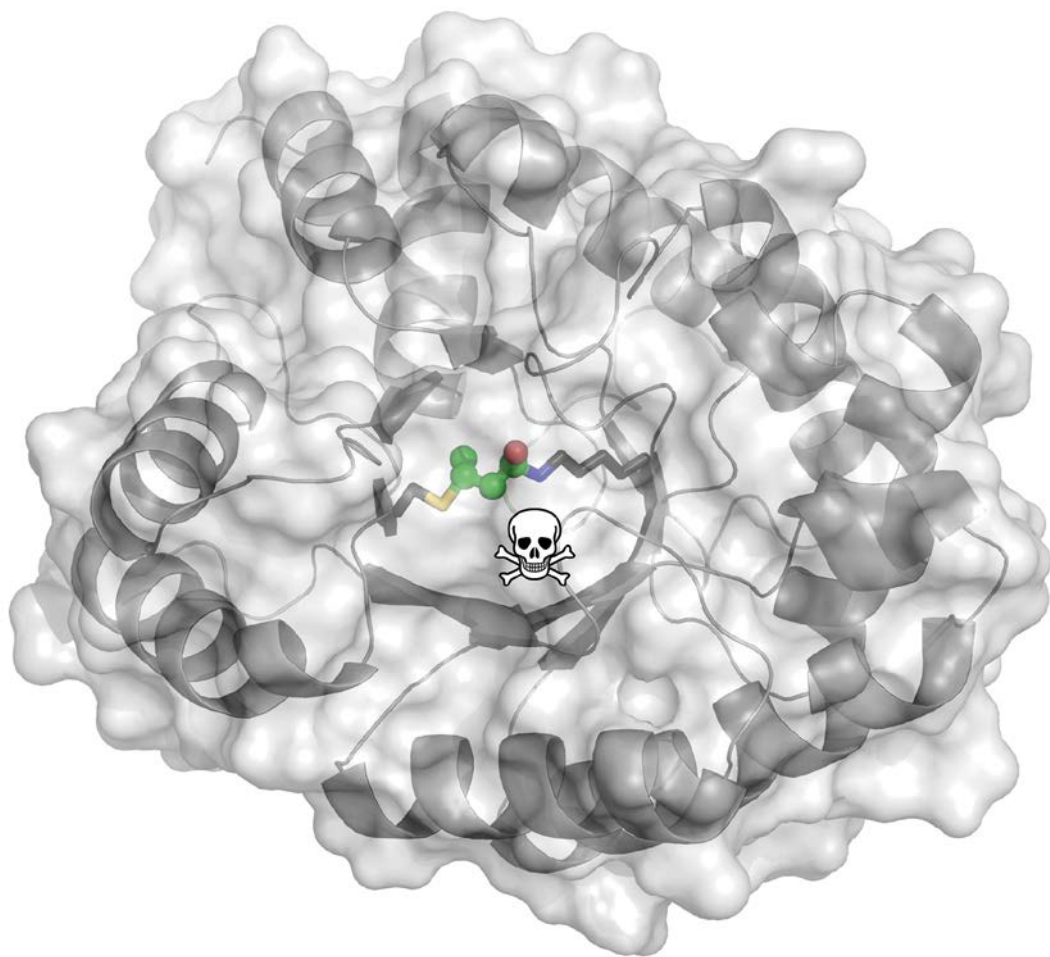


Strukturelle Untersuchungen zur Aktivität und Stabilität in Acetaldehyd-abhängigen Aldolasen

Markus Dick



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften
IBOC - Bioorganische Chemie

Strukturelle Untersuchungen zur Aktivität und Stabilität in Acetaldehyd-abhängigen Aldolasen

Markus Dick

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Band 24

ISBN 978-3-95806-165-1

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

Die 2-Desoxy-D-ribose-5-phosphat Aldolase (DERA) besitzt als C-C-verknüpfendes Enzym ein hohes Potential für den Einsatz in der organischen Synthese. Auf Grund der sehr guten stereoselektiven Kontrolle in Kombination mit milden Reaktionsbedingungen ohne zusätzliche, toxische Chemikalien ist das Enzym zu einer vielversprechenden Alternative zu rein chemischen Methoden für die Herstellung von Bausteinen für biologisch aktive Verbindungen geworden. Prominentes Beispiel einer solchen Synthese ist die DERA-katalysierte Herstellung der Seitenkette von bestimmten Statinderivaten, welche als Cholesterin-senkende Medikamente einen Milliardenmarkt darstellen.

Trotzdem limitieren entscheidende Nachteile wie eine geringe Stabilität und Substratbreite den industriellen Einsatz des Biokatalysators. Daher liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Optimierung der DERA für eine synthetische Anwendung. Im ersten Teil der Dissertation wird erläutert, wie mit Hilfe von computergestützten Methoden die Thermostabilität des Enzyms durch den Austausch von einzelnen Aminosäuren erhöht werden konnte. Im Laufe der Evolution hat die Natur bereits in sog. extremophilen Organismen Anpassungen der DERA bezüglich Aktivität und Stabilität durchgeführt. Daher wird im zweiten Teil der Arbeit beschrieben, wie durch vergleichende, strukturelle Studien molekulare Ursachen für die Adaption der Enzyme gefunden und diese für die Verbesserung der biochemischen Eigenschaften genutzt werden. Abschließend konnte im dritten Projekt durch hochauflösende Verfahren wie NMR- und Röntgenkristallographie-Studien die Ursache und eine Präventionsmöglichkeit für die schnelle Inaktivierung des Enzyms bei hohen Substratkonzentrationen gefunden werden.