer Umgebung ist die geladene Grenzstruktur begünstigt, in unpolarer Umgebung die ungeladene.



Beim Übergang von unpolaren zu polaren Solventien ändert sich die Hyperfeinkopplungskonstante sowie der g-Faktor. Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass in polarer Umgebung die Spindichte am Stickstoff größer ist als in unpolarer Umgebung.

1.3.6 Site-directed spin labeling

Site-directed spin labeling (SDSL) ist eine Technik, die sich hervorragend dazu eignet, um Struktur-Funktionsbeziehungen in Proteinen zu untersuchen. Sie ist besonders nützlich zum Studium von Membranproteinen, die nicht mittels NMR Studien untersucht werden können und auch nicht kristallisieren (Feix *et al.*, 1998). Bei der Modifizierung eines Enzyms finden vor allem SH-gruppenspezifische Reagenzien Anwendung, da die Aminosäure Cystein eher selten vorkommt.

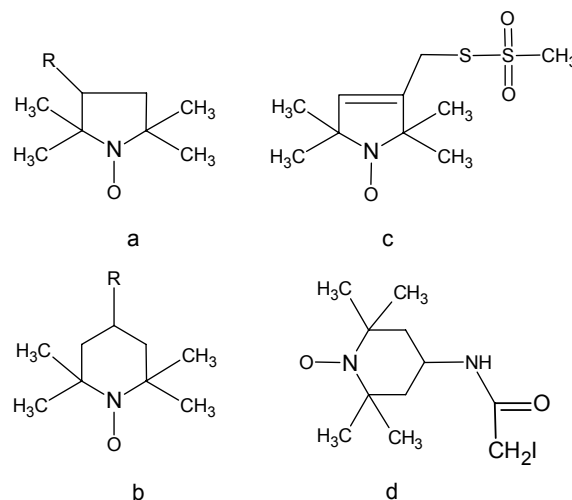


Abb. 1.15 allg. Darstellung von Nitroxidradikalen basierend auf (a) Pyrrolidin- und (b) Piperidingerüst; (c) MTS: Methanthiosulfonat, (d) IAAT: IodacetamidTEMPO

Die meisten der bisher verwendeten Spin-Label sind Nitroxid-Radikale, die auf einem Piperidin- oder Pyrrolidingerüst basieren (Abb. 1.15). Andererseits können durch molekularbiologische Methoden letztendlich an jeder beliebigen Position in einem Enzym Cysteine eingebaut werden. Die Möglichkeit „labeling-sites“ bei einer Serie von ausgewählten Resten eines Proteins spezifisch einzuführen, erhöht die Fähigkeit dieser Technik, detaillierte Informationen über Struktur und Dynamik zu liefern (Feix *et al.*, 1998). Aus den ESR-Spektren spinmarkierter Mutanten lassen sich eine Reihe wertvoller Informationen über Mobilität der Nitroxidseitenkette und die Zugänglichkeit des Labels erhalten. Studien zur Mobilität, Zugänglichkeit und auch Polarität stellen somit ein einzigartiges Hilfsmittel zur Herleitung sequenzspezifischer Sekundärstruktur in einem Protein dar. Darüber hinaus erlaubt der gleichzeitige Austausch zweier nativer Aminosäuren gegen Cysteine Abstandsbestimmungen zwischen den spinmarkierten Positionen. Somit lässt sich die Topographie eines Proteins charakterisieren und die Orientierungen individueller Segmente eines Proteins bestimmen. So konnten Mchaourab *et al.* mittels 30 einfach Cystein-Mutanten des T4 Lysozyms Aussagen zur Beziehung zwischen der Mobilität der Nitroxidseitenkette und Proteinstruktur machen. Altenbach *et al.* beschrieben 1990 eine Anwendung der Spinlabel-Technik am Beispiel des Bacteriorhodopsins. Sie konnten die Verbindung zwischen den beiden α -Helices D und E als eine Schleife bzw. Loop identifizieren, die zur wässrigen Phase hin ausgerichtet ist. Des Weiteren wurde die Lage der Transmembranhelix E hinsichtlich des Proteins charakterisiert.

Eine weitere herausragende Möglichkeit der ESR-Spektroskopie ist die Nutzung von spinmarkierten Coenzymen. Die Anwendung dieser einzigartigen Label erlaubt ebenfalls eine Abstandsbestimmung vom aktiven Zentrum zu irgendeiner anderen gelabelten Position im Protein. Die Synthese von spinmarkierten AMP, ATP und NAD^+ -Derivaten ist hauptsächlich in unserem Arbeitskreis durchgeführt worden und lässt sich auf die Arbeiten von Wenzel (Wenzel *et al.*, 1976; Wenzel&Trommer, 1977) zurückführen. Das C8- und N^6 -SL- NAD^+ ist in zahlreichen Studien an Dehydrogenasen als enzymatisch aktives Coenzym eingesetzt worden (Fritzsche *et al.*, 1984; Dubois *et al.*, 1986; Rudy *et al.*, 1989; Hartmann *et al.*, 1991).

2 Problemstellung

Die R-(3)-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (BDH) ist eines der am besten untersuchten Beispiele eines lipidabhängigen Enzyms. Dennoch ist der molekulare Mechanismus der Lipidabhängigkeit weitgehend unbekannt. Ein Schritt zum Verständnis dieses Problems war die Konstruktion zweier BDH-Strukturmodelle. Die BDH zeigt 25% Homologie zur $3\alpha,20\beta$ - und etwa 30% Homologie zur 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Das erste Modell beruht auf der Kristallstruktur der $3\alpha,20\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (Moeller, 1996), das zweite auf einer Kombination der beiden Kurzketten-Alkohol-Dehydrogenasen. Ein Vergleich der beiden Strukturmodelle zeigt, dass sie sich erheblich im C-terminalen Bereich, der im Zusammenhang mit der Lipidabhängigkeit des Enzyms diskutiert wird, unterscheiden.

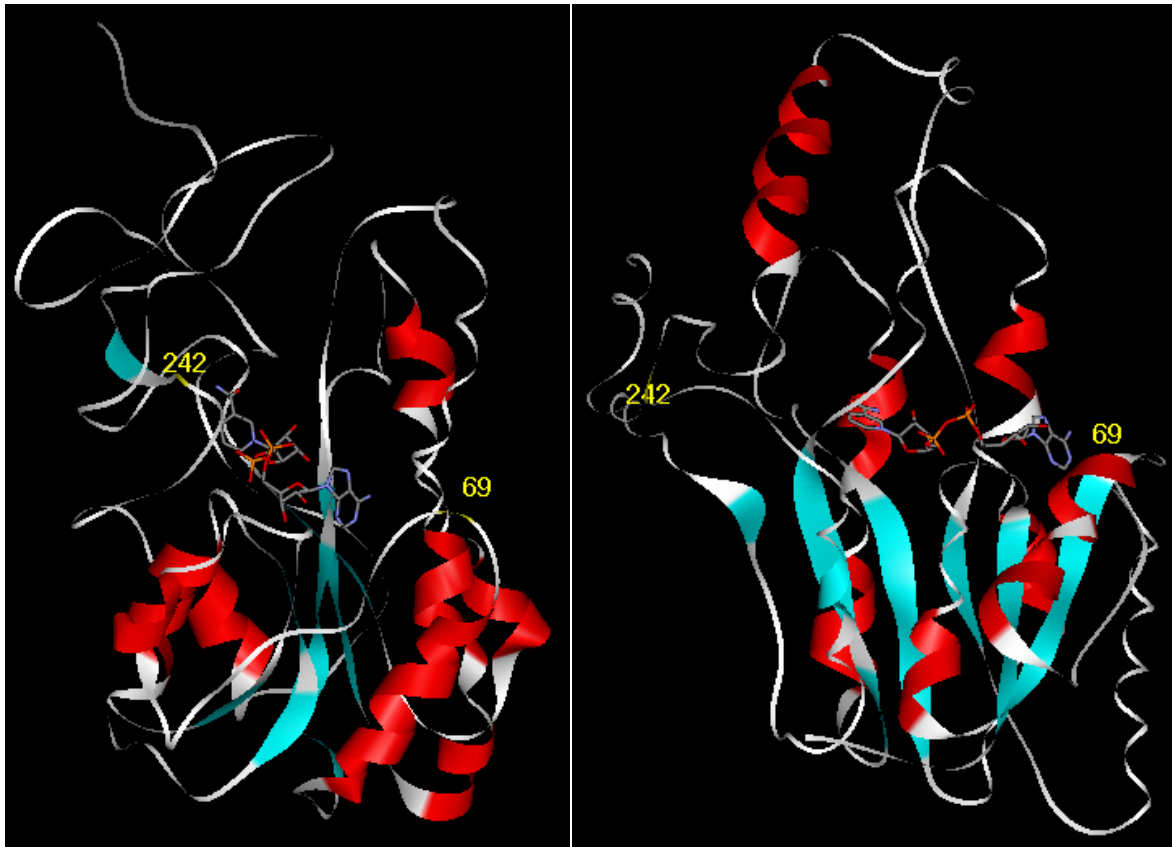


Abb. 2.1 Strukturmodelle der BDH auf der Basis der $3\alpha,20\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (links) und in Kombination mit der 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (rechts). In beiden Modellen ist das Coenzym eingelagert und die freien Cysteine 69 und 242 hervorgehoben.

Um herauszufinden, welches Strukturmodell die BDH besser beschreibt, sollten zunächst geeignete Cystein-Mutanten kloniert werden. Um eine Abstandsbestimmung zwischen zwei Cysteinen einer Mutante durchführen zu können, müssen die Cysteine gezielt mit Spin- bzw.

Fluoreszenzlabel markiert werden. Auf Grundlage der aus den jeweiligen Mutanten ermittelten Abständen sollte dann eine erste Differenzierung zwischen den beiden Strukturmodellen möglich sein.

Zahlreiche NADH-Bindungsstudien am Rinderherzenzym (BH-BDH) zeigten, dass die NADH-Emission infolge der Bindung des Coenzym an das rekonstituierte Enzym eine Fluoreszenzerhöhung erfährt. Studien an dem humanen Enzym (HH-BDH) zeigten dagegen keine detektierbare Erhöhung der NADH-Fluoreszenzintensität. Es wurde vermutet, dass der für die Isolierung notwendige Hexahistidin-Tag für dieses veränderte Verhalten im Vergleich zu dem Enzym aus Rinderherz verantwortlich ist. Um das Rinderherzenzym mit dem humanen Wildtyp vergleichen zu können, musste der Histag abgespalten und aus der Lösung entfernt werden. Anschließend sollten dann die NADH-Titrationsstudien durchgeführt werden.

Die hohe Homologie der BDH zu zwei Vertretern der Kurzketten-Alkohol-Dehydrogenasen beschränkt sich völlig auf die N-terminale Domäne. Der C-Terminus gilt als einzigartig und zeigt keine Homologie zu einer bekannten Sequenz. Die vermutete Lecithinbindungsstelle wird aber gerade in Zusammenhang mit dieser Domäne diskutiert. Studien von C-terminalen Deletionsmutanten untermauern diese Annahme (Green *et al.* 1996; Langston *et al.*, 1996). Die von uns vermutete Lecithinbindungsstelle umfasst die Sequenz DYYWWLR (273 bis 279). Um unsere Hypothese weiter zu überprüfen, sollte zunächst durch eine Mutation die Lipidbindung gestört oder sogar verhindert werden. Nachfolgend könnte in diese Sequenz ein Cystein eingebaut, spinmarkiert und ESR-spektroskopisch vermessen werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Design neuer BDH-Mutanten

In unserem Arbeitskreis wurden zwei Strukturmodelle der (R)-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase entwickelt. Das Modell von Moeller wurde auf der Basis der Kristallstruktur der 3α , 20β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase konstruiert (Moeller, 1996). Ein erst kürzlich überarbeitetes Modell beruht auf der Kombination der Kristallstrukturen der 3α , 20β - und der 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Um eine erste Differenzierung zwischen diesen beiden Modellen durchführen zu können, sollten geeignete Doppelmutanten konstruiert werden, die zwei freie Sulfhydrylgruppen (Cysteine) enthalten. Nach Einbau eines Spinlabels sollten somit Aussagen auf ESR-spektroskopischer Basis über Abstände zwischen den gelabelten Positionen möglich sein. Grundlage zum Auffinden geeigneter Doppelmutanten sollte die C69A/ Y202C/ C242A-Mutante sein, die nur ein freies Cystein enthält. Unter Berücksichtigung der Tatsachen, dass sich beide Modelle vor allem im C-terminalen Bereich unterscheiden und außerdem die Struktur möglichst wenig gestört werden sollte, erschienen die Positionen 69 und 242 als geeignet, da gerade dies die Positionen der freien Cysteine im Wildtyp sind. Demzufolge wurden neben der C69A/ Y202C/ C242A-Mutante die Doppelmutanten Y202C/ C242A und C69A/ Y202C kloniert.

Die jeweiligen Mutationen wurden mit dem QuikChange™ Site-directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene durchgeführt (Stratagene, 1997). Diese einfache und hoch effiziente Methode erlaubt die Durchführung einer gezielten Mutagenese in nahezu jedem Plasmid. In Abhängigkeit der zu klonierenden Mutante wurden die drei Plasmide pBDH-C69A/ C242A, pBDH-C69A und pBDH-C242A als Template eingesetzt.

3.1.1 Konstruktion der Plasmide pBDH-C69A/Y202C/C242A, pBDH-Y202C/C242A, pBDH-C69A/Y202C

Zur Konstruktion dieser Mutanten wurden die Primer Markus1a und Markus1b konstruiert (s. 5.1.3, 5.4.1). Die 28mer-Oligonukleotide kodieren neben einem neuen Cystein-Codon eine zusätzliche PstI-Schnittstelle, die zum späteren Screening der neuen Mutanten genutzt werden

sollte. Die Template pBDH-C69A/ C242A, pBDH-C69A und pBDH-C242A wurden nach der Qiagen-Methode isoliert und aufgereinigt (s., 5.3.3). 25 - 75ng der Template wurden jeweils in verschiedenen Polymerasen-Ketten-Reaktionen (PCR) amplifiziert (5.4.1, 5.4.2, 5.4.3). Nach Beendigung der PCR wurden die Ansätze bei 37°C mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut und nachfolgend in kompetente DH5 α -Zellen transformiert (s., 5.3.2).

3.1.2 Identifizierung der klonierten Plasmide

Zur Detektion der neu klonierten Mutanten wurden diese mit dem Restriktionsenzym PstI in dem Reaktionspuffer O⁺ verdaut (s., 5.4.1). Die Verdauungen wurden entsprechend den zu erwartenden Fragmentgrößen auf 0.9 bis 2% Agarosegele aufgetragen (s., 5.3.5) und sind in den nachfolgenden Abbildungen 3.1-3.3 dargestellt.

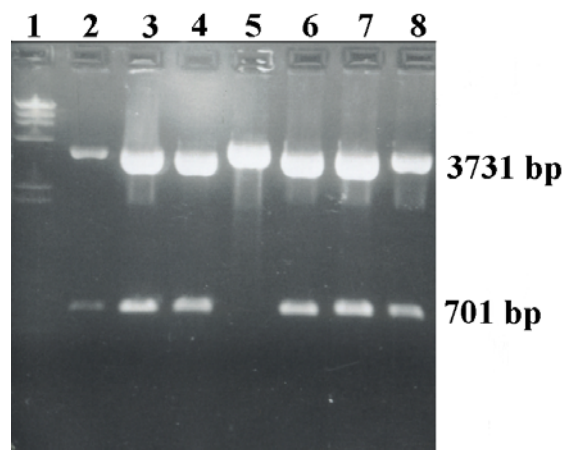


Abb. 3.1 0.9% TBE-Gel mit den PstI verdauten Plasmidproben pBDH-C69A/Y202C/C242A. Bahn 1: λ -DNA/HindIII-Marker, Bahn 2-4, 6-8: verdaute Proben, Bahn 5: verdautes Templat (pBDH-C69A/C242A).

Das Agarosegel (Abb. 3.1) belegt, dass die Klonierung der Mutante pBDH-C69A/Y202C/C242A gelungen war. Nach der Plasmidkarte (siehe Anhang) sind nach dem PstI-Verdau zwei Fragmente der Größen 3731bp und 701bp zu erwarten. Zusätzlich zum Marker auf Bahn 1 wurde auch das Templat mit PstI verdaut, um die zusätzliche Schnittstelle der neuen Mutante gegenüber dem Original zu dokumentieren.

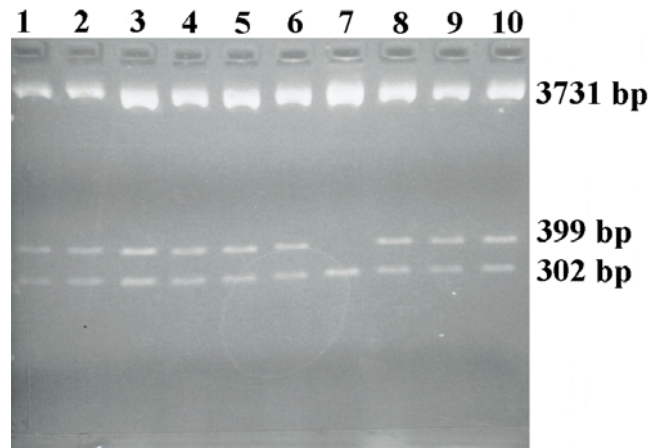


Abb. 3.2 2.0% TBE-Gel mit den PstI verdauten Plasmidproben pBDH-Y202C/C242A. Bahn 1-6, 8-10: verdaute Proben, Bahn 7: verdautes Templat (pBDH-C242A).

Das in Abbildung 3.2 dargestellte Agarosegel zeigt den PstI-Verdau der Mutante pBDH-Y202C/C242A. Aus der entsprechenden Plasmidkarte (Anhang) gehen drei PstI-Schnittstellen hervor, die nach dem Verdau zu drei Fragmenten der Größen 3731 bp, 399 bp und 302 bp führen. Zum Vergleich wurde der entsprechende Verdau des Templats pBDH-C242A auf Bahn 7 aufgetragen, wobei das größere der beiden Fragmente 4130 bp entspricht.

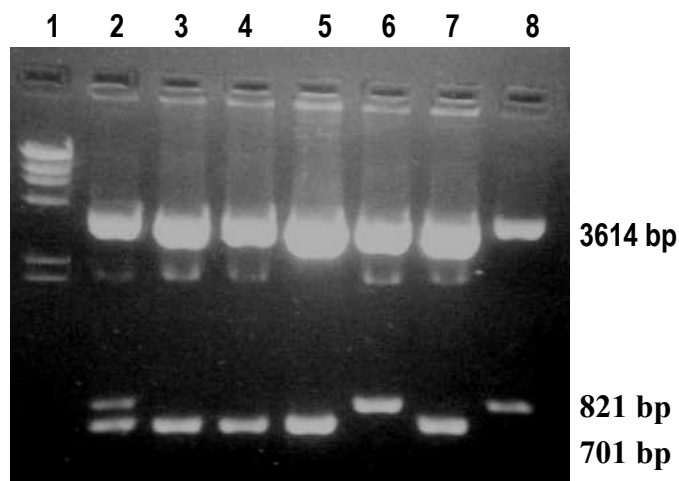


Abb. 3.3 0.9% TBE-Gel mit den PstI verdauten Plasmidproben pBDH-C69A/Y202C. Bahn 1: λ -DNA/ HindIII-Marker, Bahn 2-7: verdaute Proben, Bahn 6: verdautes Templat (pBDH-C69A).

Die Auftragung der verdauten pBDH-C69A/Y202C und Templat-Proben auf Agarosegele zeigte die erwarteten Plasmidfragmente (Abb. 3.3). Der Verdau der neuen Mutante sollte drei Fragmente der Größe 3614 bp, 701 bp und 120 bp liefern. Ein Vergleich der Bahnen 3-5 und 7 mit dem verdauten Templat auf Bahn 8 belegt den Erfolg der Klonierung. Keine weitere

Schnittstelle wurde bei der Probe auf Bahn 6 festgestellt. Somit handelt es sich hier um das Templat. Die Probe auf Bahn 2 war vermutlich nicht vollständig verdaut.

Wie schon erwähnt diente der PstI-Verdau zum Screening der Mutanten. Die Plasmidproben wurden zum Sequenzieren vorbereitet (siehe 5.4.1, 5.4.2 und 5.4.3) und anschließend von Firma MWG-Biotech sequenziert.

3.2 Expression, Isolierung und Aufreinigung von HisBDH

Expression, Isolierung und Aufreinigung aller HisBDH-Mutanten erfolgten nach einer Methode von Chelius *et al.*, die von McIntyre modifiziert wurde.

Zur Expression von HisBDH aus *E. coli* wurden 2 l YT-Medium, das Ampicillin enthielt, beimpft und die optische Dichte (OD) über mehrere Stunden verfolgt. Nachdem die Kulturen eine OD von ca. 0.8 erreichten, wurden die Expressionen mit IPTG induziert und solange weiter inkubiert, bis das Wachstum der Zellen aus der exponentiellen Phase in die stationäre Phase überging.

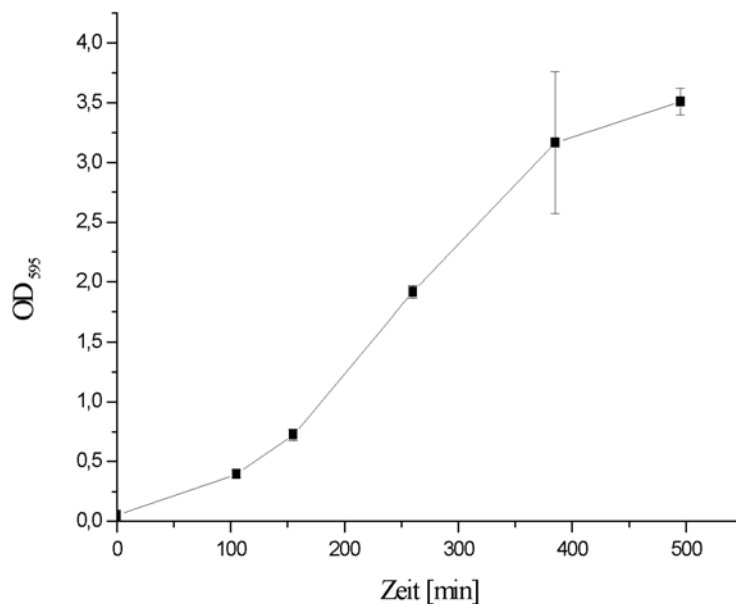


Abb. 3.4 Typische grafische Darstellung des Wachstums von HisBDH-Mutanten. Die Fehlerbalken geben die maximale Abweichung eines Messwertes vom Mittelwert an.

Zum Ernten der Zellen, wurden diese 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abdekantiert, die Pellets schockgefroren und bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Pellets in Phosphatpuffer resuspendiert und mit Hilfe einer French Press aufgeschlossen. Die

Zellen werden dabei unter hohem Druck durch ein Ventil gepresst und zerplatzen, wobei die innere Oberfläche der Membran nach außen gekehrt wird („Inside-Out Vesikel“). Nach Zugabe von DNase, RNase und des Proteaseinhibitors PMSF wurde die Suspension bei 4°C 20 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde gesammelt und auf lecithinabhängige Aktivität geprüft (siehe 5.6). Das Lysat wurde auf die equilibrierte HiTrapSäule (sog. Ni-Säule) aufgetragen. Durch sukzessives Anlegen von Imidazolgradienten konnten Verunreinigungen von der Säule eluiert werden. Erst mit einer 300 mM Imidazol-Lösung wurde die HisBDH eluiert und in 4 ml Fraktionen aliquotiert. Die aktivsten Proben wurden vereinigt und unter Argonstrom bei 4°C gegen 1 l Dialysepuffer (siehe 5.5) dialysiert. Die Proben wurden schockgefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die nachfolgenden SDS-Gele dokumentieren den typischen Verlauf der Aufreinigung von HisBDH-Mutanten. Die spezifischen Aktivitäten der neu klonierten Mutanten betragen 72-80 U/mg.

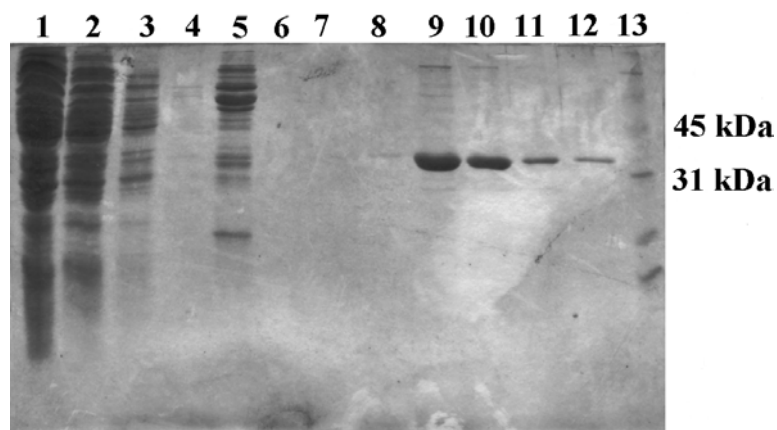


Abb. 3.5 12% SDS-Gel einer Aufarbeitung der pBDH-C69A/Y202C/C242A-Mutante. Bahn 1: Lysat, Bahn 2: Durchfluss Lysat, Bahn 3: 20 mM Imidazol, Bahn 4, 5: 100 mM Imidazol + 1% OG, Bahn 6: 100 mM Imidazol, Bahn 7-12: eluierte HisBDH, Bahn 13: Marker (97.4, 66.2, 45, 31, 21.5, 14.4 kDa).

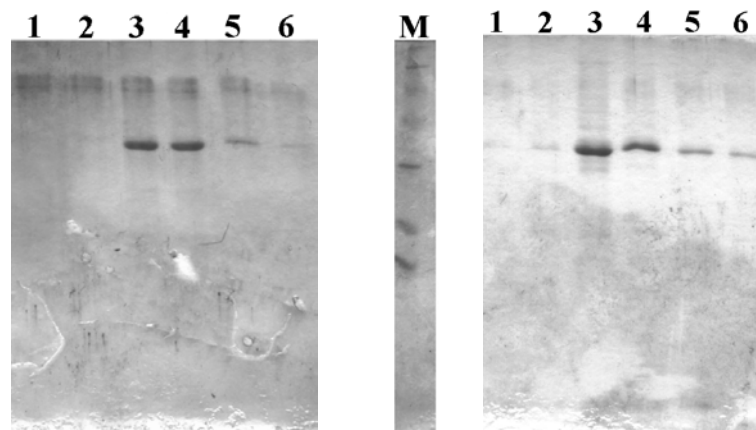


Abb. 3.6 12% SDS-Gele. links: Bahn 1-6: eluierte HisBDH pBDH-C69A/Y202C, Mitte: Bahn M: Marker (97.4, 66.2, 45, 31, 21.5, 14.4 kDa), rechts: Bahn 1-6: eluierte HisBDH pBDH-Y202C/C242A.

3.3 ESR-Spektroskopische Untersuchungen von BDH-Mutanten

Cystein-Reste können durch eine Vielzahl von Nitroxiden modifiziert werden. Der Methanthiosulfonat-Spinlabel (MTS-SL) ist jedoch der am meisten benutzte Spinlabel, da dieser hochspezifisch für Sulfhydrylgruppen ist und über ein kleines molekulares Volumen verfügt. Ein mit MTS-SL modifiziertes Cystein ist in seiner Größe vergleichbar mit Phenylalanin oder Tryptophan. Somit sollte eine möglichst geringe Störung der nativen Struktur eines Proteins durch den künstlich eingeführten Label gewährleistet werden.

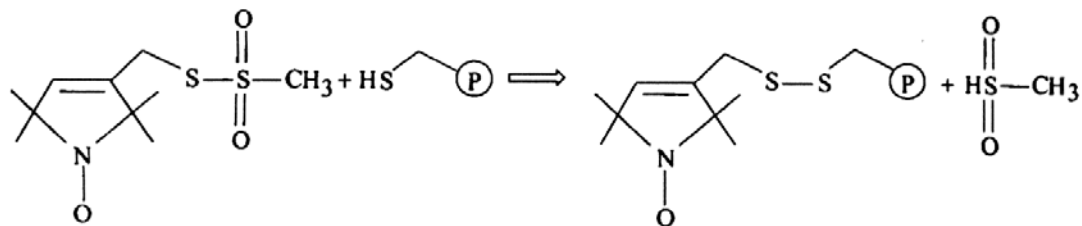


Abb. 3.7 Reaktion eines Methanthiosulfonat-Spinlabels mit einer Sulfhydrylgruppe.

3.3.1 Spinmarkierung von BDH-Mutanten

Zunächst wurde der Histag mit Enterokinase von der HisBDH abgespalten, da sonst das Fusionsprotein schon während des Aufkonzentrierens präzipitiert. In Abbildung 3.8 ist der zeitliche Verlauf eines Enterokinaseverdaus einer HisBDH-Mutante dargestellt. Nach ca. 4 h ist der Verdau praktisch vollständig abgeschlossen (siehe 5.11.2).

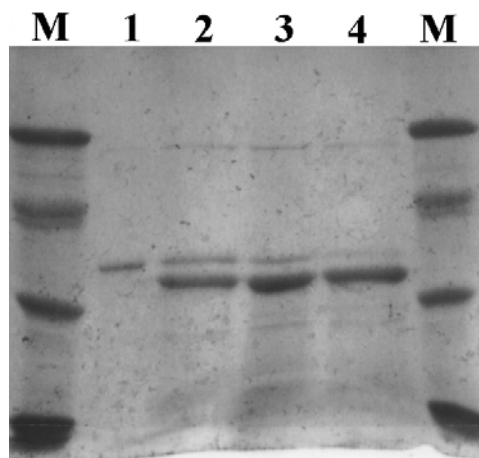


Abb. 3.8 Bahnen M: Marker (68, 45, 28, 12.5 kDa), Bahn 1: HisBDH, Bahn 2-4: Enterokinaseverdau der HisBDH nach 2, 3 und 4 Stunden.

Das verdaute Enzym wurde in PC rekonstituiert und mehrfach gegen Dialysepuffer dialysiert. Der DTT-freie BDH/ PC-Komplex wurde mit Überschuss an MTS-SL für mehrere Stunden inkubiert. Während des Labelns wurde die Aktivität verfolgt, wobei alle 1-2 h eine Probe aus dem Ansatz entnommen und auf Aktivität geprüft wurde. Der spinmarkierte BDH/ PC-Komplex wurde von nicht gebundenem Spinlabel befreit und in einer Prodigon unter Vakuum aufkonzentriert (5.11.2).

3.3.2 Abstandsbestimmungen

Der simultane Austausch zweier nativer Aminosäuren durch Cysteine und die nachfolgende Spinmarkierung mit Methanthiosulfonat-Spinlabel, erlaubt die Bestimmung von Abständen zwischen den gelabelten Positionen. Allgemein können aus einer Linienverbreiterung in ESR-Spektren, die auf dipolare Wechselwirkungen zurückzuführen sind, durch Anpassen simulierter ESR-Spektren an experimentelle Daten Abstandsinformationen gewonnen werden. Die Spektren wurden bei Temperaturen von unter 200 K gemessen. Selbst unter diesen Bedingungen ist es aufgrund einer möglichen Flexibilität der Spinlabelseitenkette oder aber auch aufgrund unterschiedlicher Konformation des Spinlabels wahrscheinlich, dass der Interspin-Abstand und die Orientierungen der Nitroxide um gemittelte Werte verteilt sind. Die Spektren wurden mit dem Programm DIPFIT, das unserem Arbeitskreis von Prof. H.-J. Steinhoff zur Verfügung gestellt wurde, simuliert. Es benutzt automatisierte Routinen, wobei eine Gauss-Verteilung von Interspin-Abständen und variable Anteile von einfach gelabeltem Protein angenommen werden. Der mittlere Abstand zwischen zwei Spinlabeln und die Verteilungsbreite werden aus der gefitteten Linienform des Spektrums berechnet (Steinhoff et al., 1997; Rabenstein&Shine, 1995).

Zunächst wurden die Parameter der Linienbreite der einfach spinmarkierten C69A-Mutante ermittelt, da diese keine Spin-Spin-Wechselwirkung zeigt. Mit diesen Parametern wurden anschließend die Spektren der Doppelmutanten (Y202C/C242A, C69A/Y202C, C69A/S246C) simuliert. Die Simulationsparameter und die Abstände sind in den Legenden der jeweiligen Spektren aufgeführt.

Die von der $3\alpha,20\beta$ - bzw. $3\alpha,20\beta$ - und 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen abgeleiteten Strukturmodelle der (R)-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen (BDH) sind in den Abbildungen 3.9 bzw. 3.10 dargestellt, wobei die spinmarkierten Reste hervorgehoben sind.



Abb. 3.9 Strukturmodell der HH-BDH basierend auf den Koordinaten der Kristallstruktur von 3α , 20β - Hydroxysteroid-Dehydrogenase. In dem Strukturmodell sind die Aminosäuren Cystein69, Tyrosin202, Cystein242 und Serin246 gelb hervorgehoben. Des weiteren wurde das Coenzym im Modell dargestellt.

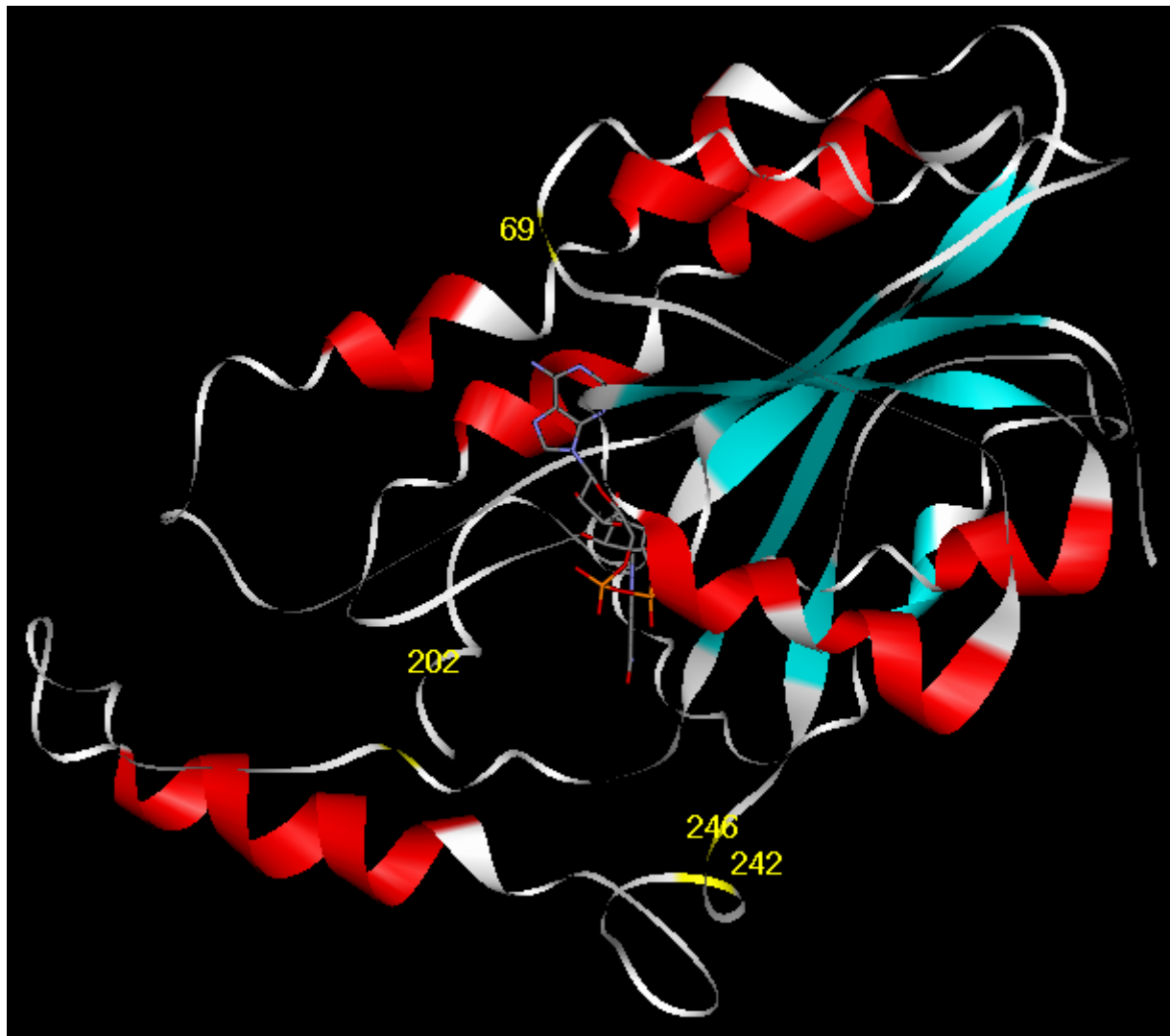


Abb. 3.10 Strukturmodell der HH-BDH basierend auf den Koordinaten von 3α , 20β - und 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Die Aminosäuren Cystein69, Tyrosin202, Cystein242 und Serin246 sind gelb hervorgehoben. Des weiteren wurde das Coenzym im Modell dargestellt.

In beiden Modellen sollen die Cysteine 69 zweier benachbarter Untereinheiten räumlich so nahe zusammen liegen, dass bei entsprechender Spinmarkierung Wechselwirkungen zwischen den Spinlabeln zu erwarten wären. Aus diesem Grund wurden für die Simulationen von Mutanten, die Cystein 69 enthalten (also C242A, Y202C/C242A), die gefitteten Parameter der Cystein 242 Mutante (C69A) benutzt, da eine Spinmarkierung dieser Position keinerlei Wechselwirkungen im Spektrum zeigen. In den nachfolgenden Abbildungen sind die aufgenommenen und simulierten ESR-Spektren der C242A-(Abb. 3.11) und Y202C/C242A-Mutante (Abb. 3.12) dargestellt.

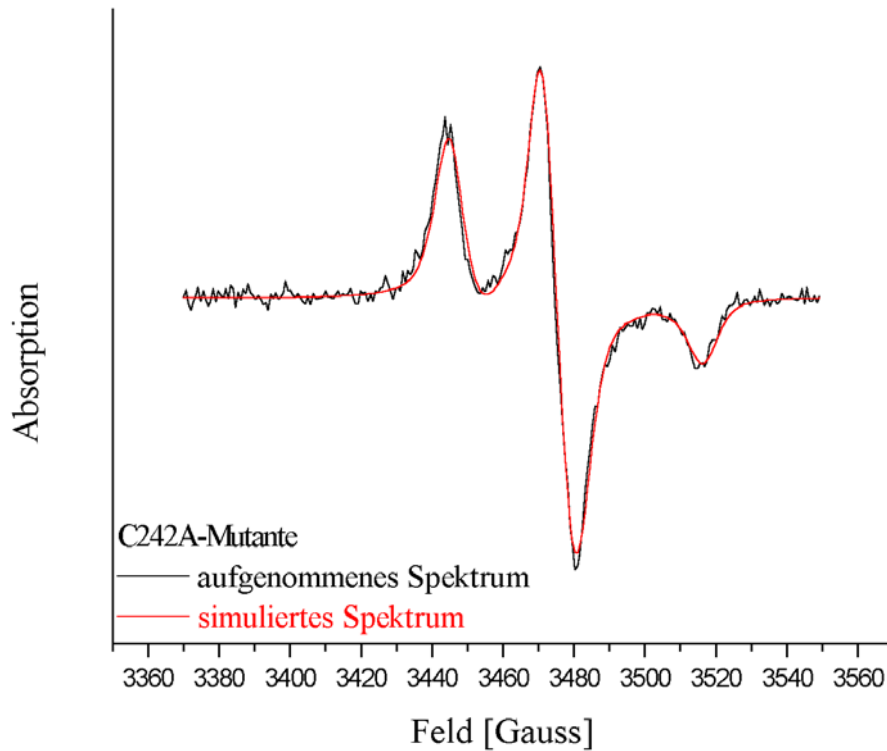


Abb. 3.11 Experimentell **aufgenommenes** und **simuliertes** Spektrum der C242A-Mutante (150 μ M). Die Aufnahmeleistung betrug 20 μ W. Die Simulationsparameter sind: g_{xx} 2.0095, g_{yy} 2.0065, g_{zz} 2.0029, A_{xx} 4.29G, A_{yy} 5.10G, A_{zz} 35.8G, Linienfkt. setzt sich aus Lorentz und Gauss der Breite 4.36G und 4.09G zusammen. Simulierter Abstand ergibt sich zu $22.2\text{\AA} \pm 2\text{\AA}$.

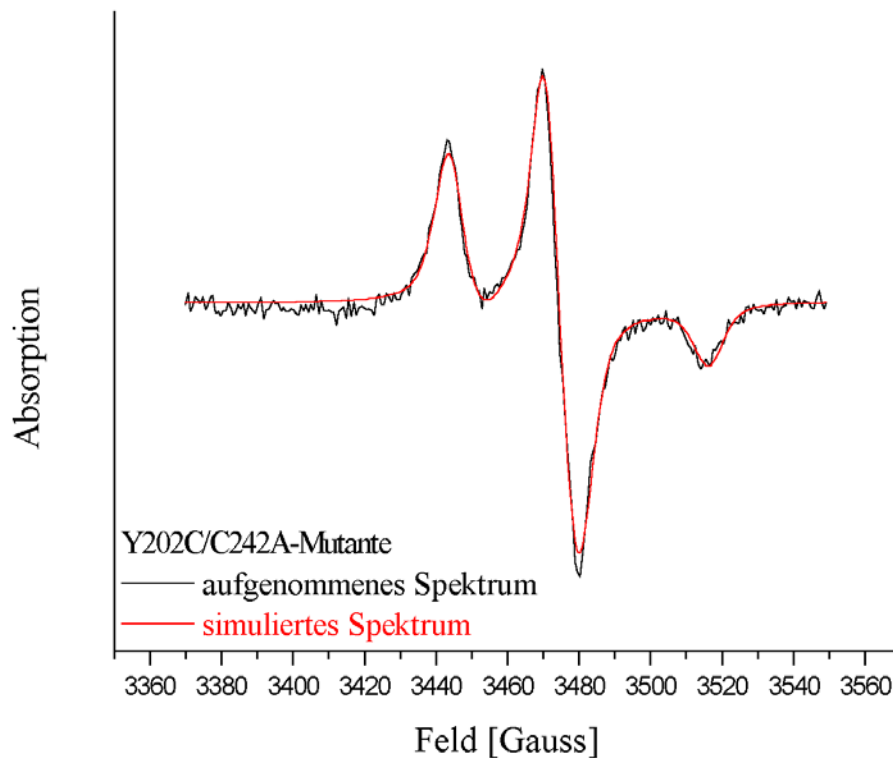


Abb. 3.12 Experimentell **aufgenommenes** und **simuliertes** Spektrum der Y202C/C242A-Mutante (150 μ M). Die Aufnahmeleistung betrug 20 μ W. Die Simulationsparameter sind: g_{xx} 2.0095, g_{yy} 2.0065, g_{zz} 2.0029, A_{xx} 4.29G, A_{yy} 5.10G, A_{zz} 36.1G, Linienfkt. aus Lorentz und Gauss der Breite 4.36G und 4.09G. Simulierter Abstand ergibt sich zu $22.8\text{\AA} \pm 2\text{\AA}$.

Die Simulation der C242A-Mutante ergibt einen mittleren Abstand von etwa $22 \pm 2 \text{ \AA}$. Hierbei handelt es sich um schwache Wechselwirkungen. Der an das Cystein 69 kovalent gebundene Spinlabel ist praktisch frei drehbar, da dieses Cystein sich an der Proteinoberfläche befindet. Somit unterliegt er nahezu keinen sterischen Zwängen, die ihn in seiner Rotationsbewegung einschränken würden. Aus den Modellen wurde nach Energieminimierung der spingelabelten Cysteine ein Abstand zwischen den Untereinheiten von etwa $20 \pm 5 \text{ \AA}$ ermittelt. Dies stimmt mit dem simulierten Abstand gut überein.

Der ermittelte Abstand aus dem simulierten Spektrum der Doppelmutante Y202C/C242A liegt bei $22.8 \pm 2 \text{ \AA}$. Dieser Wert stimmt gut mit dem Abstand der spingelabelten Cysteine 69 zweier benachbarter Untereinheiten überein. Daraus kann gefolgert werden, dass der Ursprung der Wechselwirkungen im Spektrum der Doppelmutanten einzig von den spinmarkierten Cysteinen 69 zweier benachbarter Untereinheiten stammt, da die C69A/Y202C/C242A-Mutante (also nur Cystein 202) keinerlei Wechselwirkung im Spektrum zeigt. Ihre Simulation ist in Abbildung 3.13 dargestellt.

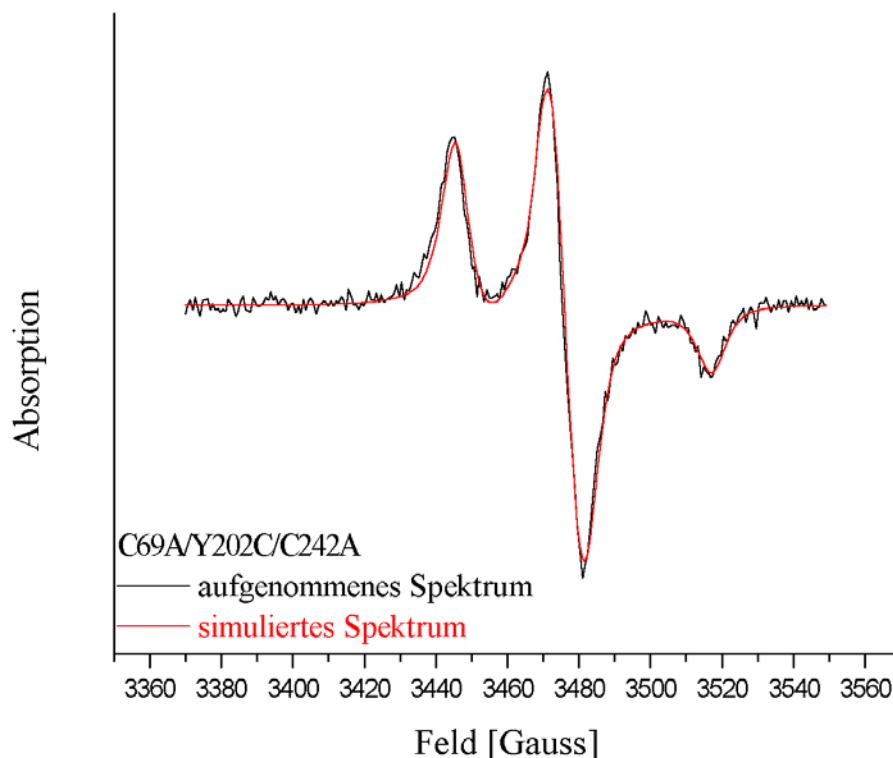


Abb. 3.13 Experimentell **aufgenommenes** und **simuliertes** Spektrum der C69A/Y202C/C242A-Mutante ($150 \mu\text{M}$). Die Aufnahmeleistung betrug $20 \mu\text{W}$. Die Simulationsparameter sind: g_{xx} 2.0097, g_{yy} 2.0065, g_{zz} 2.0029, A_{xx} 4.51G, A_{yy} 5.12G, A_{zz} 35.7G, Linienfkt. aus Lorentz und Gauss der Breite 4.60G und 5.12G.

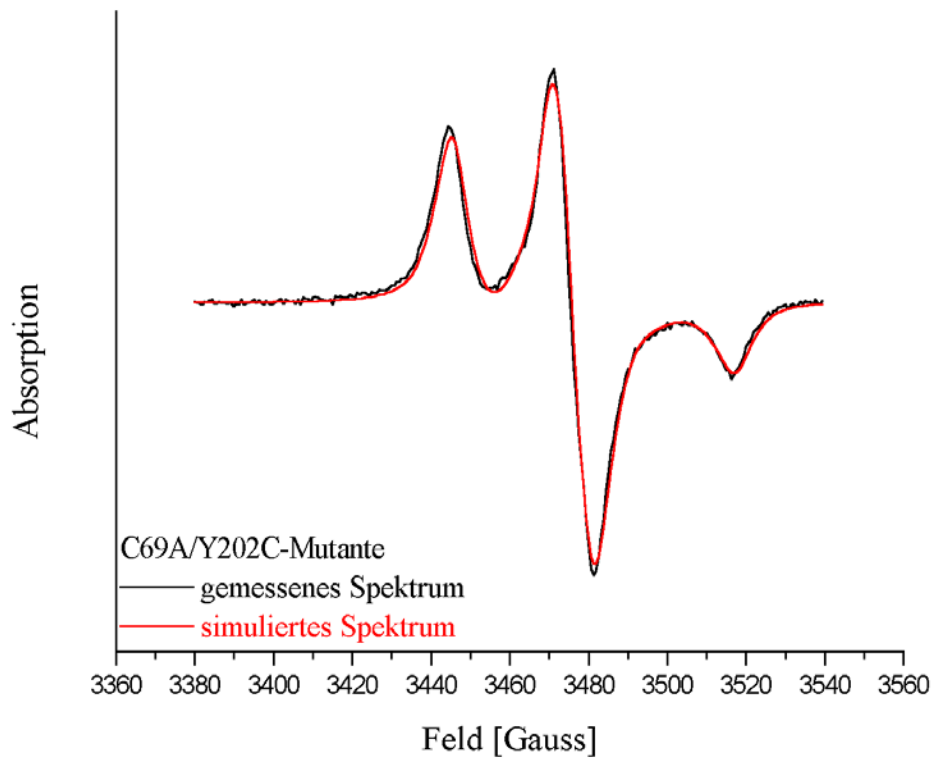


Abb. 3.14 Experimentell **aufgenommenes** und **simuliertes** Spektrum der C69A/Y202C-Mutante (150 μ M). Die Aufnahmeleistung betrug 20 μ W. Die Simulationsparameter sind: g_{xx} 2.0095, g_{yy} 2.0065, g_{zz} 2.0029, A_{xx} 4.29G, A_{yy} 5.10G, A_{zz} 35.7G, Linienfkt. aus Lorentz und Gauss der Breite 3.4G und 4.1G. Simulierter Abstand ergibt sich zu 17.2 \AA \pm 0.5 \AA .

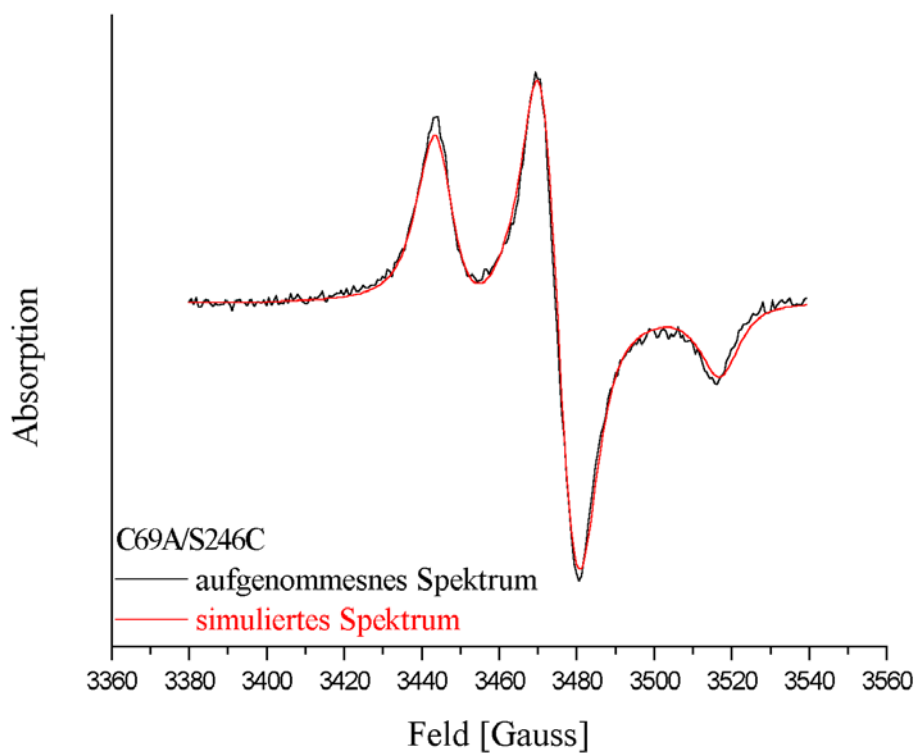


Abb. 3.15 Experimentell **aufgenommenes** und **simuliertes** Spektrum der C69A/S246C-Mutante (150 μ M). Die Aufnahmeleistung betrug 20 μ W. Die Simulationsparameter sind: g_{xx} 2.0095, g_{yy} 2.0065, g_{zz} 2.0029, A_{xx} 4.29G, A_{yy} 5.10G, A_{zz} 36.6G, Linienfkt. aus Lorentz und Gauss der Breite 4.36G und 4.09G. Simulierter Abstand ergibt sich zu 16.8 \AA \pm 1.0 \AA .

Die in Abbildungen 3.14 und 3.15 dargestellten Spektren wurden ebenfalls mit den Parametern der spinmarkierten C69A-Mutante simuliert, da beide Doppelmutanten das natürliche Cystein 242 enthalten. Die Simulation der aufgenommenen Spektren ergab für die C69A/Y202C-Mutante $17.2 \pm 0.5 \text{ \AA}$ und für die C69A/S246C-Mutante $16.8 \pm 1.0 \text{ \AA}$. In der nachfolgenden Tabelle sind die Abstände zwischen den spinmarkierten Positionen nochmals zusammengestellt.

Tabelle 3-1 Zusammenfassung der Abstände zwischen den gelabelten Positionen im Vergleich.

BDH-Mutante	Abstände [\AA]		
	$3\alpha,20\beta$ -HSD	$3\alpha,20\beta$ - und 17β -HSD	Simulation
C242A	20 ± 5		22.2
Y202C/C242A	>29	16.5	22.8
C69A/Y202C	14	>30	17.2
C242A/S246C	15	16.5	16.8

Die beiden Strukturmodelle der BDH unterscheiden sich erheblich im C-terminalen Bereich (Reste 194-297). Dagegen ist der N-terminale Bereich beider Modelle sehr ähnlich. Vor diesem Hintergrund ist es nicht weiter verwunderlich, dass die aus den verschiedenen Modellen ermittelten Abstände (etwa $20 \pm 5 \text{ \AA}$) zwischen den spinmarkierten Cysteinen 69 zweier benachbarter Untereinheiten sehr ähnlich sind. Dies würde mit dem aus dem simulierten Spektrum der C242A-Mutante bestimmten Abstand von 22.2 \AA gut übereinstimmen.

Ein weiterer Hinweis auf Wechselwirkungen zwischen spinmarkierten Cysteinen 69 benachbarter Untereinheiten liefert ein PELDOR (Puls Elektron-Elektron-Doppel-Resonanz)-Experiment. Dieses Puls-Experiment wurde im Arbeitskreis von Prof. T. Prisner freundlicherweise von Dr. Olav Schiemann durchgeführt. Es konnte ein Abstand zwischen den spinmarkierten Positionen von 15.5 \AA berechnet werden. Dieser Abstand liegt innerhalb des aus den Modellen ermittelten Abstandsbereiches.

Die N-terminale Region zwischen den Resten 10 bis 69 wird als NAD(H)-Bindungsdomäne diskutiert. Modifizierungen des Cysteins 69 mit Sulfhydryl-spezifischen Reagentien mindern die spezifische Aktivität der C242A-Mutanten erheblich (ca. 30% Restaktivität). Dies lässt sich damit erklären, dass Cystein 69 nahe dem Adenosin-Ring des Coenzym liegt. Eine entsprechende Modifizierung stört oder behindert dann natürlich den Einbau des Coenzym. Die räumliche Position 69 ist in beiden Modellen sehr ähnlich. Dennoch dürfte eine Modifizierung dieses Cysteins im $3\alpha,20\beta$ -BDH Modell größere Auswirkungen auf den Einbau des Coen-

zyms haben, da es in diesem Modell näher am Adenosin-Ring lokalisiert (ca. 7.5Å) ist als im Falle des kombinierten Modells (ca. 10.3Å). Diese Beobachtung sollte dennoch nur als Indiz für das 3 α ,20 β -Modell der BDH gewertet werden.

Wie oben schon erwähnt kann eine stärkere Wechselwirkung zwischen den spinmarkierten Cysteinen 69 und 202 ausgeschlossen werden. Nach dem Modell, welches aus der Kombination von 3 α ,20 β - und 17 β -HSD abgeleitet wurde, wären stärkere Wechselwirkungen zu erwarten. Nach diesem Modell sollte der Abstand zwischen den Cysteinen 69 und 202 etwa 16Å betragen. Dies widerspricht eindeutig dem Ergebnis der Simulation des Spektrums der Y202C/C242A-Mutante. Die Ursache für die hier gefundene schwache Wechselwirkung ist höchst wahrscheinlich auf die Wechselwirkung zwischen den spinmarkierten Cysteinen 69 der jeweiligen Untereinheiten zurückzuführen. Eine Abstandsmessung im 3 α ,20 β -Modell der BDH zwischen den spinmarkierten Cysteinen 69 und 202 ergeben eine Entfernung von etwa 30Å.

Im Vergleich zur Y202C/C242A-Mutante konnten im Spektrum der C69A/Y202C-Mutante stärkere Wechselwirkungen festgestellt werden. Die Simulation der spinmarkierten C69A/Y202C-Mutante führte zu einem Abstand zwischen den paramagnetischen Zentren von etwa 17.2Å. Der aus dem 3 α ,20 β -BDH Modell ermittelte Abstand zwischen den spinmarkierten Positionen beträgt etwa 15.5Å. Der entsprechend ermittelte Abstand aus dem kombinierten Modell beträgt mehr als 30Å. Somit würde der aus der Simulation der C69A/Y202C-Mutanten ermittelte Abstand von 17.2Å für das 3 α ,20 β -BDH Modell sprechen.

Die Analyse des Spektrums der C69A/S246C-Mutante ergab einen Abstand zwischen den gelabelten Positionen von 16.8Å. Aus dem 3 α ,20 β -BDH Modell lässt sich ein Abstand von 15Å und aus dem kombinierten Modell von 16.5Å entnehmen. Aufgrund der ähnlichen Größe der Abstände aus den Modellen und der Simulation kann keine weitere Differenzierung zwischen den beiden Strukturmodellen durchgeführt werden.

Modifizierungsexperimente (Dalton *et al.*, 1993; Hafeti *et al.* 1986; Dubois *et al.*, 1986) sowie kinetische Daten von Mutanten (Chelius *et al.*, 2001) belegen, dass die Cysteine 69 und 242 in Nachbarschaft zum aktiven Zentrum liegen müssen. Eine Modifizierung von Cystein 242 führt zur Inaktivierung dieser Mutanten (1% Restaktivität). Im Gegensatz zu Cystein 69 Mutanten ist das Ausmaß der Inaktivierung weniger abhängig von der Größe der Modifizierungsreagenzien (Dubois *et al.*, 1986; Dalton *et al.*, 1993). Da die natürlichen Cysteine weder an Coenzym- noch an Substratbindung beteiligt sind, aber selbst sterisch weniger aufwendige Reagenzien speziell die kinetischen Daten von Cystein 242 Mutanten bzgl. der Substrate dramatisch beeinflussen, muss dieses Cystein sehr nahe am aktiven Zentrum liegen. Mitarbeiter

unseres Arbeitskreises konnten zeigen, dass das native Enzym durch einen Überschuss an Substrat um etwa 50% inhibiert wird. Derivatisierung des reaktiveren Cysteins 242 hebt diese Substrathemmung auf. Die Aktivität des modifizierten Enzyms wird durch hohe Substratkonzentration mindestens um das dreifache gesteigert (Dubois *et al.*, 1986). Somit liefern diese Experimente Hinweise darauf, dass Modifizierungen des Cysteins 242 sich mehr auf die Substratbindung auswirken als auf die Bindung des Coenzym.

Diese Fakten lassen sich nur mit dem $3\alpha,20\beta$ -BDH Modell verstehen. In diesem Strukturmodell sind die natürlichen Cysteine um die vermutliche Coenzymbindungsstelle positioniert. Cystein 69 ist, wie oben schon angedeutet, dem Adenosin-Teil des Coenzym benachbart. Cystein 242 befindet sich dagegen in Nachbarschaft zum Nicotinamidring des Coenzym. Der aus diesem Modell ermittelte Abstand zwischen der Sulfhydrylgruppe des Cysteins 242 und dem Nicotinamidring beträgt etwa 8.5Å. Im kombinierten Strukturmodell ist das Cystein 242 überhaupt nicht in Nachbarschaft zum Coenzym. Der aus diesem Modell ermittelte Abstand zwischen Cystein und Coenzym beträgt mehr als 19Å. Eine Modifizierung dieses Cysteins würde die enzymatische Aktivität des Enzyms vermutlich nur wenig beeinflussen. Versuche von Hafeti *et al.* mit einem Arylazido-NAD⁺ führten zu einer Derivatisierung des reaktiveren Cysteins 242. Dies ist nur möglich, wenn es sich sehr nahe am aktiven Zentrum befindet.

Somit lässt sich feststellen, dass das $3\alpha,20\beta$ -BDH Modell die relativen Positionen der natürlichen Cysteine um das aktive Zentrum besser beschreibt als das aus der Kombination der $3\alpha,20\beta$ - und 17β -HSD entstandene Strukturmodell.

3.4 Fluoreszenzstudien von BDH-Mutanten

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Studien (FRET oder RET) stellen an Fluoreszenzlabel spezielle Bedingungen. Neben der obligatorischen Nähe von Donor- und Akzeptormolekülen (10-100Å), muss das Absorptionsspektrum des Akzeptors mit dem Fluoreszenzemissionsspektrum des Donors überlappen. Wenn Donor und Akzeptor identisch sind, kann RET durch Fluoreszenzdepolarisierung detektiert werden. Daher wurden alle Fluoreszenzstudien mit dem Fluoreszenzlabel Fluorescein (F150) der Firma Molecular Probes durchgeführt.

3.4.1 Fluoreszenzmarkierung von BDH-Mutanten

Die jeweiligen Mutanten wurden je nach beabsichtigter Labelstöchiometrie mit unterschiedlich konzentrierten F150-Lösungen für mehrere Stunden inkubiert. Der nicht gebundene Label wurde mittels Dialyse gegen Dialysepuffer (s. 5.12.2) entfernt. Vor den eigentlichen RET-Studien wurden die gelabelten Mutanten auf Aktivität geprüft. Die Anisotropiemessungen wurden, wie in Abschnitt 5.11.2 beschrieben, durchgeführt.

3.4.2 RET-Studien an BDH-Mutanten

Anisotropiemessungen von F150 gelabelten Mutanten ergaben Werte r von etwa 0.08 – 0.1. Diese Werte könnten auf ein konzentrationsbedingtes Quenchen der Fluoreszenz oder auf einen Energietransfer zwischen den Labeln hindeuten. Der erste Hinweis auf Fluorescein Resonanz-Energie-Transfer wurde durch die Beobachtung der Abhängigkeit der Anisotropie r von der Anregungswellenlänge erhalten. Die Gegenwart eines Energietransfers drückt sich dadurch aus, dass bei Anregung eines Chromophors im langwelligen Bereich seiner Anregungsbande die Anisotropiewerte dramatisch ansteigen. Dieser Effekt wird nach seinem Entdecker als „Weber’s Red-Edge-Effekt“ (Weber *et al.*, 1970) bezeichnet und ist exemplarisch für die C69A/Y202C/C242A-Mutante in Abbildung 3.16 dargestellt.

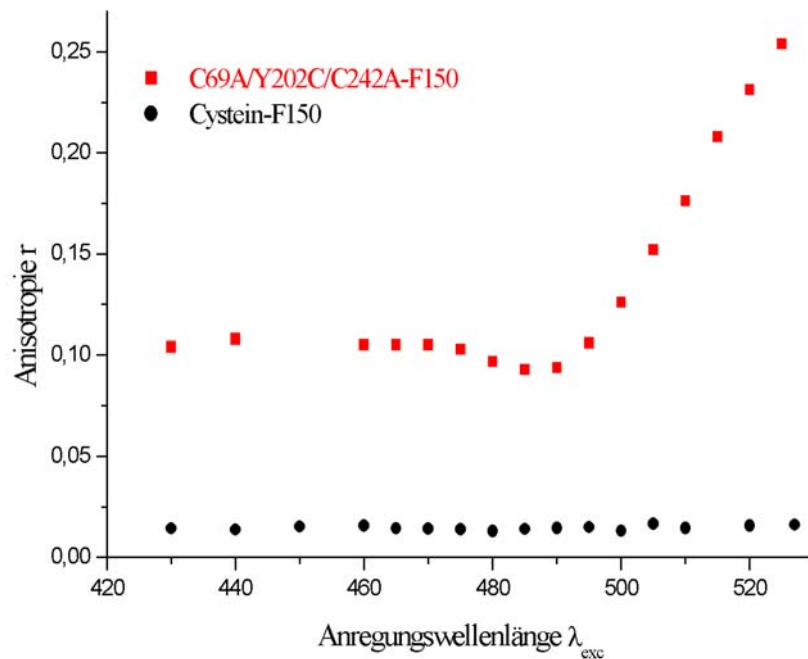


Abb. 3.16 (■) Verlust des Homotransfers durch Anregung am Red-Edge. Abhängigkeit der Anisotropiewerte r von der Anregungswellenlänge am Beispiel der Fluorescein gelabelten C69A/Y202C/C242A-Mutante; (●) Fluorescein gelabeltes Cystein. Die Konzentrationen beider Proben waren $1.2\mu\text{M}$.

Die Abbildung 3.16 zeigt eindeutig, dass die Anisotropie in dem Bereich der Anregungswellenlänge von 430nm bis 490nm (Blue-Edge) praktisch unabhängig von der Anregungswellenlänge ist und etwa 0.1 beträgt. Nähert man sich jedoch dem Red-Edge der Anregungsbande ($>495\text{nm}$), so steigt der Anisotropiewert r bis auf $r=0.23$ bei 520nm. Ein Überschreiten des Maximums der Anregungsbande bei 495nm ist mit einem fortschreitenden Versagen des Homotransfers verbunden. Um Hinweise zu erhalten, dass es sich bei der gelabelten Proteinprobe um Homotransfer und keinen konzentrationsbedingten Quench handelt, wurde ein weiteres Experiment mit einer Cystein-Fluoresceinprobe durchgeführt. Diese Probe ist offensichtlich völlig unabhängig von der Anregungswellenlänge und zeigt somit keinen Energietransfer zwischen den Labeln.

Der Homotransfer sollte durch eine Abstandsveränderung der Label reduziert werden. Daher wurden die Proben mit einem 5fachen Überschuss an PC oder mit einem 10fachen Überschuss an nicht modifiziertem Wildtyp verdünnt. Dies sollte eine Dissoziation bzw. ein Monomeren austausch des Enzyms bewirken. Die Red-Edge Experimente sind in den nachfolgenden Abbildungen 3.17 und 3.18 zusammengefasst.

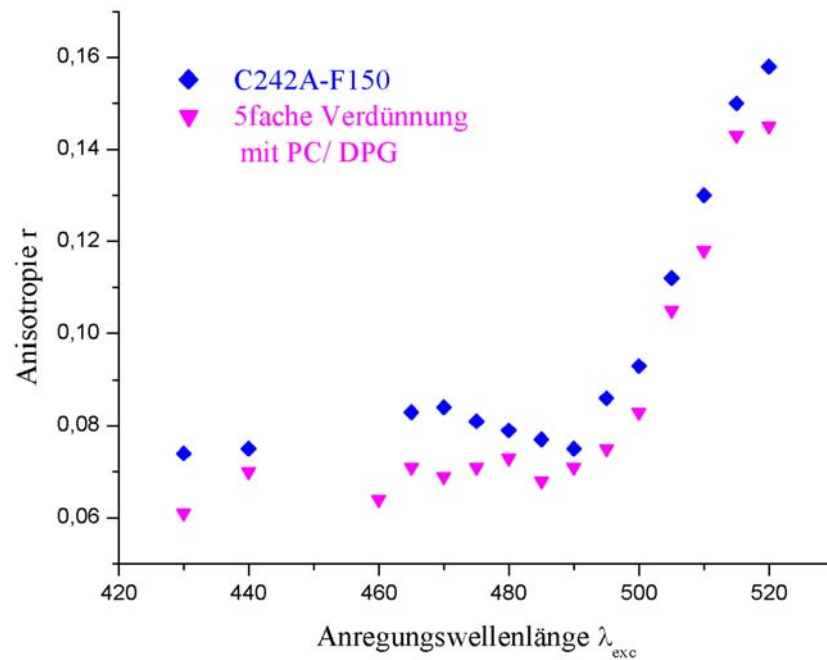


Abb. 3.17 Red-Edge Experimente einer modifizierten rekonstituierten C242A-Mutanten (\blacklozenge). Im Vergleich dazu ein Red-Edge Experiment einer mit PC/ DPG 5fach verdünnten C242A-F150 Mutante (\blacktriangledown), wobei beide Proteinproben aus derselben modifizierten Charge stammen. Die Konzentrationen betragen: $0.5\mu\text{M}$ (\blacktriangledown) und $1.0\mu\text{M}$ (\blacklozenge).

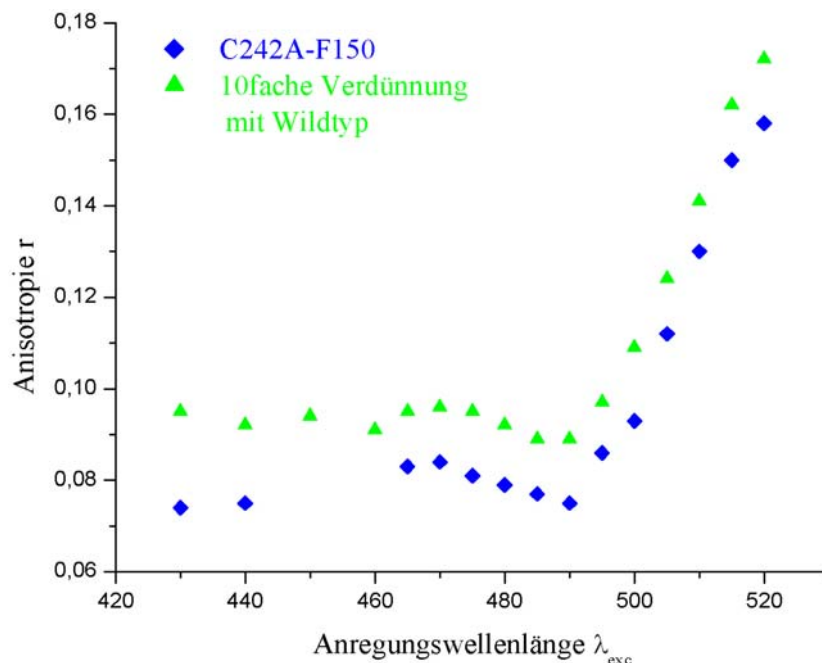


Abb. 3.18 Red-Edge Experimente einer mit Wildtyp 10fach verdünnten C242A-F150 Mutante (\blacktriangle), wobei auch hier wieder beide Proteinproben aus derselben modifizierten Charge stammen. Zum Vergleich wurde hier nochmals die Daten des Red-Edge Experimentes der C242A-F150 Mutante (\blacklozenge) aufgetragen. Die Konzentrationen betragen $1.1\mu\text{M}$ (\blacktriangle) und $1.0\mu\text{M}$ (\blacklozenge).

Die Experimente belegen eindeutig, dass der Red-Edge-Effekt noch signifikant ist. Der Homotransfer zwischen den Labeln wird praktisch weder durch einen Überschuss an PC noch

durch einen Überschuss an Wildtyp beeinflusst. Dennoch ist dieses unerwartete Verhalten des Homotransfers auf Grundlage der Struktur der BDH zu erklären. BDH soll in der Membran als Tetramer bzw. eventuell als Dimer von Dimeren vorliegen (McIntyre *et al.*, 1978). Ein Verdünnen mit PC würde die Intersubunitwechselwirkungen zwischen BDH-Einheiten, welche sich in unterschiedlichen benachbarten PC-Liposomen befinden, verhindern. Da aber in einem Liposom sicher mehr BDH-Einheiten rekonstituiert werden als eine einzige, können letztendlich die Wechselwirkungen zwischen BDH-Einheiten, die sich in einem einzigen Liposom befinden, nicht beeinflusst werden. Des Weiteren lassen die Resultate aus dem Verdünnungsexperiment mit Wildtyp vermuten, dass kein Monomeraustausch zwischen Wildtyp und der gelabelten Probe stattfindet bzw. das gelabelte Enzym nicht in Monomere dissoziiert ist. Ansonsten müsste der Homotransfer aufgrund des fehlenden Akzeptors stark vermindert sein. Ein Austausch von Dimeren in einer tetrameren Anordnung kann mit dem Red-Edge-Experiment natürlich nicht ausgeschlossen werden, da immer noch Homotransfer in einem Dimer detektiert werden würde. Um die Vermutung des Homotransfers innerhalb von Dimeren zu überprüfen, wurden die gelabelten Proben denaturiert. Dieses Vorgehen, das identisch mit dem Vorbereiten einer Probe für eine SDS-PAGE ist, führt zu einer Dissoziation der BDH in ihre monomeren Untereinheiten. In Abbildung 3.19 ist ein Red-Edge Experiment für eine denaturierte Probe am Beispiel der markierten C69A/Y202C/C242A-Mutante dargestellt.

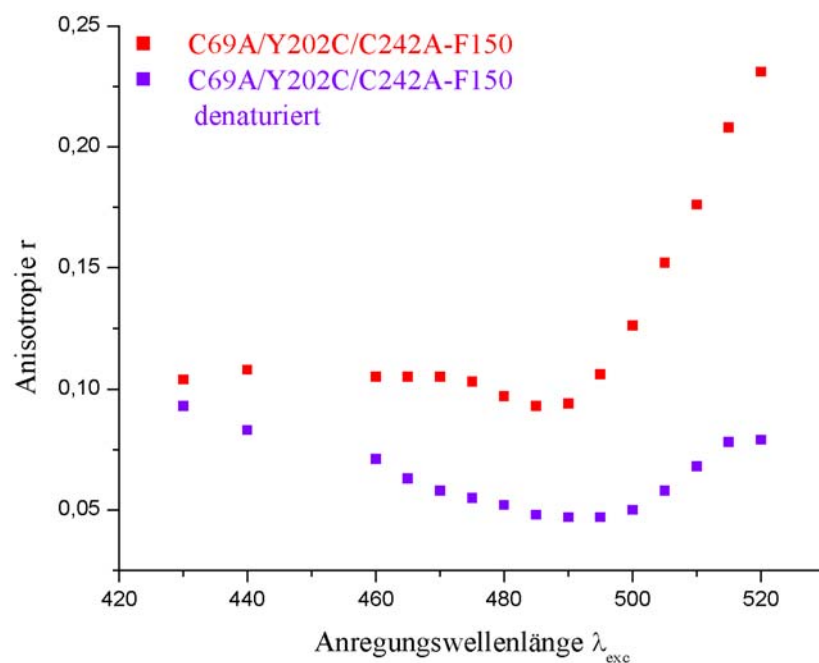


Abb. 3.19 Grafische Darstellung eines Red-Edge Experimentes einer 1,2 μ M gelabelten denaturierten (■) C69A/Y202C/C242A-Mutante. Die Probe wurde in 2% SDS, 5mM DTT für 5min bei 90°C aufgeköcht. Zum Vergleich wurde dieselbe (native) Probe vor dem Denaturieren (■) aufgetragen.

Ein Vergleich der markierten nativen (■) mit der denaturierten (■) C69A/Y202C/C242A-Probe (Abb. 3.19) zeigt, dass der Red-Edge-Effekt bzw. der Homotransfer drastisch reduziert oder sogar vollkommen gelöscht ist. Im Gegensatz zur nativen Probe verringern sich die Anisotropiewerte der denaturierten Probe bei einer Blue-Edge Anregung. Red-Edge Anregung resultiert in einem geringeren Anstieg der Anisotropiewerte als es im Fall der nativen Probe zu beobachten ist. Ein Vergleich der Anisotropie r bei 520nm mit dem Wert bei 430nm der jeweiligen Probe belegt, dass sich die Anisotropie der nativen Probe von $r_{430}=0.1$ auf $r_{520}=0.23$ mehr als verdoppelt. Im Fall der denaturierten Probe verringert sich die Anisotropie von $r_{430} 0.09$ auf $r_{520} 0.08$. Die nach der SDS-Zugabe verminderte Anisotropie spiegelt eine stärkere Bewegung der denaturierten Probe wieder. Der pseudo-Red-Edge-Effekt, der sich in allen denaturierten Proben zeigte, konnte zwar nicht geklärt werden, dennoch sei hier daran erinnert, dass die Anisotropie denaturierter Proben bei 520nm praktisch mit der Anisotropie bei 430nm übereinstimmt. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den entsprechenden Anisotropiewerten aller nativer Proben. Einen möglichen Erklärungsansatz könnten die Fluoreszenzstudien von Swaminathan *et. al.* an nativen und denaturierten Proteinen liefern. Sie postulierten, dass ein Entfalten von Proteinen infolge der Zugabe von Detergentien nicht zu einem vollständig denaturierten Protein führen muss. Es existieren vor allem dann noch lokale Strukturen, wenn diese zu einem sehr frühen Faltungsintermediat gehören. Letztendlich bleibt anzumerken, dass die Anisotropiewerte bei 520nm aller nativer Mutanten um durchschnittlich mehr als 100% größer waren als diejenigen bei 430nm. Dagegen unterschieden sich die Werte denaturierter Proben bei 430nm und 520nm praktisch nicht.

Da eine Reduktion des Homotransfers durch Verdünnung mit PC oder Wildtyp offensichtlich nicht möglich war, sollte nun der Einfluss der Labelstöchiometrie auf das Phänomen untersucht werden.

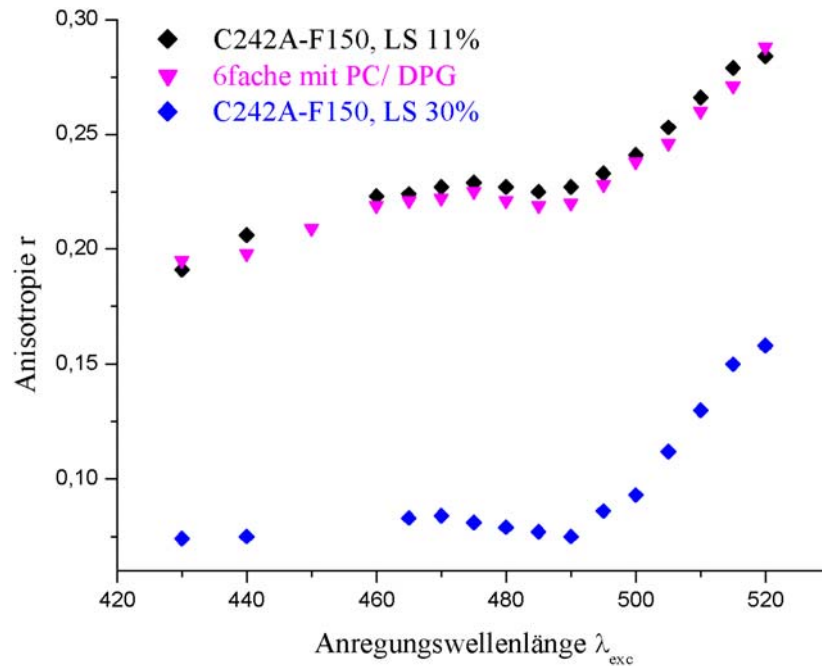


Abb. 3.20 Einfluss der Labelstöchiometrie auf den Homotransfer am Beispiel der (◆) 30% und (◆) 11% gelabelten C242A-Mutante. (▼) 6fache Verdünnung der niedriger gelabelten Mutante mit PC.

Abbildung 3.20 belegt eindeutig die erwartete Abhängigkeit des Homotransfers von der Labelstöchiometrie. Die Anisotropie der mit Fluorescein gelabelten Mutante steigt drastisch mit sinkender Labelstöchiometrie an. Dies ist auf einen verminderten Homotransfer zurückzuführen. Des weiteren wird in Ergänzung zu den oben beschriebenen Verdünnungsexperimenten aus der Abbildung 3.20 ersichtlich, dass die Anisotropie niedrig gelabelter Mutanten durch Verdünnen mit PC unbeeinflusst bleibt.

Die steady-state Anisotropie kann auch durch andere Phänomene beeinflusst werden. Änderungen in der Fluoreszenz-Lifetime würden die Anisotropie stark beeinflussen. Da Homotransfer die Lifetime nicht verändert, wurden noch zusätzlich Lifetime-Daten gesammelt. Die Lifetime-Experimente wurden freundlicherweise von Dr. T.L. Hazlett im Labor für Fluoreszenzdynamik (LFD) an der University of Illinois in Urbana (UIUC) durchgeführt. Die Tabelle 3-2 stellt eine Zusammenfassung der Lifetime-Daten der Experimente dar.

Tabelle 3-2 Zusammenfassung aller Lifetime-Daten gelabelter BDH-Mutanten. Fluorescein diente als Referenz. Die letzte Spalte gibt die Abweichung der Lifetime der jeweiligen Probe von der Lifetime der Referenz (4.05 ns) an. Die Hochgestellten Prozentbeträge in der ersten Spalte (Probe) geben die Labelstöchiometrie der jeweiligen Probe an.

Probe	Lifetime [ns]	Abweichung [%]
Fluorescein (F150)	4.05	
C242A-F150 ^[11%]	4.08	0.7
C242A-F150 ^[30%]	3.81	6.0
C69A-F150 ^[24%]	3.71	8.4
C69A-F150 ^[13%]	4.16	2.7
Y202C/C242A-F150 ^[80%]	4.09	1.0
C69A/Y202C/C242A-F150 ^[43%]	4.13	1.9

Die geringen Abweichungen der Fluorescein-Lifetime der Proteinproben im Vergleich zu der Referenzprobe beweist, dass es sich bei dem vorliegenden Phänomen tatsächlich um Homotransfer handelt. Mit den durchgeführten Experimenten konnte der Nachweis von Resonanz-Energie-Homotransfer erbracht werden. Dennoch bleibt kritisch anzumerken, dass in keinem der durchgeführten Experimente der Homotransfer völlig ausgelöscht werden konnte. Da aber eine Abstandsbestimmung auf Parametern wechselwirkungsfreier Systeme beruht, konnten keine Abstände zwischen den gelabelten Positionen bestimmt werden.

Mögliche Erklärungsansätze hierfür könnten in der tetrameren Struktur der BDH zu finden sein. Die Fluorophoren können über sehr weite Strecken wechselwirken. Somit müssen neben Wechselwirkungen innerhalb eines Monomers, Dimers und Tetramers auch Wechselwirkungen zwischen Untereinheiten benachbarter Label in Betracht gezogen werden.

3.4.3 NADH-Titrationsstudien von HH-BDH im Vergleich mit BH-BDH

Der Ursprung intrinsischer Proteinfluoreszenz liegt in den aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Die Indolgruppe des Tryptophans ist dabei die Quelle der UV-Absorption und Emission in Proteinen (Lakowicz, 1999). HH-BDH kodiert in ihrer Sequenz für 5 intrinsische Tryptophane, die für Bindungsstudien genutzt werden können.

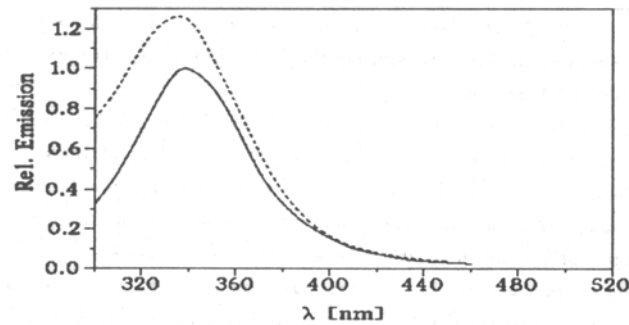


Abb. 3.21 Emissionsspektren der BDH mit (durchgezogene Linie) und ohne (gepunktete Linie) Lecithin-haltigen Liposomen. Anregung des Tryptophans bei λ_{exc} 290nm/ λ_{em} 335nm [Zirkel, 1992].

In Abbildung 3.21 sind die Emissionsspektren von Apo-BDH und rekonstituierter BDH dargestellt. Dabei ist eindeutig eine Zunahme in der Fluoreszenzintensität des rekonstituierten Enzyms im Vergleich zum Apo-Enzym, ohne erkennbare Blauverschiebung des Emissionsmaximums zu erkennen. El Kebbaj *et. al.* erklärten diese Intensitätszunahme auf Grundlage einer Konformationsänderung des in Liposomen insertierten Enzyms.

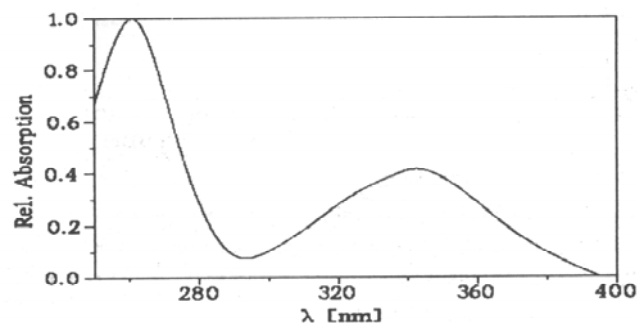


Abb. 3.22 Absorptionsspektrum von NADH in Wasser [Zirkel, 1992].

Aus dem Absorptionsspektrum von NADH (Abb. 3.22) lassen sich zwei wichtige Konsequenzen ableiten. Bei einer Anregung des Tryptophans um 290nm wird NADH nur wenig angeregt, da das Absorptionsspektrum in diesem Bereich ein Minimum aufweist. Im Bereich der Tryptophanemission weist NADH hingegen ein Maximum auf. Da das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt, ist auch hier wieder ein Fluoreszenz-Energie-Transfer möglich.

Aus zahlreichen Fluoreszenzstudien an BH-BDH ist bekannt, dass die NADH-Emission infolge der Bindung des Coenzyms an das rekonstituierte Enzym eine Fluoreszenzerhöhung im Vergleich zum PC-haltigen Puffersystem ohne Enzym erfährt (Abb. 3.23 und 3.24).

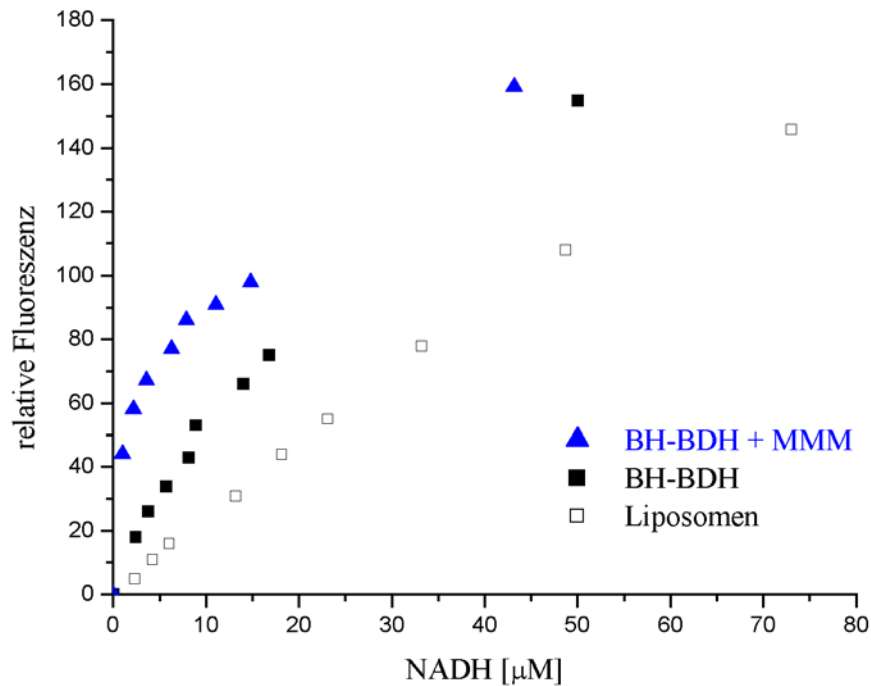


Abb. 3.23 Fluoreszenz-Energie-Transfer von rekonstituierter BH-BDH zum gebundenen NADH (λ_{exc} 296 nm, λ_{em} 460 nm). Die Grafik zeigt den Vergleich zwischen der BH-BDH mit (\blacktriangle) und ohne (\blacksquare) Monomethylmalonat einerseits und Liposomen ohne Enzym (\square) in Puffer andererseits. Die Messung wurde mit einer Anfangskonzentration von $1.5\mu\text{M}$ mit $0.1\mu\text{gP}/\mu\text{g}$ Enzym durchgeführt.

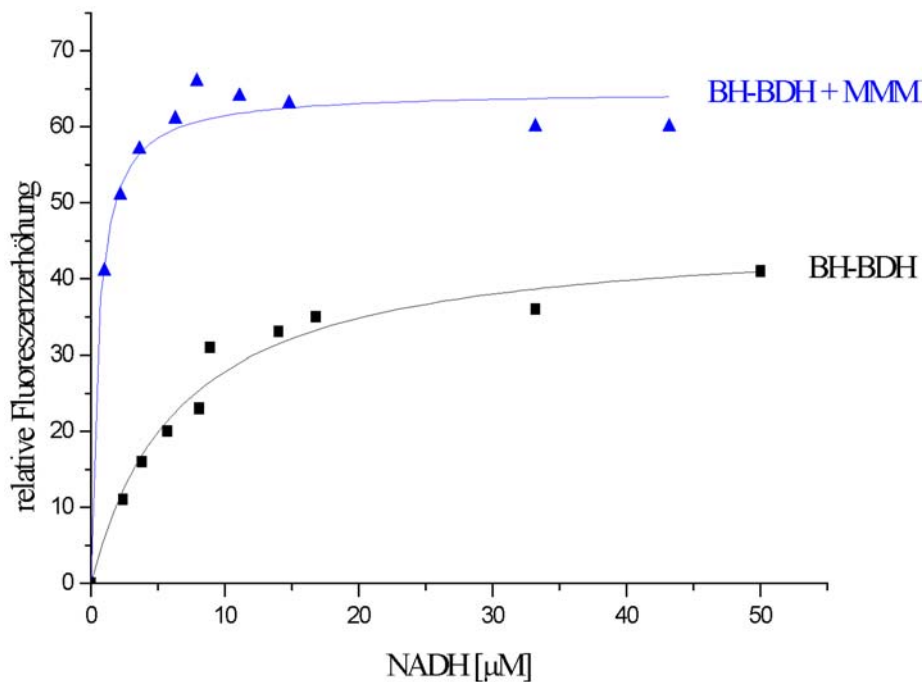


Abb. 3.24 Differenz der NADH-Titrationskurven aus Liposomen ohne Enzym (\square) und den entsprechenden Titrationskurven (\blacktriangle , \blacksquare). Die aus den Kurven berechneten K_D -Werte für NADH betragen $0.54\mu\text{M}$ und $6.70\mu\text{M}$.

Abbildung 3.23 zeigt eindeutig eine erhebliche Verstärkung (\blacksquare , \blacktriangle) der NADH-Emission im Vergleich zur Kontrollprobe (\square). Die hyperbolische Verstärkung der NADH-Fluoreszenz in der Enzymprobe kommt durch einen Energietransfer von den intrinsischen Tryptophanen des Enzyms zum NADH zustande. Die Differenz der Titrationskurven, gebildet aus der jeweiligen

Enzymprobe (■, ▲) und Liposomen ohne Enzym (□), ist in der Abbildung 3.24 dargestellt. Auffällig ist, dass in Gegenwart des Substratanalogons Monomethylmalonat eine etwa 1.5fach größere Verstärkung der NADH-Emission detektiert werden kann als es in Abwesenheit des Reagenzes der Fall ist. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass NADH in Gegenwart von Monomethylmalonat optimal bindet und somit ein sehr effizienter Energietransfer von den intrinsischen Tryptophanen auf das NADH gewährleistet ist. Ein weiterer Grund oder die Konsequenz aus der optimalen Bindung könnte eine optimale Ausrichtung des NADH's in der Bindungstasche oder der Tryptophane in Richtung auf das NADH sein.

Frühere NADH-Titrations an HisHH-BDH ergaben keine Erhöhung der NADH-Fluoreszenz. Es wurde vermutet, dass der Hexahistidin-Tag die NADH-Fluoreszenz quencht und daher keine Erhöhung detektierbar ist. Daher wurde der Histidin-Tag mit Enterokinase abgespalten und durch Dialyse aus der Lösung entfernt. Die entsprechenden Daten der NADH-Titrations mit dem Enzym aus menschlichem Herz (HH-BDH) sind in den Abbildungen 3.25 und 3.26 dargestellt.

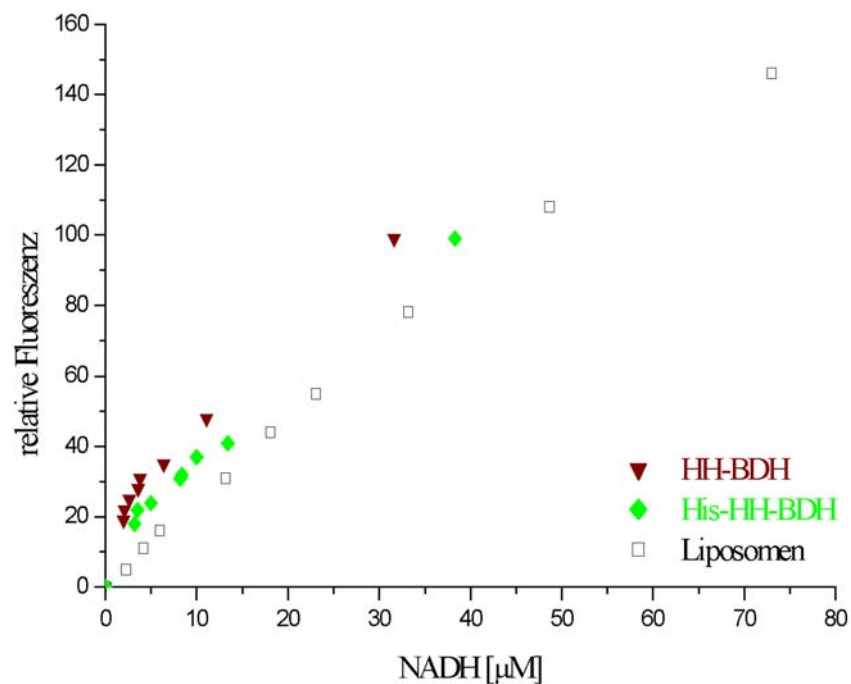


Abb. 3.25 Fluoreszenz-Energie-Transfer von rekonstituierter HisHH-BDH (◆) und HH-BDH (▼) zum gebundenen NADH (λ_{exc} 296 nm, λ_{em} 460 nm). Die Grafik zeigt den Vergleich der relativen Fluoreszenz zwischen rekonstituiertem Enzym mit (◆) und ohne (▼) Histag und Liposomen (□) in Puffer. Die Messungen wurden jeweils mit einer Anfangskonzentration von 1.5 μM mit 0.1 μgP/ μg Enzym durchgeführt.

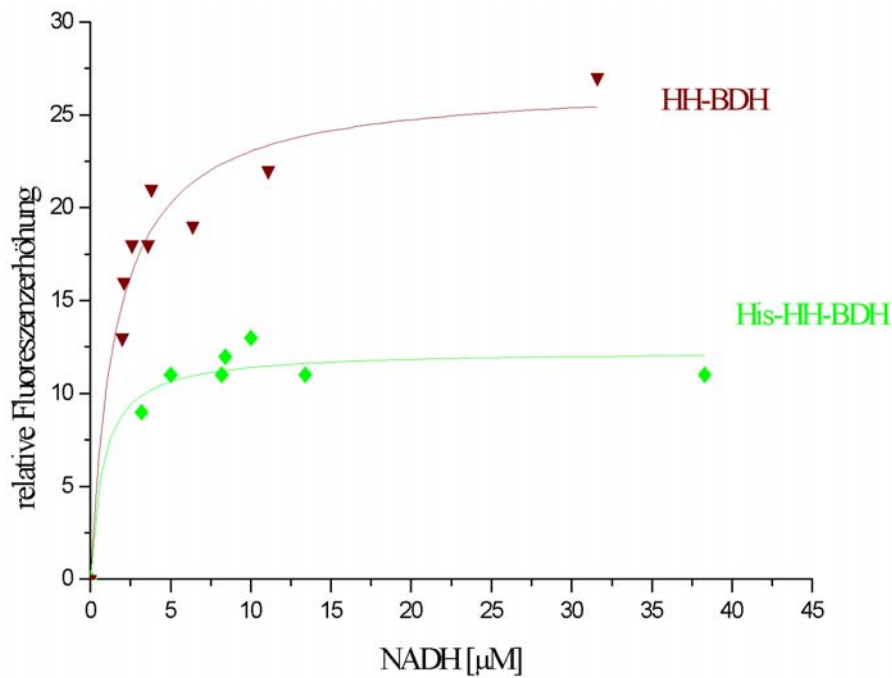


Abb. 3.26 Differenz der NADH-Titrationskurven aus Liposomen ohne Enzym (\square) und den entsprechenden Titrationskurven mit Enzym (\diamond , \blacktriangledown). Die aus den Kurven bestimmten K_D -Werte für NADH betragen $1.60\mu\text{M}$ und $0.78\mu\text{M}$.

Die NADH-Emission wird sowohl in HH-BDH als auch in His-HH-BDH verstärkt. Ein Vergleich der Titrationskurven beider Enzyme in der Abbildung 3.26 zeigt, dass der Hexahistidin-Tag tatsächlich für eine geringere Verstärkung der NADH-Fluoreszenz verantwortlich ist. Eine wichtige Erkenntnis liefert der Vergleich des HH-Enzyms mit dem BH-Enzym (Abb. 3.27).

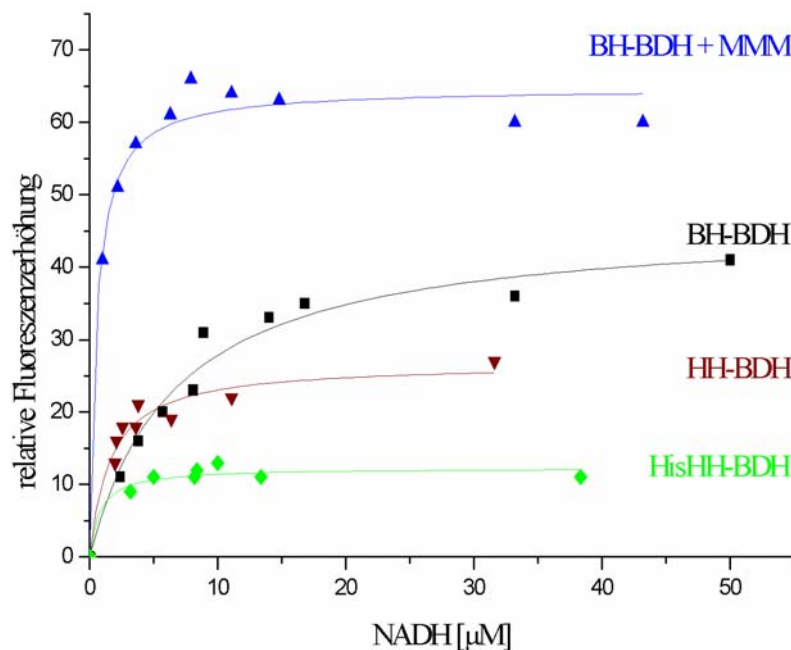


Abb. 3.27 Vergleich des Energietransfers rekonstituierter HisHH-BDH (\diamond), HH-BDH (\blacktriangledown), BH-BDH ohne (\blacksquare) und mit (\blacktriangle) Monomethylmalonat.

Das Enzym aus Rinderherz verfügt mit seinen 4 intrinsischen Tryptophanen über ein Tryptophan weniger als das Enzym aus menschlichem Herzen. Dennoch erfährt die NADH-Fluoreszenz in der BH-BDH eine größere Verstärkung. Ein möglicher Grund für die geringere Verstärkung der NADH-Fluoreszenz im HH-BDH Enzym könnte eine leicht veränderte Umgebung um die Bindungstasche des Coenzym sein. Dabei würde es wahrscheinlich schon ausreichend sein, dass die Tryptophane im Vergleich zum BH-BDH Enzym eine minimal veränderte Ausrichtung haben. Somit könnten die Winkel zwischen den Tryptophanen des Enzyms und dem gebundenen NADH leicht verändert sein. Die Konsequenz der größeren Abstände drückt sich dann in einem weniger effizienten Energietransfer von den intrinsischen Tryptophanen zum NADH aus. Des weiteren ist anzumerken, dass die Anzahl der am Energietransfer beteiligten Tryptophane nicht bekannt ist.

Zusätzlich zum Wildtyp wurden die Fluoreszenz-Titrationen auch mit den His-HH-Mutanten C69A und C242A in Gegenwart von Monomethylmalonat durchgeführt. Die Daten der Titration für die C69A-Mutante sind in der Abbildungen 3.28 und 3.29 dargestellt.

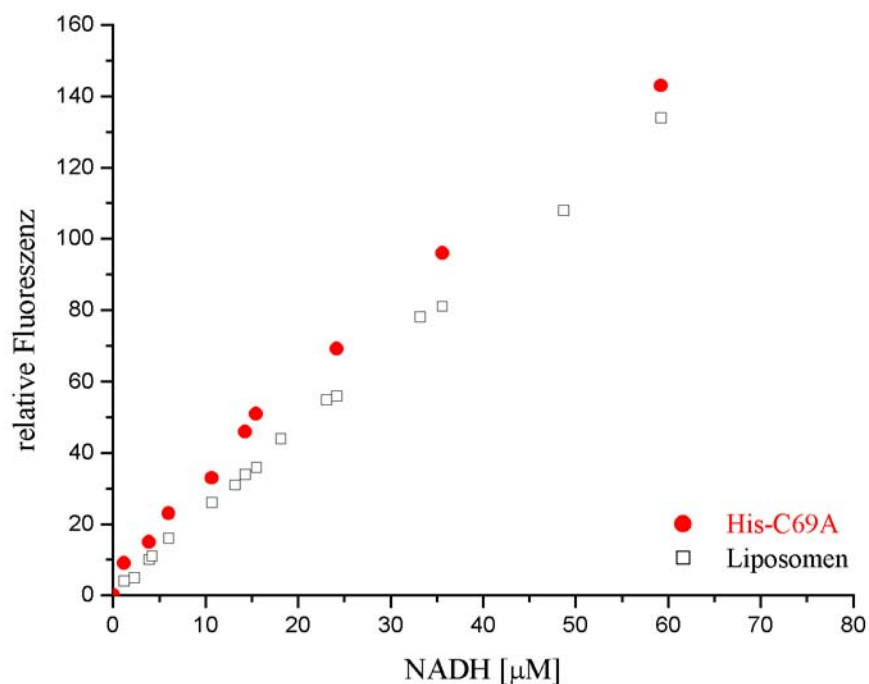


Abb. 3.28 Fluoreszenz-Energie-Transfer von rekonstituierter HisC69A-BDH (●) zum gebundenen NADH (λ_{exc} 296 nm, λ_{em} 460 nm) in Gegenwart von 50mM Monomethylmalonat. Die Grafik zeigt den Vergleich der relativen Fluoreszenz zwischen rekonstituiertem Enzym (●) und Liposomen (□) in Puffer. Die Messung wurde mit einer Anfangskonzentration von 1.2 μM für HisC69A mit 0.1 $\mu\text{gP}/\mu\text{g}$ Enzym durchgeführt.

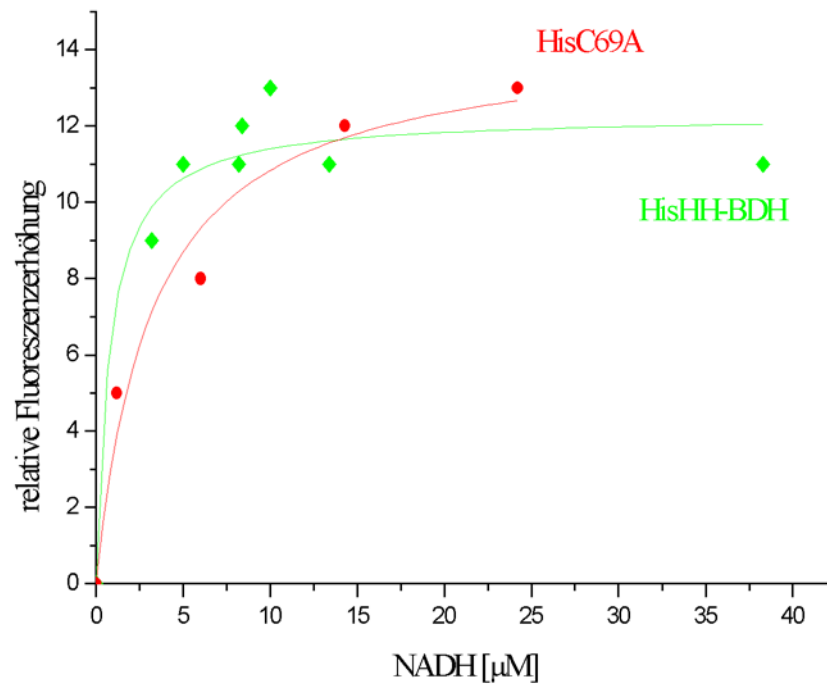


Abb. 3.29 Differenz der NADH-Titrationskurven aus Liposomen ohne Enzym (\square) und der Titrationskurve mit rekonstituierter HisC69A (\bullet). Zum Vergleich wurde nochmals die relative Fluoreszenzerhöhung der His-HH-BDH (**ohne Monomethylmalonat**) dargestellt (\blacklozenge). Die Messungen wurden jeweils mit einer Anfangskonzentration von $1.2\mu\text{M}$ für HisC69A und $1.5\mu\text{M}$ mit jeweils $0.1\mu\text{gP}/\mu\text{g}$ Enzym durchgeführt. Der aus der Kurve bestimmte K_D (NADH)-Wert beträgt $3.3\mu\text{M}$.

Obwohl die Fluoreszenzstudien der His-C69A-Mutante in Gegenwart des Inhibitors Monomethylmalonat durchgeführt wurden, scheint dies keine weitere Erhöhung in der NADH-Fluoreszenz zu bewirken. Dies lässt der direkte Vergleich der His-C69A-Mutante mit dem Wildtyp (Abb. 3.29), der ohne Inhibitor mit NADH titriert wurde, vermuten. Da Monomethylmalonat anscheinend das Coenzym fester binden lässt, sollte sich dieser verstärkende Effekt unmittelbar auf die Dissoziationskonstante auswirken (nachfolgende Tabelle 3-3). Andererseits liegen keine Daten vor, aus denen der Einfluss der Alanin-Mutation abgeschätzt werden kann; d.h. eine NADH-Titration der His-C69A-Mutante in Abwesenheit von Monomethylmalonat. Daher kann der Effekt des Inhibitors nicht richtig eingeschätzt werden.

Abschließend sollte noch die His-C242A-Mutante untersucht werden. NADH-Titrations dieser Mutante zeigen dagegen keine Erhöhung der NADH-Fluoreszenz-Intensität (Abbildung 3.30).

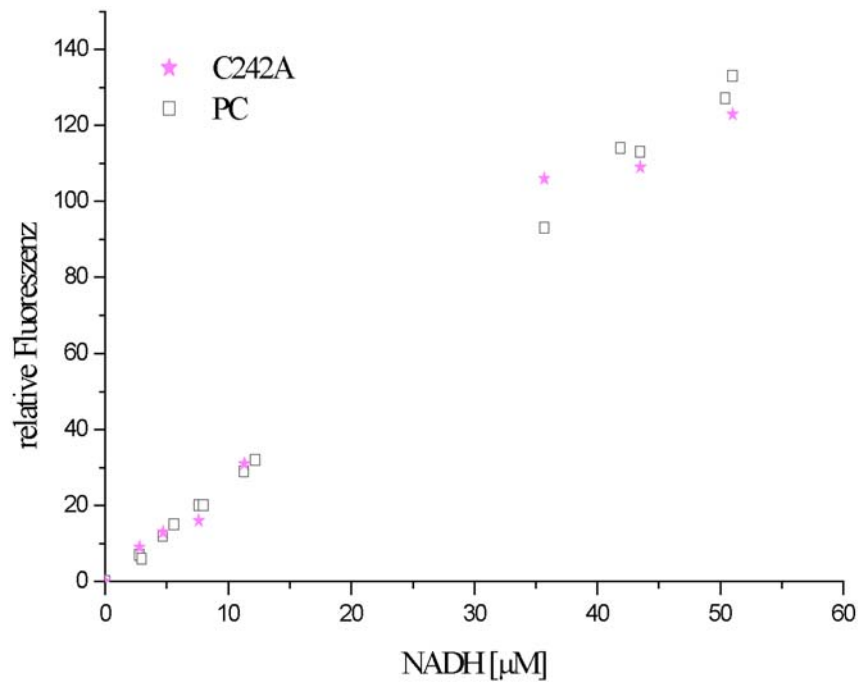


Abb. 3.30 Relative NADH-Fluoreszenz bei 460nm (Extinktion 290nm) in Gegenwart von Liposomen (□) und in Gegenwart von HisC242A/ PC-Komplex (★). Die Messung wurde mit einer anfänglichen Enzymkonzentration von 1.2 μM durchgeführt.

Somit findet auch kein Energietransfer vom Tryptophan zum NADH statt. Dennoch konnte auch bei der C242A-Mutante ein Quench der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz (λ_{exc} 290nm, λ_{em} 340nm) detektiert werden. Somit ist offensichtlich, dass das aktive Enzym das Coenzym bindet. McIntyre machte eine verblüffend ähnliche Beobachtung (McIntyre *et. al.*, 1984). Sie führten NADH-Titrationen an N-Ethylmaleimid modifizierter BH-BDH durch. Nach Modifizierung des reaktiveren Cysteins 242 konnte zwar ein Quench der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz festgestellt werden, dennoch konnte kein Energietransfer vom Tryptophan zum NADH detektiert werden. Sie erklärten dieses Phänomen damit, dass das Coenzym infolge der Modifizierung eine ungünstige Orientierung zu den Tryptophanen einnimmt und somit einen Energietransfer unmöglich macht. Wir wissen, dass die C242A-Mutante hochaktiv ist und daher das Coenzym bindet. Die Umgebung um den Nicotinamidring des Coenzym wird infolge der Mutation C242A offensichtlich dahingehend beeinflusst, dass im Vergleich zum Wildtyp oder der C69A-Mutante die Orientierung der Tryptophane zum NADH ungünstig wird.

Bei den vorgestellten Fluoreszenz-Titrationen wurden sowohl die Anregungsübertragung vom Tryptophan zum NADH-Liganden (λ_{exc} 290nm, λ_{em} 460nm) als auch die Fluoreszenzlöschung der intrinsischen Tryptophanen (λ_{exc} 290nm, λ_{em} 340nm), die hier nicht grafisch dokumentiert wurden, verfolgt. Eine Auswertung der Fluoreszenzlöschung der intrinsischen Tryptophan-

Fluoreszenz ergibt generell höhere K_D (NADH)-Werte, da die Fluoreszenzlöschung nicht nur auf einer Energieübertragung vom Donor zum Akzeptor, sondern auch durch unspezifische Ursachen gelöscht werden kann. Daher wurden die Dissoziationskonstanten aus den grafischen Darstellungen der relativen Fluoreszenzerhöhung der jeweiligen Mutanten bestimmt.

Tabelle 3-3 Tabellarische Darstellung der aus den relativen Fluoreszenzerhöhungen bestimmten Dissoziationskonstanten K_D (NADH). MMM: Monomethylmalonat. n.b. nicht bestimmt.

Symbol	Mutante	K_D [μM]
▲	BH-BDH (+ 50mM MMM)	0.54
■	BH-BDH	6.70
◆	His-HH-Wildtyp	0.78
▼	HH-Wildtyp	1.60
●	His-C69A (+ 50mM MMM)	3.30
✱	His-C242A (+ 50mM MMM)	n.b.

Ein Vergleich der K_D (NADH)-Werte des Rinderherzenzyms (▲, ■) zeigen, dass Monomethylmalonat die Bindung von NADH an das Enzym erheblich verstärkt. In Abwesenheit von Monomethylmalonat ist die Dissoziationskonstante fast 12 mal größer als in Anwesenheit des Substratanalogons. Der K_D (NADH)-Wert von $6.7\mu\text{M}$ stimmt mit dem von Chelius ermittelten Wert von $5\mu\text{M}$ recht gut überein (Chelius, 1998).

Die unterschiedlichen K_D (NADH)-Werte des Wildtyps (mit ◆ und ohne ▼ Histag) aus Menschenherz könnten auf den Einfluss des Histags zurückgeführt werden. Somit würde eine Bestimmung der Dissoziationskonstanten an Mutanten mit Histag einen Vergleich mit Mutanten ohne Histag nicht sinnvoll erscheinen lassen. Die Mutation des Cysteins 69 zu Alanin (●) führt im Vergleich zum His-HH-Wildtyp (◆) zu einer etwa 4 mal größeren Dissoziationskonstanten. Dies ist auch nicht weiter verwunderlich, da das Cystein 69 in nächster Nachbarschaft zum Adenosin-Ring des Coenzym liegt. Eine Mutation in diesem Bereich wirkt sich unwillkürlich auf die Bindungscharakteristik des Coenzym aus. Im Vergleich zur C242A-Mutante wirkt sich die Mutation aber weit weniger aus. Da keine Energieübertragung festgestellt werden konnte, wurde keine Dissoziationskonstante bestimmt. Ein Vergleich der Dissoziationskonstanten des Rinderherzenzyms mit dem Enzym aus menschlichem Herz zeigt größere Unterschiede. Die erstaunlichste Erkenntnis ist, dass der HH-Wildtyp (▼, K_D $1.60\mu\text{M}$) das Coenzym offensichtlich fester bindet als das BH-Enzym (■, K_D $6.70\mu\text{M}$).

3.5 Studien zur C-terminalen Domäne

Die R-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase zeigt eine hohe Homologie zur 3 α ,20 β - und 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen, zwei Vertreter von Kurzketten-Alkohol-Dehydrogenasen. Die Homologie beschränkt sich aber auf die N-terminale Domäne (Aminosäuren 1 bis 193). Die C-terminale Domäne (Aminosäuren 194 bis 297) weist praktisch keine Homologie mit einer bekannten Sequenz auf. Analysen der primären Sequenz von BDH lassen vermuten, dass die Lipidbindungsstelle und auch Elemente der Substratspezifität im C-terminalen Ende der BDH lokalisiert sind (Green *et al.*, 1996). Für die vermutliche Lipidbindungsstelle im C-Terminus sprechen Deletionsmutanten, denen 18 (Langston *et al.*, 1996) bzw. 12 (Green *et al.*, 1996) C-terminale Aminosäuren fehlen. In beiden Fällen führt die Deletion zum Verlust der Enzymaktivität unter physiologischen Bedingungen. Bei hohen Substratkonzentrationen lässt sich jedoch eine schwache Enzymaktivität detektieren. Adami *et al.* bestätigten durch einen Verdau mit Carboxypeptidase von weniger als 14 C-terminalen Aminosäuren, dass diese Mutanten nicht mehr durch PC reaktiviert werden können. Interessanterweise ist der C-Terminus des rekonstituierten Enzyms vor einem Carboxypeptidase-Verdau geschützt.

Eine Sequenz im C-terminalen Ende der BDH (DYYWWLR, Aminosäuren 273 bis 279) ist nahezu identisch mit den an der Cholinbindung der Phospholipase A₂ (PLA₂) beteiligten Aminosäuren (Ortiz *et al.*, 1992).

In der o.g. hydrophoben Sequenz sollte zunächst überprüft werden, ob die Lecithinbindung durch eine drastische Mutation von Tryptophan 276 nach Arginin blockiert werden kann. Des Weiteren sollte anschließend durch die Mutation von Tryptophan 276 nach Cystein eine Möglichkeit geschaffen werden, diese Position entsprechend zu markieren.

3.5.1 Konstruktion der Plasmide pBDH-W276R und pBDH-W276C

Zur Konstruktion dieser Mutanten wurden die Primer cterm1 und cterm2 (pBDH-W276R) bzw. w276c1 und w276c2 (W276C) konstruiert (s. 5.1.3, 5.4.4). Auch hier wurde über das erste Primerpaar eine neue Schnittstelle, AgeI, eingebaut. Die entsprechende Cystein-Mutante wurde durch Löschen von NcoI und/ oder StyI verifiziert. Das Templat pBDH-C69A/C242A wurde nach der Qiagen-Methode isoliert und aufgereinigt (s., 5.3.3). Templat wurden jeweils in verschiedenen Polymerasen-Ketten-Reaktionen (PCR) amplifiziert (s., 5.4.4, 5.4.5). Nach Beendigung der PCR wurden die Ansätze bei 37°C mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut und nachfolgend in kompetente DH5 α -Zellen transformiert (s., 5.3.2).

3.5.2 Identifizierung der klonierten Plasmide

Zur Detektion der W276R-Mutante wurde diese mit den Restriktionsenzymen EcoRI und AgeI in dem Reaktionspuffer O⁺ verdaut (s., 5.4.4). Die W276C-Mutante wurde mit einem einfachen NcoI-Verdau in dem Puffer O⁺ detektiert (s., 5.4.5). Die Verdauungen wurden entsprechend den zu erwartenden Fragmentgrößen auf 0.9% Agarosegele aufgetragen (s., 5.3.5) und sind in den Abbildungen 3.31 und 3.32 dargestellt.

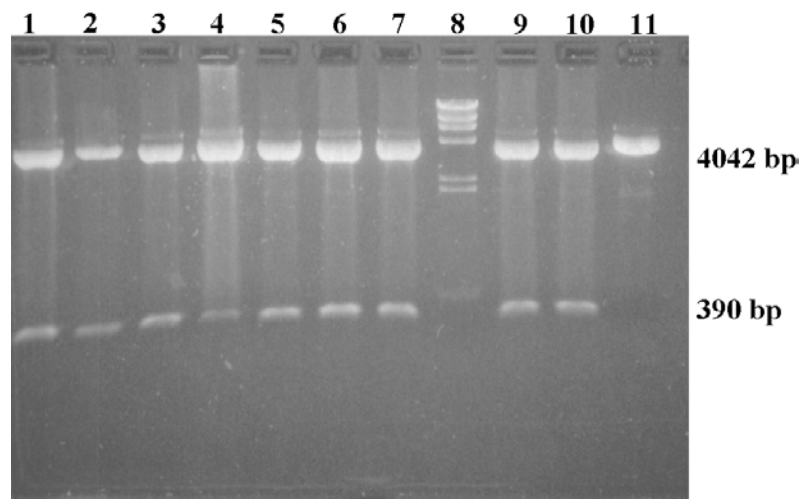


Abb. 3.31 0.9% TBE-Gel mit den AgeI/ EcoRI doppelt verdauten Plasmidproben pBDH-C69A/C242A und pBDH-W276R. Bahn 1-7, 9,10: verdaute W276R-Proben, Bahn 8: λ -DNA/ HindIII-Marker, Bahn 11: verdautes Templat (pBDH-C69A/C242A).

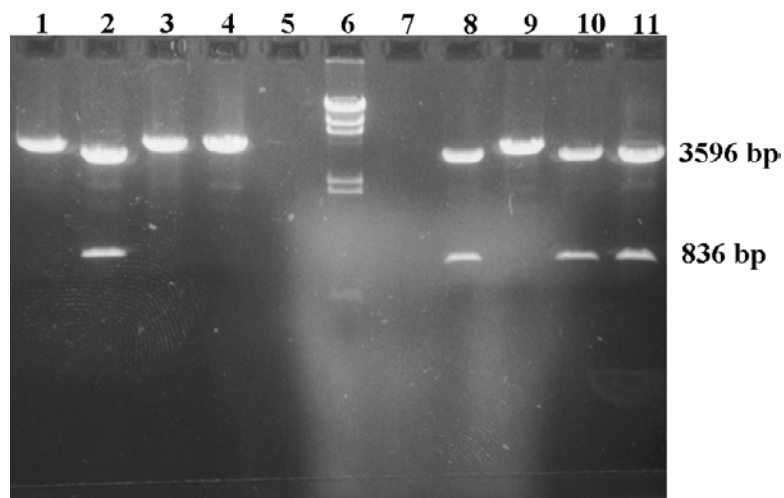


Abb. 3.32 0.9% TBE-Gel der NcoI verdauten Plasmidproben pBDH-C69A/C242A und pBDH-W276C. Bahn 1-4, 8-10: verdaute W276R-Proben, Bahn 6: λ -DNA/ HindIII-Marker, Bahn 11: verdautes Templat (pBDH-C69A/C242A).

Im Vergleich zum Templat auf Bahn 11, enthalten alle verdauten Proben die neue Schnittstelle AgeI. Nach dem Doppelverdau der W276R-Proben ergeben sich 2 Fragmente der Größen 4042bp und 390bp, was durch das in Abbildung 3.31 dargestellte Gel belegt wird.

Das Agarosegel in Abbildung 3.32 zeigt den NcoI-Verdau der W276C-Mutante und ihres Templats C69A/C242A, das auf Bahn 11 aufgetragen wurde. Vier der sieben verdauten PCR-Proben tragen die Mutation von Tryptophan nach Cystein (Bahn 1,3,4 und 9). Bei den Proben auf den Bahnen 2, 8 und 10 handelt es sich um nicht mutiertes Ausgangstemplat. Die entsprechenden Plasmidkarten sind im Anhang zu finden.

3.5.3 Expression, Isolierung und Aufreinigung der W276R-Mutante

Die Expression und Isolierung der Mutante pBDH-W276R wurde analog der in Abschnitt 5.5 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Mutante zeigte eine geringe spezifische Aktivität von etwa 10U/mg. Ob aber die stark verminderte enzymatische Aktivität durch eine Störung der vermutlichen Lipidbindungsstelle oder durch strukturelle Störung des Enzyms herbeigeführt wurde, musste noch überprüft werden. Aus diesem Grund sollte nun ein CD-Spektrum der W276R-Mutante aufgenommen werden.

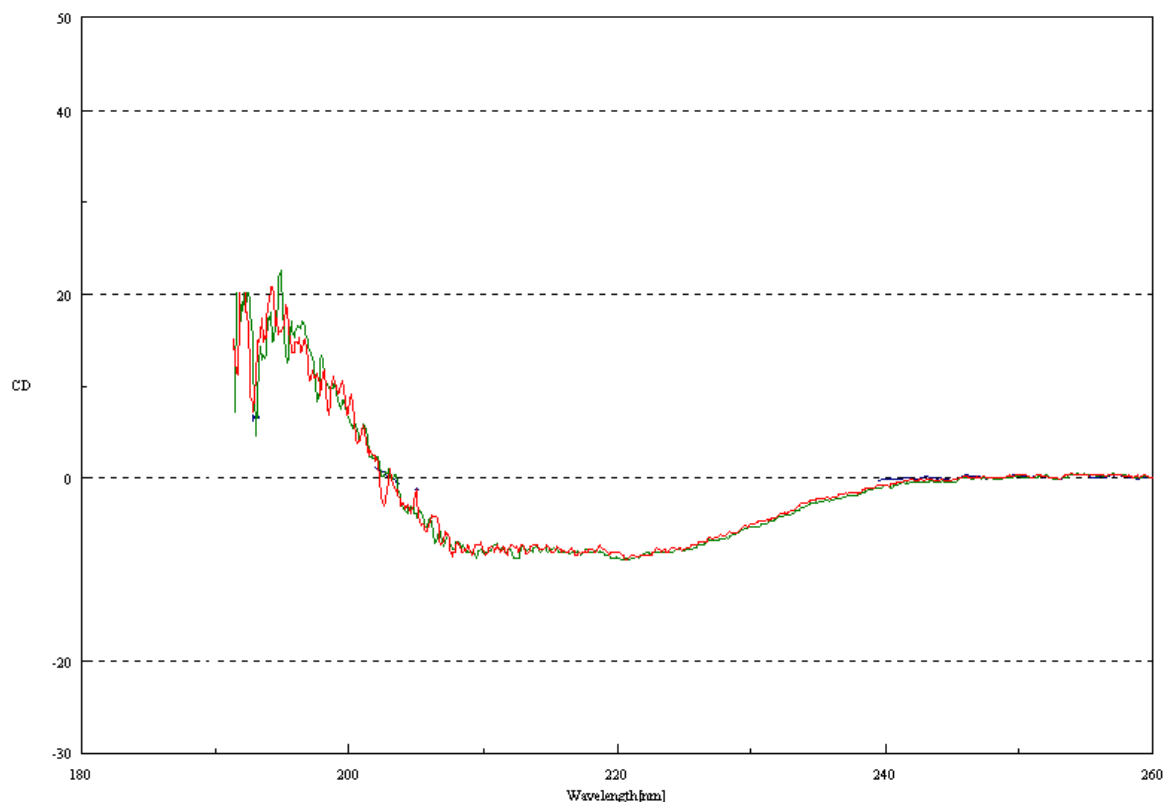


Abb. 3.33 CD-Spektrum der W276R- und C69A/C242A-Mutante. Die Konzentration der Proben war 4 μ M.

Aus der grafischen Darstellung (Abb. 3.33) geht hervor, dass die CD-Spektren der jeweiligen Mutanten nahezu identisch sind. Eine α -Helix hat ausgeprägte negative CD-Banden bei 208 und 222 nm und eine positive Bande bei 192 nm. Genau diese Charakteristika lassen sich aus den CD-Spektren entnehmen. Wäre die W276R-Mutante nicht gefaltet bzw. eine zufällig gefaltete Polypeptidkette, würde das Spektrum aus einer stark ausgeprägten negativen Bande bei 195 nm bestehen. Somit lässt sich feststellen, dass die W276R-Mutante im gefalteten Zustand vorliegt. Die Mutation hat keine wesentliche Störung der Struktur bewirkt, sondern scheint sich vielmehr auf die vermutliche Lipidbindungsstelle auszuwirken (Sreerama&Woody, 2000).

3.5.4 ESR-Spektroskopische Untersuchung der W276C-Mutante

Die W276C-Mutante, die nur ein Cystein enthält, wurde analog der in Abschnitt 5.5 ausführlich beschriebenen Methode isoliert. Sie konnte mit einer spezifischen Aktivität von 34U/mg isoliert werden. Dieser Befund war einerseits überraschend, da alle Cystein-Mutanten weit höhere spezifische Aktivitäten aufwiesen. Andererseits scheint die Mutation W276C sich stärker auf die Lipidbindung auszuwirken als vermutet. Gerade dieses Resultat sollte als weiterer Hinweis auf die Lokalisierung der vermuteten Lecithinbindungsstelle gewertet werden.

Die Spinmarkierung dieser Mutante wurde nach der in Abschnitt 5.11.2 beschriebenen Vorschrift durchgeführt. Das mit Enterokinase verdaute und in PC rekonstituierte Enzym wurde dialysiert. Nach Inkubation des BDH/ PC-Komplexes mit einem 10fachen molaren Überschuss an MTS-Spinlabel, wurde die Probe auf Aktivität geprüft. Im Vergleich zur verdauten und rekonstituierten Probe vor der Dialyse zeigte die modifizierte Probe einen 98% Verlust an Aktivität. Selbst unter hohen Substratbedingungen konnte die Aktivität nicht gesteigert werden.

Aufgrund der geringen Restaktivität der modifizierten Mutante mußte auf weiterführende ESR-Studien mit spinmarkierten Coenzymspinlabeln verzichtet werden. Dennoch kann natürlich von der mit MTS modifizierten Mutante ein ESR-Spektrum aufgenommen und zusätzlich simuliert (Abb. 3.34) werden.

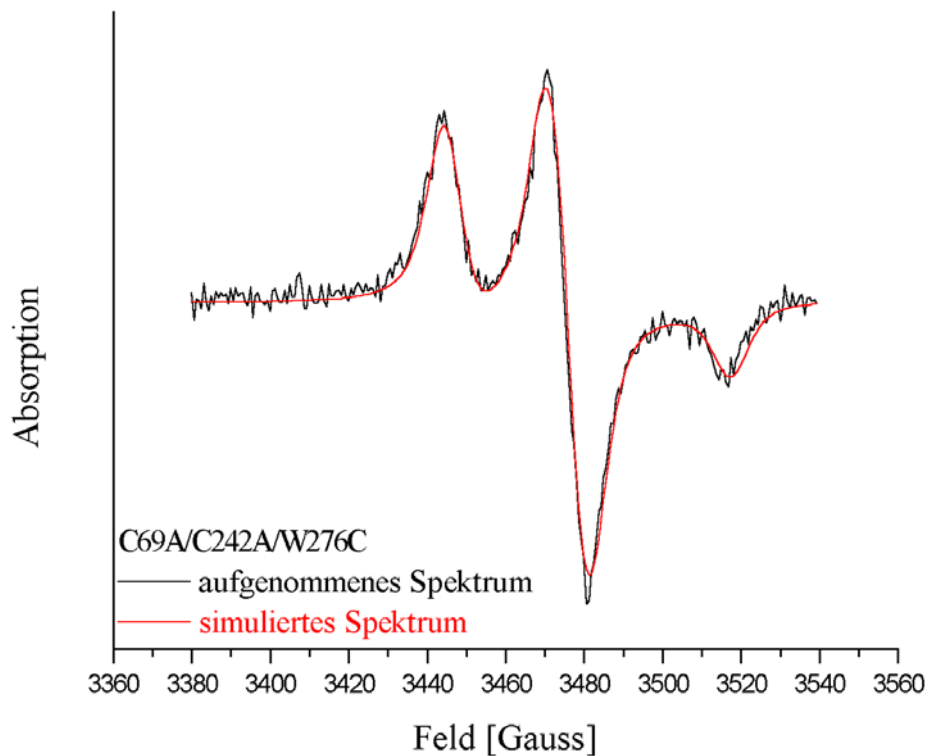


Abb. 3.34 Experimentell **aufgenommenes** und **simuliertes** Spektrum der C69A/C242A/W276C-Mutante (200 μ M). Die Aufnahmeleistung betrug 2 μ W. Die Simulationsparameter sind: g_{xx} 2.0101, g_{yy} 2.0063, g_{zz} 2.0028, A_{xx} 4.51G, A_{yy} 5.10G, A_{zz} 36.3G, Linienfkt. setzt sich aus Lorentz und Gauss der Breite 5.15G und 4.01G zusammen. Simulierter Abstand ergibt sich zu 21.0 \AA \pm 1.0 \AA .

Die Simulation des experimentell aufgenommenen Spektrums der spinmarkierten W276C-Mutante ergibt einen Abstand von etwa 21 \AA . Der Abstand deutet auf schwache Wechselwirkungen zwischen den spinmarkierten Positionen zweier benachbarter Untereinheiten hin. Interessanterweise ist dieser Abstand nahezu identisch mit dem Abstand zwischen spingelabelten Cysteinen 69 zweier benachbarter Untereinheiten. Leider lassen sich keine weitere Informationen ableiten, die nur für ein Modell sprechen würden. Allerdings könnte durch eine Doppelmutante, welche die Cysteine 242 und 276 enthält, eindeutig zwischen den Modellen unterschieden werden. In dem Modell, das auf der Kombination von 3 α ,20 β - und 17 β -HSD beruht, beträgt der Abstand zwischen diesen beiden Aminosäureresten weniger als 5 \AA . Im Vergleich dazu beträgt der Abstand im 3 α ,20 β -Modell der BDH mehr als 20 \AA .

Wichtiger als die gewonnene Abstandsinformation könnte die Erkenntnis sein, dass Tryptophan 276 vermutlich eine besondere Rolle bzgl. der Lecithinbindung einnimmt. Diese Vermutung stützt sich auf diese beiden Mutanten. Die cysteinfreie W276R-Mutante zeigte eine 10% Restaktivität, wobei eine strukturelle Destabilisierung ausgeschlossen werden kann. Die entsprechende Cystein-Mutante zeigte im Vergleich zu allen anderen Mutanten eine reduzierte enzymatische Aktivität. Des Weiteren wurde bei der spinmarkierten Mutanten eine 2% Restaktivität detektiert.

Um die Funktion des Tryptophans näher zu definieren, könnte ein Vergleich mit der Phospholipase A₂ aus Kobraschlangengift (PLA₂) hilfreich sein. Das Enzym hydrolysiert die C(2)-Fettsäure eines Triacylglycerins und wird durch PC-haltige Substrate aktiviert. Ortiz *et al.* postulierten eine spezifische Erkennungssequenz, die sich u.a. aus den benachbarten Aminosäuren WYEK (Reste 61, 63-65) zusammensetzt. Die aromatischen Reste können die positive Ladung an der Cholinkopfgruppe erkennen, wobei die elektronenreiche π -Systeme durch Kation- π -Wechselwirkungen stabilisierend wirken. Das Lysin fixiert die negative Phosphat-Gruppe. Die von uns vermutete Lecithinbindungsstelle umfasst die Aminosäuren DYYWWLR (Reste 273-279). Ein Vergleich der beiden Sequenzen könnte zu der hypothetischen Annahme führen, dass die Tyrosine und Tryptophane als elektronenreiche- π -Systeme ebenfalls eine stabilisierende Funktion ausüben. Des Weiteren könnte Arginin die Funktion des Lysins aus PLA₂ übernehmen. Diese Überlegungen sind aber rein spekulativ und können ohne weitere Daten nicht belegt werden.

4 Zusammenfassung

Die R-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (BDH) zeigt 25% Homologie zur 3 α ,20 β - und 30% Homologie zur 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Auf der Grundlage der Kristallstruktur der 3 α ,20 β - und in Kombination mit der 17 β -HSD wurden zwei Strukturmodelle erstellt. In dem ersten Teil meiner Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, welches dieser beiden Strukturmodelle die Struktur der BDH besser zu beschreiben vermag. Um Hinweise zur Beantwortung dieser Frage zu finden, sollten Abstandsmessungen auf ESR-spektroskopischer Grundlage durchgeführt werden (Abschnitt 3.3.2). Dazu mussten zunächst geeignete Cystein-Doppelmutanten molekularbiologisch konstruiert werden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Abstände zwischen den spinmarkierten Positionen (also Cysteinen) ca. 20Å betragen und die Struktur möglichst wenig gestört werden sollte, wurden Cystein-Doppelmutanten konstruiert. Die Mutanten wurden exprimiert, isoliert und aufgereinigt mit Ausbeuten und spezifischen Aktivitäten, die mit dem nativen Enzym vergleichbar waren. Die Mutanten wurden ESR-spektroskopisch untersucht und anschließend mit dem Programm DIPFIT, das unserem Arbeitskreis von Prof. H.-J. Steinhoff zur Verfügung gestellt wurde, simuliert. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass spinmarkierte Cysteine 69 zweier benachbarter Untereinheiten wechselwirken können, wurden die Simulationen aller Mutanten mit den Parametern, die aus der Simulation der C69A-Mutante ermittelt wurden, durchgeführt. Das Spektrum dieser Mutante, welche nur das Cystein 242 enthält, ist wechselwirkungsfrei. Die Ergebnisse der Simulationen der jeweiligen Mutanten sind in Tabelle 4-1 nochmals zusammengefasst.

Tabelle 4-1 Zusammenfassung der Abstände zwischen den gelabelten Positionen in den beiden Strukturmodellen.

BDH-Mutante	Abstände [Å]		
	3 α ,20 β -HSD	3 α ,20 β - und 17 β -HSD	Simulation
C242A	15-25		22.2
Y202C/C242A	>29	16.5	22.8
C69A/Y202C	14	>30	17.2
C242A/S246C	15	16.5	16.8

Die beiden Modelle unterscheiden sich in der N-terminalen Domäne, in der die NAD(H)-Bindungsstelle liegt, nur wenig voneinander. Der Abstand zwischen den benachbarten spinmarkierten Cysteinen 69 deutet auf schwache Wechselwirkungen zwischen zwei Untereinheiten hin. Aus den Modellen geht auch hervor, dass Cystein 69 in Nachbarschaft zum Adenosin-Ring des Coenzym liegt. Modifizierungsexperimente von Dalton *et al.* zeigten eindeutig, dass die spezifische Aktivität Cystein 69 modifizierter Enzyme in hohem Maße von der Größe des Modifizierungsreagenzes abhängt. Dies würde das $3\alpha,20\beta$ -BDH-Modell unterstützen, da der Abstand zwischen Cystein 69 und Coenzym in diesem Modell kleiner ist als im kombinierten Modell. Des weiteren lassen sich die aus den Spektren der Mutanten Y202C/C242A und C69A/Y202C ermittelten Abstände nur mit dem $3\alpha,20\beta$ -BDH-Modell vereinbaren. Die beiden Modelle unterscheiden sich erheblich im C-terminalen Bereich, was auch durch die bestimmten Abstände zum Ausdruck kommt. Modifizierungsexperimente (Dalton *et al.*, Dubois *et al.*, Hafeti *et al.*) und kinetische Daten (Chelius *et al.*) belegen eindeutig, dass das Cystein 242 in nächster Nähe zum Nicotinamidring des Coenzym und zur Substratbindungsstelle liegt. In diesem Punkt unterscheiden sich die beiden Strukturmodelle erheblich voneinander. Im kombinierten Modell ist der Abstand zwischen der Sulfhydrylgruppe des Cysteins 242 und dem Nicotinamidring praktisch doppelt so groß (etwa 20Å) wie im $3\alpha,20\beta$ -Modell. Die kinetischen Daten und auch die Modifizierungsexperimente lassen sich nur auf der Grundlage des $3\alpha,20\beta$ -BDH-Modell verstehen.

Um Abstände über größere Distanzen messen zu können, wurden Fluoreszenzstudien an Fluorescein markierten Mutanten durchgeführt. Da die Anisotropiemessungen eine Abhängigkeit der Anisotropie r von der Anregungswellenlänge enthüllten, führte diese Beobachtung zu der Vermutung eines Fluorescein-Resonanz-Energie-Transfers (Homotransfer). Da Abstandsbestimmungen aus Fluoreszenzstudien nur an wechselwirkungsfreien Systemen funktionieren, musste ein entsprechendes System gefunden werden. Das Ziel wurde weder durch ein Verdünnen mit PC noch mit ungelabeltem Protein erreicht. Dieses unerwartete Verhalten könnte dadurch erklärt werden, dass die BDH als Dimer von Dimeren in der Membran vorliegt (McIntyre *et al.*, 1978). Dann ist aber auch verständlich, dass infolge der Intersubunit Wechselwirkungen der Homotransfer nicht beeinflusst werden kann. Selbst ein Dimerenaustausch in einem Tetramer, hätte darauf keine Auswirkung. Vor allem das Verdünnungsexperiment mit ungelabeltem Protein spricht für diese Hypothese. Wird die Proteinstruktur durch Hitze und SDS denaturiert, reißt der Homotransfer ab. Red-Edge Experimente an Mutanten mit unterschiedlicher Labelstöchiometrie enthüllten eine starke Beeinflussung des Homotransfers, was

durch ein Ansteigen der Anisotropie r festgestellt werden konnte. Leider konnte in keinem Experiment das Phänomen vollkommen ausgelöscht werden. Somit war eine Abstandsbestimmung nicht möglich. Der Beweis, dass es sich tatsächlich um Homotransfer handelte, wurde durch ein Messen der Fluoreszenz-Lifetime erbracht.

Des Weiteren wurden NADH-Titrations an dem Enzym aus Rinderherz und Menschenherz durchgeführt. Die Dissoziationskonstanten $K_D(\text{NADH})$ wurden ausschließlich aus den grafischen Darstellungen der relativen Fluoreszenzerhöhung der jeweiligen Mutanten bestimmt.

Tabelle 4-2 Tabellarische Darstellung der aus den relativen Fluoreszenzerhöhungen bestimmten Dissoziationskonstanten $K_D(\text{NADH})$. MMM: Monomethylmalonat. n.b. nicht bestimmt.

Symbol	Mutante	K_D [μM]
▲	BH-BDH (+ 50mM MMM)	0.54
■	BH-BDH	6.70
◆	His-HH-Wildtyp	0.78
▼	HH-Wildtyp	1.60
●	His-C69A (+ 50mM MMM)	3.30
✱	His-C242A (+ 50mM MMM)	n.b.

Es wurde festgestellt, dass der $K_D(\text{NADH})$ -Wert der BH-BDH in Anwesenheit von Monomethylmalonat (MMM) etwa 12mal größer ist als in Abwesenheit des Substratinhibitors. Dies zeigt, dass NADH in Gegenwart von MMM anscheinend optimal an das rekonstituierte Enzym bindet. Ein Vergleich von HisHH-BDH (◆) mit HH-BDH (▼) zeigt klar, dass der Histag für eine verminderte NADH-Fluoreszenz verantwortlich ist. Dennoch wurde auch in Gegenwart des Histags ein Energietransfer festgestellt. Eine wichtige Erkenntnis liefert ein Vergleich von BH-BDH und HH-BDH. Die NADH-Emission erfährt in der BH-BDH eine größere Verstärkung. Eine mögliche Erklärung könnte eine leicht unterschiedliche Umgebung um die NADH-Bindungstasche sein. Auffällig ist, dass die $K_D(\text{NADH})$ -Werte von HH-BDH (▼) und BH-BDH (■) enorm voneinander abweichen. Die unterschiedlichen $K_D(\text{NADH})$ -Werte der HH-BDH (mit ◆ und ohne ▼ Histag) sind vermutlich auf den Histag zurückzuführen.

Zusätzlich wurden weitere Studien an den HisBDH-Mutanten C69A (●) und C242A (✱) durchgeführt. Die Mutation von C69A resultiert in einer etwa 4mal größeren Dissoziati-

onskonstanten. Dies lässt sich durch die Nachbarschaft der Position 69 zum Adenosin-Ring des Coenzym erklären. Im Vergleich zur C242A-Mutante wirkt sich die Punktmutation C69A kaum aus. Hier konnte infolge der Punktmutation kein Energietransfer von den Tryptophanen zum NADH festgestellt werden. Dennoch konnte ein Löschen der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz detektiert werden. Eine mögliche Erklärung lieferten McIntyre *et al.* Sie vermuteten, dass aufgrund ihrer Modifizierung des Cysteins 242 (hier: Punktmutation C242A) das Coenzym eine ungünstige Orientierung zu den Tryptophanen einnimmt und somit einen Energietransfer unmöglich macht.

Die C-terminale Domäne zeigt nahezu keine Homologie zu einer bekannten Sequenz. Sie wird in Zusammenhang mit der Lipidabhängigkeit des Enzyms diskutiert. Die von uns vermutete Lecithinbindungsstelle umfasst die Sequenz DYYWWLR. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst infolge einer drastischen Mutation die Mutante W276R kloniert. Expression, Isolierung und Aufreinigung wurden wie üblich durchgeführt. Diese Mutante zeichnet sich durch eine stark verminderte enzymatische Aktivität aus. Ein Vergleich des CD-Spektrums der W276R-Mutante mit dem Spektrum der enzymatisch hoch aktiven C69A/C242A-Mutante belegt, dass sie sich im gefalteten Zustand befindet. Somit kann vermutet werden, dass infolge der Mutation von Tryptophan zu Arginin der Bindungsprozess des Enzyms an Lecithin erschwert ist. Da sie eine etwa 10% Restaktivität aufzeigt, ist die Bindung an das Lipid nicht vollständig blockiert. In einer weiteren gezielten Mutagenese wurde Tryptophan gegen Cystein ausgetauscht. Nach Expression, Isolierung und Aufreinigung der W276C-Mutante wurde eine enzymatische Aktivität von 34% im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Spinmarkierung dieses Cystein inaktiviert die Mutante (etwa 1% Restaktivität). Das enzymatische Verhalten der beiden Mutanten, insbesondere der spinmarkierten W276C-Mutante, lässt sich auf der Basis erklären, dass Tryptophan 276 entweder aktiv am Bindungsprozess Lipid-Protein beteiligt oder aber in nächster Nähe zur Bindungsstelle gelegen ist.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 E. coli Stämme

Stamm	Genotyp	Literatur
DH5 α	F ⁻ , v80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>supE44</i> , 8 ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hannahan, 1983]
BI21(DE3)	E.coli B F ⁻ dcm ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal λ (DE3)	Stratagene
BI21(DE3)GOLD	E.coli B F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal λ (DE3) endA Hte	Stratagene

5.1.2 Plasmide und Vektoren

Tabelle 5-1 Auflistung aller benutzten Plasmide sowie Mutationen.

Plasmid	Mutation
pBDHC69A ^[1]	C69A
pBDHC242A ^[2]	C242A
pBDHY202C	C69A/Y202C/C242A
pBDHW276R*	C69A/C242A/W276R
pBDHW276C*	C69A/C242A/W276C
pBDHWT ^[3]	
pBDHC69A/C242A ^[4]	C69A/C242A
pBDHY202C/C242A	Y202C/C242A
pBDHC69A/Y202C	C69A/Y202C
pBDHC69A/S246C*	C69A/S246C

Die mit * gekennzeichneten Plasmide liegen ausschließlich im pUC-Vektor vor. Die BDH-Sequenzen der restlichen Mutanten wurden zusätzlich auch in den pET3d-Vektor inkloniert. Zur Unterscheidung der im pUC- bzw. pET-System inklonierten Mutanten, werden nachfolgend die Mutanten, die sich im pET-System befinden, mit einer der Mutation vorangestellten pET-Abkürzung bezeichnet; d.h. pET-C69A (pBDH-C69A wäre im pUC-Vektor). Die in **Tabelle 5-1** nummerierten Plasmide [1] bis [4] wurden von Dr. Oliver McIntyre in den pET-Vektor inkloniert und freundlicherweise unserem Arbeitskreis zur Verfügung gestellt.

5.1.3 Oligonukleotide und Sequenzierung

Tabelle 5-2 Auflistung der zur Klonierung benutzten Primer

Primer	Länge	Sequenz
Markus1a ^[1]	28mer	5'-CTGCCACCAGCCTCTGCAGCCCTGAGAG-3'
Markus1b ^[2]	28mer	5'-CTCTCAGGGCTGCAGAGGCTGGTGGCAG-3'
cterm1	30mer	5'-CCATGGACTACTACCGGTGGCTGCGAATGC-3
cterm2	30mer	5'-GCATTCGCAGCCACCGGTAGTAGTCCATGG-3'
W276c1	33mer	5'-GCTACCACCCAATGGACTACTACTGCTGGCTGC-3'
W276c2	33mer	5'-GCAGCCAGCAGTAGTAGTCCATTGGGTGGTAGC-3'

Die Oligonukleotide [1], [2] wurden bei der Firma Pharmacia Biotech, alle anderen Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen. Das Lyophilisat wurde in H₂O_{bidest} aufgenommen und die Konzentration durch UV-Absorptionsmessung bestimmt.

Alle klonierten Plasmide wurden von der Firma MWG-Biotech sequenziert. In Abhängigkeit der Lage der Mutation auf dem Plasmid wurde mit Standardprimern sequenziert. Nicht-Standardprimer wurden von MWG-Biotech synthetisiert und anschließend zum sequenzieren benutzt. Die sequenzierten Daten und die Soll-Sequenz wurden mit Hilfe des Programms Chromas miteinander verglichen.

5.1.4 Enzyme

Enzyme	Firma	Puffer
AgeI	MBI-Fermentas	O ⁺
DpnI	Stratagene bzw NEB	
Eco81I	MBI-Fermentas	One-Phor-All
EcoRI	MBI-Fermentas	One-Phor-All
λ-DNA/ HindIII-Marker	MBI-Fermentas	
HpaI	MBI-Fermentas	Y ⁺
NcoI		
NheI	MBI-Fermentas	
PstI	MBI-Fermentas	O ⁺
XhoI	MBI-Fermentas	
T4-DNA-Ligase	MBI-Fermentas	
PfuPolymerase	Stratagene	cloning buffer
PfuTurboPolymerase	Stratagene	cloning buffer
DNase	Sigma	
Enterokinase	Novagen	
RNase	USB/ Amersham	

5.1.5 Medien

Agar	ICN Biochemicals Inc., Ohio
Ampicillin	Sigma
Bacto- Trypton (-Pepton)	Difco
Yeastextract	Fluka

5.1.6 Chemikalien

Acrylamidlösung Rotipuran	Roth
Agarose	Serva
BSA	MBI-Fermentas
β-Mercaptoethanol	Serva
DEAE Sepharose CL-6B	Pharmacia-Biotech

DTT	Serva
Fluorescein F150	Molecular Probes
Hi-Trap Säulen	Pharmacia-Biotech
R,S Hydroxybutyrat	Fluka
Iodessigsäure	Roth
IPTG	Roth
n-Octylglucosid	Calbiochem
NAD	
PMSF	Roth
Rubidiumchlorid	Fluka
SeaPlaque GTG Agarose	FMC Products
Sephadex [®] G25 fine	Pharmacia Biotech

Alle nicht aufgeführten Chemikalien waren im Arbeitskreis Trommer vorhanden oder wurden über die Chemikalienausgabe der Universität Kaiserslautern bezogen.

5.1.7 Weitere Materialien

Dialyseschlauch	Roth
SnakeSkin	Pierce
QIAprep Spin Kit	Qiagen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
Plasmid Isolation Kit	Promega

5.1.8 Geräte

Geräte	Bezeichnung	Firma
Autoklaven	RTX 182	Ebro
	Dampfkochtopf	Sitram
Brutschrank		Memmert
Elektrophoresezubehör	Elektrophoresekammer	Biorad
	Sofortbildkamera DS 34	Polaroid
Fluoreszenz-Spektrometer		
French Press	French Pressure Cell	Aminco

	EmulsiFlex	
Geltrockner	2003 Slab Gel Dryer	LKB
Inkubatoren	Luftschüttler	New Brunswick Scientific
	Wasserbadschüttler	Innova
Photometer	DU-640	Beckman
Rotoren	JA-10, JA 14, JA-20	Beckman
Spannungsgerät	PowerPac 3000	BioRad
Waagen	Feinwaage 1601 MP8-1	Satorius
	1204 MP	Satorius
Zentrifugen	Eppendorffzentrifuge 5415 C	Eppendorf
	J2-21	Beckman

5.2 Kultivierung und Lagerung

5.2.1 Autoklavieren

Medien mit einem Volumen von bis zu 500 ml wurden in einem 10 l Dampfdrucktopf bei 121°C und 1.5 bar für 20 Minuten autoklaviert, größere Mengen in einem Autoklav der Firma Ebron bei 121°C und 1.5 bar für 30 Minuten.

5.2.2 Flüssigmedien (Sambrook *et al.*)

LB-Medium:

10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl
 pH 7.5 mit 1 M NaOH; ad 1000 ml mit H₂O bidest

YT-Medium:

16 g Bacto-Trypton
 10 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 pH 7.5 mit 1 M NaOH; ad 1000 ml mit H₂O bidest

Antibiotikum, IPTG, RNase und DNase:

Ampicillin-Stock: 150 mg/ml in H₂O_{bidest}

Das Antibiotikum wurde durch einen 0.45µm Filter steril filtriert und bei –20°C gelagert. Da das Ampicillin nicht autoklaviert werden konnte, mussten die Medien vor Zugabe des Antibiotikums unter 50°C abgekühlt sein. Die Endkonzentration des Ampicillins in den Flüssigmedien lag zwischen 100 – 150 µg/ml.

5.2.3 Festmedien

Zur Herstellung der Agarplatten wurden dem Flüssigmedium 1.5% Agar zugesetzt. Dem autoklavierten Medium wurde bei einer Temperatur von ca. 50°C Ampicillinlösung bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt.

5.2.4 Kulturbedingungen**5.2.4.1 Flüssigmedium:**

Es wurden einzelne Kolonien unter sterilen Bedingungen von den Agarplatten in das gewünschte Medium überführt. Die Kulturen wurden bei 30-37°C und 210 bis 300 rpm in einem Wasserbadschüttler oder Luftschtüttler inkubiert. Außerdem wurde darauf geachtet, daß die sterilen Erlenmeyerkolben mit maximal 10 % Flüssigkultur befüllt wurden.

5.2.4.2 Festmedium:

Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Die beimpften Platten wurden eine Woche bei 4°C aufbewahrt. Die unbeimpften Platten konnten bis zu zwei Monaten bei 4°C gelagert werden.

5.2.4.3 Glycerinkulturen:

500 µl 80% autoklaviertes Glycerin und 500 µl einer Übernachtskultur, die sich noch im exponentiellen Wachstum befand, wurden in sterilen Kryoröhrchen gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kulturen wurden bei – 80°C aufbewahrt. Des weiteren wurde jede Glycerinkultur nur zweimal für einen Verdünnungsaufstrich benutzt.

5.2.5 Wachstumsmessungen

Eine indirekte Bestimmung der Bakterienzahl ist die Trübungsmessung einer Bakteriensuspension. Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass sichtbares Licht beim Durchtritt durch die Bakteriensuspension zum Teil gestreut wird, wobei die Streuung von der Zahl, der Größe und der Form der Bakterien abhängig ist (Süßmuth *et al.*, 1987). Diese Lichtschwächung wird durch einen Vergleich mit einem unbeimpften Medium spektrometrisch bei 595nm bestimmt und als optische Dichte (OD_{595}) bezeichnet. Kulturen mit einer hohen optischen Dichte (ab 0.9 OD_{595}) mussten mit Wasser verdünnt werden. Die Bestimmung der OD_{595} erfolgte mit einem Spektrometer DU-640 der Firma Beckman.

5.3 Allgemeine Arbeitsmethoden

5.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

Um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erreichen, wurden die Zellen nach der Rubidiumchloridmethode (Hanahan, 1983) kompetent gemacht.

TFB1

30 mM KAc
10 mM $CaCl_2$
15% (w/v) Glycerin
50 mM $MnCl_2$
100 mM RbCl
pH 5.8 mit HAc

TFB2

10 mM MOPS
75 mM $CaCl_2$
15% (w/v) Glycerin
10 mM RbCl
pH 6.5 mit 1M KOH

10 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 300 rpm im Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden 250 ml LB-Medium, das 20 mM $MgSO_4$ enthielt, mit 2.5 ml frischer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Um die Zellkultur in der praeexponentiellen Phase zu halten, wurde die Kultur 30 Minuten in Eiswasser gelagert.

Die nachfolgenden Arbeitsschritte mussten mit gekühlten Materialien und Lösungen im Kühlraum durchgeführt werden. Die Zellkultur wurde auf zwei sterile Zentrifugenbecher aufgeteilt und 5 Minuten in einem JA14-Rotor bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Nach dem vollständigen

digen Entfernen des Überstandes, wurde das Pellet vorsichtig mit einer Pasteurpipette in 2 ml TFB1-Lösung resuspendiert. Danach wurde jeweils mit TFB1 auf 25 ml aufgefüllt und 15 Minuten in Eiswasser inkubiert. Die vereinigten Suspensionen wurden 5 Minuten bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das in 10 ml TFB2-Lösung resuspendierte Pellet 1 Stunde in Eiswasser gelagert. Die Zellsuspension wurde anschließend in 100 µl Aliquote aufgeteilt und bei -80°C gelagert werden.

5.3.2 Transformation von Plasmid-DNA

100 µl kompetenter Zellen wurden in Eiswasser aufgetaut. Nach Zugabe der gewünschten DNA-Lösung wurde die Suspension gemischt und 30-60 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte 3 Minuten bei 42°C ein Hitzeschock. Anschließend wurden die Zellen 2 Minuten erneut auf Eis gelagert. In 16 mm Reagenzgläsern wurde 1 ml LB-Medium vorgelegt und die Zellsuspension zupipettiert. Die transformierten Zellen wurden 1 Stunde bei 37 °C und 170 rpm im Schüttler inkubiert. Danach wurden 50 bis 150 µl Zellkultur auf ampicillinhaltigen Platten mit einem Drygalski-Spatel ausgestrichen. Die restliche Lösung wurde auf LB-Platten ausgestrichen.

Als Positivkontrolle wurde ein unverdautes Plasmid transformiert und ausplattiert. Ein linearisiertes Plasmid diente dagegen als Negativkontrolle. Bei Selektion auf Antibiotikaresistenz wurden kompetente Zellen auf LBA-Medien ausplattiert. Alle ausgestrichenen Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

5.3.3 Plasmidpräparationen

Die Isolierung ligierter und amplifizierter DNA erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989).

2 bis 5 ml einer frischen Übernachtskultur wurden in sterile Eppendorfgefäße überführt und 30 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde vollständig abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 100 µl eiskalter Sol1 homogen resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl frisch hergestellter Sol2, ein Lysepuffer, zugegeben. Die Probe wurde zur Durchmischung mehrfach gedreht und 5 Minuten auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 150 µl Sol3 wurde die Probe vorsichtig gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Der dabei entstehende weiße Niederschlag setzt sich aus chromosomaler DNA, Zelltrümmern und Proteinen zusammen. Anschließend wurde 5 Minuten bei 14000 rpm

und 4°C zentrifugiert. Das klare Lysat wurde in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an Phenol/ Chloroform-Lösung versetzt. Nach kurzem Vortexen und 2minütiger Zentrifugation bei 8000 rpm wurde die wässrige Phase in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 2 Volumina 99% Ethanol konnten die Plasmidmoleküle nach ca. 30minütiger Lagerung bei -20°C ausgefällt werden. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach dem vollständigen Entfernen des Überstandes, wurde das Pellet für ca. 10 Minuten im Exsikator getrocknet. Das farblose Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer pH 8, der 20 µg/ml RNase enthielt, kurz gevortext und bei -20°C gelagert.

Sol1

50mM Glucose
10mM EDTA
25mM TrisHCl pH 8

Sol2

1% SDS in 0.2 N NaOH

Sol2

60 ml 5M KAc
11.5 ml Eisessig
28.5 ml H₂O_{bidest}
pH 5.8 (gegebenenfalls mit Essigsäure conc. einstellen)

TE-Puffer

1 mM EDTA
10 mM TrisHCl pH 8

DNA-Proben zur Sequenzierung und Amplifizierung wurden mit dem käuflichen System Qiaprep Spin Kit von Qiagen durchgeführt. Das Verfahren beruht auf der Bindung von DNA an eine Silicagel-Matrix. Nach einem Aufreinigungsschritt konnte die DNA mit EB-Puffer oder H₂O_{bidest} von der Säule eluiert werden.

Die Isolierung der DNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. 2 ml einer frischen Übernachtskultur wurden in einem Eppendorfgefäß 30 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in P1-Puffer resuspendiert. Zu der Bakteriensuspension wurden nacheinander jeweils 250 µl P2-Puffer gegeben, kurz gemischt,

350 µl N3-Puffer zugegeben und 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine Säule pipettiert und 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 750 µl PE-Puffer wurde zweimal bei 14000 rpm zentrifugiert, da auch die letzten Flüssigkeitsreste von der Säule entfernt werden sollten. Nach diesem Reinigungsschritt konnte die aufgereinigte DNA in 50 µl EB-Puffer (10 mM TrisHCl pH 8.5) oder H₂O_{bidest} von der Säule eluiert werden.

5.3.4 Restriktionsverdau von DNA mit Endonukleasen

Für den Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen eingehalten und die mitgelieferten 10xRestriktionspuffer benutzt.

Ein Standardansatz für analytische und präparative Spaltungen setzte sich wie folgt zusammen:

- 2 µl 10xPuffer
- 2-3 µl DNA
- 1 µl Enzym (5-10 U/µl)
- ad 20 µl dH₂O

Der Verdau der DNA wurde bei der empfohlenen Temperatur durchgeführt. Die Reaktion wurde durch eine zehninütige Inkubation im Wasserbad oder nach Zugabe von 2 µl 200 mM EDTA-Lösung (pH 7) gestoppt.

Bei einem Doppelverdau mussten die Reaktionsbedingungen der eingesetzten Endonukleasen aufeinander abgestimmt werden, da die Aktivität eines Enzyms entscheidend von dem benutzten Reaktionspuffer anhängig ist. Es musste daher darauf geachtet werden, dass die Aktivität der eingesetzten Enzyme bei mindestens 50% lag.

Dies konnte dadurch erreicht werden, dass zunächst eines der beiden Enzyme in einem höher konzentrierteren Puffer zugesetzt wurde. Nach ca. 1 Stunde wurde das zweite Restriktionsenzym zugegeben. Als Kontrollreaktion wurden die beiden Enzyme getrennt in dem gewählten Puffersystem eingesetzt.

5.3.5 Agarosegelelektrophorese

Elektrophoresepuffer:

TBE-Puffer:

0.089 M Tris

0.089 M H₃BO₃

0.002 M EDTA

pH 8.3 mit H₃BO₃

Loading Dye:

0.25 % Bromphenolblau

0.25 % Xylenblau

30 % Glycerin in H₂O_{bidest}

50 mM EDTA

Die vermutlich wichtigste Methode zur Untersuchung von DNA-Molekülen ist die Elektrophorese in Agarose- oder Polyacrylamidgelen. Die Geschwindigkeit, mit der sich DNA im elektrischen Feld auf die Anode zu bewegt, hängt von unterschiedlichen Bedingungen ab. Neben der Struktur der DNA spielt die Größe eine entscheidende Rolle. Lineare, doppelsträngige DNA wandert durch die Agarose-Matrix mit Geschwindigkeiten, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größen sind. Weiter hängt die Mobilität der Banden im Feld von der Konzentration der Agarose ab. Die Auftrennung unterschiedlich großer DNA-Fragmente lässt sich über die Agarosekonzentration beeinflussen.

Tabelle 5-3 Abhängigkeit der Auftrennung unterschiedlich großer Fragmente von der Agarosekonzentration

Agarosekonzentration [%]	Größe linearer DNA [kbp]
0.9	0.4 – 7
1.5	0.2 – 4
2.0	0.1 - 3

Durch die UV-Fluoreszenz des interkalierenden Agens Ethidiumbromid werden die DNA-Banden im Gel sichtbar.

Durchführung:

In einem Erlenmeyerkolben wurde die entsprechende Menge an Agarose in 70 ml TBE-Puffer erhitzt, bis die Suspension aufklarte. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 50°C erfolgte die Zugabe von 3.5 µl Ethidiumbromidlösung der Stammkonzentration von 10 mg/ml. Das Gel wurde in einer entsprechenden Form gegossen und der Kamm in der Lösung positioniert. Nach ca. 45 Minuten konnte der Kamm aus der festen Agarose gezogen und das Gel in die Elektrophoresekammer überführt werden. Die vorbereiteten Proben wurden 10 Minuten bei

65°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele fotografiert.

Für präorative Gele konnten ausschließlich TBE-Gele und Puffer benutzt werden, da die DNA aus der Gelmatrix isoliert wurde. Dazu wurden nach der Elektrophorese die entsprechenden Fragmente mit einem Skalpell aus dem TBE-Gel herausgeschnitten und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Dabei ist zu beachten, dass die Agarosestückchen, welche die DNA enthielten, nicht über die Arbeitsfläche geschoben werden, da das Fragment mit anderer DNA verunreinigt werden könnte. Außerdem sollte die DNA nur so kurz wie möglich dem UV-Licht ausgesetzt werden, um Mutationen zu verhindern.

Probenvorbereitung:

Unverdaute Plasmide und DNA-Marker-Lösungen wurden mit TE-Puffer auf 20 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 7 µl vorbereiteter Loading Dye Lösung zugesetzt.

Zu den PCR-Proben und den verdauten DNA Ansätzen wurde direkt 7 µl Loading Dye Lösung zugesetzt. Die Zuordnung der verschiedenen Banden erfolgte durch Vergleich mit DNA-Fragmenten bekannter Größe.

5.3.6 DNA-Größenstandards

Zur Abschätzung der verdauten und unverdauten DNA-Fragmente, wurde der λ-DNA/HindIII-Marker benutzt.

Tabelle 5-4 λ-DNA/ HindIII Markerfragmente

Bande	Fragment [bp]
1	23130
2	9416
3	6557
4	4361
5	2322
6	2027
7	564
8	125

5.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Konzentrationsbestimmung der DNA und der gelieferten Oligonukleotide erfolgte spektralphotometrisch durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums im Bereich von 230 nm bis 310 nm. Dazu wurde die Differenz der Extinktion bei 260 nm und 300 nm (Basislinie) gebildet und die folgende mathematische Beziehung ausgenutzt:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml dsDNA}$$

$$1 \text{ OD}_{260} = 33 \text{ } \mu\text{g/ml ssDNA}$$

5.3.8 Elution von DNA aus Agarosegelen

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus Gelen wurde das käufliche System QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen benutzt. Die DNA-Fragmente konnten aus TAE- und TBE-Agarosegelen nach dem Protokoll des Herstellers wie folgt isoliert werden.

Das aus einem präparativen Agarose-Gel ausgeschnittene DNA-Fragment wurde in ein steriles Eppendorfgefäß überführt, gewogen und anschließend mit Puffer QG versetzt (100 mg Gel in 300 μl Puffer). Während einer 10minütigen Inkubationszeit bei 50°C, musste die Probe mehrfach kurz gevortext werden. Die resuspendierte Lösung wurde auf eine Spinsäule aufgetragen und 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss konnte verworfen werden. Nach Zugabe von 750 μl PE-Puffer wurde zweimal für jeweils 1 Minute zentrifugiert. Die DNA konnte nun von der Spinsäule mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ von der Säule eluiert werden. Falls die zu eluierende DNA für eine blunt-end Ligation eingesetzt werden sollte, wurde anstatt des bidestillierten Wassers EB-Puffer benutzt.

5.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Für eine Zwei-Fragment-Ligation wurde ausschließlich T4-DNA-Ligase benutzt. Das Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen der 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppe in doppelsträngiger DNA. Die Ligase besitzt außerdem die Fähigkeit sowohl sticky-ends als auch blunt-ends zu ligieren.

Zur Ligation von DNA-Fragmenten musste zunächst die DNA aus der Gelmatrix isoliert werden (s., 5.3.8). Danach wurden der isolierten DNA nacheinander 10xLigasepuffer, dH_2O und T4-DNA-Ligase zugesetzt. Die Ligationsansätze wurden 2 Stunden bei 37°C und anschlie-

ßend über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10minütiges Erhitzen beendet. Zur Überprüfung des Ergebnisses wurde ein Aliquot des Ligationansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen. Der restliche Ansatz wurde in kompetente Zellen transformiert (s. 5.3.2).

5.4 Klonierung der Plasmide

Die gezielte Mutagenese wurde nach der QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Methode der Firma Stratagene durchgeführt. Sie zeichnet sich vor allem gegenüber der früher benutzten Kunkel-Methode dadurch aus, dass die Mutation direkt auf dem Plasmid durchgeführt werden kann (Stratagene, 1997). Die Klonierung eines DNA-Fragments in einen M13Phagen entfällt somit. Die nachfolgenden Arbeitsschritte entsprachen dem Protokoll des Herstellers und erfolgten ausschließlich im pUC-Vektor..

Polymerase: PfuTurboPolymerase (2.5 U/µl)

Restriktionsenzym: DpnI (5-10 U/µl)

dNTP (N = A, C, G, T) jedes Nukleotid 2.5 mM

10xReaction Buffer für Polymerase:

100 mM KCl

60 mM (NH₄)₂SO₄

200 mM Tris-HCl (pH 8.0)

20 mM MgCl₂

1% Triton® X-100

100 µg/ml BSA (nukleasefrei)

5.4.1 Konstruktion des Plasmids pBDH-Y202C

Primerdesign:

Die für diese Methode der gezielten Mutagenese benötigten Primer sollten nach dem Protokoll des Herstellers spezielle Bedingungen erfüllen (**Stratagene, 1997**). So mussten beide Primer die gewünschten Mutationen tragen und in der gleichen Region an die gegenüberliegenden DNA-Stränge binden. Des Weiteren sollten die Primer eine Schmelztemperatur T_M von ca. 78°C aufweisen. Die für das Design des Plasmids pBDH-Y202C benötigten Primer (s.

5.1.3 Tabelle 5-2) wurden so gewählt, dass zusätzlich zum Cysteinocodon eine PstI-Schnittstelle entstand. Diese neue Schnittstelle diente einzig zum Screening der klonierten Mutante.

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):

Die in der PCR zu amplifizierende DNA wurde nach der Qiagen-Methode (s., **5.3.3**) isoliert und aufgereinigt. Zur Durchführung der PCR wurden die benötigten Lösungen, wie in **Tabelle 5-5** angegeben, in spezielle PCR-Reaktionsgefäße der Firma Biozym pipettiert.

Tabelle 5-5 Pipettierschema für PCR

10xReaction Buffer	5 µl
dNTP-Mix (jedes 2.5 mM)	1 µl
pBDH-C69A/C242A (5ng/µl)	5-15 µl
Markus1a (125 ng/µl)	1 µl
Markus1b (125 ng/µl)	1 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl
PfuTurbo Polymerase (2.5 U/µl)	1 µl

Tabelle 5-6 Zusammenfassung der PCR-Parameter zur Konstruktion des Plasmids pBDH-Y202C

Segment	Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]	Zyklenanzahl
1	95	3	1
	95	1	
2	65	1	17
	72	4.5	
3	72	10	1
	4	2	

Die PCR-Ansätze wurden vor und nach der PCR auf Eis gelagert. Nach Beendigung des PCR-Programms wurde ein Aliquot der amplifizierten Probe auf ein 0.9% Agarosegel aufgetragen (s., **5.3.5**), um den Erfolg des Experiments zu überprüfen. Die restliche PCR-Probe wurde bei 37°C für 2 Stunden mit 1-2 µl des Restriktionsenzym DpnI inkubiert. Die Endonuklease DpnI erkennt nur alkylierte Sequenzen. Für den PCR-Ansatz bedeutet dies, dass nur die parentale DNA, das Templat, verdaut wird und nicht die neu amplifizierte DNA. Das DpnI-verdaute PCR-Produkt wurde in 100 µl kompetente DH5α transformiert (s., **5.3.2**).

Identifizierung des Plasmids pBDH-Y202C durch Restriktionsverdau:

Zur Kontrolle des neu klonierten Plasmids wurde dieses mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease verdaut.

Puffer O⁺:

10 mM MgCl₂
 100 mM NaCl
 0.1 mg/ ml BSA
 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 37°C)

PstI-Verdau:

15 µl H₂O_{bidest}
 2 µl Puffer O⁺
 2 µl DNA
 1 µl PstI

Die Proben wurden 2 Stunden bei 37°C verdaut und bis zum Auftragen auf ein TBE-Gel auf Eis gelagert. Die sich anschließende Agarosegelelektrophorese ist in Abschnitt **5.3.5** beschrieben.

Vorbereitung zum Sequenzieren:

Zur weiteren Minimierung der eventuell durch die PCR entstandenen Mutationen wurde die Sequenz um die gewünschte Mutation aus dem Plasmid pBDH-Y202C herausgeschnitten und mit dem entsprechend verdauten Fragment des Plasmids pBDH-C69A/C242A ligiert.

Puffer Y⁺:

10 mM MgAc₂
 66 mM KAc
 0.1 mg/ ml BSA
 33 mM Tris-Acetat (pH 7.9 bei 37 °C)

Eco81I/ XhoI-Verdau:

14 µl H₂O_{bidest}
 4 µl Y⁺
 1 µl DNA
 1 µl XhoI
 2.2 µl Eco81I

Zunächst musste hier ein XhoI-Verdau bei 37°C durchgeführt werden. Nach ca. 2 Stunden wurden 2.2 µl in die jeweiligen Ansätze pipettiert und für weitere 90 Minuten inkubiert.

Nach thermischer Inaktivierung der Restriktionsenzyme wurden die Proben auf ein 0.9% TBE-Gel aufgetragen (s., **5.3.5**) und folgende Fragmente aus der Gelmatrix extrahiert:

409 bp Fragment des pBDH-Y202C/ Eco81I/ XhoI-Verdau

4023 bp Fragment des pBDH-C69A/C242A / Eco81I/ XhoI-Verdau

Ligation der Fragmente:

Die aus dem TAE-Gel herausgeschnittenen Fragmente wurden in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei 65°C im Wasserbad geschmolzen. In ein bei 37°C temperiertes Eppendorfgefäß wurden 60 µl der geschmolzenen low-melting Agarose, 12 µl 10xLigase-Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase und 47 µl steriles H₂O_{bidest} pipettiert.

Der Ligaseansatz wurde wie in Abschnitt **5.3.9** ausführlich beschrieben inkubiert und anschließend in kompetente DH5α transformiert (s., **5.3.2**). Das transformierte Plasmid wurde nochmals mittels Doppelverdau überprüft und zum Sequenzieren an die Firma MWG-Biotech geschickt.

5.4.2 Konstruktion des Plasmids pBDH-Y202C/C242A*Primerdesign:*

Zur Konstruktion des Plasmids pBDH-Y202C/C242A wurden die Primer Markus1a und Markus1b benutzt (s., **5.1.3 Tabelle 5-2; 5.4.1**).

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):

In Abänderung des in **Tabelle 5-5** angegebenen Pipettierschemas, wurden zur Konstruktion des Plasmids pBDH-Y202C/C242 5-10 µl des Qiagen aufgereinigten Templats pBDH-C242A der Stammkonzentration 5 ng/µl eingesetzt.

Die in Tabelle 5-6 beschriebenen PCR-Parameter wurden hier übernommen. Nach der PCR wurde ein Aliquot auf ein 0.9% TBE aufgetragen. Die restliche Lösung wurde bei 37°C für 2 Stunden mit 1-2 µl des Restriktionsenzym DpnI inkubiert wie in Abschnitt **5.3.2** beschrieben transformiert.

Identifizierung des Plasmids pBDH-Y202C/C242A durch Restriktionsverdau:

Zur Kontrolle des neu klonierten Plasmids wurde dieses mit PstI verdaut und anschließend auf ein 2.0% TBE-Gel aufgetragen. Puffer und PstI-Verdau sind in Abschnitt **5.4.1** genau beschrieben.

Vorbereitung zum Sequenzieren:

Auch hier wurde die Sequenz um die gewünschte Mutation aus dem neu klonierten Plasmid pBDH-Y202C/C242A herausgeschnitten und mit dem entsprechend verdauten Fragment des Plasmids pBDH-C242A ligiert.

HpaI/ NheI-Verdau:

14 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
2 μl Y^+
2 μl DNA
1 μl HpaI, 1 μl NheI

Der Doppelverdau wurde wie in Abschnitt **5.3.4** beschrieben durchgeführt. Nach thermischer Inaktivierung der Restriktionsenzyme wurden die Proben auf ein 2.0% TBE-Gel aufgetragen (**s. 5.3.5**) und folgende Fragmente aus der Gelmatrix eluiert (**s., 5.3.8**):

436 bp Fragment des pBDH-Y202C/C242A/ HpaI/ NheI-Verdau
3996 bp Fragment des pBDH-C242A/ HpaI/ NheI-Verdau

Ligation der Fragmente:

Die beiden Fragmente wurden zusammen in 60 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ von der Säule eluiert. Der Ligationsansatz setzte sich aus 50 μl eluierter DNA-Lösung, 10 μl 10xLigasepuffer, 2 μl T4-DNA-Ligase (5 U/ μl) und 39 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ zusammen.

Die Ligation wurde wie in Abschnitt **5.3.9** beschrieben durchgeführt und transformiert (**s., 5.3.2**). Das transformierte Plasmid wurde nochmals mittels Doppelverdau überprüft und zum Sequenzieren an die Firma MWG-Biotech geschickt.

5.4.3 Konstruktion des Plasmids pBDH-C69A/Y202C*Primerdesign:*

Zur Konstruktion des Plasmids pBDH-C69A/Y202C wurden die Primer Markus1a und Markus1b benutzt (**s., 5.1.3 Tabelle 5-2; s., 5.4.1**).

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):

Zum Design dieser Mutante wurden 5-15 μl des Plasmids pBDH-C69A der Konzentration 5ng/ μl eingesetzt. Pipettierschema und PCR-Parameter sind in den Tabellen 5-5 und 5-6 zu finden.

Ein Teil des PCR-Ansatzes wurde bei 37°C für 90 Minuten mit 1-2 μl des Restriktionsenzym DpnI inkubiert und anschließend transformiert (**s., 5.3.2**).

Identifizierung des Plasmids pBDH-C69A/Y202C durch Restriktionsverdau:

Zur Identifizierung des Plasmids pBDH-C69A/Y202C wurde dieses ebenso wie das Templat mit PstI verdaut und anschließend auf ein 0.9% TBE-Gel aufgetragen. Puffer und PstI-Verdau sind in Abschnitt **5.4.1** beschrieben.

Vorbereitung zum Sequenzieren:

Die Sequenz um die gewünschte Mutation wurde aus dem neu klonierten Plasmid pBDH-C69A/Y202C herausgeschnitten und mit dem entsprechenden Fragment des verdauten Ausgangsplasmids pBDH-C69A ligiert.

Eco81I/ NheI-Verdau:

14 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
2 μl O^+
2 μl DNA
1 μl Eco81I, 1 μl NheI

Der Doppelverdau wurde wie in Abschnitt **5.3.4** beschrieben durchgeführt, auf ein 1% TBE-Gel aufgetragen (s., **5.3.5**) und folgende Fragmente aus der Gelmatrix eluiert (s., **5.3.8**):

451 bp Fragment des pBDH-C69A/Y202C/ Eco81I/ NheI-Verdau
3981 bp Fragment des pBDH-C69A/ Eco81I/ NheI-Verdau

Ligation der Fragmente:

Der Ligationsansatz setzte sich aus 60 μl DNA-Lösung, 12 μl 10xLigasepuffer, 1 μl T4-DNA-Ligase (10 U/ μl) und 47 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ zusammen.

Durchführung der Ligation sowie nachfolgende Transformation sind in den Abschnitten **5.3.9** und **5.3.2** beschrieben.

5.4.4 Konstruktion des Plasmids pBDH-W276R

Primerdesign:

Die für das Design des Plasmids pBDH-W276R benötigten Primer (s., 5.1.3 Tabelle 5-2) sollten neben dem Codon für Arginin zusätzlich die Sequenz einer AgeI-Schnittstelle beinhalten.

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):

Zur Konstruktion dieser Mutante wurden 3-5 µl des Plasmids pBDH-C69A/C242A der Konzentration 21 ng/µl benutzt. In Abänderung des in **Tabelle 5-5** angegebenen Schemas wurden jeweils 1 µl der Oligonukleotide cterm1 und cterm2 der jeweiligen Stammkonzentration von 125 ng/µl eingesetzt.

Tabelle 5-7 beschreibt das 2. Segment der durchgeführten PCR. Für die Anlagerung der Primer (Annealing) wurde ein Temperaturgradient von 61°C auf 65°C benutzt. Die Segmente 1 und 3 sind in **Tabelle 5-6** zu finden.

Tabelle 5-7 Zusammenfassung der PCR-Parameter zur Konstruktion des Plasmids pBDH-W276R

Segment	Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]	Zyklusanzahl
	95	1	
2	61—►65	1	20
	72	4.5	

Ein Teil der amplifizierten PCR-Ansätze wurde mit 1-2 µl DpnI bei 37°C für 90 min verdaut und anschließend transformiert (s., 5.3.2).

Identifizierung des Plasmids pBDH-W276R durch Restriktionsverdau:

Zur Identifizierung des Plasmids pBDH-W276R wurde dieses ebenso wie das Templat mit EcoRI/ AgeI verdaut und anschließend auf ein 0.9% TBE-Gel überprüft.

EcoRI/ AgeI-Verdau:

- 14 µl H₂O_{bidest}
- 2 µl O⁺
- 2 µl DNA
- 1 µl Eco81I, 1 µl AgeI

Vorbereitung zum Sequenzieren:

Die Sequenz um die gewünschte Mutation wurde aus dem klonierten Plasmid pBDH-W276R herausgeschnitten und mit dem entsprechenden Fragment des verdauten Templots pBDH-C69A/C242A ligiert.

EcoRI/ Eco81I-Verdau:

14 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
 2 μl OPA
 1 μl BSA (2 mg/ml)
 1 μl DNA
 1 μl EcoRI, 1 μl Eco81I

One-Phor-All-Buffer (OPA):

100 mM MgAc_2
 500 mM KAc
 100 mM DTT

Der Doppelverdau wurde wie in Abschnitt 5.3.4 beschrieben durchgeführt, auf ein 0.9% TBE-Gel aufgetragen (s., 5.3.5) und folgende Fragmente aus der Gelmatrix eluiert (s., 5.3.8):

558 bp Fragment des pBDH-W276R/ Eco81I/ EcoRI-Verdau
 3874 bp Fragment des pBDH-C69A/C242A/ Eco81I/ EcoRI-Verdau

Ligation der Fragmente:

Der Ligationsansatz setzte sich aus 50 μl DNA-Lösung, 10 μl 10xLigasepuffer, 2 μl T4-DNA-Ligase (5 U/ μl) und 38 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ zusammen. Ligation und Transformation sind in den Abschnitten 5.3.9 und 5.3.2 beschrieben.

5.4.5 Konstruktion des Plasmids pBDH-W276C*Primerdesign:*

Die für das Design des Plasmids pBDH-W276C benötigten Primer (s., 5.1.3 Tabelle 5-2) sollten ein Codon für die Aminosäure Cystein kodieren. Mit dem Einbau der Mutation wurden gleichzeitig zwei Schnittstellen gelöscht. Ein NcoI- bzw. StyI-Verdau sollte für das Screening ausgenutzt werden.

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):

Zur Konstruktion des neuen Plasmids wurden 5-15 μl des Plasmids pBDH-C69A/C242A der Konzentration 5ng/ μl benutzt. In Abänderung des in Tabelle 5-5 angegebenen Schemas wur-

den jeweils 1 µl der Oligonukleotide w276c1 und w276c2 der jeweiligen Stammkonzentration von 125 ng/µl eingesetzt.

Im Unterschied zu den in **Tabelle 5-6** aufgeführten Parametern, wurde eine Annealing-Temperatur von 67°C gewählt. Das zweite Segment wurde 22 mal durchlaufen.

Die PCR-Ansätze wurde mit 1-2 µl DpnI bei 37°C für 90 min verdaut und anschließend transformiert (s., **5.3.2**).

Identifizierung des Plasmids pBDH-W276C durch Restriktionsverdau:

Zur Identifizierung des Plasmids pBDH-W276C wurde dieses ebenso wie das Templat mit NcoI verdaut und anschließend auf ein 0.9% TBE-Gel überprüft.

NcoI-Verdau:

15 µl H₂O_{bidest}
2 µl O⁺
2 µl DNA
1 µl NcoI

Vorbereitung zum Sequenzieren:

Vorbereitung, EcoRI-/ Eco81I-Verdau der Plasmide pBDH-W276C und pBDH-C69A/C242A und Ligation der entsprechend verdauten Fragmente sind im Abschnitt **5.4.4** detailliert beschrieben.

5.5 Expression und Isolierung von HisBDH

Kultivierung der E. coli Stämme:

Zur Expression der HisBDH-Mutanten aus den jeweiligen Plasmiden (**Tabelle 5-1**) wurden die *E. coli* Stämme B121(DE3) und B121(DE3)GOLD eingesetzt.

2 l 30°C temperiertes YT-Medium, das 150 µg/ml Ampicillin enthielt, wurden mit 40 ml frischer Übernachtskultur beimpft. Die Zellkultur wurde bei 37°C und 240 rpm inkubiert. Die optische Dichte OD₅₉₅ wurde stündlich gemessen (s., **5.2.5**). Nachdem die Kulturen eine OD von 0.6-0.8 erreichten, wurden 2 ml einer 1 M IPTG-Lösung zugegeben. Bei Verwendung der B121(DE3)GOLD-Zellen wurden zusätzlich nochmals 500 µl einer 50 µg/ml Amicillin-Lösung zugegeben. Die Kultur wurde für weitere 5 h inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension in JA-10 Zentrifugenbehälter überführt und 10 min bei 4°C und 7000 rpm zentrifugiert.

Der klare Überstand wurde zum späteren Autoklavieren gesammelt, die Pellets schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Lysieren der pelletierten Zellen:

Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden im Kühlraum mit gekühlten Materialien und Lösungen durchgeführt.

Die Pellets wurden mit einem entsprechenden Homogenisator in 40 ml START-Puffer, der 10 mM β -Mercaptoethanol enthielt, resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer French Press oder EmulsiFlex aufgeschlossen. Dazu wurde die Suspension zweimal einem Druck von 300 kp/cm^2 ausgesetzt und das Eluat in gekühlte JA-20 Zentrifugenbehälter gesammelt. Nach 10 min Inkubation mit DNase und RNase (jeweils $1\text{ }\mu\text{g/ml}$), erfolgte die Zugabe des Protease-Inhibitors PMSF (1 mM). Die Suspension wurde für 20 min bei 4°C und 20000 rpm zentrifugiert. Das Lysat wurde unter Argonatmosphäre auf Eis gelagert und auf Aktivität geprüft.

Aufreinigung der HisBDH:

Zur Aufreinigung der aus *E coli* exprimierten HisBDH kamen die HiTrap-Säulen der Firma Pharmacia-Biotech zur Anwendung. Alle Lösungen wurden mit einer P1-Pumpe auf die Säulen aufgetragen. Vor jeder Isolierung wurde eine entsprechende Säule mit 20 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen und anschließend mit 5 ml 0.1 M NiSO_4 -Lösung beladen. Nach erneutem Waschen mit 20 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, wurde die Ni-Säule mit 25 ml START-Puffer equilibriert. Nach dem vollständigen Auftragen des Lysats, wurde die Säule mit 30 ml START-Puffer, 20 ml Wash2 und 30 ml Wash3 gewaschen. Die HisBDH wurde von der Ni-Säule mit 24 ml Elution-Buffer eluiert. Die eluierten Proben wurden in 4 ml Fraktionen in Kryoröhrchen gesammelt, die 1-5 mM DTT-Lösung enthielten. Die aktivsten Proben wurden vereinigt und 90 min unter Argonstrom gegen 1 l Dialysepuffer dialysiert (10 mM HEPES, 0.25 M NaCl, 1-10mM DTT, 1 mM EDTA pH 7.3). Die Proteinproben wurden in flüssigem Stickstoff gelagert.

START-Puffer: 20mM Na-Phosphatpuffer, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazol pH 7.4

Wash2: 20mM Na-Phosphatpuffer, 0.5 M NaCl, 100 mM Imidazol pH 7.4, 1% Octylglucosid

Wash3: 20mM Na-Phosphatpuffer, 0.5 M NaCl, 100 mM Imidazol pH 7.4

Elution buffer: 20mM Na-Phosphatpuffer, 0.5 M NaCl, 300 mM Imidazol pH 7.4

5.6 BDH-Aktivitätstest

Die BDH-Aktivität wurde nach zwei verschiedenen Methoden bestimmt, die sich nur in dem jeweiligen Start der enzymatischen Reaktion unterscheiden. Die Messung der Aktivität während der Isolierung erfolgte nach der Methode von McIntyre *et al.* (1988), wobei die Reaktion durch Zugabe des Substrats R-Hydroxybutyrat (R-BOH) gestartet wird. Eine exaktere Bestimmung der spezifischen Aktivität erlaubt die Methode nach Fleischer *et al.* (1975). Hierbei wird die Reaktion mit einem BDH/ Liposomen-Komplex gestartet. Die Messung erfolgte UV-spektroskopisch über die Absorption der entstandenen NADH's.

Lösung 1:

16 ml EtOH (95%)
4.8 ml BSA (10%)
2 ml 0.3 M EDTA (pH 6.5)
12 ml 1 M Phosphatpuffer (pH 7.3)
ad 360 ml H₂O_{bidest}

Lösung 2:

9 ml Lösung 1
16 ml H₂O_{bidest}
0.9 ml 0.1 M DTT

Aktivitätstest nach McIntyre et al. (1988):

Zur Durchführung des Aktivitätstests wurden 620-x µl Lösung2, 50 µl Liposomenlösung, 50 µl 0.1 M NAD⁺-Lösung (pH 5.5) und x (5-50) µl Probenlösung in eine Quarzküvette pipettiert, mit Argon überschichtet und 15 min bei 30°C inkubiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl 0.2 M R,S-BOH und wurde bei 340 nm mit einem UV-Spektrometer DU 640 der Firma Beckman verfolgt.

Aktivitätstest nach Bock und Fleischer (1975):

Zur Ausbildung des BDH/ Liposomen-Komplexes wurde die auf Aktivität zu prüfende Probe mit Liposomen gemischt und unter Argonatmosphäre zunächst 10 min bei 22°C inkubiert. Das Verhältnis Lipid/ BDH wurde auf 100 µgP/mg Protein eingestellt. Zur weiteren Durchführung dieses Aktivitätstests wurden 550 µl Lösung2, 160 µl 0.1 M NAD-Lösung (pH 5.5) und 80 µl 0.2 M R,S-BOH in eine Quarzküvette pipettiert, mit Argon überschichtet und zusammen mit dem BDH/Liposomen-Komplex 15 min bei 30°C inkubiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 10 µl des BDH/ Liposomen-Komplexes zu der Lösung in der Küvette.

Die Volumenaktivität einer Probelösung berechnet sich wie folgt:

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta E V}{\Delta t d v \varepsilon}$$

mit

ΔE	Extinktionsänderung
V	Probenvolumen (cm ³)
Δt	Zeitintervall (min)
d	Schichtdicke (cm)
v	zugegebenes Volumen an HisBDH (cm ³)
ε	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm (6220 l mol ⁻¹ cm) ⁻¹

5.7 Herstellung der Liposomen (Cortese *et al.*)

Die in Chloroform gelösten synthetischen Phospholipide wurden im gewünschten Lipid-Verhältnis in einem Reagenzglas pipettiert und das organische Lösungsmittel im Argonstrom verflüchtigt. Um das Lösungsmittel vollständig zu entfernen, wurden die Lipide im Wasserstrahlvakuum ca. 1 h evakuiert. Sie wurden anschließend mit entgastem 10 mM Tris-HCl/ 1 mM EDTA-Puffer (pH 8.3) in einer Konzentration von 200 µg „Lipid-Phosphor“ pro 2 ml aufgenommen. Die trübe Suspension, die sich unter Argonatmosphäre befand, wurde in einem Ultraschallbad 10-20 min behandelt. Die klare Liposomen-Lösung wurde bei 4°C gelagert. Vor Benutzung der Liposomen wurden diese für wenige Minuten im Ultraschallbad behandelt.

5.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration des rekonstituierten Komplexes bzw. des Apoenzyms wurden nach der Methode von Lowry (1951) bestimmt. Konzentrationen von Proteinproben, die DTT enthielten, wurden nach der nach Ross und Schatz (1973) modifizierten Lowrymethode bestimmt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

Zum Detektieren der Protein-enthaltenen eluierten Proben nach einer Gelfiltration, wurde die Methode nach Bradford (1976) benutzt.

5.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Diese Methode der SDS-Page geht auf Laemmli (1970) zurück und wurde mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Die Elektrophoresekammer hatte die Maße 7.5x 8 0.2 cm und die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 16 mA durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig in Methanol/ Eisessig/ Wasser (5:1:4) aufgekocht und über Nacht in 0.25% Coomassie Brillantblau R250 in Methanol/ Eisessig/ Wasser (5:1:4) entfärbt.

5.10 Western Blotting

Der Western Blot ist ein empfindliches und spezifisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen, das von Adami *et. al.* (1993) für die BDH etabliert wurde. Dieses Dreischritt-Verfahren wird eingesetzt, um Proteine zunächst zu trennen und dann ein bestimmtes Protein nachzuweisen.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteinbanden auf eine Nylon Membran geblottet. Die 4 x 5 cm große Membran wurde in Methanol getaucht, wobei die Membran nur mit einer Pinzette angefasst wurde. Vier 3MM Papierstücke wurden für wenige Minuten in Transferpuffer inkubiert. Auf zwei 3 MM Papierstücke wurde die Membran in das Transferpuffer-Bad und darauf das SDS-Gel gelegt. Die restlichen Papierfilter wurden auf das Gel gelegt. Das Elektroblothing wurde für ca. 60 min bei Raumtemperatur und Stromdichten von ca. 3.2 mA/ cm² durchgeführt. Als Transferblotter dienten zwei 20x20x2 cm große Grafit-elektroden (Zentrale Werkstätten Universität Kaiserslautern). Zum Absättigen freier Proteinbindungsstellen wurde die Membran nach dem Blotten über Nacht in einer Magermilchpulver-Lösung (4g in 50 ml 1xTBST) inkubiert. Anschließend wurde dreimal je 5 min mit TBST gewaschen und 1 h mit den Primärantikörpern inkubiert. Dabei handelte es sich um Polyklonale anti-BDH-Antikörper aus Kaninchen, die freundlicherweise von J. Oliver McIntyre, Department of Molecular Biology an der Vanderbilt University, Nashville, TN (USA), zur Verfügung gestellt wurden. Sie wurden als 1% Lösung in TBST, das mit 1% BSA versetzt war, eingesetzt und konnten bei Lagerung bei -20°C mehrfach benutzt werden. Die Membran wurde dreimal je 5 min mit TBST gewaschen, 60 min in Sekundärantikörperkonjugat-Lösung inkubiert und erneut dreimal je 5 min mit TBST gewaschen. Nach Entfernen der Lösung wurde 15 ml Färbelösung zur Membran gegeben. Nach wenigen Minuten waren die BDH-Banden

gefärbt. Anschließend wurde die überschüssige Färbelösung entfernt, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen und die Membran getrocknet.

Transferpuffer:

5.99 g Glycerin
1.20 g Tris
20 mg SDS
60 ml Methanol
ad 400 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

10xTBST:

190 ml NaCl (4 M)
6.1 g Tris
2.5 ml Tween20
ad 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
pH 8.0 mit HCl

Sekundärantikörperkonjugat-Lösung:

2 μl Anti-Rabbit IgG
12 ml 1xTBST

Alkalische-Phosphatase-Puffer (AP):

2.3 g Tris
1.17 g NaCl
1 ml MgCl_2 (1M)
ad 200 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
pH 9.5 mit HCl

Färbelösung:

30 ml AP-Puffer
198 μl NBT (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
99 μl BCIP (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

5.11 ESR-Spektroskopie

5.11.1 Geräte und Parameter

Die ESR-Messungen wurden auf einem Elexsys 580 X-Band Spektrometer der Firma Bruker durchgeführt. Die Messungen wurden in einer dielektrischen Cavity TE_{001} (ER 4118) in Quarzkapillaren der Firma Spintec bei einer Mikrowellenleistung von 9.7 GHz in einem Messbereich mit einem Centerfield bei 3460 Gauss durchgeführt. Moduliert wurde mit einer Frequenz von 100 KHz und einer Amplitude von 0.8 Gauss. Der Innendurchmesser der Kapillaren betrug 0.9 mm. Die zur Aufnahme der jeweiligen Spektren gewählten Parameter sind nachfolgend in **Tabelle 5-7** aufgelistet. Falls sich die Aufnahmebedingungen eines Spektrums

von den in **Tabelle 5-7** angegebenen unterschieden, wurde dies in der Legende des jeweiligen Spektrums vermerkt. Für die Tieftemperaturmessungen wurde die Stickstoff/ Helium-Temperiereinheit LLT600 der Firma Oxford Instruments benutzt.

Tabelle 5-7 Aufnahmeparameter der ESR-Messungen

Temperatur [K]	170	298
Spektrenbreite [Gauss]	160	100
sampling time [s]	163.84	163.84
Zeitkonstante [s]	0.08192	0.08192
Receiver gain	80	80
Mikrowellenleistung	> 30 db	20-25 db

5.11.2 Durchführung der ESR-Messungen

Abspaltung des Histags

Der zur Aufreinigung des Proteins notwendige Hexahistidin-Tag wurde durch Verdau mit dem Enzym Enterokinase abgespalten. Die Inkubation wurde ca. 5 Stunden in einem Wasserbad bei 21°C unter Argonatmosphäre durchgeführt. Das dabei entstehende ca. 2 kDa große Fragment konnte durch Dialyse (cut-off 10kDa) vom Protein entfernt und auf SDS-Gelen überprüft werden.

Spinmarkierung der BDH mit Methanthiosulfonat-Spin-Label (MTS-SL)

Nach dem Verdau der Probe wurde zunächst ausgiebig gegen 10 mM HEPES, 0.25 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0 dialysiert, da das auf den Spinlabel reduzierend wirkende Reagenz DTT im Lagerungspuffer enthalten war. Der DTT-freie BDH/ PC-Komplex wurde mit einem 10fachen molaren Überschuss an MTS-SL-Lösung (100 mM in DMF) für 2-5 Stunden bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Das überschüssige SL-Reagenz wurde durch mehrfaches dialysieren gegen Dialysepuffer bzw. durch Gelfiltration abgetrennt. Dazu wurde eine Sephadex G25 Säule (Durchmesser 1.5 cm, Höhe 10 cm) benutzt. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen, wobei o.g. Dialysepuffer als Elutionspuffer diente. Die Proteinbestimmung der eluierten Proben wurde nach der Bradford-Methode durchgeführt. Die dialysierte Probe bzw. die Protein-enthaltenden eluierten vereinigten Proben wurden im Vakuum in einer Prodigon-Zelle gegen Dialysepuffer, der 10% Ethanol enthielt, aufkonzentriert. Die spinmarkierten Proben wurden auf 100-300µM aufkonzentriert.

Tieftemperaturmessungen

Bei der Aufnahme von Tieftemperaturspektren besteht die Gefahr, dass sich das System bei der Aufnahme eines Spektrums im Sättigungszustand befindet. Dies bedeutet, dass die eingestrahlte Mikrowellenleistung zu groß ist und somit die Anregungsrate der Spins die Relaxationsrate übertrifft. Aus diesem Grund wurde bei der Aufnahme jedes Spektrums bei tiefen Temperaturen (170K) die eingestrahlte Mikrowellenleistung variiert bis keine Veränderung der Spektrenform mehr zu beobachten war. Das spingelabelte Cystein/ Protein-Verhältnis wurde bestimmt durch Doppelintegration der ESR-Spektren gefolgt von einem Vergleich mit einer frisch angesetzten MTS-Lösung bekannter Konzentration und der durch Lowry bestimmten Proteinkonzentration.

5.12 Fluoreszenz-Spektroskopie

5.12.1 Durchführung fluorimetrischer NADH-Titrationen

Die Titrationen wurden mit der niedrigsten Coenzym Konzentration gestartet und mit steigender NADH-Konzentration bis zu einem 100 fachen molaren Überschuss zur Proteinkonzentration fortgesetzt. Der Proteingehalt variierte je nach Experiment von 0.6 – 1.5 μM BDH/ PC-Komplex in 250 μl Puffer (10 mM HEPES, 1 mM EDTA pH 8.0, 5 mM DTT). Die gefüllten Fluoreszenzküvetten wurden mit Argon begast, mit einem Silikonstopfen verschlossen und gemischt. Nach 30minütiger Inkubation bei 25°C wurde zur Probe Monomethylmalonat (MMM, 50mM) und Superoxid-Dismutase (SOD 20 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben und erneut 30 min inkubiert. Zu dieser Lösung wurden mit Hamilton-Spritzen die NADH-Lösungen zugegeben. Die Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen des Fluoreszenzspektrometers wurden wie folgt gewählt:

Tabelle 5-8 Parameter der durchgeführten Fluoreszenzmessungen

Wellenlängen [nm]		Spaltbreite [nm]	
λ_{exc}	λ_{em}	λ_{exc}	λ_{em}
296	340	8	8
296	460	8	16
340	460	8	16

Parallel dazu wurde in einer Referenzküvette eine Titration durchgeführt, wobei die Referenzprobe kein Protein enthielt. Die OD-Werte wurden mit einem Shimadzu UV-2501PC Spektrophotometer bestimmt. Die Fluoreszenzmessungen wurden nach Sandermann *et al.* auf einem Perkin-Elmer MPF-44B Fluorometer (Norwalk, CT) durchgeführt. Die Fluoreszenzwerte wurden für den inner-filter Effekt, wie von Lakowicz beschrieben, korrigiert.

5.12.2 Anisotropie-Messungen

Labeln der HisBDH mit Fluorescein (F150)

Die Proteinproben wurden je nach Experiment mit einem Überschuss bzw. Unterschuss an Fluorescein-Lösung (50mM-Stock in DMF bzw. verdünnte F150-Lösungen) für 4-5 h bei 4°C unter Argonatmosphäre inkubiert. Zum Entfernen des überschüssigen bzw. nicht gebundenen Labels wurden die jeweiligen Proben mehrfach gegen 10 mM HEPES, 1 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl unter Argon dialysiert. Während der Dialyse wurden die entnommenen Proben auf F150-Fluoreszenz untersucht, wobei die Anregungswellenlänge λ_{exc} 492 nm und die Emissionswellenlänge λ_{em} 515 nm betrug. Die F150 Konzentration wurde aus den jeweiligen Absorptionsspektren bei 500 nm und einem Extinktionskoeffizienten von $83000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Molecular Probes) berechnet. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Durchführung der Anisotropie-Messungen

Die Messungen zur Bestimmung der steady-state Anisotropie wurden mit einem SLM8000 Fluorometer im T-Format durchgeführt. Die Daten zur Bestimmung eines Anisotropie-Wertes wurden über 20-30 s für jede Orientierung des Polarisators gesammelt und nach folgender Formel berechnet:

$$r = \frac{(I_{vv} - GI_{vh})}{(I_{vv} + 2GI_{vh})}$$

wobei G ein Korrekturfaktor und wie folgt definiert ist

$$G = \frac{(I_{hv})}{(I_{hh})}$$

I_{xy} steht dabei für die um den Background korrigierte Intensität mit der Polarisatorstellung für die Anregung in x-Richtung und die Polarisatorstellung für die Emission in y-Richtung.

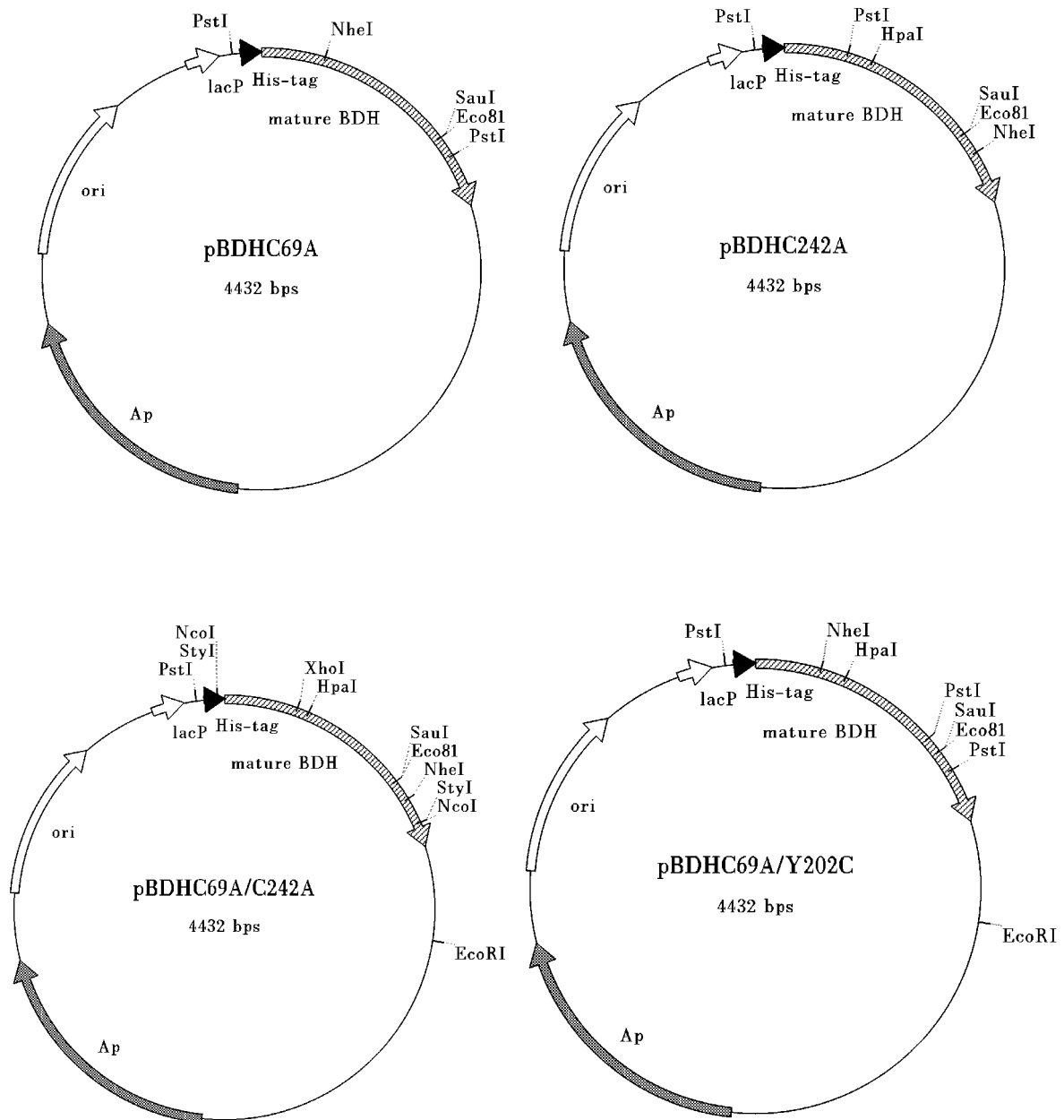
Vor jedem Experiment wurden die jeweiligen Proben für 1-2h unter Argon in PC rekonstituiert. Die Anisotropiemessungen wurden in 10 mM HEPES, 1 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl bei 25°C durchgeführt. Nach den Messungen wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gelagert. Sie wurden durch Zugabe von 2%SDS und 5mM DTT denaturiert, wobei sich ein 5minütiges Aufkochen bei ca. 80°C anschloss. Die Spaltbreite für die Anregungswellenlänge betrug 4 nm und für die Emissionswellenlänge jeweils 8 nm.

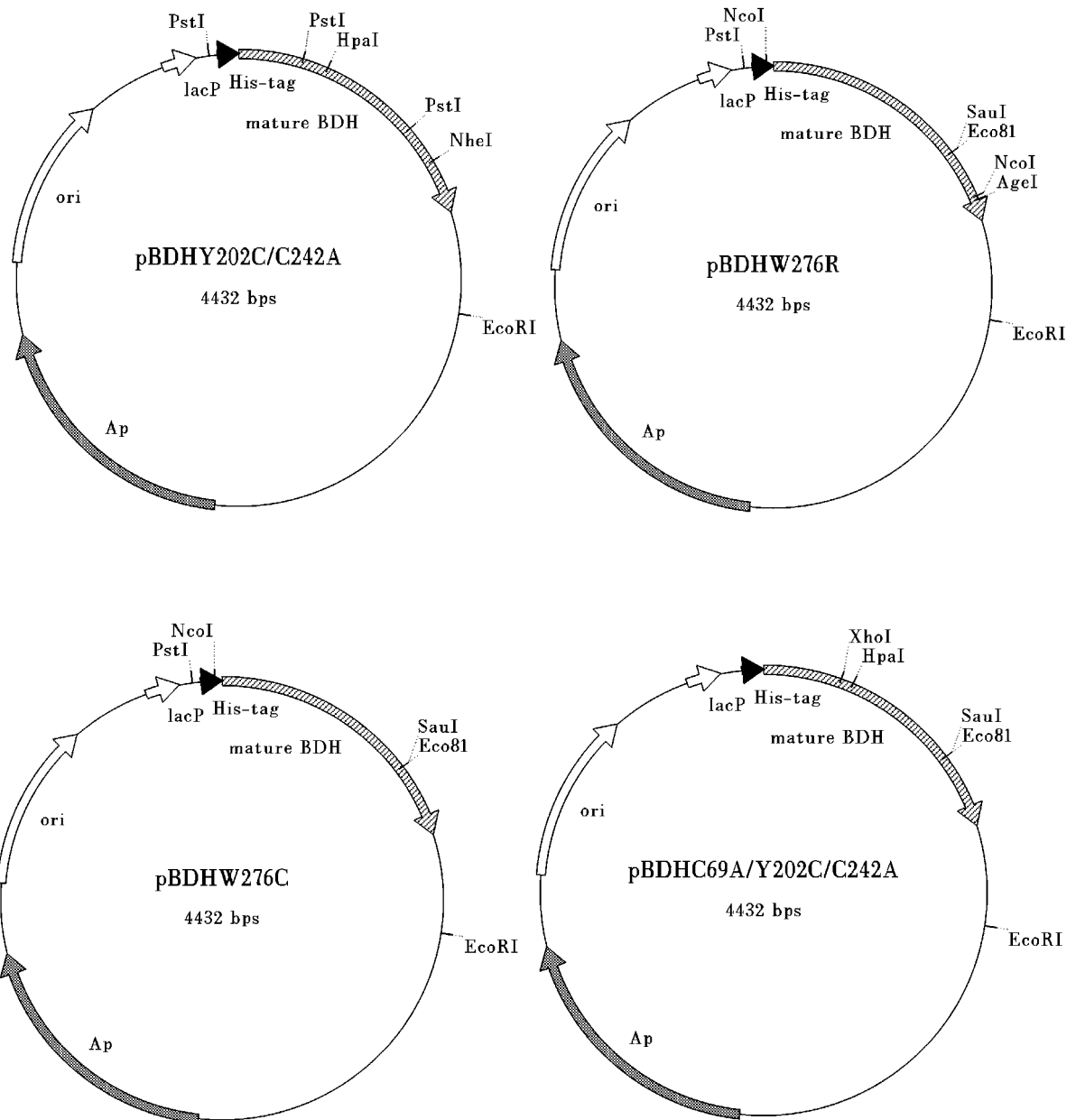
5.13 CD-Messungen

Die CD-Messungen wurden im Arbeitskreis von Frau Prof. Bernhard durchgeführt. Da sich der Lagerungspuffer (10mM HEPES, 250mM NaCl, 1mM EDTA pH 8.1) als sehr problematisch bei den Messungen erwies, wurde die Stocklösung der jeweiligen Probe in 10mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.4) verdünnt und anschließend vermessen. Die Messungen wurden mit Unterstützung von Herrn Dipl. Biologe A. Heinz in der far-UV Region zwischen 190 bis 254nm durchgeführt.

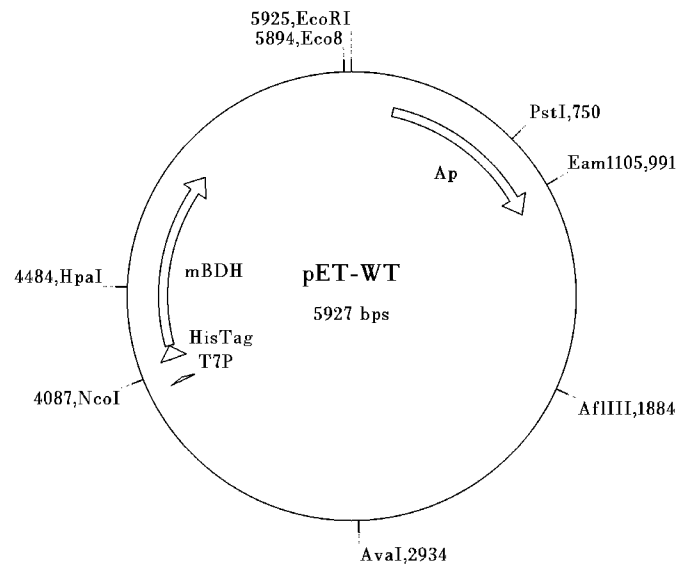
6 Anhang

6.1 Restriktionskarten benutzter pUC-Plasmide:





6.2 Restriktionskarte des Wildtyps im pET-System:



7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AcAc	Acetoacetat
HH-BDH	(R)-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase aus human heart
BH-BDH	(R)-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase aus bovine heart
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraessigsäure
F150	Fluorescein
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser
IPTG	Isopropylthiogalactosid
K _D	Dissoziationskonstante
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LBA	Luria-Bertani Medium mit Ampicillin
MMM	Monomethylmalonsäure
MTS-SL	Methanthiosulfonat-Spinlabel
NAD ⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (reduzierte Form)
OD	optische Dichte
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
R-BOH	R-Hydroxybutyrat
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett

8 Literatur

- Adami, P., Duncan, T.M., McIntyre, J.O., Carter, C.E., Fu, C., Melin, M., Latruffe, N., Fleischer, S. (1993) *Biochem. J.*, 292, 863–72
- Bedetti, C.D., Montero, G.A., Stoppani, A.O.M. (1987) *Biochem. Int.*, 14, 45-54
- Berliner, L.J. (1976) *Spin Labeling – Theory and Applications*, Academic Press, New York
- Berrez, J.M., Latruffe, N., Gaudemer, Y. (1984) *Biochimie*, 66, 717-22
- Blum, L. (1910) *Münch. med. Wochenschrift* 57, 683
- Bock, H.G., Fleischer, S. (1974) *Meth. Enzym.*, 31, 374-391
- Bock, H.G., Fleischer, S. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 5774-81
- Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.*, 72, 248-54
- Chelius, D., Loeb-Hennard, C., Fleischer, S., McIntyre, J.O., Marks, A.R., De, S., Hahn, De S., Jehl, M.M., Moeller, J., Philipp, R., Wise, J.G. and Trommer W.E. (2000) *Biochemistry* 39, 9687-97
- Churchill, S., Churchill, P. (1991) *Biochem. Cell Biol.*, 69, 670-73
- Churchill, P., Hempel, J., Romovacek, H., Zhang, W.-W., Churchill, S (1992) *Biochemistry*, 31, 3793-99
- Coquard, C., Latruffe, N., Gaudemer, Y. (1982) *Biol. of the cell*, 44, 189-192
- Cortese, J.O., McIntyre, J. O., Duncan, T.M., Fleischer, S. (1989) *Biochem.*, 28, 3000–8
- Cortese, J.O., Fleischer, S. (1987) *Biochem.*, 26, 5283–93
- Cortese, J.D., Vidal, J.C. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 224, 351-7
- Cortese, J.O., Vidal, J.C., Churchill, P., McIntyre, J. O., Fleischer, S. (1982) *Biochemistry* 16, 3899–908
- Dakin, H. D. (1909) *J. Biol. Chem.*, 6, 373
- Dakin, H. D. (1910) *J. Biol. Chem.*, 8, 97
- Dalton, L., McIntyre, J. O., Fleischer, S. (1993) *Biochem. J.*, 296, 563–9
- Deese, A., McIntyre, J. O., Fleischer, S. (1987) *Biochem.*, 26, 2117–30
- Dubois, H., Fritzsche, T.M., Trommer, W.E., McIntyre, J. O., Fleischer, S. (1986) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 367, 343-53
- El Kebbaj, M.S., Latruffe, N., Monsigny, M., Obrenovitch, A. (1986) *Biochem. J.*, 237, 359-64
- Filling, C., Berndt, K.D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jörnvall, H., Oppermann, U. (2002) *JBC in press*

- Feix, J.B., Klug, C.S. (1998) in: *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 14: Spin Labeling: The Next Millennium, edited by Berliner, Plenum Press, New York
- Fleer, E. A. M., McIntyre, J. O., Fleischer, S. (1984) *Biochemistry J.*, 23, 5142–5147
- Fleischer, A., Fleischer, S. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24, 189-94
- Fleischer, S., Bock, H.-G., Gazzotti, P. (1974) *Membrane Proteins in Transport and Phosphorylation*, North-Holland Publishing Company Amsterdam, 125–36
- Förster, T. (1948) *Ann. Phys.*, 2, 55-75
- Fritzsche, T.M., McIntyre, J. O., Fleischer, S., Trommer, W.E. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, 791, 173-85
- Gaudemer, Y., Latruffe, (1975) *N. FEBS Lett.*, 54, 30-4
- Gazzotti, P., Bock, H.-G., Fleischer, S., (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58, 309–15
- Gazzotti, P., Bock, H.-G., Fleischer, S., (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 5782–90
- Ghosh, D., Weeks, C.M., Grochulski, P., Duax, W.L., Erman, M., Rimsay, R.L., Orr, J.C. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88,10064-68
- Ghosh, D., Wawrzak, Z., Weeks, C.M., Duax, W.L., Erman, M. (1994) *Structure* 2, 629-40
- Green, D. E, Dewan, J. G., Leloir, L. F. (1937) *Biochem. J.* 31, 934-49
- Green, D., Marks, A. R., Fleischer, S., McIntyre, J. O. (1996) *Biochemistry*, 35, 8158-65
- Hannahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557 – 580
- Hartmann, D., Philipp, R., Schmadel, K., Birktoft, J.J., Banaszak, L.J., Trommer, W.E. (1991) *Biochem.*, 30, 2782-90
- Hsia, J.C., Piette, L.H. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.*, 129, 296-307
- Isaacson, Y.A., Deroo, P.W., Rosenthal, A.F., Bittman, R., McIntyre, J. O., Bock, H.-G., Gazzotti, P., Fleischer, S., (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 117–26
- Jörnvall, H., Persson, M, Jeffery, J (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, 4226-30
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez,-Duarte, R., Jeffery, J., and Ghosh, D. (1995) *Biochemistry*, 34, 6003-13
- Jörnvall, H., Persson, M, Jeffery, J (1995) *Eur. J. Biochem.*, 167, 195-201
- Jurtshuk, P., Sekuzu, I., Green, D. E. (1961) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6, 76-80
- Jurtshuk, P., Sekuzu, I., Green, D. E. (1963) *J. Biol. Chem.*, 238, 3595-605
- Kante A., Cherkaoui-Malki, M., Bailly, A., Adami, P., Latruffe, N. (1987) *C. R. Soc. Biol.*, 181, 389-94
- Kante A., Cherkaoui-Malki, M., Coquard, C., Latruffe, N. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1033, 291-7

- Kaminsky, Y.G, Kosenko, E.A. (1988) *Comp. Biochem. Physiol.*, 90C, 79-82
- Klein, K., Rudy, B., McIntyre, J. O., Fleischer, S., Trommer, W.E., (1996) *Biochemistry*, 35, 3044-49
- Killian, J.A., Keller, R.C.A., Struyve, M., de Kroon, A., Tommassen, J., de Kruijff, B. (1990) *Biochem.*, 29, 8131-7
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, 227, 680 – 685
- Lakowicz, J.R. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd Edition, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York
- Langston, H.P., Jones, L., Churchill, S., Churchill, P.F. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.*, 327, 45-52
- Lehninger, A. L. (1949) *J. Biol. Chem.*, 178, 625
- Lehninger, A. L., Sudduth, H. C., Wise, J. B. (1960) *J. Biol. Chem.*, 235, 2450-5
- Lippolis, R., Morini, P., Conserva, A.R., Casalino, E., Landriscina, C. (1990) *Mol. Cell. Biochem.*, 93, 147-52
- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L., Randall, A. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265 – 275
- Marks, A. R., McIntyre, J. O., Duncan, T. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Fleischer, S. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 15459 – 15463
- Marsh, D. (1981) in: Grell, E. (ed.) *Membrane Spectroscopy*, Springer, Berlin
- Maurer, A., McIntyre, J. O., Churchill, S., Fleischer, S. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 1661–9
- McIntyre, J. O., Holladay, L.A., Smigel, M., Puett, D., Fleischer, S. (1978) *Biochemistry* 17, 4169–77
- McIntyre, J. O., Wang, C.T., Fleischer, S. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 5199–207
- McIntyre, J. O., Churchill, P., Maurer, A., Berenski, C.J., Jung, C.Y., Fleischer, S. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 953–9
- McIntyre, J. O., Fleer, E. A. M., Fleischer, S. (1984) *Biochemistry*, 23, 5135–41
- McIntyre, J. O., Fleischer, S., (1987) *Target-Size Analysis of Membrane Proteins* 123–135
- McIntyre, J. O., Latruffe, N., Brenner, S. C., Fleischer, S. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, 262, 85-98
- McKinley-McKee, J.S., Winberg, J.O., Petterson, G. (1991) *Biochem. Int.*, 25, 879-885
- Mihara, K., Omura, T., Harano, T., Brenner, S., Fleischer, S., Rajagopalan, K.V., Blobel, G.J. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 3355-58
- Moeller, J. (1996), Dissertation

- Moore, C.H., Taylor, S.S., Smith, M.J., & Hartley, B.S. (1978) in Atlas of Protein Sequence and Structure (Dayhoff, M.O., Ed.) Vol. 5, Suppl. 3, p. 68, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC.
- Nasser, B., El Kebbaj, M.S., Cottin, P., Latruffe, N. (2002) *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 131 (1), 9-18
- Nielsen, N. C., Zahler, W. I., Fleischer, S. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 2556-62
- Ortiz, A.R., Pisabarro, M.T., Gallego, J., Gago, F. (1992) *Biochemistry*, 31, 2887-96
- Persson, B., Krook, M., Jörnvall, H. (1991) *Eur. J. Biochem.*, 200, 537-43
- Rabenstein, M.D. and Shin, Y.-K. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8239-43
- Rossmann, M. G., Liljas, A., Bränden, C.-I., Banaszak, L. J. (1975) in *The Enzymes*, 3rd Edition (Boyer, P. D., Ed., 11, 61-102, Academic Press, New York
- Rudy, B., Dubois, H., Mink, R., Trommer, W.E., McIntyre, J. O., Fleischer, S. (1989) *Biochemistry*, 28, 5354-66
- Sambrook, J., Fritsh, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sandermann, H., McIntyre, J. O., Fleischer, S. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261, 6201-8
- Schwartz, M.F., & Jörnvall, H. (1976) *Eur. J. Biochem.*, 68, 159-68
- Sekuzu, I., Jurtshuk, P., Green, D. E. (1963) *J. Biol. Chem.*, 238, 975-82
- Sreerama, N., Woody, R.W. (2000) in: *Circular Dichroism: Principles and Application*, 2nd Edition, Edited by Berova, N., Nakanishi, K., Woody, R.W., John Wiley&Sons
- Steinhoff, H.-J., Radzwill, N., Thevis, W., Lenz, V., Brandenburg, D., Antson, A., Dodson, G., Wollmer, A (1997) *Biophys. J.*, 73, 3287-98
- Stratagene (1997) *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis*
- Stratagene (1997) *PfuTurbo™ DNA Polymerase: Instruction Manual*
- Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W. (1987) *Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum*, Georg-Thieme Verlag, Stuttgart
- Sultan, A.M.N (1987) *Mol. Cell. Biochem.*, 79, 113-8
- Surewicz, W.K., Epand, R.M. (1984) *Biochem.*, 23, 6072-7
- Swaminathan, R., Krishnamoorthy, G, Periasamy, N. (1994) *Biophys. J.*, 67, 2013-23
- Velick, S.F., Symposium on Light and Life, McElroy, W.D., Glass, B., p. 108, John Hopkins Press, Baltimore (1961)
- Weber, G. (1951) Polarization of the fluorescence of macromolecules, *Biochem. J.*, 51, 155-67
- Weber, G., Rosenheck, K. (1964) *Biopolymers. Symp.*, 1, 333-44

Weber, G., Shinitzky, M. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 65, 823-30

Wenzel, H.R., Pfeleiderer, G., Trommer, W.E., Paschenda, K., Redhardt, A. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 452, 292-301

Wenzel, H.R., Trommer, W.E. (1977) FEBS LETTERS, 78, 184-8

Yamaguchi, M., Chen, S., Hafeti, Y. (1986) Biochemistry, 25, 4864-8

Zhang, W. W., Churchill, P. (1990) Biochem. Cell. Biol., 68, 980-983

Zhang, W. W., Redman, K., Churchill, S., Churchill, P. (1990) Biochem. Cell. Biol., 68, 1225-1230

Zirkel, J. (1992) Dissertation, Universität Kaiserslautern

