

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Ein Vorwort	VII
Synopse der Arbeit	IX
Synopsis of the thesis	XIII
A. Untersuchungen über die Stereoselektivität bakterieller, Pyruvat-abhängiger Aldolasen	17
A.1 Kenntnisstand.....	3
A.1.1 $(\beta/\alpha)_8$ -barrels	3
A.1.2 Aldolasen	6
A.1.2.1 Rolle im Stoffwechsel.....	6
A.1.2.2 Typen und Klassen.....	9
A.1.2.3 Nutzung Pyruvat-abhängiger Aldolasen	13
A.2 Ergebnisse und Diskussion	18
A.2.1 Expression und Isolation der 2-Keto-3-desoxy-6-phospho-glukonat Aldolase (KDPG _{EC}) und 2-Keto-3-desoxy-6-phospho-galaktonat Aldolase (KDPGal _{EC}) aus <i>E. coli</i>	18
A.2.2 Untersuchungen über die Stereoselektivität der KDPG und der KDPGal-Aldolasen	19
A.2.2.1 Analyse durch Molekulardynamik-Simulationen	19
A.2.2.2 Analyse durch Sequenzvergleiche	26
A.2.2.3 Deduzierte Hypothesen.....	28
A.2.2.4 Überprüfung der Hypothesen.....	29
A.2.2.5 Anwendung der Ergebnisse auf die Acetaldehyd abhängige Aldolase DERA	35
A.2.3 Die 2-Keto-3-desoxy-6-phospho-Glukonat Aldolase aus <i>Z. mobilis</i>	40
A.2.3.1 Kristallisation von TEV-Eda _{ZM} und Eda _{ZM}	41
A.2.3.2 Röntgendiffraktometrie und Strukturlösung von Eda _{ZM}	45
A.2.3.3 Die Struktur von Eda _{ZM}	50
A.3 Ausblick	53
A.3.1 Stereoselektivität der Pyruvat-abhängigen Aldolasen.....	53
A.3.2 Hypothetische Betrachtungen der Chemoselektivität bezüglich Pyruvat.....	54
A.3.3 Stabilität der Pyruvat-abhängigen Aldolasen	57
B. Die Multikupferoxidase CueO aus <i>Rhodococcus erythropolis</i>	63
B.1 Kenntnisstand.....	65
B.1.1 Struktur und Mechanismus der Multikupferoxidasen	65
B.1.2 Kupferresistenz	66
B.2 Ergebnisse und Diskussion	69
B.2.1 Identifikation und Klonierung von cueO aus <i>R. erythropolis</i>	69
B.2.2 Mutanten der Methionin-reichen Region	73
B.2.3 Etablierung einer photometrischen Kupferbestimmungsmethode	75
B.2.4 Expression und Isolation.....	79
B.2.4.1 Expression und Isolation von Apo-CueO _{RE}	79
B.2.4.2 Rekonstitution von CueO _{RE}	79
B.2.4.3 Expression von holo-CueO _{RE}	81
B.2.4.4 Isolation der holo-CueO _{RE}	82
B.2.4.1 Einfluss des Reinigungspuffers auf holo-CueO _{RE}	83

II

B.2.4.2	MALDI-ToF-MS-Analyse	84
B.2.5	Biochemische und -physikalische Charakterisierung	85
B.2.5.1	Strukturelle Analysen mittels analytischer Größenausschlusschromatographie und elektronischer Spektroskopie	85
B.2.5.2	pH/Temperatur-Aktivitäts-/Stabilitätsuntersuchungen von holo-CueO _{RE} sowie dessen Resistenz gegen Acetonitril als Cosolvens	89
B.2.5.3	Kinetische Charakterisierungen	90
B.2.6	Kristallisation von CueO _{RE}	95
B.3	Ausblick	100
C.	Enoatreduktasen aus <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Zymomonas mobilis</i> und <i>Lactobacillus acidophilus</i>	103
C.1	Kenntnisstand	105
C.1.1	Mechanismus und Struktur der Enoatreduktasen	105
C.1.2	Die Stereoselektivität von Enoatreduktasen	107
C.1.2.1	Natürliche Enantiokomplementarität	107
C.1.2.2	Enantiokomplementarität durch Mutagenese	109
C.2	Ergebnisse und Diskussion	114
C.2.1	YqjM	114
C.2.1.1	Optimierung der Expression und Reinigung von YqjM	114
C.2.1.2	Kristallisation	116
C.2.2	Vorhersage der Stereoselektivität nach Oberdorfer et al.	119
C.2.2.1	Überprüfung der Determinantenhypothese	121
C.2.2.2	Überprüfung der Indikatorhypothese	124
C.2.2.3	Überprüfung der Vorhersage des Oligomerzustandes	127
C.2.3	Die enigmatische Ncr aus <i>Lactobacillus acidophilus</i>	128
C.2.3.1	Identifizierung und Charakterisierung	128
C.2.3.2	Ncr _{LA} -YqjM-Chimäre	133
C.3	Ausblick	137
C.3.1	Die Enoatreduktase aus <i>Photorhabdus luminescens</i>	137
C.3.2	Die Enoatreduktase aus <i>Lactobacillus acidophilus</i>	138
D.	Genereller Experimentalteil	141
D.1	Materialien	143
D.1.1	Geräte	143
D.1.2	Verbrauchsmaterialien	144
D.2	Chemikalien	144
D.2.1	Enzyme	145
D.2.2	Oligonukleotide & synthetische Gene	145
D.2.2.1	Verwendete Oligonukleotide	145
D.2.3	Kits	147
D.2.4	Stammlösungen	147
D.3	Analytische Dienstleistungen	148
D.3.1	DNA Sequenzierungen	148
D.4	Mikrobielle Techniken	148
D.4.1	Stämme	148
D.4.2	Plasmide	149
D.4.2.1	Die pCH-Konstrukte	149
D.4.2.2	Der pHT-Vektor	150
D.4.2.3	Der pNH-Vektor	151
D.4.3	Anzucht von Bakterien	152
D.4.3.1	Kulturmedien: Allgemeine Anmerkungen	152
D.4.3.2	Anzucht und Medien für <i>E. coli</i>	152

D.4.3.3	Anzucht von <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC#29191.....	153
D.4.3.4	Anzucht von <i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM311.....	153
D.4.3.5	Anzucht von <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM#9126.....	153
D.4.4	Transformation von <i>E. coli</i>	154
D.4.4.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	154
D.4.4.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	154
D.5	Genetische Methoden.....	155
D.5.1	Nukleinsäureisolation und Konzentrationsbestimmung.....	155
D.5.1.1	Isolation von prokaryontischer, genomischer DNA.....	155
D.5.1.2	Plasmidisolation.....	155
D.5.1.3	Agarosegelelektrophorese.....	156
D.5.1.4	Gelextraktion von Nucleinsäuren.....	156
D.5.1.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	157
D.5.2	Polymerasekettenreaktion	157
D.5.2.1	Primer Design	157
D.5.2.2	Kolonie-PCR.....	158
D.5.2.3	Präparative PCR: Das Standardprotokoll.....	158
D.5.2.4	Weiterführende Lösungsansätze für die PCR	159
D.5.3	Inverse Polymerase-Kettenreaktion	160
D.5.3.1	<i>In vitro</i> Mutagenese mit Doppelstrang-DNA-Templaten (<i>QuikChange</i> TM).....	163
D.5.3.2	Megaprimer PCR mit ganzen Plasmiden (<i>MEGAWHOP</i>)	164
D.5.3.3	Round-the-Horn-Mutagenesis.....	164
D.5.3.4	Site directed ligation independent mutagenesis (SLIM)	166
D.5.3.5	Vergleich von inversen PCR-Mutagenesemethoden.....	168
D.5.4	Restriktionsendonukleasen und Ligase abhängige Klonierung.....	169
D.5.4.1	Einfügen der Restriktionsschnittstellen in die <i>insert</i> -DNA.....	170
D.5.4.2	Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation.....	170
D.5.5	<i>Sequence and Ligation independent Cloning</i> (SLIC).....	171
D.5.5.1	Primerdesign für die SLIC	172
D.5.5.2	Vektor und <i>insert</i> Behandlung für die SLIC	172
D.6	Proteinbiochemische Methoden	172
D.6.1	SDS-PAGE	172
D.6.1.1	Gelherstellung.....	172
D.6.1.2	Probenvorbereitung.....	173
D.6.1.3	Proteinfällung für die SDS-PAGE	174
D.6.1.4	SDS-PAGE	174
D.6.1.5	Kolloidale <i>Coomassie G-250</i> -Färbung	175
D.6.1.6	Silberfärbung	176
D.6.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	176
D.6.2.1	<i>Bradford</i> -Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung	176
D.6.2.2	Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung	177
D.6.3	Generelle Anmerkungen zur Reinigung von Proteinen mit His-Tag	177
D.6.3.1	Zellaufschluss	178
D.6.3.2	Inclusion body Test.....	179
D.6.3.3	Reinigung: IMAC	179
D.6.3.4	Reinigung: Präparative Größenausschlusschromatographie	180
D.6.3.5	Konzentration von Proteinproben	180
D.6.3.6	Entsalzen von Proteinproben	180
D.6.3.7	Lyophilisation	180
D.6.4	Analytische Größenausschlusschromatographie	181
D.6.5	Circular-Dichroismus-Spektroskopie.....	181
D.6.6	Kristallisationsansätze	182
D.7	Bioinformatische Methoden.....	185
D.7.1	Molekulardynamik-Simulationen	185
D.7.1.1	Einführung in Molekulardynamik-Simulationen	185

IV

D.7.1.2	Verwendete Software für die Molekulardynamik-Simulation	189
D.7.1.3	Vorbereiten der Kristallstrukturen für die MD-Simulation.....	189
D.7.1.4	Äquilibrieren von MD-Simulationen	190
D.7.1.5	Nachbereitung von MD-Simulationen und deren Analyse	191
D.7.2	Docking.....	192
D.7.3	Evolutionäre Energiekonservierungsanalyse	193
E.	Spezieller Experimentaltail	197
E.1	Projekt: Aldolasen.....	199
E.1.1	Die 2-Keto-3-desoxy-6-phosphoglukonat Aldolase (Eda _{EC}) und die 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogalaktonat Aldolase aus <i>E. coli</i> (DgoA _{EC})	199
E.1.1.1	Klonierung von Eda _{EC} (pCH::eda _{EC}).....	199
E.1.1.2	Erzeugung der Eda _{EC} -Varianten mittels SLIM	199
E.1.1.3	Klonierung von DgoA _{EC} (pCH::dgoA _{EC})	200
E.1.1.4	Erzeugung der DgoA _{EC} -Varianten	200
E.1.1.5	Expression und Isolation von Eda _{EC} und DgoA _{EC}	200
E.1.1.6	Stereoselektivitätsassay.....	201
E.1.2	Die 2-Keto-3-desoxy-6-phosphoglukonat Aldolase (Eda _{ZM}) aus <i>Zymomonas mobilis</i>	202
E.1.2.1	Klonierung und Mutagenese von <i>eda_{ZM}</i> aus <i>Z. mobilis</i> ATCC29191	202
E.1.2.2	Expression und Isolation von Eda _{ZM} und TEV-Eda _{ZM}	203
E.2	Projekt: Multikupferoxidase CueO _{RE}	204
E.2.1	Klonierungen und Mutagenese	204
E.2.1.1	Klonierung von cueO _{RE} (pHT::cueO _{RE}).....	205
E.2.1.2	Deletion des Methionin-reichen Schwanzes von CueO _{RE} (pHT::cueO _{RE} ΔMet _{RE}).....	205
E.2.1.3	Klonierung von cueO _{EC} mit Methionin-reichem Schwanz von CueO _{RE} (pHT::cueO _{EC} :Met _{RE}) 205	
E.2.1.4	Insertion der Methionin-reichen Region von CueO _{EC} in CueO _{RE} (pHT::cueO _{RE} ::Met _{EC} ΔMet _{RE}) 206	
E.2.1.5	Deletion der Methionin-reichen Region aus cueO _{EC} :Met _{RE} (pHT::cueO _{EC} ΔMet _{EC} :Met _{RE})	206
E.2.1.6	Erzeugung von pHT::cueO _{EC}	206
E.2.1.7	Sequenzierung der genomischen TAT-Sequenz von CueO _{RE}	207
E.2.1.8	Erstellung von pNH::cueO _{RE}	207
E.2.1.9	Erstellung von pCR::cueO _{RE} und pCR::cueO _{EC}	207
E.2.2	Expression von cueO aus <i>R. erythropolis</i> und <i>E. coli</i>	208
E.2.2.1	Heterologe Apo-Expression von cueO _{RE}	208
E.2.2.2	Testreihe zur heterologen Holo-Expression von cueO _{RE}	208
E.2.2.3	Heterologe Holo-Expression von cueO _{RE} und CueO _{EC}	209
E.2.3	Reinigung von CueO _{RE/EC} mittels IMAC	209
E.2.4	MALDI-ToF-Massenspektrometrie	210
E.2.5	Photometrische Kupferbestimmung.....	211
E.2.6	Rekonstitution von holo-CueO _{RE}	215
E.2.7	Enzym Assays	215
E.2.7.1	Der Standard-ABTS-Assay.....	215
E.2.7.2	Variationen des ABTS-Assays: Bestimmung von Temperatur- & pH-Optimum/Stabilität; Acetonitrilstabilität	216
E.2.7.3	Der Laccase-Assay.....	217
E.2.7.4	Der Kupfer-Oxidase-Assay.....	217
E.2.8	Kristallisation	219
E.2.8.1	Reinigung.....	219
E.2.8.2	Enzymatische Entfernung des His-Tags	219
E.3	Projekt: Enoatreduktasen	220
E.3.1	YqjM.....	220
E.3.1.1	Erstellung des Vektors pHT::yqjM.....	220
E.3.1.2	Erstellung von p::yqjM und Mutanten	221

E.3.1.3	Expression.....	221
E.3.1.4	Isolation von YqjM mittels IMAC.....	221
E.3.1.5	Studie zur Komplementation von apo-YqjM.....	222
E.3.1.6	Reinigung von pYqjM zu Kristallisationszwecken.....	222
E.3.1.7	Kristallisation von YqjM.....	223
E.3.1.8	Aktivitätsassay.....	224
E.3.2	Ncr _{ZM}	224
E.3.2.1	Klonierung der Enoatreduktase aus <i>Zymomonas mobilis</i>	224
E.3.2.2	Mutagenese von Ncr _{ZM}	224
E.3.2.3	Expression und Reinigung von Ncr _{ZM}	225
E.3.3	Synthese von (<i>E</i>)-1-Nitro-2-phenyl-prop-1-en (53).....	225
E.3.4	Reduktion von Nitroalkenen.....	226
E.3.5	Selektivitätsassay.....	226
E.3.6	Ncr _{PL}	228
E.3.7	Ncr _{LA}	228
E.3.7.1	Klonierung: Erstellung des pHT::ncr _{LA}	228
E.3.7.2	Erstellung des pHT::yqjM _{α1-β2} ncr _{LA} mittels SLIC.....	228
E.3.7.3	Erstellung des pHT::ncr _{LA} ΔC und pHT::yqjM _{α1-β2} ncr _{LA} ΔC.....	229
E.3.7.4	Erstellung des pHT::yqjMΔα1-β2.....	229
E.3.7.5	Erstellung des pHT::yqjMΔC.....	229
E.3.7.6	Erstellung des pHT::yqjMΔα1-β2ΔC:CA _{LA} mittels SLIC.....	229
E.3.7.7	Sequenzierung des genomischen Kontextes von ncr _{LA}	230
Der Anhang.....	231	
Vektoren.....	233	
Allgemeine Vektoren.....	233	
pCH::eda _{EC}	233	
pCH::dgoA _{EC}	234	
pHT::eda _{ZM}	235	
pNH::eda _{ZM}	236	
pET21a::yqjM.....	237	
pHT::yqjM.....	238	
Der p::yqjM.....	239	
pHT::ncr _{ZM}	240	
pHT::yqjMΔC:C _{LA}	241	
pHT::yqjMΔα1-α3ΔC:C _{LA}	242	
pHT::yqjMΔα1-α3.....	243	
pHT::yqjMΔC.....	244	
pHT::ncr _{LA}	245	
pHT::yqjM _{α1-α3} :ncr _{LA}	246	
pHT::yqjM _{α1-α3} :ncr _{LA} ΔC.....	247	
pHT::ncr _{LA} ΔC.....	248	
pHT::ncr _{PL}	249	
pHT::cueO _{RE}	250	
pNH::cueO _{RE}	251	
pHT::cueO _{RE} Δmet _{RE}	252	
pHT::cueO _{RE} ::met _{EC} Δmet _{RE}	253	
pHT::cueO _{EC}	254	
pHT::cueO _{EC} :met _{RE}	255	
pHT::cueO _{EC} Δmet _{EC}	256	

VI

pHT::cueO _{EC} Δmet _{EC} :met _{RE}	257
Der pCR*-Vektor	258
Der pCR-Vektor	259
pCR::cueO _{RE}	260
pCR::cueO _{EC}	261
MD-Simulationsskripte	262
Sander: Initiales Minimieren mit 25 kcal/molÅ Positionskontrolle	262
Sander: Initiales Minimieren mit 5 kcal/molÅ Positionskontrolle	263
Sander: NVT-Minimierung mit 5 kcal/molÅ Positionskontrolle	264
Sander: NPT-Minimieren mit 5 kcal/molÅ Positionskontrolle	265
Sander: NVT-Minimieren mit 5 kcal/molÅ Positionskontrolle	266
Sander: NVT-Minimieren mit 4 kcal/molÅ Positionskontrolle	267
Sander: NVT-Minimieren mit 3 kcal/molÅ Positionskontrolle	268
Sander: NVT-Minimieren mit 2 kcal/molÅ Positionskontrolle	269
Sander: NVT-Minimieren mit 1 kcal/molÅ Positionskontrolle	270
Sander: NVT-Minimieren ohne Positionskontrolle.....	271
Sander: NVT-Minimieren ohne Positionskontrolle II	272
Sander: NVT-Simulation ohne Positionskontrolle	273
GI-Nummern der verwendeten KDPG-Aldolasen für die evolutionäre Energiekonservierungsanalyse.....	274
GI-Nummern der verwendeten KDPGal-Aldolasen für die evolutionäre Energiekonservierungsanalyse.....	275
Abkürzungen	276
Allgemeine Abkürzungen	276
Biochemische Abkürzungen	278
Literaturverzeichnis.....	279
Danksagungen	296
Erklärungen.....	297
Stichwortverzeichnis	298