

**Funktionelle Charakterisierung  
bakterieller Histondeacetylase-ähnlicher  
Amidohydrolasen (HDAH)**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Christian Hildmann  
aus Kassel

Göttingen 2004

**D7**

**Referent: PD Dr. Andreas Schwienhorst**

**Korreferent: PD Dr. Harald Kolmar**

**Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.05**

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	Acetylierungen von $\alpha$ -Aminogruppen N-terminaler Aminosäuren.....	8
1.2	Acetylierung an $\epsilon$ -Aminogruppen interner Lysine.....	9
1.2.1	Acetylierung von $\epsilon$ -Aminogruppen interner Lysine in Eukaryonten.....	9
1.2.2	Acetylierung von $\epsilon$ -Aminogruppen interner Lysine in Prokaryonten und Archäen.....	11
1.3	Enzyme der Histondeacetylase-Superfamilie.....	12
1.3.1	Enzyme der Klasse der Sir2-(ähnlichen) Enzyme.....	13
1.3.2	Enzyme der Klasse der Acetylpolyamin-Amidohydrolasen (APAH) und der <i>acetoin utilisation proteins</i> (AcuC).....	14
1.4	Verpackung der DNA und Funktion der Histondeacetylase.....	16
1.5	Postulierter Reaktionsmechanismus der Deacetylierung des <i>histondeacetylase-like proteins</i> (HDLP) aus <i>Aquifex aeolicus</i> .....	19
1.6	Motivation zur Suche nach deacetylierenden Enzymen.....	23
1.7	APAH aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	25
1.8	Ziel der Arbeit.....	26
2	Material.....	27
2.1	Bakterienstämme.....	27
2.2	Genomische DNA.....	27
2.3	Plasmide.....	28
2.3.1	pQEB-MCS.....	28
2.3.2	pQEB-CH.....	29
2.3.3	pCR <sup>®</sup> 4-TOPO.....	29
2.4	DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker.....	31
2.4.1	DNA-Längenstandards.....	31
2.4.2	Protein-Molekulargewichtsmarker.....	31
2.5	Oligodesoxyribonukleotide.....	31

---

2.5.1 Primer zur Amplifikation der <i>FB188</i> HDAH.....	32
2.5.2 Primer zur Amplifikation der <i>PA3774</i> HDAH.....	32
2.5.3 Primer zur Sequenzierung der Amidohydrolasen.....	32
2.5.4. Primer zur Sequenzierung der TOPO-Klonierung.....	33
2.5.5 Primer zur Generierung der Mutanten über QCM-Verfahren.....	33
2.6 Enzyme und Proteine.....	35
2.7 Chemikalien.....	36
2.8 Kits.....	38
2.9 Sonstige Materialien und Geräte.....	38
2.10 Nährmedien.....	42
2.10.1 Nährmedien für <i>Escherichia coli</i> .....	42
2.10.2 Nährmedien für <i>Bordetella/Alcaligenes FB188</i> .....	43
2.11 Lösungen und Puffer.....	43
2.12 Computer-Software.....	48
<b>3 Methoden</b>	
3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	49
3.1.1 Kultivierung und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> .....	49
3.1.2 Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	49
3.1.2.1 Präparation und Transformation elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	49
3.1.2.2 Präparation und Transformation CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	50
3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	51
3.2.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen.....	51
3.2.2 Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen.....	52
3.2.2.1 Fällung von DNA mit Ethanol.....	52
3.2.2.2 Fällung von DNA mit Isopropanol.....	52
3.2.3 Extraktion von DNA aus wässrigen Lösungen mit organischen Lösungsmitteln.....	53
3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	53
3.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	54

3.2.6	Abtrennung von Oligonukleotiden und kurzen DNA-Fragmenten aus DNA-Gemischen.....	54
3.2.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	55
3.2.7.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> im analytischen Maßstab (Mini-Präparation).....	55
3.2.7.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> im präparativen Maßstab (Midi-Präparation).....	56
3.2.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	57
3.2.9	Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	57
3.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten.....	58
3.2.11	Direkte Klonierung von PCR-Produkten (TA-Cloning).....	58
3.2.12	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	59
3.2.13	Direkte PCR-Mutagenese eines Zielvektors (QCM-Verfahren).....	60
3.2.13.1	QCM-PCR unter Zugabe beider Primer.....	61
3.2.13.2	QCM-PCR unter Zugabe von nur einem Primer.....	61
3.2.14	PAA-Gelelektrophorese.....	62
3.2.15	Mikrodialyse von Ligationsansätzen.....	62
3.2.16	Dephosphorylierung von Vektorfragmenten.....	63
3.2.17	Sequenzierung von Plasmid-DNA nach der Kettenabbruch-Methode.....	63
3.3	Proteinchemische Arbeitsmethoden.....	64
3.3.1	Isolierung von cytoplasmatischen Proteinen aus <i>Escherichia coli</i> .....	64
3.3.1.1	Nachweis der Expression von cytoplasmatischen Proteinen aus <i>Escherichia coli</i> im analytischen Maßstab.....	64
3.3.1.2	Nachweis der Expression von cytoplasmatischen Proteinen aus <i>Escherichia coli</i> im präparativen Maßstab.....	64
3.3.1.3	Isolierung von cytoplasmatischen Proteinen aus <i>Escherichia coli</i> für Kristallisationsexperimente.....	65
3.3.2	Zellaufschluß.....	65
3.3.2.1	Disruption.....	65
3.3.2.2	Sonifizierung.....	66
3.3.3	Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC).....	66
3.3.4	Perfusionschromatographie.....	67
3.3.5	Gelfiltration.....	68
3.3.6	Einkonzentrieren von Proteinlösungen durch Ultrafiltration.....	68
3.3.7	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	69

3.3.7.1 Herstellung 10 und 12 %iger Polyacrylamidgele.....	70
3.3.7.2. Probenvorbereitung.....	70
3.3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	70
3.3.8 Bestimmung der Konzentration von Proteinen in einer wässrigen Lösung.....	71
3.3.9 Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen über die Bindung von Antikörpern und Alkalischer Phosphatase-Nachweis ( <i>Western Blot</i> ).....	72
3.4 Enzymatische Aktivitätstests.....	73
3.4.1 Bestimmung von $K_m$ - und $V_{max}$ -Werten.....	73
3.4.2 Fluorescamin-Assay.....	74
3.4.3 <i>Acetic Acid Standard Test</i> .....	76
3.4.4 Assay zur Deacetylierung von radioaktiv markierten Histonen .....	76
3.4.5 HDAC-Assay.....	77
3.4.5.1 Bestimmung der $K_m$ - und $V_{max}$ -Werte für HDAC-Substrate im 96 well-Format.....	78
3.4.5.2 Bestimmung der IC50 –Werte von Inhibitoren im 96 well-Format...79	
3.4.5.3 Bestimmung der pH-Abhängigkeit von HDAH.....	79
3.4.5.4 Bestimmung der Salz- und Lösungsmitteltoleranz von HDAH.....	80
3.5 Biophysikalische Arbeitsmethoden.....	80
3.5.1 ICP-Analyse ( <u>I</u> nductively <u>C</u> oupled <u>P</u> lasma Atomic Emission Spectrometry) zur Bestimmung des Zinkgehaltes der HDAH.....	80
4 Ergebnisse.....	82
4.1 Isolierung, Amplifikation und Klonierung der <i>FB188</i> HDAH.....	82
4.2 Genanalyse des <i>FB188</i> HDAH-Gens.....	86
4.2.1 Analyse der regulatorischen Elemente des <i>FB188</i> HDAH-Gens.....	86
4.2.2 Sequenzvergleich und Charakterisierung <i>FB188</i> HDAH.....	87
4.3 Expression von rekombinanter <i>FB188</i> HDAH und Aufreinigung mittels Affinitätschromatografie an immobilisierten Metallionen (IMAC).....	90
4.3.1 Expression der <i>FB188</i> HDAH in XL1 blue und Aufreinigung über $Ni^{2+}$ -IMAC.....	90
4.3.2 Expression der <i>FB188</i> HDAH in XL1 blue, Aufreinigung über $Zn^{2+}$ -IMAC und ICP-Analyse.....	91

4.3.2.1 ICP-Analyse der <i>FB188</i> HDAH zur Untersuchung der Kofaktorenabhängigkeit des Enzyms.....	92
4.3.3 Expression der <i>FB188</i> HDAH in B834 und Aufreinigung über $Zn^{2+}$ -IMAC.....	94
4.3.4 Produktion nativer <i>FB188</i> HDAH und Aufreinigung über Perfusionschromatografie und Gelfiltration.....	95
4.3.5 Nachweis der exprimierten <i>FB188</i> HDAH über <i>Western Blotting</i> .....	98
4.4 Isolierung, Amplifikation und Klonierung der HDAH <i>PA3774</i> .....	100
4.5 Expression der <i>PA3774</i> HDAH in XL1 blue und Aufreinigung über $Zn^{2+}$ -IMAC.....	102
4.6 Untersuchungen zur Substratspezifität der <i>FB188</i> HDAH.....	104
4.6.1 Umsatz von Acetylpolyaminen und Nachweis über den <i>Acetic acid standard test</i> .....	104
4.6.2 Umsatz von NAA und Nachweis über Fluorescamin.....	105
4.6.3 Umsatz der <i>FB188</i> HDAH von radioaktiv markierten Histonen.....	106
4.7 Aktivitätsbestimmung der HDAHs im Standard-HDAC-Assay.....	107
4.7.1 Assay-Entwicklung.....	107
4.7.2 pH-Abhängigkeit der Aktivität der HDAHs.....	108
4.7.3 Abhängigkeit der <i>FB188</i> HDAH von bivalenten Kofaktoren.....	109
4.7.4 Bestimmung von $K_m$ - und $V_{max}$ -Werten der HDAHs mit dem Standard-Substrat Boc-Lys( $\epsilon$ -Acetyl)-MCA im Standard-HDAC-Assay.....	110
4.7.5 Umsatz der <i>FB188</i> HDAH mit tripeptidischen Substraten.....	114
4.7.6 Untersuchung der Substratspezifität der HDAHs - Austausch des Acetyl-Restes durch andere Substituenten.....	116
4.7.7 Untersuchungen zur Enantioselektivität der HDAHs und zur Seitenkettenlängenvariation des Lysins.....	119
4.8 Competitionsexperimente mit HDAHs.....	121
4.8.1 Competition durch Säureanionen.....	121
4.8.2 Competition der HDAHs mit Polyaminen.....	122
4.9 Inhibition der HDAHs mit Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACI).....	124
4.9.1 Inhibition der <i>FB188</i> HDAH mit Trichostatin A (TSA), Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) und Cyclopentyl-Propionyl-Hydroxamsäure (CypX) – Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte...	124

4.9.2 Inhibition der PA3774 HDAH mit Trichostatin A (TSA), Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) und Cyclopentyl- Propionyl-Hydroxamsäure (CypX) – Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte...	127
4.9.3 Inhibition durch putative Übergangszustandsmimetika.....	129
4.9.4 Wachstumskurven von FB188 mit HDAC-Inhibitoren.....	131
4.10 Mutagenese-Studien der FB188 HDAH zur Untersuchung des Katalysemechanismus –Austausch von essentiellen Aminosäuren.....	132
4.10.1 Austausch der Aminosäuren des aktiven Zentrums.....	136
4.10.2 Austausch von Aminosäuren in der Substratbindungstasche.....	138
4.10.3 Austausch von Aminosäuren in der unteren Kavität sowie Mutationen in Richtung der HDAC-Klasse I-Enzyme.....	141
4.11 Erste Experimente zur Identifikation des natürlichen Substrates der FB188 HDAH.....	143
4.12 Kristallisation der FB188 HDAH.....	147
5 Diskussion.....	
5.1 Analyse der Gene der FB188 HDAH und der PA3774 HDAH.....	149
5.2 Zink-Abhängigkeit der beiden HDAHs .....	150
5.3 Substratspezifität - Auf der Suche nach dem natürlichen Substrat der FB188 HDAH.....	152
5.4 Reaktionsmechanismus und Substrat-/Inhibitor-Bindung.....	161
6 Zusammenfassung und Ausblick .....	168
7 Literaturverzeichnis.....	170
8 Anhang.....	178
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	178
8.2 Sequenzen der verwendeten HDAHs.....	181
8.2.1 HDAH aus <i>Bordetella/Alcaligenes FB188</i> .....	181
8.2.2 HDAH aus <i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i> .....	182
8.3 Fluoreszenz-Kalibrierungsgerade (BMG-Reader).....	183
8.4 Bradford-Kalibrierungsgerade.....	184
8.5 Fluorescamin-Kalibrierungsgerade.....	184
8.6 Danksagung.....	186
8.7 Lebenslauf.....	188

# 1. Einleitung

Posttranslationale Proteinmodifikationen spielen eine wichtige Rolle in der lebenden Zelle. Durch diese Modifikationen können die physikalischen und chemischen Eigenschaften eines Proteins, und damit die Stabilität und natürlich die Funktion eines Proteins signifikant verändert werden. Als Modifikationen von Proteinstrukturen sind u.a. Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung, Glykosylierung und Sumoylierung bekannt. Da diese Modifikationen mit einer Vielzahl von Vorgängen (Signal-Transduktion, Transkriptionsregulierung, Proteolyse, Zell-Zell-Interaktionen und einer großen Anzahl weiterer zellulärer Abläufe) in Zusammenhang gebracht werden können, stellen sie ein interessantes Forschungsgebiet dar. Neben einem eher akademischen Interesse besteht dabei zunehmend auch ein ganz praktisches Interesse. Jüngste Forschungen zeigen nämlich, dass Proteinmodifikationen auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Zivilisationskrankheiten wie Erkrankungen des Herzens, Krebs, Neurodegenerativen Erkrankungen oder Diabetes spielen.

## 1.1 Acetylierungen von $\alpha$ -Aminogruppen N-terminaler Aminosäuren

Im Rahmen von posttranslationalen Modifikationen können Proteine und Peptide eine Vielzahl von Umgestaltungen erfahren. Dabei ist die Acetylierung von besonders großer Bedeutung. Man unterscheidet N-terminale und interne Acetylierungen (z.B. an Lysin-Seitenketten). N-terminale Acetylierungen werden von einer großen Anzahl sogenannter N-Acetyltransferasen (NATs) katalysiert. Diese weisen keine uniforme Sequenz auf und unterscheiden sich vor allem in ihren Amino-terminalen Bereichen (Polevoda *et al.*, 1999). Die N-Acetyltransferasen transferieren Acetyl-Gruppen von Acetyl-Coenzym A auf  $\alpha$ -Aminogruppen von N-terminalen Aminosäuren (Methionin, Glycin und Threonin in 95 % aller Fälle, aber auch Acetylierung von Serin oder Alanin sind bekannt).

Die N-terminale Acetylierung geschieht bei Polypeptiden eukaryontischen Ursprungs sowohl ko- (Driessen *et al.*, 1985; Persson *et al.*, 1985; Polevoda and Sherman, 2000) als auch post-translational (Bannister *et al.*, 2000; Dockray, 1987; MacRae, 1997; Smyth *et al.*, 1979).

Die Funktion der N-terminalen Acetylierung ist noch relativ unerforscht. Bekannt ist u.a. dass durch N-terminale Acetylierung Peptidhormone aktiviert werden können, eine Schutzfunktion vor N-terminaler Degradation ist ebenfalls nicht auszuschließen.

Über die N-terminale Acetylierung von prokaryotischen Proteinen ist wenig bekannt. Bisher konnte nachgewiesen werden, dass die wenigen, bekannten Proteine posttranslational acetyliert werden. Die ribosomalen Proteine S5, S18 und L12 aus *E. coli* (Tanaka *et al.*, 1989; Yoshikawa *et al.*, 1987) sowie das myco-bakterielle L12 konnten bisher als Targets identifiziert werden, ebenso die dazugehörigen N-Acetyltransferasen. Die identifizierten N-Acetyltransferasen besitzen Ähnlichkeiten zu den eukaryontischen NATs, welche ebenfalls für die Modifikation von ribosomalen Proteinen an Serin- und Alanin-Positionen verantwortlich sind (Kouzarides, 2000).

Alle Acetylierungen an N-terminalen Positionen haben gemein, dass sie irreversibel sind.

## 1.2 Acetylierung an $\epsilon$ -Aminogruppen interner Lysine

### 1.2.1 Acetylierung von $\epsilon$ -Aminogruppen interner Lysine in Eukaryonten

Von großer Wichtigkeit sind auch Acetylierung der  $\epsilon$ -Aminogruppe interner Lysine. Der wichtigste Unterschied dieser Reaktion zu N-terminalen Acetylierungen liegt darin, dass sie reversibel ist. Natürliche Substrate in Eukaryonten sind DNA-Bindeproteine (Histone, Transkriptionsfaktoren), *high-mobility-group*-Proteine (HMGs), Kern-Transport-Proteine sowie Tubulin. Man geht davon aus, dass z.B. die Transkriptionsregulierung stark vom Acetylierungsgrad der beteiligten Proteine/Proteinkomplexen abhängt. Neben Methylierung (von Argininen und Lysinen), Phosphorylierung (von Serinen) und Ubiquitinierung (von Lysinen) macht die Acetylierung von Lysinen einen großen Anteil der posttranslationalen Modifikationen in Histonen aus (Turner, 2002).

Histone besitzen an ihren N-terminalen Enden eine Vielzahl von Lysinen, die ihnen einen positiven Ladungscharakter verschaffen. Diese Eigenschaft vermittelt direkt oder indirekt die Bindung an DNA sowie an benachbarte Nukleosomen. Durch Acetylierungen der geladenen Lysinreste wird diese positive Ladung aufgehoben. Dadurch verändern sich Histon-Nichthistonprotein- und auch Histon-DNA-Wechselwirkungen. Eine gelockerte

Chromatinkonformation ist die Folge (Berger, 2002). Bereits vor 40 Jahren wurden Acetylierungen (und Methylierungen) der Histonschwänze mit der Regulation der Transkription in Verbindung gebracht (Allfrey *et al.*, 1964; Pogo *et al.*, 1966). Aber erst wesentlich später wurde der direkte Zusammenhang zwischen Acetylierung und transkriptioneller Aktivierung aufgezeigt (Hebbes *et al.*, 1988) und die sog. Histon-Code Hypothese aufgestellt (Strahl and Allis, 2000; Turner, 2000).

Generell konnte in den letzten Jahren eine Korrelation aktiver Gene mit einer Hyperacetylierung der Histone ihrer Nukleosomen und eine Stilllegung der Transkription (*silencing*) infolge Hypoacetylierung festgestellt werden (Grunstein, 1997; Wade *et al.*, 1997). Für das IFN $\beta$ -Gen konnte z.B. gezeigt werden, dass eine sequenzielle Acetylierung von Lys8 am Histon H4 und Acetylierung von Lys9 und Lys14 am H3 zuerst zur Rekrutierung von SWI/SNF und des basalen Transkriptionsfaktors TFIID der RNA-Polymerase II und somit letztlich zur Aktivierung des IFN $\beta$ -Gens *in vitro* (Agalioti *et al.*, 2002) führten. Es gibt allerdings Ausnahmen für dieses sich wahrscheinlich zu einfach vorgestellte Regulationsverfahren. Eine Acetylierung von Lys12 an H4 ist nämlich entgegen der allgemeinen Regel in Heterochromatin von Hefe und Fruchtfliege zu finden und somit wohl als ein Repressionssignal zu verstehen (De Rubertis *et al.*, 1996; Grunstein, 1997; Rundlett *et al.*, 1996)

Die Bindungseigenschaften von Transkriptionsfaktoren können ebenfalls durch Acetylierung reguliert werden. Liegen die Acetylierungsstellen außerhalb der DNA-Bindedomäne kann es zu einer Steigerung der DNA-Bindung und somit zur Transkriptionsaktivierung kommen. Beispiele hierfür sind die Proteine p53 (Gu and Roeder, 1997), E2F1 (Martinez-Balbas, *et al.* 2000) und GATA1 (Boyes *et al.*, 1998). Andererseits kann eine Acetylierung innerhalb der DNA-Bindedomäne die Wechselwirkungen auflösen und die Transkription somit reprimieren (HMGI).

Weitere Funktionen der Acetylierung beziehen sich auf Protein-Protein Wechselwirkungen (Chen *et al.*, 1999), Regulierung von Kern-Transport (Importin  $\alpha$ 7) (Bannister *et al.*, 2000) sowie der Assemblierung von Tubulin. Tubulin besteht aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen (Luduena, 1998), die sich je nach Modifikationsgrad zu heterodimeren Komplexen zusammen lagern und Protofilamente bilden. Diese Protofilamente sind die Grundbausteine für die Wände von Mikrotubuli. Eine Deacetylierung von  $\alpha$ -Tubulin durch die humane, cytoplasmatisch lokalisierte Histondeacetylase 6 konnte bereits nachgewiesen werden (Hubbert *et al.*, 2002).

## 1.2.2 Acetylierung von $\epsilon$ -Aminogruppen interner Lysine in Prokaryonten und Archäen

Aus der Literatur sind bisher zwei Beispiele für eine Acetylierung von Lysinen an ihrer  $\epsilon$ -Amino-Position in Bakterien bekannt. Das erste Exempel ist die Acetylierung von CheY aus *E. coli* (Ramakrishnan *et al.*, 1998). Dieses Protein stellt einen sog. *Response Regulator* in der Chemotaxis dar. Die Flagellenrotation richtet sich im Allgemeinen gegen den Uhrzeigersinn (*ccw*, *counterclockwise*). Eine Modifikation dieses *Response Regulators* CheY in Form einer Acetylierung resultiert in einer Änderung der Flagellenrotation mit dem Uhrzeigersinn (*cw*, *clockwise*). Das Prinzip der Flagellenrotations-Änderung durch acetyliertes CheY ist allerdings noch nicht genau bekannt.

Die Lysine an Position 92 und 109 konnten als Acetylierungsstellen identifiziert werden (Barak and Eisenbach, 2001). *In vivo* bewiesen wurden diese Aussagen durch die Generierung einer  $\Delta$ acs- sowie einer CheY-(K92R)-Mutante. acs ist die Acetyl CoenzymA Synthetase von CheY und Lysin 92 die oder eine der Ziel-Aminosäure(n) der Acetylierung. Beide Varianten zeigten einen Defekt in der chemotaktischen Antwort. Kürzlich konnte sogar ein ko-regulatorischer Effekt zwischen Acetylierung und Phosphorylierung von CheY nachgewiesen werden (Barak and Eisenbach, 2004). Phosphoryliertes CheY hat eine erhöhte Bindungsaffinität zum *switch* Protein FliM, welches an der Basis des Flagellenmotors sitzt, und durch Bindung die Richtung der Flagellenrotation, analog dem acetylierten CheY, von *ccw* in *cw* ändert. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der Vorgang der Acetylierung durch Phosphorylierung gehemmt wird. Genauere Zusammenhänge konnten allerdings noch nicht ermittelt werden.

Das zweite Beispiel von Acetylierung an  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinen bezieht sich auf das Protein Alba aus dem Archäon *Sulfolobus solfataricus* (Bell *et al.*, 2002). Dieses wird durch das Sir2-Protein deacetyliert. Bei den Enzymen der Sir2-ähnlichen Deacetylasen (oder auch Sirtuine genannt) handelt es sich um Enzyme, die sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten anzutreffen sind, sich aber von den Enzymen der Histondeacetylase-Superfamilie (HDAC, APAH, *AcuC*) unterscheiden (siehe 1.3.1). Über Immunpräzipitation von ssSir2 (*Sulfolobus solfataricus* Sir2), dem Sir2 Homolog aus der Hefe, konnte ein Protein der Masse von ca. 10 kDa isoliert werden. Dieses stellte sich nach weiterer Analyse als das in *Sulfolobus* vorherrschende Chromatin-Protein heraus. Es ist in Archäen hoch

konserviert und Sequenzhomologe sind in vielen Teilen der Eukaryonten zu finden. Nach den Experimenten wurde dieses Protein in Alba (Acetylation lowers binding affinity) umbenannt.

DNA-Bindungsstudien zeigten, dass Lysin16/Lysin17-Mutanten von Alba eine 30-fach schlechtere DNA-Bindung zeigen (Bell *et al.*, 2002). Ebenso wurde in *in vitro* Transkriptionssystemen nachgewiesen, dass rekombinantes, unacetyliertes Alba die Transkription reprimiert. Man vermutet hier, dass die Deacetylierung von Alba durch ssSir2 eine Regulierung der Transkription durch Einflüsse auf die DNA-Bindung darstellen könnte. In einer weiteren Arbeit konnte die Struktur von Alba über eine Röntgenkristallografische Analyse aufgeklärt werden (Zhao *et al.*, 2003). Hierbei konnten nicht nur Modelle zur Interaktion von Alba und DNA-Strukturen entwickelt, sondern auch das Lysin 16 als Position der Acetylierung bestätigt werden (Wardleworth *et al.*, 2002).

### 1.3 Enzyme der Histondeacetylase-Superfamilie

Die reversible Acetylierung von Histonen spielt eine bedeutende Rolle bei der Transkriptionsregulierung in eukaryotischen Zellen. Darüber hinaus gibt es Evidenzen, dass die Acetylierung von nicht-Histon Proteinen ebenfalls eine tragende Rolle in anderen zellulären Prozessen spielt (Kouzarides, 2000). Bisher konnten zwei verschiedene Familien von Enzymen, die eine Deacetylierungsreaktion durchführen, identifiziert werden. Zum einen handelt es sich hierbei um die Histonedeacetylasen (HDACs) und zum anderen um die Sir2-ähnlichen Enzyme, auch Sirtuine genannt (Grozinger and Schreiber, 2002). Diese Einteilung ist allerdings nicht streng konform, in einigen Publikationen werden die Sir2-ähnlichen Enzymen auch als Klasse III Enzyme der Histondeacetylase-Familie bezeichnet (Gray and Ekstrom, 2001), so dass beide Begriffe in der Literatur Verwendung finden. Enzyme der HDAC Klasse I stellen die sog. RPD3-ähnlichen Enzyme dar. Die Zuordnung von Enzymen in diese Klasse erfolgt aufgrund von Sequenzhomologien zu dem nachgewiesenen Transkriptions-Regulator RPD3 (Furukawa *et al.*, 1996) aus Hefe. Neben der HDAC1 (Taunton *et al.*, 1996) zählen die HDAC2 (Betz *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1996), HDAC3 (Dangond *et al.*, 1998; Emiliani *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1997), HDAC8 (Buggy *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2000; Van den Wyngaert *et al.*, 2000), die allerdings einige Besonderheiten aufweist, und die HDAC10 ebenso zu dieser Klasse (Gregoretto *et al.*, 2004).

Eine Isolierung des Transkriptions-Korepressor HDA1 aus Hefe und ein Vergleich zu RPD3 zeigte leichte Unterschiede dieser beiden Proteine (Rundlett *et al.*, 1996), was in einer Aufstellung der HDAC Klasse II (HDA1 Klasse) resultierte (Fischle *et al.*, 1999; Grozinger *et al.*, 1999). Zu dieser Klasse II zählen die HDAC4 (Wang *et al.*, 1999), HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 und die HDAC11 (Gregoretti *et al.*, 2004). Enzyme beider Klassen weisen im Bereich der etwa 390 Aminosäuren umfassenden katalytischen Domäne eine hohe Homologie auf, divergieren am N- und C-Terminus jedoch stark voneinander (Khochbin and Wolffe, 1997; Verdin *et al.*, 2003).

### 1.3.1 Enzyme der Klasse der Sir2-(ähnlichen) Enzyme

Während die Histondeacetylasen der Klassen I und II bisher ausschließlich in Eukaryonten nachgewiesen werden konnten, findet man die Sir2-ähnlichen Enzyme sowohl in Eukaryonten als auch Bakterien und Archäen. Und obwohl diese ebenso in Prozesse der Transkriptionsregulierung als auch in Vorgänge der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur oder des Zellzyklus involviert sind, gibt es weitere Unterscheidungsmerkmale zu den Histondeacetylasen. Einer dieser Unterschiede lässt sich an einer konservierten, 275 Aminosäuren langen katalytischen Domäne, die keinerlei Verwandtschaft zu Histondeacetylasen der Klassen I und II zeigt, belegen. Zudem besitzen die Sir2-ähnlichen Enzyme einen, von den HDACs abweichenden, NAD-abhängigen Reaktionsmechanismus. Es verwundert daher nicht, dass sich die Sir2-Enzyme nicht von potenten HDAC-Inhibitoren wie Trichostatin A oder Trapoxin hemmen lassen (Grozinger and Schreiber, 2002)

Die Familie der Sir2- bzw. Sir2-ähnlichen Proteine lässt sich in vier Klassen aufteilen (Frye, 2000), wobei Enzyme prokaryotischen Ursprungs in den Klassen II und III anzutreffen sind. In der Subklasse II gelten *Streptomyces coelicolor*, *Mycobacter avium* sowie *Bordetella pertussis* als Beispielorganismen. Subklasse III bildet den Hauptbestandteil der prokaryotischen Sir2-Proteine: diese findet man in Organismen wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Pasteurella multocida* als bakterielle Beispiele sowie in *Archeoglobus fulgidus*, *Aeropyrum pernix* und einigen Vertretern der *Pyrococcus*-Gattung als Beispiele aus dem Reich der Archäen. Subklassen I und IV sind bisher nicht in Bakterien gefunden worden.

### 1.3.2 Enzyme der Klasse der Acetylpolyamin-Amidohydrolasen (APAH) und der *acetoin utilisation proteins* (AcuC)

Ein Sequenz-*blast* von RPD3 (Hefe), HDAC1 (Mensch), HDA1 (Hefe) und anderen eukaryontischen Histondeacetylasen zeigte, dass Enzyme der HDAC-Familie hohe Sequenzähnlichkeiten mit Enzymen aus Archäen und Bakterien aufweisen. Diese Ähnlichkeiten treten besonders deutlich in Form von neun Motiven innerhalb der Sequenzen von Acetylpolyamin-Amidohydrolasen (APAHs) und den *acetoin utilisation proteins* (AcuC) (Leipe and Landsman, 1997) hervor. Darüber hinaus können für die HDACs und die APAHs als funktionelle Gemeinsamkeiten das (i) Erkennen einer acetylierten Aminoacyl-Gruppe, (ii) das Entfernen einer Acetyl-Gruppe durch Spaltung einer Amidbindung und (iii) die Erhöhung der positiven Ladung des Substrates herausgestellt werden.

Substrate für diese Enzyme bilden die Acetylpolyamine. Polyamine in Form von Putrescin, Cadaverin, Spermidin und Spermin sind im Reich der Prokaryoten und der Eukaryoten weit verbreitet. Sie sind essentiell für das Zellwachstum, universell detaillierte Funktionen konnten ihnen noch nicht zugeschrieben werden. Eine Rolle bei der Verpackung der bakteriellen DNA wird von einigen Forschern für wahrscheinlich gehalten (Morgan, 1998). In höheren Eukaryonten modulieren sie die Aktivität von Kanal-Aktivitäten von Rezeptoren wie dem N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor. Diese Rezeptoren spielen eine Rolle bei Glutamat-vermittelten Kanal-Veränderungen im Hirn und Vorgängen der Neurotoxizität im zentralen Nervensystem (Nakanishi, 1992). Spermin besitzt eine stimulatorische Funktion auf die Protein-Kinase Casein-Kinase 2 (Leroy *et al.*, 1995). Bisher sind vier Schlüsselenzyme aus dem Polyamin-Metabolismus bekannt: L-Ornithin-Decarboxylase generiert Putrescin aus L-Ornithin und S-Adenosylmethionin-Decarboxylase bildet decarboxyliertes S-adenosylmethionin. Spermidine- und Spermin-Syntase transferieren eine Aminopropyl-Gruppe von decarboxyliertem S-Adenosylmethionin, welches hier als Aminopropyl-Donor wirkt, auf Putrescin und Spermidin (Tabor and Tabor, 1984).

Enzyme der Klasse der Acetylpolyamin-Amidohydrolasen sind bisher aus *Streptomyces avellaneus* (Okada, 1981), *Arthrobacter* sp. (Kobayashi, 1985) und *Micrococcus luteus* (Miyazaki, 1985) bekannt. Diese deacetylieren speziell Acetyl-Putrescin. Aus dem Proteobakterium *Mycoplana ramosa* konnte ein Enzym isoliert werden, welches alle

Typen von Acetyl-Polyaminen prozessiert (Sakurada *et al.*, 1996). Dieses Enzym liegt in aktiver Form als Dimer vor, eine Zink-Abhängigkeit konnte nachgewiesen werden. Grundsätzlich können Enzyme aus der Klasse der APAHs über einen großen Bereich von Eubakterien nachgewiesen werden, in einigen Organismen (*Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*) fehlen sie jedoch gänzlich (Gregoretti *et al.*, 2004).

Die andere Gruppe von HDAC-ähnlichen Enzymen stellen die *acetoin utilisation proteins* (AcuCs) dar. Als Beispielorganismen hierfür können *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus xylosus* genannt werden (Leipe and Landsman, 1997). Das AcuC-Gen ist Bestandteil des AcuABC-Operons, welches in unmittelbarer Nähe zum Acetyl-CoA-Synthase-Gen gefunden wurde (Grundy *et al.*, 1993).

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Disruption des *Bacillus subtilis* AcuABC-Operons im Bereich des AcuA-Gens mit einem signifikant schlechterem Wachstumsverhalten mit Acetoin und Butandiol als einzigen C-Quellen einhergeht (Grundy *et al.*, 1993). Das AcuA-Gen wiederum beinhaltet ein Sequenzmotiv, welches Ähnlichkeiten zu nachgewiesenen, konservierten Acetyltransferasen zeigt (Grundy *et al.*, 1993; Neuwald, 1997).

Acetoin ( $\text{CH}_3\text{-CO-HCOH-CH}_3$ ) ist ein Fermentationsprodukt von vielen Bakterien und wird im Butandiol-Zyklus zu Acetat konvertiert, sofern andere C-Quellen fehlen. Es scheint daher möglich, dass die Deacetylierung von Acetoin oder Intermediaten des Butandiol-Zyklus einen ähnlichen Reaktionsmechanismus wie den der HDAHs oder APAHs erwarten lässt.

## 1.4 Verpackung der DNA und Funktion der Histon-deacetylasen

Die Histone sind wichtige Elemente des Chromatins und dienen der kompakten Verpackung genomischer DNA. Sie besitzen an ihren N-Termini eine Vielzahl an positiv geladenen Aminosäuren, was ihre DNA Bindungseigenschaften erklärt. Ähnlich wie Perlen auf einer Schnur ist die DNA in regelmäßigen Abständen um die Histonoktamere, auch Nukleosomen genannt, gewickelt. Ein Nukleosom ist aus je zwei Histonen der Typen 2A, 2B, 3 und 4 aufgebaut. Die regelmässige Anordnung der mit DNA-umwickelten Nukleosomen wird durch das Histon H1 unterstützt (Hayes and Hansen, 2001). Die Nukleosomen sind spiralig zu einer faserartigen Struktur verdrillt, den Solenoiden. Diese bilden in ihrer Gesamtheit das 30 nm-Filament, welches aufgrund ihres Durchmessers so bezeichnet wird. Dieses Filament ist wiederum in Schlaufen aufgewunden und bildet letztendlich das Chromatingerüst, welches in weiteren Aufwindungen das Chromosom darstellt.

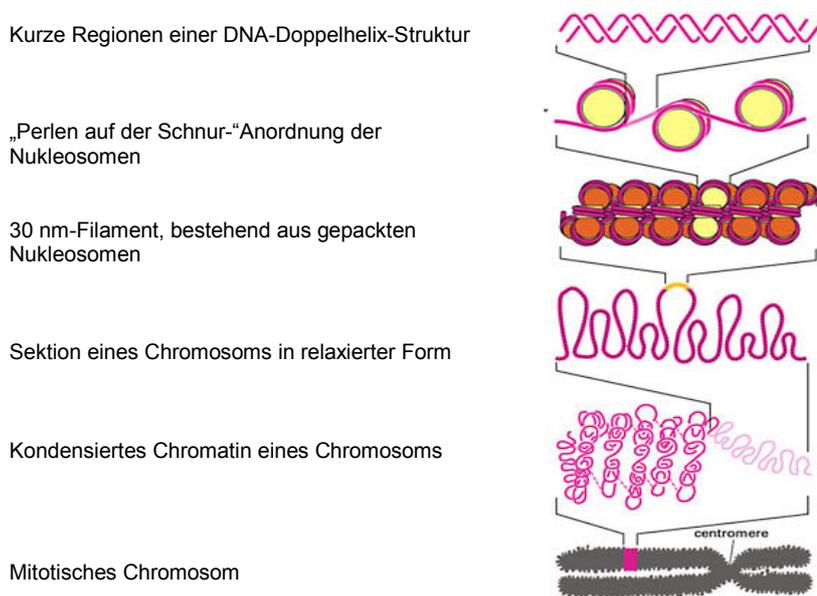


Abb. 1.1 Organisation von DNA

(entnommen von [http://www.accessexcellence.org/AB/GG/chroma\\_packg.html](http://www.accessexcellence.org/AB/GG/chroma_packg.html) und modifiziert)

Die Sequenzen der ca. 100 bis etwas mehr als 200 Aminosäure langen Histone, vor allem der Histone 3 und 4, sind bei fast allen Eukaryoten hochkonserviert, was auf eine evolutiv

frühe Entstehung des Chromatins hindeutet (Reeve, 2003). Unterstützt wird diese Aussage durch das Vorhandensein von Histonäquivalenten als Teile einer vereinfachten Chromatinstruktur in Archäen (Reeve, 2003; Sandman and Reeve, 1998).

Dieses Verpackungsmuster von DNA ist in allen Eukaryonten vorherrschend. Histon-Proteine kommen ebenso in Archäen vor (Sandman *et al.*, 1998; Sandman and Reeve, 1998), was für eine frühe evolutive Entstehung des Chromatins spricht (Reeve, 2003). In Bakterien konnten bisher keine Proteine eines Histon-Ursprungs identifiziert werden. Es ist jedoch seit Anfang der 80er Jahre bekannt, dass es ebenso in Bakterien eine geordnete DNA-Organisation gibt (Kleppe *et al.*, 1979). Diese wird von den Histon-ähnlichen Proteinen (HU) bewerkstelligt, die jedoch keine Gemeinsamkeiten zu Histonen aufweisen. Diese Form der DNA-Organisation konnte anhand von Nukleoid-Strukturen über Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden (Mogilnaya *et al.*, 1992).

Die Funktion der Histondeacetylasen begründet sich in der Deacetylierung von  $\epsilon$ -acetylierten Lysin, welche an den N-Termini von Histonen liegen. Im nicht-acetylierten Zustand weisen die Histone an ihren Lysin positive Ladungen auf, was eine Voraussetzung zur Bindung von DNA darstellt. Durch Acetylierung(en) werden diese Ladungen aufgehoben und die Bindungsfähigkeit von DNA damit reduziert. Dies führt zur Auflockerung der Chromatinstruktur. Als Gegenspieler der Histondeacetylasen sind die Histon-Acetyl-Transferasen (HAT) bekannt, die für eine Acetylierung der  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysine verantwortlich sind (Abb 1.2). Die Halbwertszeit der Acetylierungen erstreckt sich von wenigen Minuten bis auf mehrere Stunden (Covault and Chalkley, 1980); (Katan-Khaykovich and Struhl, 2002), so dass von einem Fließgleichgewicht ausgegangen wird, das durch die gegensätzlichen enzymatischen Aktivitäten zweier Enzymfamilien einen bestimmten Acetylierungslevel aufrecht erhält (Fischle *et al.*, 2003).

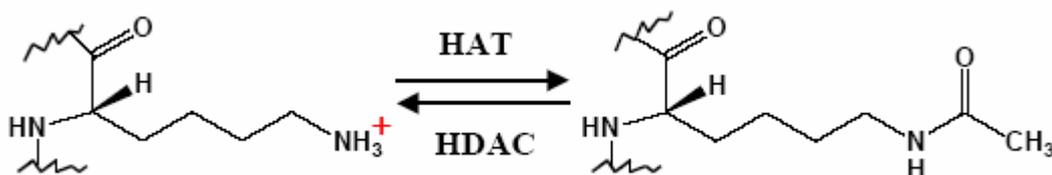


Abb. 1.2

Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) katalysieren gegensätzliche Reaktionen an Lysinresten

Diese Prozesse, die reversible Acetylierung und Deacetylierung von Histonschwänzen spielen eine tragende Rolle in der Regulation der Transkription. Allerdings stellen sie nicht die einzigen Vorgänge in diesem Zusammenhang dar, vielmehr konnten weitere Modifikationen an bestimmten Positionen in Histonen wie z.B. Phosphorylierung (von Serinen), Methylierung (von Lysinen und Argininen) und Ubiquitinierung (von Lysinen) nachgewiesen werden, die ebenfalls Einfluss auf die Transkriptionsregulierung haben (Turner, 2002). Ein einfaches Schema für die Transkriptionsregulierung ist somit nicht aufzustellen. Grundsätzlich kann man aber sagen, dass aktive Gene hyperacetyliert sind während und eine Stilllegung der Transkription (*silencing*) infolge Hypoacetylierung festgestellt werden konnte (Grunstein, 1997; Wade *et al.*, 1997).

## 1.5 Postulierter Reaktionsmechanismus der Deacetylierung des *Histone-deacetylase-like proteins* (HDLP) aus *Aquifex aeolicus*

Nach der Röntgenkristallografischen Analyse des *Histone-deacetylase like protein* (HDLP) aus dem hyperthermophilen Bakterium *Aquifex aeolicus* in Komplexen mit den Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACI) Trichostatin A (TSA) (Yoshida *et al.*, 1990) und Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) (Richon *et al.*, 1998), wurde für die Deacetylierungsreaktion von Finnin und Mitarbeitern ein Reaktionsmechanismus postuliert, der stark an jenen der Zink-Metalloproteasen und der Serinproteasen angelehnt ist (Finnin *et al.*, 1999). Das HDLP besitzt 35,2 % Sequenzidentität über 375 Aminosäuren gegenüber der HDAC1 und seine biologische Funktion ist noch nicht bekannt.

Grundsätzlich ist der Bereich des aktiven Zentrums in zwei Bereiche einzuteilen, eine tiefe, schmale Tasche und eine darunterliegende interne Kavität (Abb. 1.3(A)). Am Ende der röhrenförmigen Tasche liegt das aktive Zentrum mit einem durch Aminosäuren-Seitenketten koordinierten Zink-Ion und zwei Asp-His *charge relay* Systemen (Abb.1.3(B))

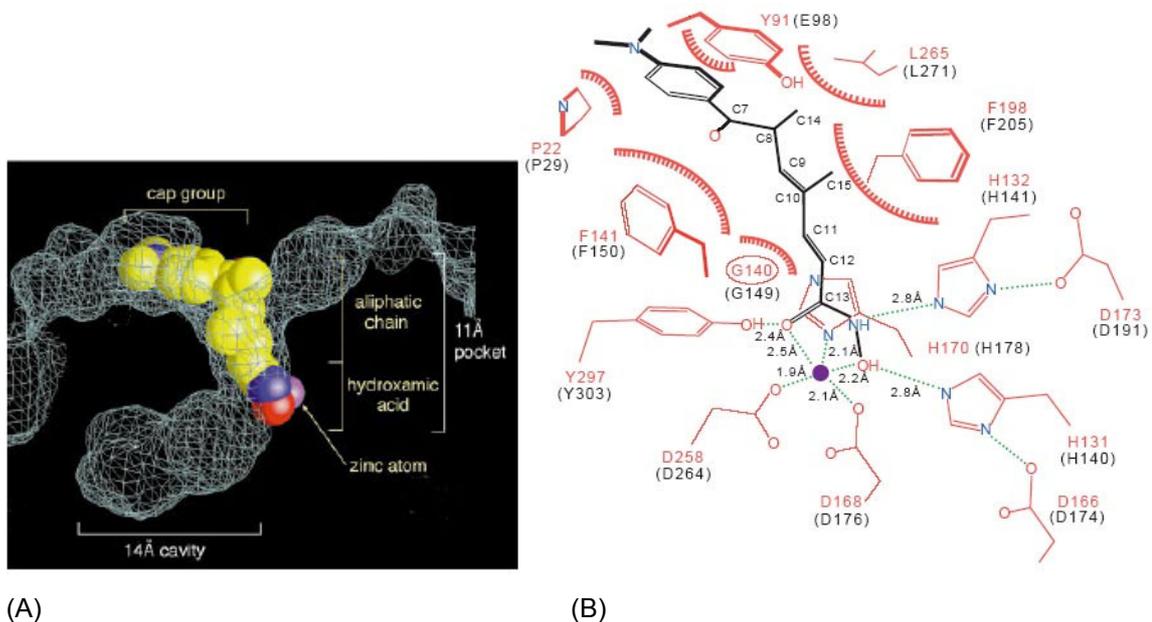


Abb. 1.3 (Finnin *et al.*, 1999)

(A) Darstellung des aktiven Zentrums der HDLP aus *A. aeolicus*. Gelb ist der Inhibitor TSA mit seinem Hydroxamatrest (blau/rot) dargestellt. Hellviolett ist das Zink-Ion hervorgehoben. Man kann die röhrenförmige Substratbindetasche und die sog. 14 Å interne Kavität erkennen. Gleichzeitig lässt sich die Grobstrukturierung von gängigen HDACI ableiten, ein Hydroxamatrest am Ende, eine aliphatische Kette als linker-Region und eine sog. Kappengruppe. In (B) sind die HDLP-TSA

Interaktionen schematisch dargestellt. Mit Rot sind die Aminosäuren der HDLP gekennzeichnet, Schwarz gibt die Struktur von TSA wieder. Das Zink-Ion ist violett dargestellt. Rote Beschriftungen geben die Aminosäure-Positionen in HDLP an, Schwarz gibt die entsprechenden Positionen der HDAC1 wieder.

Das Zink-Ion wird über drei Liganden der HDLP komplexiert. Dies sind die Aspartate 168 und 258 sowie das Histidin 170. Darüber hinaus enthält die Struktur ein „inneres“ His-Asp *charge relay* System (His131, Asp166). Ein zweites, „äußeres“ His-Asp *charge relay* System wird durch die Aminosäuren His132 und Asp 173 gebildet. Beide Histidine der *charge relay* Systeme bilden Wasserstoffbrücken einmal zur OH- und im anderen Fall zur NH-Gruppe des Hydroxamatrestes (Inhibitor) aus. Der Carboxyl-Sauerstoff des Hydroxamates bindet an die freie Valenz des Zink-Ions und gleichzeitig an die OH-Gruppe des Tyr297. Finnin *et al.* postulieren in Analogie zum katalytischen Mechanismus bei Serin-Proteasen, dass das innere *charge relay* System (His131, Asp166) anstelle zur Hydroxamat-OH-Gruppe im Falle der Substratbindung eine Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül bildet und so dieses (i) polarisiert (verstärkt durch eine zusätzliche Wechselwirkung des Wassermoleküls mit dem Zink-Ion) und (ii) für den Angriff auf das Carbonyl-C-Atom (Acetat) des Substrates ausrichtet. Der Angriff wird erleichtert durch die Polarisierung der Carbonylgruppe des Substrates. Letzteres wird erreicht durch Wechselwirkung des Carbonyl-Sauerstoffs sowohl mit dem Zink-Ion als auch mit der OH-Gruppe des Tyr297.

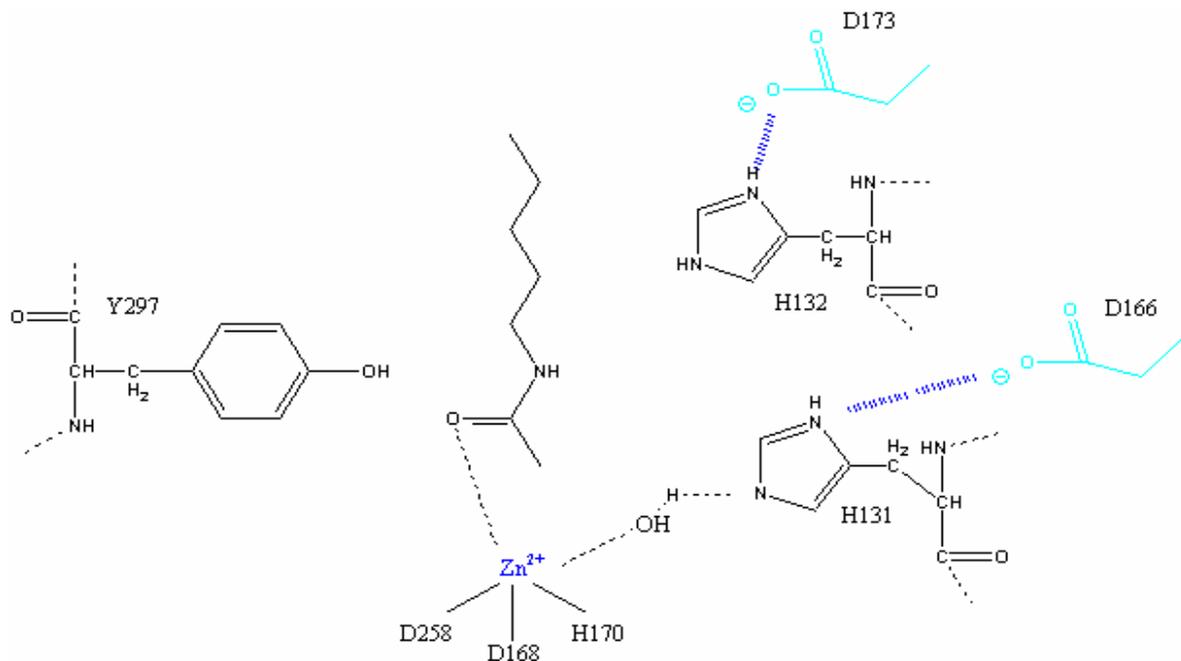


Abb. 1.4 (A)

Anlagerung der Carbonylgruppe an das Zink-Ion und Positionierung des Wassermoleküls. Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht der Nummerierung des HDLP aus *A. aeolicus*.

Laut postuliertem Mechanismus wird ein tetrahedrischer Übergangszustand ausgebildet (Abb 1.4 (B)).

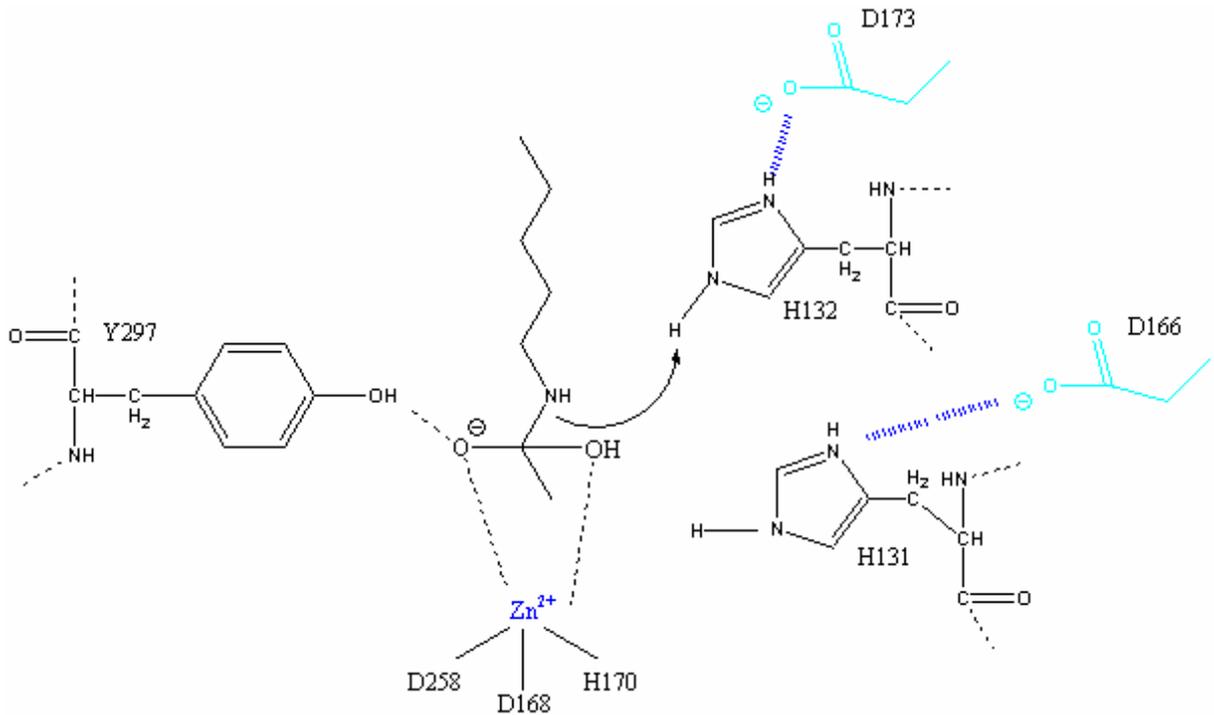


Abb. 1.4 (B)

Ausbildung des tetrahedrischen Übergangszustandes am Carbonyl-Kohlenstoffatom

Laut Finnin *et al.* wird das Oxyanion-Intermediat von zwei Zink-Sauerstoff Wechselwirkungen sowie einer Wasserstoffbrücke zur Hydroxyl-Gruppe des Tyr297 und einer Wasserstoffbrücke der  $\epsilon$ -NH-Gruppe des Substratlysins zum His 132 des äußeren *charge relay* Systems stabilisiert. In dem finalen Schritt wird die Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung dieses Intermediates aufgelöst und der Stickstoff nimmt ein Wasserstoff-Proton des His132-Asp173 *charge relay* Systems auf. Hiernach erhalten wir nun die Produkte in Form von Acetat und Lysin (Abb. 1.4 (C)).

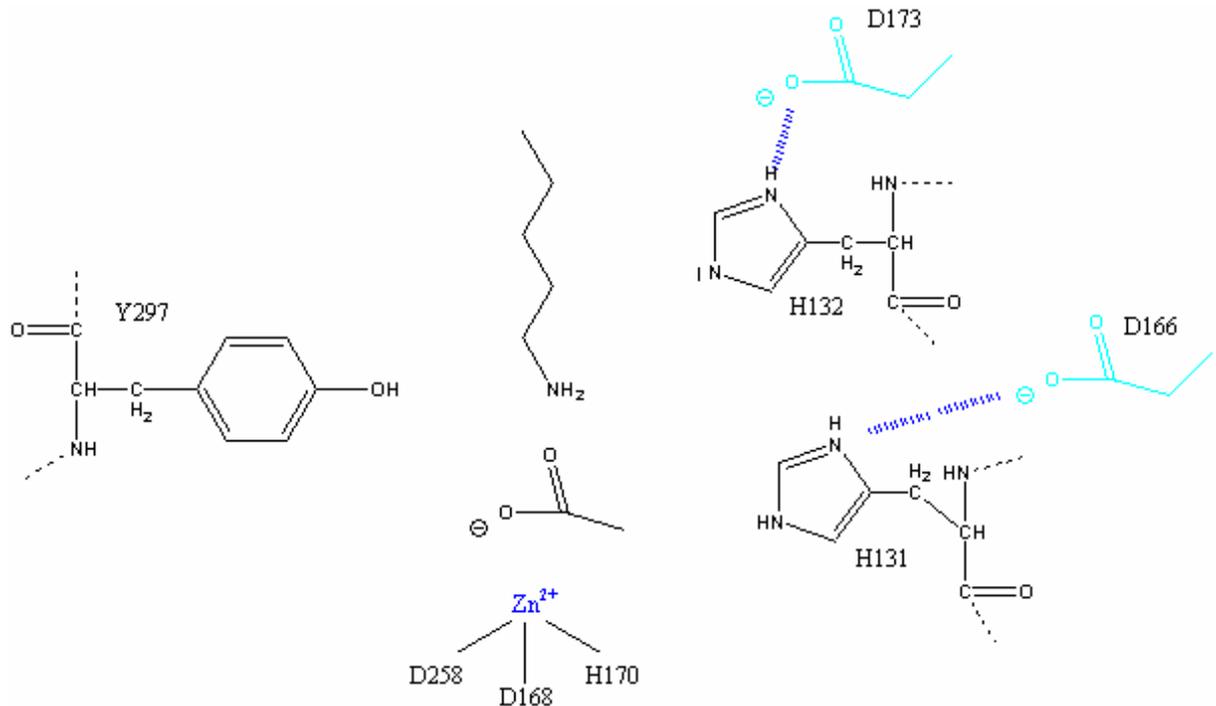


Abb. 1.4 (C)  
Freisetzung des Acetats

Die in diesem Zusammenhang erwähnten Aminosäuren sind innerhalb der Familie der HDACs streng konserviert (Grozinger and Schreiber, 2002), was für einen uniformen Katalysemechanismus dieser Enzyme sprechen könnte. So konnte die Anordnung der drei Zinkliganden, (Asp258, Asp168 und His170), der beiden His-Asp *charge relay* Systeme (His131-Asp166 / His132-Asp 173) und des Tyr297 ebenfalls in der HDAC8, dessen Struktur erst kürzlich aufgelöst wurde, wieder gefunden werden (Vannini *et al.*, 2004).

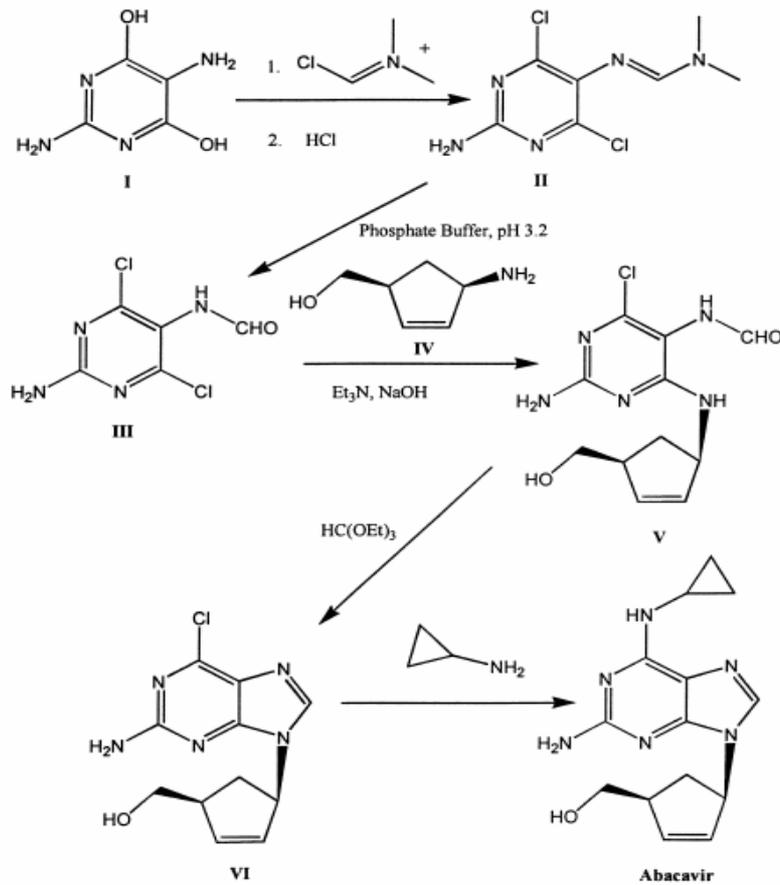
In einem Computer-basierten Verfahren, der sog. *ab initio*-Methode konnte eine Konformation des HDLP/TSA-Komplexes ermittelt werden (Vanommeslaeghe *et al.*, 2003), die nur minimal von der Konformation der HPLP, abgeleitet aus der Röntgenstrukturanalyse, abweicht. In dieser Publikation konnte die Deprotonierung der Hydroxamat-OH-Gruppe durch das His131 nachgewiesen werden, was somit den Wirkungsmechanismus der Inhibitoren aus der Klasse der Hydroxamate erklärt. Auch die Anlagerung von Wasser und dessen Zink-vermittelte Deprotonierung konnte nachgewiesen werden, allerdings gab es in diesem Zusammenhang mögliche Abweichungen zu dem angenommenen Reaktionsmechanismus. So nimmt das aus dem Wasser entstehende OH<sup>-</sup>-Ion eine andere, nämlich zum Tyr297 benachbarte Position ein.

In einer weiteren Publikation konnte die röntgenkristallografische Struktur der HDLP im Komplex mit TSA ebenfalls bestätigt werden (Wang *et al.*, 2004). Wang und Mitarbeiter konnten über den Computer-basierten Ansatz von sog. *AutoDock*-Kalkulationen u.a. die Bindung der Inhibitoren TSA und SAHA belegen. Darüber hinaus wurden Acetat-Bindungsstudien durchgeführt die nahe legen, dass der Austritt des Acetats nach erfolgreicher Prozessierung des Substrates über die 14 Å-Kavität passieren könnte. Es konnten zwei Arginine (Arg16 und Arg27 des HDLP) identifiziert werden, über die möglicherweise dieser Austritt katalysiert werden könnte. Über eine sequenzielle Übertragung des Acetats auf diese Arginine soll das aus dem Substrat entstehende Acetat über die 14 Å-Kavität aus dem Enzym ins Medium befördert werden. Im Gegenzug dazu soll der Eintritt des für die Deacetylierungsreaktion notwendigen Wassers zum Reaktionszentrum ebenfalls über die Öffnung am Ende dieser Kavität erfolgen.

## 1.6 Motivation zur Suche nach deacetylierenden Enzymen

Enzyme finden aufgrund ihres Ersatzes von komplizierten Synthesewegen und ihrer Selektivität vermehrt Anwendung in der pharmazeutischen Industrie (Schwienhorst, 2002). Bei chemischen Synthesewegen fallen oftmals ungewünschte Nebenprodukte durch Sekundärreaktionen an, welche durch aufwendige Aufreinigungsprozeduren wieder entfernt werden müssen. Mit der Verwendung von gerichtet wirksamen Enzymen senkt man diesen Anteil von unspezifischen Reaktionsprodukten. Zudem arbeiten Enzyme äußerst selektiv und vermindern das Anhäufen z.B. von stereochemisch nicht erwünschten Enantiomeren.

Im Rahmen einer Industriekooperation unserer Arbeitsgruppe sollten in diesem Zusammenhang Enzyme mit einer Deacetylase-Funktion gefunden werden, die zur Synthese (Racematspaltung) eines Synthons der Abacavir-Synthese eingesetzt werden konnten. Zur Synthese von Abacavir (Huff, 1999), einem neuen HIV Wirkstoff aus der Klasse der nukleosidischen Reverse-Transkriptase Inhibitoren (NRTI), benötigt man *cis*-(1S,4R)-(4-aminocyclopent-2-enyl) methanol (Abb. 1.5, Substanz IV, Amino-Alkohol, AA)



Diese Substanz lässt sich nach einer Deacetylierung aus *cis*-(±)-*N*-[4-(hydroxymethyl)cyclopent-2-enyl]acetamide (NAA) herstellen (Abb. 1.6).

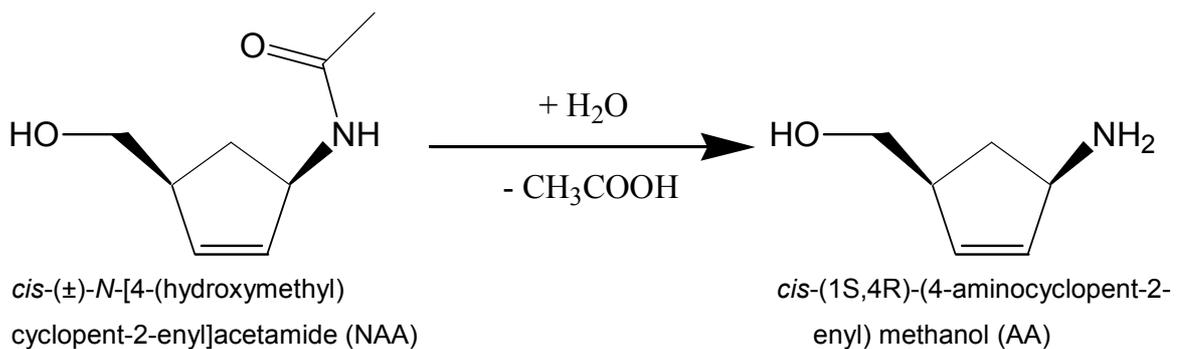


Abb. 1.6 Schematische Darstellung der Deacetylierung von NAA (zeigt nur das umgesetzte Enantiomer)

In diesem Zusammenhang sollte nun nach einem Enzym gesucht werden, mit dem die Deacetylierung von NAA durchgeführt werden kann und das sich später in Biotransformationen einsetzen lässt.

## 1.7 APAH aus *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein gram-negatives Bakterium welches sowohl im Boden, in Sümpfen und mariner Umgebung als auch als Pathogen auf Pflanzen- und Tierzellen wachsen kann. Zudem ist dieses Bakterium in der Lage Biofilme auszubilden. Es ist für eine Vielzahl von Infektionen bei Pflanzen, Tieren und dem Menschen verantwortlich (He *et al.*, 2004). Eine Infektion ist immer mit anderen Krankheiten assoziiert, gesunde Organismen werden von diesem Pathogen nicht befallen. So tritt eine *Pseudomonas*-Infektion als Begleiterscheinung bei Patienten von Cystischer Fibrose (CF) (Govan and Deretic, 1996), Krebs oder AIDS auf. Allein 90 % der CF-Patienten erleiden eine Infektion dieses Keimes, was i.A. ein schnelleres Fortschreiten des Krankheitsbildes bedeutet. Da dieser Organismus mit einer Vielzahl an Virulenzfaktoren und einer breiten Antibiotikaresistenz ausgestattet ist, gibt es bisher wenig befriedigende Therapieansätze gegen eine *Pseudomas aeruginosa*-Infektion.

Innerhalb der Sequenz des Genoms konnten nach dessen Sequenzierung (Stover *et al.*, 2000) und Annotation drei putative Acetylpolyamin-Amidohydrolasen identifiziert werden, die zwischen 56 % und 70 % Ähnlichkeit zu APAHs aus *M. ramosa* und *A. fulgidus* aufweisen. Die putative APAH des Leserahmens PA3774 zeigte signifikante Ähnlichkeiten mit der FB188 HDAH und wurde daraufhin für weitere Betrachtungen ausgewählt.

## 1.8 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Charakterisierung von Enzymen der Klasse der Histondeacetylase-ähnlichen Amidohydrolasen (HDAH) durchgeführt werden. Diese Untersuchungen wurden in erster Linie mit der *FB188* HDAH aus *Bordetella/Alcaligenes FB188*, eine Vielzahl der Experimente aber auch mit der erst später isolierten *PA3774* HDAH aus *Pseudomonas aeruginosa* durchgeführt. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu Enzymen der Klasse der Histondeacetylasen (HDAC) und Acetylpolyamin-Amidohydrolasen (APAH) ist ein ähnliches Substratspektrum sowie ein ähnlicher Reaktionsmechanismus zu erwarten. Es stellte sich die Frage, was die natürlichen Substrate für diese Enzymklasse sind. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden umfangreiche Untersuchungen hinsichtlich des Substratspektrums unternommen. Es wurden sowohl Acetyl-Polyamine, als natürliche Substrate der Acetylpolyamin-Amidohydrolasen als auch Histone sowie synthetische, peptidische Substrate mit Histoncharakter als natürliche Substrate der Histondeacetylasen untersucht. Darüber hinaus wurden eine Vielzahl anderer Substrate verwendet, um nicht nur die Substratspezifität, sondern auch einen, für das Histondeacetylase-ähnliche Protein (HDLP) aus *Aquifex aeolicus* postulierten Reaktionsmechanismus zu verifizieren. Kernstück dieser Untersuchungen zum Katalysemechanismus waren die umfassenden Mutagenese-Studien der *FB188* HDAH, bei der 15 Funktionsmutanten, auf der Basis der veröffentlichten HDLP-Struktur und des postulierten Reaktionsmechanismus, generiert und weitreichend analysiert wurden. Experimente zur Competition und zur Inhibition mit teilweise bekannten als auch neuartigen HDAC-Inhibitoren rundeten diese Untersuchungen zur Substratspezifität und zum Katalysemechanismus ab.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde versucht, Kenntnisse über posttranslationale Modifikationen in Form von Acetylierungsmustern in Prokaryonten zu erlangen, mit dem mittelfristigen Ziel, natürliche Substrate der HDAHs zu identifizieren. Ferner wurden Vorbereitungen in Hinblick auf eine Strukturaufklärung der *FB188* HDAH über Röntgenkristallographie getroffen.

## 2. Material

### 2.1 Bakterienstämme

*Bordetella/Alcaligenes FB188* (DMSZ 11172)

*Bacillus subtilis* (DSM 347)

*Staphylococcus simulans* (DSM 20322)

*Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, USA, (Bullock, 1987)

*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15* Tn10 (Tetr)]

Dieser Stamm ist u.a. Endonuklease (*endA1*)- und Rekombinations-defizient (*recA1*). Aufgrund dieser Tatsache konnte eine spezielle Plasmid-Aufreinigung durchgeführt werden.

*Escherichia coli* BL21 (Stratagene, USA)

F- *dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>) gal*

*Escherichia coli* B834 (DE3) pLysS (Leahy *et al.*, 1992; Wood, 1966)

r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup> gal<sup>-</sup> met<sup>-</sup>

Bei diesem Stamm handelt es sich um einen parentalen Stamm von BL21 (s.o.) Dieser Stamm ist Protease-defizient und Methionin-auxotroph. Somit ist eine Markierung durch <sup>35</sup>S-Methionin oder Selenomethionin für kristallographische Studien möglich.

### 2.2 Genomische DNA

*Bordetella/Alcaligenes FB188* (DMSZ 11172)

*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (DSMZ 1707)

## 2.3 Plasmide

### 2.3.1. pQEB-MCS

Bei dem Vektor pQEB-MCS handelt es sich um einen handelsüblichen pQE70 Vektor (Qiagen), der in seiner Mehrfachklonierungsregion (*multiple cloning site*, MCS) um einige Restriktionsschnittstellen erweitert wurde. Dieses „*high-copy*“ Plasmid eignet sich für cytoplasmatische Expression von Histidin-markierten heterologen Proteinen. Ausgestattet ist dieser Vektor mit einer T5 Promotor-Region (Phage T5) und zwei aufeinander folgenden *lac*-Operator Regionen. Diese zwei *lac*-Operator Regionen sollen eine verbesserte Repression erzeugen. In der Mehrfachklonierungsregion liegt am Anfang eine synthetische Ribosomen-Bindestelle (RBS) und am Ende eine Hexa-Histidin Sequenz. Nach der MCS folgen zwei starke Transkriptions-Terminations-Regionen, welche ein „Durchlesen“ des Plasmids verhindern sollen. Diese stammen vom Phagen Lambda ( $t_0$ ) sowie vom *rrnB*-Operon von *Escherichia coli* (T1). Das  $\beta$ -Laktamase-Gen (Amp) vermittelt eine Resistenz gegenüber Ampicillin bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$ . Der ColE1-Ori (*Origin of replication*) gewährleistet die Reproduktion des Plasmids.

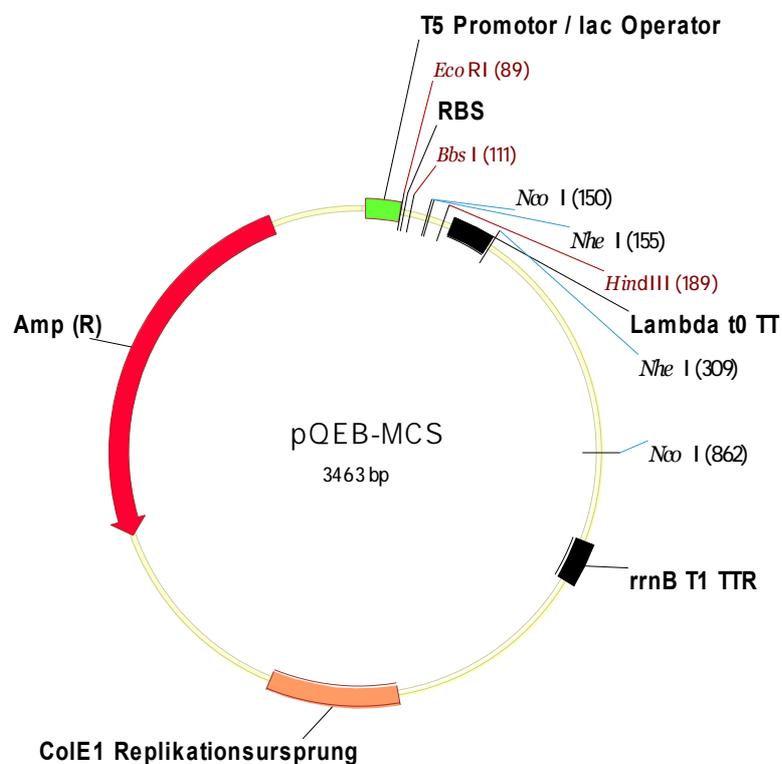


Abb. 2.1 Plasmidkarte von pQEB-MCS. RBS = Ribosomenbindestelle, TTR = Transkription Terminationsregion, Amp(R) = Ampicillinresistenz ( $\beta$ -Laktamase)

### 2.3.2. pQEB-CH

Dieser Vektor ist eine Weiterentwicklung von pQEB-MCS und beinhaltet eine zusätzliche *Bam*HI-Schnittstelle in der MCS.

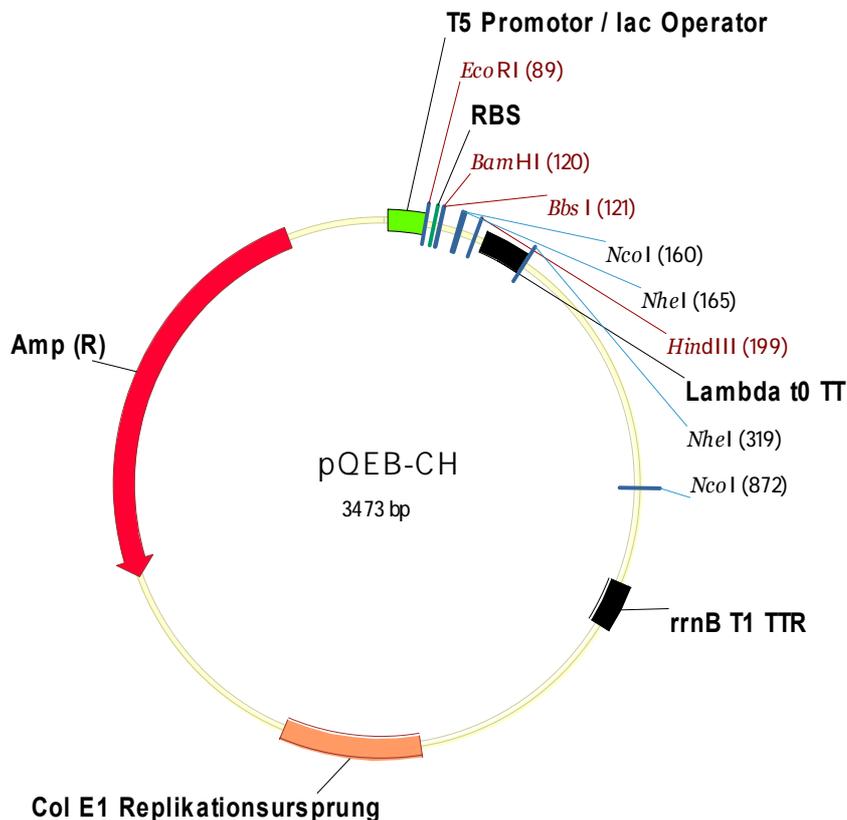


Abb. 2.2 Plasmidkarte von pQEB-CH. RBS = Ribosomenbindestelle, TTR = Transkription Terminationsregion, Amp(R) = Ampicillinresistenz ( $\beta$ -Laktamase)

### 2.3.3. pCR<sup>®</sup>4-TOPO (Invitrogen, Leek, NL)

Für die direkte Klonierung von PCR-Produkten wurde der Vektor pCR<sup>®</sup>4-TOPO aus dem TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Leek, NL) verwendet. Es handelt sich um einen 3957 bp großen, linearisierten Vektor mit zwei 3'-Dideoxythymidin-Überhängen. PCR-Produkte, welche durch die matrizenunabhängige Aktivität einiger DNA-Polymerasen (z.B. *Amplitaq*<sup>®</sup>) am 3'-Ende des Duplex-Moleküls einzelne Deoxyadenosin-Überhänge tragen, können daher direkt mit dem Vektor ligiert werden. Dafür wird die Aktivität der kovalent an den 3'-dT-Überhängen des Vektors gebundenen Topoisomerase I

ausgenutzt (Shuman, 1994). Es entsteht dabei ein zirkuläres DNA-Molekül mit zwei Einzelstrangbrüchen an den Insertionsstellen, welches direkt zur Transformation von *E. coli* eingesetzt werden kann. Die zwei dT-Überhänge des Vektors werden von jeweils einer *EcoRI*-Schnittstelle flankiert und befinden sich innerhalb der MCS. Dieser codiert 18 potentielle Restriktionsendonuklease-Schnittstellen und wird von den Promotoren SP6 und T7, von Bindungsstellen der M13-reverse und M13-forward Primer sowie der Primer ABI-for bzw. ABI-rev flankiert. Um eine Identifikation von rekombinanten Plasmiden zu erleichtern, trägt der Vektor das *lacZα* Gen, welches C-terminal mit dem für *E. coli* letalen *ccdB*-Gen gekoppelt ist. Die Insertion eines PCR-Produktes führt zu einer Disruption des *lacZα-ccdB*- Fusionsgens und erlaubt lediglich den positiven Rekombinanten ein Wachstum. Der Vektor trägt für die Selektion eine Kanamycin (kan)- und eine Ampicillinresistenz (amp) sowie den ColE1-Replikationsursprung, der die Replikation des Vektors in *E. coli* ermöglicht.

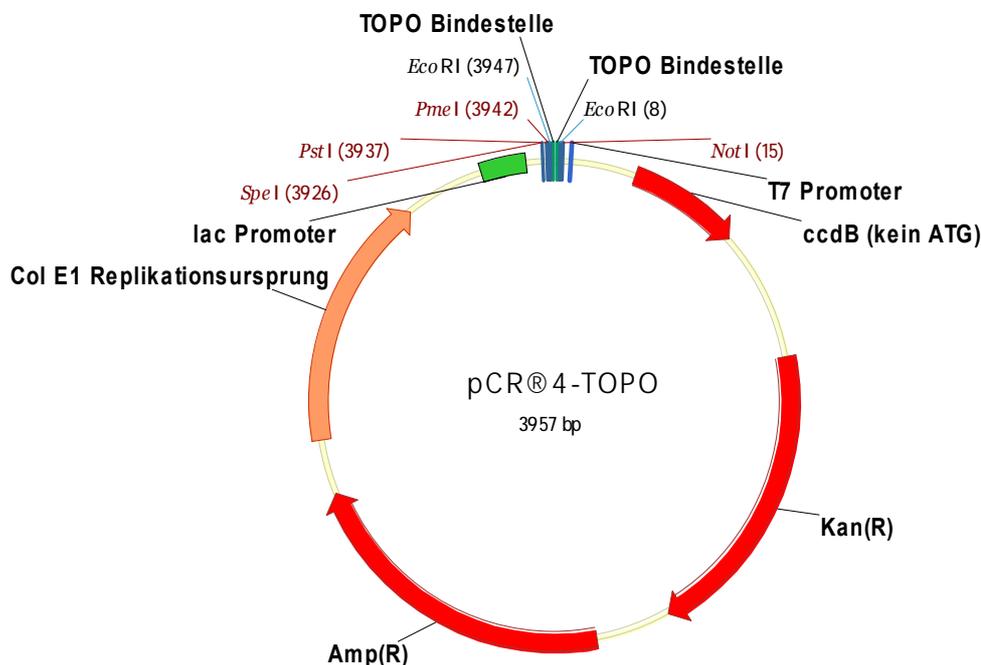


Abb. 2.3 Plasmidkarte von pCR®4-TOPO. Kan (R) = Kanamycinresistenz, Amp(R) = Ampicillinresistenz

## 2.4 DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker

### 2.4.1 DNA-Längenstandards

DNA-Längenstandard-Lösungen wurden mit TE-Puffer und Sucrosefarbmarker auf eine Konzentration von 100 ng/μl eingestellt und bei 4 °C gelagert.

#### **λ-DNA/Eco47I (AvaII)-Marker (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)**

Fragmentgrößen [bp]: 8126, 6555, 6442, 3676, 2606, 2555, 2134, 2005, 1951, 1611, 1420, 1284, 985, 974, 894, 597, 590, 513, 511, 433, 398, 345, 310, 308, 272, 242, 215, 151, 88, 73, 67, 45, 42, 32, 29, 23

### 2.4.2 Protein-Molekulargewichtsmarker

#### **BenchMark™ Prestained Protein Ladder (Gibco, Eggenstein)**

relatives Molekulargewicht der Proteine: 185380, 118900, 85080, 62130, 51190, 38200, 22380, 15390, 10080, 6540

#### ***Prestained Protein Ladder 10-160 kDa* (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)**

apparentes relatives Molekulargewicht der mit einem blauen Chromophor gekoppelten Proteine: 160000, 110000, 90000, 70000, 55000, 45000, 35000, 25000, 15000, 10000.

Das Protein mit einem  $M_r$  von ca. 70000 wurde mit einem rotem Chromophor gekoppelt.

## 2.5 Oligodesoxyribonukleotide

Alle synthetischen Oligodesoxyribonukleotide wurden lyophilisiert von der Fa. Sigma-Genosys (Steinheim) bezogen, mit demineralisiertem Wasser zu 100 pmol/μl gelöst und bei -20 °C gelagert. Wichtige, in den Primern enthaltene Restriktionsschnittstellen sind *kursiv* geschrieben, Nukleotide, die einen Basenaustausch bewirken, sind **fett** dargestellt.

### 2.5.1 Primer zur Amplifikation der *FB188* HDAH

**BOCA3I:** 5'-GAY GGI ATH ACI ATG ATG GG-3'

**BOCA5B:** 5'-CCR CAR AAN GGN AGR TAR TG-3'

**Lon1B:** 5'-CGG *AAT TCC* GGA TCC AGC ATG CTG GCA TCG AA-3'

**Lon2A:** 5'-GCG *AAT TCG* GAT CCG CTG GCG CGC ATG AT-3'

**pEB-rv:** 5'-ATT *CAA GCT TAT* CAG CGG ATA TCC GCC AGC AG-3'

**pEB-fw :** 5'-CTG *AAT TCA* TTA AAG AGG AGA AAT TAA GCA TGG CCA TCG GAT ATG  
TTT GG-3'

**pQEB-(N-His)fw:** 5'-CTG *AAT TCA* TTA AAG AGG AGA AAT TAA GCA TGC ATC ACC ATC  
ACC ATC ACG CCA TCG GAT ATG TTT GG-3'

N= A, G, C oder U; Y=U oder C; H= T, C, oder A; R= A oder G; I= Inosin

### 2.5.2 Primer zur Amplifikation der *PA3774* HDAH

**PA3774 *Bam*HI N-His fw :** 5' - CGC GGA TCC ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC ACC  
CGA CGT ACC GCT TTC TTC – 3'

**PA3774 *Hind*III rv :** 5'- GC AAG AAG CTT CTA CCT GGC CGC TTG AAG C – 3'

### 2.5.3 Primer zur Sequenzierung der Amidohydrolasen

**pQE70 fw2:** 5'-GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG-3'

**pQE70 rv2:** 5'-CTA GCT TGG ATT CTC ACC-3'

**LA fw:** 5'-GCC AAC CTGACGGCG-3'

**LA rv:** 5'-GCCTCGATGACGGCC-3'

#### 2.5.4. Primer zur Sequenzierung der TOPO-Klonierung

**ABI-for** : 5'-ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG-3'

**ABI-rev** : 5'-TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'

#### 2.5.5 Primer zur Generierung der Mutanten über QCM-Verfahren

**R29M fw**: 5'-AAC CTG ACG GCG **ATG** CAG CCC ATC-3'

**R29M rv**: 5'-GAT GGG CTG **CAT** CGC CGT CAG GTT-3'

**L37P fw**: 5'-C AGC CAT CAC **CCG** GCG CAT CCT GAC-3'

**L37P rv**: 5'-GTC AGG ATG CGC **CGG** GTG ATG GCT G-3'

**H142N fw**: 5'-CCG CCC GGG **AAC** CAT GCG CC-3'

**H142N rv**: 5'-GG CGC ATG GTT CCC GGG CGG-3'

**H143N fw**: 5'-CCC GGG CAC **AAT** GCG CCG CAC-3'

**H143N rv**: 5'-GTG CGG CGC ATT GTG CCC GGG-3'

**F152L fw**: 5'-GCC GCC ATG GGT **CTT** TGC ATC TTC-3'

**F152L rv**: 5'-GAA GAT GCA **AAG** ACC CAT GGC GGC-3'

**F152R fw**: 5'-GCC GCC ATG GGT **CGT** TGC ATC TTC-3'

**F152R rv**: 5'-GAA GAT GCA **ACG** ACC CAT GGC GGC-3'

**D178N fw**: 5'-GTC GCC ATC CTC **AAC** TGG GAT GTG CAT-3'

**D178N rv**: 5'-ATG CAC ATC CCA **GTT** GAG GAT GGC GAC-3'

**W179I fw**: 5'-TC GCC ATC CTC GAC **ATC** GAT GTG CAT CAT-3'

**W179I rv**: 5'-ATG ATG CAC ATC **GAT** GTC GAG GAT GGC GA-3'

**W179L fw.:** 5'-GCC ATC CTC GAC **TTA** GAT GTG CAT CAT-3'

**W179L rv**: 5'-ATG ATG CAC ATC **TAA** GTC GAG GAT GGC-3'

**H182N fw:** 5'-GAC TGG GAT GTG **AAT** CAT GGC AAC G-3'

**H182N rv:** 5'-C GTT GCC ATG ATT CAC ATC CCA GTC-3'

**N185D fw:** 5'-GTG CAT CAT GGC **GAC** GGC ACC CAG G-3'

**N185D rv:** 5'-C CTG GGT GCC **GTC** GCC ATG ATG CAC-3'

**F208L fw:** 5'-CAG CAT CTG TGC **TTA** CCG CCC GAC TCC-3'

**F208L rv:** 5'-GGA GTC GGG CGG **TAA** GCA CAG ATG CTG-3'

**F208R fw:** 5'-CAG CAT CTG TGC **CGC** CCG CCC GAC TCC-3'

**F208R rv:** 5'-GGA GTC GGG CGG **GCG** GCA CAG ATG CTG-3'

**D268N fw:** 5'-TCC GGT TTC **AAT** GCC AGC ATG C-3'

**D268N rv:** 5'-G CAT GCT GGC ATT GAA ACC GGA-3'

**G310A fw:** 5'-C GTC CAG GAA **GCG** GGC TAT AGC CCC-3'

**G310A rv:** 5'-GGG GCT ATA GCC **CGC** TTC CTG GAC G-3'

**G311A fw:** 5'-C CAG GAA GGC **GCG** TAT AGC CCC CAC-3'

**G311A rv:** 5'-GTG GGG GCT ATA **CGC** GCC TTC CTG G-3'

**Y312F fw:** 5'-GAA GGC GGC TTT AGC CCC CAC-3'

**Y312F rv:** 5'-GTG GGG GCT **AAA** GCC GCC TTC-3'

## 2.6 Enzyme und Proteine

### **Abcam Ltd., Cambridge, UK**

polyklonaler *Anti-acetylated proteins antibody* (ab193) aus Kaninchen gegen  $\epsilon$ -acetylierte Lysine (Hebbes *et al.*, 1988)

### **Boehringer Mannheim, Mannheim**

Ribonuklease A (RNase A)

### **Calbiochem, Schwalbach am Taunus**

HDAC aus Rattenleber (*rat liver* HDAC)

### **Eurogentec, Seraing, Belgien**

polyklonaler Anti-HDAH-Antikörper

### **MBI Fermentas, Vilnius, Litauen**

Restriktionsendonukleasen und zugehörige Puffer, Rinderserumalbumin (BSA), T4 DNA-Ligase, SAP (*shrimp alkaline phosphatase*)

### **New England Biolabs, Bad Schwalbach**

Restriktionsendonukleasen und zugehörige Puffer, Rinderserumalbumin (BSA)

### **Perkin Elmer, Branchburg, USA**

Amplitaq DNA-Polymerase mit PCR-Puffer

### **Promega, Madison, USA**

RNasin

### **Qiagen, Hilden**

Omniscript Reverse Transkriptase, monoklonaler Anti-PentaHis-tag-Antikörper aus Maus, monoklonaler Anti-TetraHis-tag-Antikörper aus Maus

### **Roche Diagnostics GmbH, Mannheim**

SAP (*shrimp alkaline phosphatase*)

### **Sigma, Deisenhofen**

Trypsin (vom Schwein), Anti-Maus-IgG-AP-Konjugat, Anti-Kaninchen-IgG-AP-Konjugat,

### **Stratagene, Amsterdam, Niederlande**

*Pfu*<sup>®</sup>Turbo-DNA Polymerase

## 2.7 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten, nicht gesondert aufgeführten Peptidyl-MCA-Substrate sowie einige der HDACI wurden von Daniel Riester in der AG Schwienhorst, Abteilung für Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen synthetisiert.

### **Applichem, Darmstadt**

Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)

### **Bachem Feinchemikalien, Bubendorf, CH**

Boc-Lys(Ac)-MCA, Boc-Lys-MCA, Tos-Gly-Pro-Lys-MCA, Tos-Gly-Pro-Arg-AMC

### **Baker, Deventer, NL**

Dimethylformamid

### **Biomol, Hamburg**

SAHA

### **BioRad, CA, USA**

Tween®-20

### **Biozym, Hess. Oldendorf**

Biozym DNA Agarose

### **Boehringer Mannheim, Mannheim**

Ampicillin (Natriumsalz), 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

### **Difco, Dreieich**

Bacto-Agar, Bacto-Peptide

### **Fluka, Neu-Ulm**

DMSO, NMP, Bromphenolblau, Glycerin,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Saccharose, Coomassie Brilliant Blue R250, Natriumchlorid, D(+)-Glukose Monohydrat,

### **Gerbu, Gaiberg**

Isopropyl-  $\beta$  -D-thiogalactopyranosid (IPTG)

### **Gibco BRL, Eggenstein**

Hefe-Extrakt (*Yeast Extract*)

**ICN Biochemicals, Aurora, USA**

Borsäure, Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)

**Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA**

*UltraPure* Agarose (Electrophoresis Grade)

**National Diagnostics, Simerville, USA**

Protogel<sup>®</sup> 30

**Oxoid, Wesel**

*Agar Bacteriological*, Trypton, Pepton, *Yeast Extract*

**Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden**

Chelating Sepharose Fast Flow

**Riedel-De Haen, Seelze**

Ammoniumacetat, Chloroform, Ethanol, Methanol, Natriumchlorid, Salzsäure, Ammoniumsulfat

**Roth, Karlsruhe**

Einmalküvetten für das Photometer, Aqua Roti-Phenol, TEMED, Rotiphorese-Gel 30 bzw. 40

**Scharlau Chemie S.A., Spanien**

HPLC-*grade* Wasser, MeOH und MeCN

**Serva, Heidelberg**

DTT, EDTA (Dinatriumsalz), D(+)-Glukose Monohydrat, SDS, TEMED, Ammoniumpersulfat, Glycin

**Sigma, Deisenhofen**

Fluorescamin, Ethidiumbromid, Polyethylenglycol 8000, Bromphenolblau, Triethanolamin, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Triton X-100, Kanamycin, Tween-20 (Polyethylen-Sorbitan-Monolaureat), Trichostatin A, Tos-Gly-Pro-Arg-MCA

## 2.8 Kits

### **Invitrogen, Groningen, NL**

TOPO TA Cloning Kit

### **Pierce, Rockfort, USA**

Coomassie Protein Assay Reagent Kit

### **Qiagen, Hilden**

QIAquick Gel Extraction Kit, Plasmid Midiprep Kit,

PCR Purification Kit, Ni-NTA Purification Kit

### **Roche Diagnostics, Mannheim**

Acetic Acid Standard Test (Katalog Nr.148261)

## 2.9 Sonstige Materialien und Geräte

### **American National Can., Chicago, USA**

Parafilm<sup>®</sup> "M" Laboratory Film

### **Ansell, München**

Nitrilierte Einmalhandschuhe

### **Bender & Hobein, Zürich, Schweiz**

Vortex<sup>®</sup> Genie 2

### **Biometra, Göttingen**

TRIO-Thermocycler, Twin-Gel Elektrophoresekammern

### **BioRad, München**

*E. coli* Pulser<sup>®</sup> Elektroporator, Gene Pulser<sup>®</sup> Elektroporator, Elektroporationsküvetten, Power Pac 200, Trans-Blot semi-dry Elektroblotapparat, Sequi-Blot PVDF-Membran (0,2 µm)

### **Biozym, Hessisch Oldendorf**

Gestopfte, sterile Pipettenspitzen (Safeseal Tips, 10, 20, 100, 200 µl)

### **BMG LabTechnologies, Offenburg**

BMG Fluoreszenz-Reader POLARstar Galaxy

### **Branson Ultrasonics, Danbury, CT., USA**

Sonifier Ultraschallstab und Steuereinheit

### **Brother, Japan**

Mikrowellenherd Powerwave

**CEAG Schirp Reinraumtechnik**

Envirco Sterilbank

**Cybertech, Berlin**

Cybertech CS-1 Elektronische Sofortbildkamera

**CyBio AG, Jena**

CyBi-Screen-Machine mit 10 µl und 250 µl 96-Spitzen-Pipettierigel mit integriertem MTP-Fluoreszenzreader (BMG), Stacker, Übergabe-Dreharm, Inkubator/MTP-Paternoster und zwei Waschstationen

**Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg**

Reaktionsgefäße 2,0 ml Safe-Lock, Reaktionsgefäße 1,5 ml, SpeedVac Concentrator 5301, Thermomixer 5436, Kühlzentrifuge 5804R

**Gilson, Medical Electronics, Frankreich**

Mikroliter-Pipetten, 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl und 2µl

**Greiner Bio-One, Frickenhausen**

Petrischalen, Röhrchen 12 ml, schwarze 96-Well Mikrotiterplatten Fluotrac 200, schwarze 384-Well Mikrotiterplatten, Deep Well-Platten (Masterblock 96 well, 2 ml)

**Helma, Müllheim/Baden**

Quarzküvetten (1 und 2 ml, 1 cm Schichtdicke)

**Heraeus, Osterode**

Tischzentrifuge Biofuge pico, Brutschränke B6060 und 6420

**Herolab, Wiesloch**

UVT2035 302 nm UV-Leuchttisch

**Hettich Zentrifugen, Tuttlingen**

Kühlzentrifuge Mikro Rapid/K, Kühlzentrifuge Roto Silenta/RP, Kühlzentrifuge Rotixa/RP, Kühlzentrifuge Rotanta/RPC, Mikroliter-Tischzentrifuge

**Hitachi, Tokio, Japan**

Fluorimeter F-4500

**Hoefer Scientific, San Francisco, USA**

Platten für SDS-Gele

**IKA-Labortechnik, Staufen**

beheizbarer Magnetrührer IKAMAG RCT basic

**Infors AG, Bottmingen, Schweiz**

Kultur-Schüttler mit Inkubatorhaube

**IUL Instruments GmbH, Königswinter**

Constant Systems Hochdruck-Zellaufschlußsystem (Zelldisruptor)

**Kimberley-Clark, USA**

Kimwipes<sup>®</sup> fusselfreie Papiertücher, puderfreie Einmal-Handschuhe

**Knick, Berlin**

pH-Meter 761 Calimatic

**Kontron, Eching**

Zweistrahlspektrophotometer Uvicon<sup>®</sup> 930

**Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen**

Wasserbad

**Labsystems**

Finnpipetten 8-Kanal Multipetten 0,5 – 10 µl, 50 – 300 µl

**Matrix, Wilmslow Chesire, UK**

Magazine mit je 96 mal 250 µl Spitzen (D.A.R.T.s extended length), Digitale Pipette *Impact2* und digitale 8-Kanal-Pipette *Impact8* mit zugehörigen gestopften Spitzen

**Menzel-Gläser, Braunschweig**

Objektträger (76 x 26 mm), Deckgläser (18 x 18 mm)

**Merck, Darmstadt**

pH-Indikatorstreifen

**Millipore, Eschborn**

Filtereinheiten Millex FG13, Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage, Nitrocellulose Rundfilter 0,25µm, Ø 13 mm, Microcon-Konzentratoren YM-10,

**Nalgene, Hereford, England**

Cryoware Cryovial (2 ml-Röhrchen für Gefrierkulturen)

**neoLab, Heidelberg**

8 ml-Braunglasröhrchen mit Schraubdeckel (Wheaton-Röhrchen)

**Neschen**

filmolux 609 (50 m x 10 cm) selbstklebende Abdeckfolie

**Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden**

96 well Polypropylen-MTP mit V-Boden

**Perseptive Biosystems Incorporated, Framingham, USA**

Vision Workstation für Perfusions-Chromatographie, Poros 20 HQ-Säule

**Pharmacia /LKB, Freiburg**

Elektrophorese Stromversorger ECPS 3000/150

**Sarstedt, Nümbrecht; Newton, USA**

Reaktionsgefäße 1,5 ml, Rörchen 5 ml, Rörchen 50 ml (Falcon tubes), Multiple Well Plate 96-Well, Round bzw. Flat Bottom with Lid (Mikrotiterplatten, steril mit Deckel), PCR-cups 0,5 ml

**Sartorius, Göttingen**

Minisart NML Sterilfilter, Sartorius Universal U 4800P Feinwaage

**Schleicher und Schuell, Dassel**

Sterilfilter für Spritzen 0,2 und 0,45 µm, 3 MM-Filterpapier (Whatman), Falten-Filter, Ø 240 mm,

**Schott, Mainz**

Glaswaren

**Schütt Labortechnik, Göttingen**

pH-Meter 526, Schüttler Titramax und Inkubator 1000

**Serva, Heidelberg**

Visking Dialyseschläuche verschiedener Stärken und einem *molecular cut off* von  $M_r \sim 12000 - 14000$

**Sorvall, Bad Nauheim**

Zentrifuge RC-5C, Rotortyp SS34

**Terumo, Leuven, Belgien**

Spritzen, 5 ml, 10 ml, 30 ml

**Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim**

pH-Meter-522

**Zeiss, Oberkochen**

Mikroskop Axioskop mit Durchlicht- und Auflichtfluoreszenz (Filtersätze: 487902 und 487909) und Kameraaufsatz, Okulare: Vergrößerung 10 x, Sehfeldzahl 20, Objektive: Plan Neofluar 63 x/1,25 Oil, 440480, Plan Neofluar 100 x/1,25 Oil, 440460, Acroplan 20 x, 440845, Immersionsöl

**Ziegra, Stockport, England**

Eismaschine

## 2.10 Nährmedien

Zur Sterilisation wurden die Nährmedien 20 min bei 121 °C autoklaviert, wobei Glukose immer separat autoklaviert wurde. Festmedien (Platten) enthalten zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar. Hitzelabile Ingredienzen (z. B. Antibiotika) wurden nach Abkühlen des Mediums auf etwa 55 °C zugesetzt. Platten wurden bei 4 °C gelagert und vor Benutzung auf RT gebracht.

Antibiotika wurden aus 1000fach konzentrierten Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml für Ampicillin, 75 µg/ml für Kanamycin bzw. 50 µg/ml für Tetracyclin zugegeben.

### 2.10.1 Nährmedien für *Escherichia coli*

#### **dYT**

1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1,6 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) NaCl

#### **LB**

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) Tryptone, 1% (w/v) NaCl

#### **SOC**

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Trypton, 2,5 mM KCl, 0,05 % (w/v) NaCl, nach dem Autoklavieren wurden 2 % (w/v) Glukose und 10 mM (Endkonzentration) MgCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> zugesetzt.

#### **M9 Minimal-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)**

0,4 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1,6 % (w/v) Trypton, 0,04 % (w/v) NaCl, nach dem Autoklavieren wurden 0,5 % (w/v) Glukose zugesetzt und Endkonzentrationen von 100 µM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 µM FeCl<sub>3</sub> sowie 1 µg/ml Thiaminlösung eingestellt.

### 2.10.2 Nährmedien für *Bordetella/Alcaligenes FB188*

#### **Medium A**

78,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,95 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,118 mM, FeCl<sub>3</sub>, 15,4 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 34,2 mM NaCl, 1 ml Vitamin Lösung (Schlegel, 1985) und einer finalen Konzentration von 10 mM NAA

## 2.11 Lösungen und Puffer

### **Ampicillin-Stammlösung**

100 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser, sterilfiltriert

### **Anodenpuffer I**

300 mM Tris/HCl, pH 10,4

### **Anodenpuffer II**

25 mM Tris/HCl, pH 10,4

### **APS-Stammlösung**

10 % APS in Wasser

### **BB-Puffer (Blocking-Puffer I)**

5 % Milchpulver in PBS-Puffer

### **BBT-Puffer (Blocking-Puffer I mit Tween 20)**

5 % Milchpulver in PBS-Puffer, 5 % (v/v) Tween 20

### **BBT/PBS-Puffer (Blocking-Puffer II)**

50% BBT und 50 % PBS

### **BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat)**

25 mg/ml BCIP, gelöst in 100 % DMF

### **Chloramphenicol-Stammlösung**

25 mg/ml Chloramphenicol in 96 % Ethanol

### **dNTPs-Arbeitslösung (10 mM)**

je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in Wasser

### **DTT-Stammlösung**

1 M DTT in Wasser, sterilfiltriert

### **E1 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))**

50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA

### **E2 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))**

200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

### **E3 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))**

3,2 M Kaliumacetat-Essigsäure, pH 5,5

### **E4 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))**

600 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat-Essigsäure, pH 5,0

### **E5 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))**

800 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat-Essigsäure, pH 5,0

**E6 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))**

1,25 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5

**Entwicklungspuffer**

100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5

**Ethidiumbromid-Stammlösung (10x)**

10 mg/ml Ethidiumbromid

**HD-Puffer**

15mM Tris-HCl, pH 8.1, 250 µM EDTA, 250mM NaCl, 10 % Glyzerin

**HD-KP-Puffer**

15mM Tris-HCl, pH 8.1, 250 µM EDTA, 250mM NaCl, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
pH 8,0, 10 % Glyzerin

**IMAC-Puffer I**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8,0, 100 mM NaCl

**IMAC-Puffer II**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 M Imidazol

**IPTG-Stammlösung**

1 M IPTG in Wasser, sterilfiltriert

**Kaliumphosphat-Puffer**

1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8,0;  
200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 und 10,0

**Kanamycin-Stammlösung**

75 mg/ml Kanamycin in Wasser

**Kathodenpuffer**

25 mM Tris/HCl, pH 9,4, 40 mM L-Norleucin

**Laemmli-Puffer (Laufpuffer für die SDS-PAGE)**

33 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3

**NBT (Nitro-Tetrazolium Blau)**

75 mg/ml NBT, gelöst in 75 % DMF

**NaCl**

1 M NaCl in Wasser, autoklaviert

**Natriumacetat**

NaAc 2,5 M NaAc in Wasser, mit Essigsäure auf pH 5.2

**P1-Puffer**

50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,1 g/l RNase A

**P2-Puffer**

200 mM NaOH, 1 % SDS

**P3-Puffer**

2,55 mM KAc, pH 4,8

**PBS-Puffer**

140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**PBST-Puffer**

140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 % (v/v)

Tween 20

**PEG-Lösung**

13 % (w/v) PEG 8000 in Wasser, sterilfiltriert

**PfuTurbo<sup>®</sup> Polymerase-Puffer**

100mM KCl, 100 mM (NN<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 mM Tris-HCl (pH 8,75), 20 mM MgSO<sub>4</sub>,

1 % Triton X-100, 1mg/ml BSA

**Proteinfärbelösung**

45 % (v/v) Methanol, 0,2 % (v/v) Coomassie Brilliant Blue R250,

10 % (v/v) Eisessig

**Proteinprobenpuffer**

2,5 ml 4 x Sammelgelpuffer, 3 ml 10 % (w/v) SDS, 300 µl β-Mercaptoethanol,

2,5 ml 80 % Glycerin, 100 µl 2 % Bromphenolblau

**Phenol/Chloroform**

1 Vol Phenol/TE, 1 Vol Chloroform

**Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas)**

**Blau:** 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>

**Grün:** 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl

**Orange:** 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl

**Rot:** 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl

**Gelb:** 33 mM Tris-Essigsäure, pH 7,9, 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat

**Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (NEB)**

**NEB1:** 10 mM Bis-Tris Propan-HCl, pH 7,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT

**NEB2:** 10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl 1 mM DTT

**NEB3:** 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM DTT

**NEB4:** 20 mM Tris-Essigsäure, pH 7,9, 10 mM Magnesiumacetat, 50 mM Kaliumacetat, 1 mM DTT

**Sammelgelpuffer (4 x) für SDS-Polyacrylamidgele**

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

**Sammelgel, 5 %ig für 2 Gele**

3 ml 4x Sammelgelpuffer, 2 ml 30 % Protogel™, 7 ml H<sub>2</sub>O, 50 µl APS, 25 µl TEMED

**SAP-Dephosphorylierungspuffer**

500 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 8,5)

**SDS**

10 % (w/v) SDS in Wasser

**Sucrosefarbmarker**

60 % (w/v) Sucrose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF in 1x TAE

**Sucrosegradientenpuffer**

100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 18,5 % (w/v) Saccharose

**T4-DNA-Ligase-Puffer**

400 mM Tris-HCl, pH 7,8 bei 25 °C, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP

**Taq-Polymerase-Puffer / Taq-Puffer**

50 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % (w/v) Triton X 100

**TAE-Puffer**

40 mM Tris-Acetat, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,4

**TBE-Puffer**

89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA

**TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 8,0, aus Stammlösungen zusammengestellt

**TEA-Puffer**

20 mM Triethanolamin-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,0

**Tfl-DNA-Polymerase-Puffer (20x)**

1 M Tris-HCl, pH 9,0, 400 mM Ammoniumsulfat, 30 mM MgCl<sub>2</sub>

**Trenngelpuffer ( 4 x) für SDS-Polyacrylamidgele**

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

### **Trenngel, 10 %ig für 2 Gele**

4,5 ml 4x Trenngelpuffer, 6 ml 30 % Rotiphorese Protogel™, 7,5 ml H<sub>2</sub>O, 80 µl APS,  
40 µl TEMED

### **Tris-Puffer**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (z.B. Sigma 7-9) in Wasser auflösen und den pH-Wert mit Säure einstellen. Für Tris-HCl wird Salzsäure, für Tris-Acetat wird Essigsäure verwendet. Der pH-Wert von Tris-Puffer kann mit normalen pH-Elektroden nicht genau bestimmt werden, weswegen pH-Indikatorpapier verwendet werden muß.

### **Tris-Puffer A**

25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 25 mM NaCl

### **Tris-Puffer B**

25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 M NaCl

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit demineralisiertem Wasser (Millipore, Nanopore-Wasser-Anlage) angesetzt.

## **2.12 Computer-Software**

### **BMG LabTechnologies, Offenburg**

FLUOStar Galaxy 4.01-0

### **CambridgeSoft Corporation, Cambridge, USA**

CS Chem Draw Std

### **GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA**

Graph Pad Prism 3.03

### **Corel Corporation**

Corel Draw 9

### **Conor McCarthy, School of Health Science, Griffith-University, Southport,**

### **Australia**

Chromas 1.45

### **CyBio AG, Jena**

CyBio-Control 1.70

### **DeLano Scientific LLC, San Carlos, USA**

PyMole V. 0.97

**InforMax, Maryland, USA**

Vector NTI 9.0.0

**Julie Thompson, Toby Gibson, Des Higgins, EMBL Heidelberg, Cambridge, UK**

ClustalW 1.6

**Microsoft Corporation**

Word 2000, XP ; Excel 2000, XP

**Netscape Communications Corporation**

Netscape Communicator 7.1

**Williamstone**

*Primer-Calculator*

## 3 Methoden

### 3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

#### 3.1.1 Kultivierung und Lagerung von *Escherichia coli*

Die Bakterien wurden in dYT- oder LB-Medium, dem das der plasmidkodierte Resistenz des Stammes entsprechende Antibiotikum (Endkonzentration bei Amp 100 µg/ml, bei Kan 75 µg/ml, bei Tet 25 µg/ml) zugesetzt wurde, bei 37 °C über Nacht angezogen. Kulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden in Kulturröhrchen im Roller, Kulturen von 50 ml im 100 ml-Erlenmeyerkolben bei 150-200 Upm im Schüttelinkubator unter einer Wärmehaube inkubiert. Die Anzucht von 1 l-Kulturen erfolgte in der Regel in 3 l-Schikanekolben, in dem mit 5 ml einer 50 ml-Vorkultur beimpft wurde. Die Zelldichte der Flüssigkulturen wurde photometrisch bei OD<sub>600</sub> gegen Medium bestimmt, wobei die Kultur immer so mit sterilem Medium verdünnt wurde, daß die gemessene Absorption kleiner als 0,8 und somit im linearen Meßbereich des Gerätes blieb. Zur mittelfristigen Lagerung (wenige Wochen) wurden die Stämme auf Festmedien, mit dem erforderlichen Antibiotikum versehen, ausgestrichen und nach Anzucht bei 37 °C bei 4 °C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung der Bakterien bei -80 °C wurden Glycerinkulturen mit einem Glyceringehalt von etwa 30 % angelegt. Dazu wurden Übernachtskulturen mit steriler 87%iger Glycerinlösung in einem Kryokulturröhrchen verdünnt.

#### 3.1.2 Transformation von *Escherichia coli*

##### 3.1.2.1 Präparation und Transformation elektrokompenter *Escherichia coli*-Zellen (Dower *et al.*, 1988)

Zur Transformation von *Escherichia coli* nach der Elektroporationsmethode wurde das Protokoll nach Dower *et al.* (1988) verwendet. Zur Präparation elektrokompenter Zellen wurden 50 ml dYT/Tet mit *Escherichia coli* XL1-Blue inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 herangezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Hettich-Rotanta, 4000 Upm, 10 min, 4 °C) geerntet, in 50 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert (Waschen) und erneut pelletiert. Dieser Waschschrift wurde mehrmals wiederholt, wobei das Zellpellet nacheinander in 25 ml und in 10 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert

wurde. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet in 300 µl DMSO (8%) resuspendiert. Während des gesamten Vorgangs wurden die Zellen auf Eis gehalten. 50 µl Aliquots der Zellsuspension wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur späteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Transformationstests mit 1 ng pUC18-Plasmid ergaben normalerweise eine Transformationseffizienz von über  $10^7$  cfu/µg DNA. Zur Transformation wurden 50 µl Zellsuspension auf Eis aufgetaut (45 min) mit 2–10µl dialysiertem (3.2.15.) Ligationsansatz versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde im *E. coli*-Pulser<sup>®</sup> (BioRad) bei folgenden Einstellungen durchgeführt: 25 µF, 1,7 kV, 200 Ohm, (meist 4,5 ms Zeitkonstante). Unmittelbar nach dem Potentialpuls wurden 950 µl steriles SOC-Medium in die Elektroporationsküvette pipettiert, der Inhalt in ein Kulturröhrchen überführt, die Küvette zweimal mit einem weiteren Milliliter SOC-Medium in das Röhrchen ausgespült und die Zellsuspension für eine Stunde bei 37 °C im Roller inkubiert. Anschließend wurden 800-1000 µl der Kultur durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge pico, 13000 Upm, 20 s, RT) pelletiert, in etwa 50-100 µl Medium resuspendiert und dann auf Selektivplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollen wurde jeweils ein Ligationsansatz ohne Insert mit Ligase, für den Anteil an Rezyklisierung, und ein Ansatz ohne Ligase und Insert, für den Anteil an ungeschnittenem Vektor, mitgeführt.

### **3.1.2.2 Präparation und Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen (Mandel and Higa, 1970), modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972)**

Mit je 0,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) wurden 4 x 50 ml dYT-Medium (mit Tetracyclin) angeimpft und diese Kulturen bei 37 °C und 150 Upm im Schüttler inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 wurden die Zellen für 1 h auf Eis inkubiert, nachfolgend pelletiert (Hettich-Rotanta/RPC, 4000 Upm, 10 min, 4 °C) und in 50 ml eiskaltem, sterilem Trituration-Buffer aufgenommen. Nach Inkubation auf Eis für 45 min und erneutem Pelletieren wurden die Zellen in 5 ml Trituration-Buffer resuspendiert und gesammelt. Nach Zutropfen von 4 ml 87%igem Glycerin und leichtem Mischen, wurden 200 µl-Aliquots der Zellsuspension auf Trockeneis in Eppendorf-Reaktionsgefäße abgefüllt und bei -80 °C bis zur späteren Verwendung eingefroren.

Transformationstests mit 1 ng pUC18-Plasmid ergaben normalerweise eine Transformationseffizienz von über  $10^5$  cfu/ $\mu$ g DNA.

Die Transformation erfolgte in modifizierter Form nach Sambrook *et al.* (1989). Auf Eis wurden 200  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub>-kompetente Zellen langsam aufgetaut, vorsichtig mit 5 oder 10  $\mu$ l Ligationsansatz vermischt und dann 30 min auf Eis inkubiert (Adsorption der DNA an die Zelloberfläche). Danach erhielten die Zellen einen Hitzeschock für 60 s bei 42 °C im Heizblock und wurden im Anschluß daran für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800  $\mu$ l 37 °C warmen SOC-Medium wurde der für 1 h bei 37 °C im Heizblock geschüttelt. Beim direkten „TA-Cloning“ von PCR-Produkten (3.2.11) wurden pro Ansatz jeweils 200  $\mu$ l und 800  $\mu$ l Zellsuspension auf LB-Amp/Kan-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden ü.N. bei 37 °C inkubiert. Bei Transformation Ligase-vermittelter Ligationsansätze wurden pro Ansatz jeweils 200  $\mu$ l Zellsuspension direkt auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Nach Pelletierung und Resuspendierung der restlichen Zellen des Ansatzes in 200  $\mu$ l Medium wurde diese konzentrierte Zellsuspension ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden ü.N. bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollen wurde jeweils ein Ligationsansatz ohne Insert (Rezyklisierung) und ein Ansatz ohne Ligase und Insert (Anteil an ungeschnittenem Vektor) mitgeführt.

## **3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

### **3.2.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen**

Hitzestabile Geräte wurden durch Erhitzen für 20 min auf 181 °C sterilisiert. Hitzestabile Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. In der Hitze nicht beständige Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt und getrocknet. Hitzelabile Bestandteile von Lösungen wurden als konzentrierte Stammlösungen hergestellt und vor der Zugabe zu bereits sterilen Lösungen durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2  $\mu$ m sterilfiltriert.

## 3.2.2 Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen

### 3.2.2.1 Fällung von DNA mit Ethanol

Die Fällung von DNA mit Ethanol dient der Konzentrierung der nukleinsäurehaltigen Lösung und der Entfernung von Salzen, Proteinen sowie der Minderung des Gehaltes an freien Nukleotiden bzw. Oligonukleotiden. Bei dieser Methode wird die Konzentration monovalenter Kationen ( $\text{NH}_4^+$  oder  $\text{Na}^+$ ) stark erhöht und so die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren neutralisiert. Durch Zugabe von Ethanol (abs.) wird das Lösungsmittel ( $\text{H}_2\text{O}$ ) entzogen und der Nukleinsäure-Salz-Komplex ausgefällt.

DNA wurde mit 1/10 Vol. 7,5 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (oder 1/10 Vol. 2,5 M  $\text{NaAc}$ , pH 5,2) und 2-3 Vol. eiskaltem Ethanol (abs.) versetzt und anschließend 30-45 min bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  oder mindestens 1 h bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gefällt. Anschließend wurde die DNA pelletiert (Eppendorf 5804R, 30 min, 13.000 Upm,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das DNA-Pellet mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, um verbliebene Salze zu entfernen. Es folgte eine weitere Zentrifugation (15 min, 13.000 Upm,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ), wonach der Überstand sorgfältig entfernt und das DNA-Pellet anschließend bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  oder 3–5 min in der SpeedVac getrocknet wurde, um das restliche Ethanol verdampfen zu lassen. Die gereinigte DNA wurde dann in einem geeigneten Volumen  $\text{H}_2\text{O}$  oder TE-Puffer aufgenommen und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.2.2.2 Fällung von DNA mit Isopropanol

DNA kann auch mit Isopropanol anstelle von Ethanol gefällt werden. Bei der Verwendung von Isopropanol wird dabei die Präzipitation von Salzen weitgehend vermindert. Es wurde analog zur DNA-Fällung mit Ethanol verfahren. Im Unterschied dazu wurden jedoch nur 0,7 Vol. bis 1 Vol. Isopropanol zugesetzt und bei RT gefällt. Wie auch nach der Ethanolfällung wurde anschließend mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und das getrocknete Pellet in  $\text{H}_2\text{O}$  oder TE aufgenommen.

### 3.2.3 Extraktion von DNA aus wässrigen Lösungen mit organischen Lösungsmitteln

Zur Entfernung von Proteinen aus einer wässrigen DNA-Lösung, wurde diese mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gründlich gemischt. Die anschließende Trennung der Phasen wurde durch eine Zentrifugation (1 min, 13.000 Upm, RT) beschleunigt. Im Anschluss wurde die obere, wässrige und DNA-haltige Phase abgenommen und mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, ebenfalls gründlich gemischt und anschließend zentrifugiert (5 min, 13.000 Upm, RT). Es wurde erneut die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus dieser Lösung konnte die nun proteinfreie DNA mit Ethanol ausgefällt (3.2.2.1) werden. Bei Bedarf konnte die Extraktion auch einmal mit TE-gesättigtem Phenol und danach zweimal mit wassergesättigtem Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) durchgeführt werden. Diese Art der Extraktion kam zur Anwendung, wenn DNA von DNA-Polymerasen oder Ligase abgetrennt werden sollte.

### 3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode kann zur relativ genauen Größenbestimmung von linearen DNA-Fragmenten genutzt werden, da wegen des Polyanion-Charakters der DNA über einen breiten Bereich eine lineare Beziehung zwischen relativer Wanderungstrecke und dem Logarithmus der Länge der Fragmente besteht. Zirkuläre Moleküle wie Plasmide zeigen in relaxierter oder in ihrer überspiralisierten („*supercoiled*“) Form aberrantes Wanderungsverhalten. Ein Vergleich mit DNA-Längenstandards erlaubt eine Größenbestimmung der aufgetrennten DNA-Fragmente, als Referenz bei Plasmiden können andere überspiralisierte Plasmide dienen.

Diese Art der Gelelektrophorese wurde zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten angewendet. Es wurden Agarose-Gele unterschiedlicher Größe und Konzentration (0,6-2 % (w/v)) eingesetzt, wobei kurze DNA-Fragmente in hochprozentigen und lange DNA-Fragmente in niederprozentigen Gelen aufgetrennt wurden. Die Agaroselösung wurde in 1 x TAE-Puffer (50-150 ml) in einem Mikrowellengerät (Brother Powerwave) aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde das Gel in eine Flachbettgelapparatur mit einem darüberhängenden Taschenformer

der erforderlichen Größe gegossen. Nach der Verfestigung des Gels konnte der Kamm vorsichtig herausgelöst und das Gel in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt werden. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Vol DNA Loading Dye versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Bei präparativen Gelen ist pro Spur maximal 5 µg DNA aufgetragen worden, um eine Überladung des Gels zu vermeiden. Die anschließende Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe erfolgte bei einer Feldstärke von 5-10 Volt/cm (60–120 V). Nach Anfärbung der DNA im Gel in einem Ethidiumbromidbad (10 µg/ml) konnten die DNA-Banden auf einem UV-Leuchttisch (Herolab, Wiesloch) bei einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht und mit einer Videoprinteinheit (Cybertech, Berlin) dokumentiert werden.

### 3.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennte DNA wurde mit Hilfe des *Gel Extraction Kit* (Qiagen) aus dem Gel isoliert. Dazu wurde das gewünschte Fragment mit einem sterilen Skalpell unter UV-Belichtung aus dem Gel ausgeschnitten. Nach Zugabe von 3 Volumen chaotropem QG-Puffer pro 100 mg Gel wurde das Gelstück durch eine 15-minütige Inkubation bei 50 °C aufgelöst, anschließend auf eine Zentrifugationssäule gegeben und diese zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico, 13.000 Upm, 1 min, RT). Die gebundene DNA wurde nacheinander mit 500 µl QG und 750 µl PE-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 13.000 Upm, 1 min, RT). Die DNA konnte dann mit zwei mal 30 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 oder H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert werden (Zentrifugation: 13.000 Upm, 1 min, RT).

### 3.2.6 Abtrennung von Oligonukleotiden und kurzen DNA-Fragmenten aus DNA-Gemischen

PCR-Produkte wurden mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* über eine Silika-Matrix aufgereinigt. Durch diese Methode konnten sowohl PCR-Produkte sowohl von Salzen und Enzymen als auch große Vektorfragmente von kleinen DNA-Fragmenten (< 100 bp) befreit werden. Für die Aufreinigung durch den *QIAquick PCR Purification Kit* wurde die zu reinigende Probe mit 5 Volumen PB-Puffer (v/v) verdünnt, auf eine

*QIAquick*-Säule gegeben und zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico, 1 min, 13.000 Upm, RT). DNA-Fragmente (> 100 bp) binden dabei an eine Silika-Membran, wobei Enzyme und Salze durch Abzentrifugieren und einen anschließenden Waschschrift mit 0,75 ml PE-Puffer entfernt werden. Zur Elution der DNA von der Säule wurden 50 µl Elutions-Puffer auf die Silika-Membran pipettiert und die Säule anschließend zentrifugiert (13.000 Upm, 1 min, RT).

### 3.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

#### 3.2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* im analytischen

##### **Maßstab (Mini-Präparation)**

Die Mini-Präparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen SDS-Lyse (Birnboim and Doly, 1979). In diesem Protokoll wurde die DNA durch wiederholte Fällung aus der wässrigen Phase aufgereinigt. Da im für die Plasmidpräparation verwendeten Stamm *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) das Gen *endA* disruptiert ist, welches für eine Endonuklease codiert, konnte auf eine schnelle und absolute Abtrennung von Proteinen aus dem Lysat mittels Phenol-Extraktion verzichtet werden.

Im ersten Schritt erfolgte die alkalische Lyse von 1,5 ml Übernachtskultur in 200 µl P1-Puffer und 300 µl P2-Puffer. Dabei sorgte die Alkalisierung durch das NaOH auch für das Aufschmelzen von dsDNA und das SDS für die Denaturierung der Proteine. Die RNase entfernte die RNA. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis und schlagartiger Neutralisation durch Zugabe von 300 µl P3-Puffer aggregierten zufällig homologe Bereiche der relativ langen genomischen DNA-Moleküle und fielen aus. Die zirkulären, relativ kurzen, komplementären Einzelstränge der freigesetzte Plasmid-DNA waren topologisch verbunden und konnten daher mit hoher Wahrscheinlichkeit wieder zum dsDNA-Ring hybridisieren. Bei der folgenden Zentrifugation (Eppendorf 5804R, 30 min, 13.000 Upm, 4 °C) wurden Zelltrümmer, Proteine und die unlöslichen SDS-Membran-DNA-Knäuel pelletiert. Der Plasmid-DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Plasmide nach Versetzen mit 800 µl Isopropanol und Zentrifugation (20 min, 13.000 Upm, 4 °C) gefällt. Nach Waschen des Pellets mit 500 µl 70 %igem (v/v) EtOH und Trocknen in der SpeedVac (Eppendorf) wurde die DNA in 20 µl H<sub>2</sub>O oder TE aufgenommen.

Die Ausbeute lag bei ca. 20 µg Plasmid-DNA. Die so gewonnene DNA war qualitativ für den Verdau mit Restriktionsenzymen, für Transformationen und PCR geeignet.

Sollte die Plasmid-DNA sequenziert werden, wurde die DNA nach dem Waschen in 32 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, mit 8 µl 4 M NaCl und 40 µl 13 %igem (w/v) PEG 8000 versetzt und erneut präzipitiert (20 min, 13.000 Upm, 4 °C). Nach zweimaligem Waschen der Plasmid-DNA mit 70 %igem EtOH wurde das Pellet luftgetrocknet und in 25 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Diese weitere Aufreinigungsprozedur ergab für die Sequenzierung qualitativ geeignete DNA (Giorgia Riboldi, persönliche Mitteilung).

### **3.2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* im präparativen**

#### **Maßstab (Midi-Präparation)**

Die Gewinnung der Plasmid-DNA in größerem Maßstab erfolgte mit dem *Plasmid Midiprep Kit* (Qiagen) prinzipiell in analoger Weise wie in 3.2.7.1, allerdings wurde mehr Zellmaterial aufgearbeitet und die freigesetzte Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Säule gebunden. Die Bindung der Plasmid-DNA erfolgte bei 750 mM NaCl, durch Erhöhung der Salzkonzentration auf 1,25 M NaCl konnte sie eluiert werden.

Zellen einer 50 ml Übernachtskultur wurden geerntet (Hettich Rotanta/RPC, 10 min, 4.000 Upm, RT). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 4 ml P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml P2-Puffer und Umschwenken wurde die Lösung für 5 min auf Eis inkubiert, nach Zugabe von 5 ml P3-Puffer und Umschwenken für weitere 15 min auf Eis belassen. Das Lysat wurde auf eine mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Midi-100-Säule filtriert (Falten-Filter, Ø 240 mm, Schleicher & Schüll). Beim Durchlaufen der Säule wurde Plasmid-DNA selektiv gebunden, während Proteine und Zelltrümmer im Durchfluss zu finden waren. Nach Waschen der Säule mit zweimal 10 ml QC-Puffer wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Die mit Isopropanol gefällte DNA (3.2.2.2) wurde mit 70%igem (v/v) EtOH gewaschen, getrocknet und in insgesamt 125 µl TE oder Wasser aufgenommen.

Die Ausbeuten lagen für Plasmide mit ColE1-Replikationsursprung normalerweise bei 90-120 µg DNA pro 50 ml Kultur.

### 3.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Eine grobe Abschätzung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte, indem ein Aliquot der Probe zusammen mit einem DNA-Längenstandard bekannter Konzentration auf einem Agarosegel aufgetrennt wurde (3.2.4). Durch den Vergleich der mit Ethidiumbromid gefärbten Nukleinsäuren konnte die Konzentration der Probe abgeschätzt werden.

Die Konzentration einer Probe konnte auch photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden, da nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Absorption einer Lösung in der Konzentration der gelösten Substanz bei konstantem Lichtweg proportional ist und Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweisen. Für die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration gelten folgende Entsprechungen:

$$\begin{aligned} 1 \text{ OD}_{260} & \approx 50 \text{ ng}/\mu\text{l doppelsträngige DNA bzw.} \\ & = 40 \text{ ng}/\mu\text{l RNA bzw.} \\ & = 20 \text{ ng}/\mu\text{l Oligonukleotide.} \end{aligned}$$

Die Extinktion der Probe wurde außerdem bei 280 nm gemessen, da hier das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt. Der Quotient  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  gibt daher den Grad der Verunreinigungen der Probe durch Proteine an. Reine Präparationen sollten einen Quotienten von über 1,6 aufweisen, wenn es sich um DNA handelt. RNAs weisen idealerweise einen Quotienten von 2,0 auf. Alle photometrischen Messungen wurden in einer Quarzküvette (Helma, Schichtdicke = 1 cm) gegen reines  $\text{H}_2\text{O}$  als Referenzwert durchgeführt, wobei die DNA meist in 100-facher Verdünnung vermessen wurde.

### 3.2.9 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II wurden benutzt, um DNA an definierten Stellen zu schneiden. Dabei wurden dabei die vom Hersteller empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen (pH, Salz, Ionenstärke) eingehalten, da diese Parameter für die Enzymaktivität entscheidend sind. Plasmide wurden mit 5-10 U Enzym pro Mikrogramm DNA für 2 h bei der für die benutzten Restriktionsenzyme optimalen Temperatur (meist 37 °C) inkubiert. Bei Inkubationen über Nacht wurde weniger Enzym eingesetzt. Das Volumen des Restriktionsansatzes betrug zwischen 20 und 100  $\mu\text{l}$ , wobei darauf geachtet wurde, daß die Endkonzentration des Glycerins aus dem Enzymlagerungspuffer im Reaktionsansatz unter 5 % (v/v) lag, um eine mögliche Star-Aktivität mancher Enzyme zu

vermeiden. Sofern vom Hersteller vorgeschlagen, wurde auch acetyliertes BSA in einer Endkonzentration von 100 ng/ $\mu$ l zugesetzt. Die Reaktion wurde anschließend auf einem Agarose-Gel analysiert. Hitzelabile Restriktionsendonukleasen wurden durch Hitze inaktiviert (meist 65 °C für 20 min), andere durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (3.2.3) und präparative Agarosegelelektrophorese (3.2.5) abgetrennt oder mit organischen Lösungsmitteln behandelt und gefällt.

### 3.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Ligationsprodukt wurde in einem variablen molaren Verhältnis (von etwa 1/10 bis 1/1) an entsprechend verdautem (3.2.9) DNA-Insert-Fragment gegenüber dem DNA-Vektor-Fragment durchgeführt. Vektor-DNA wurde in Konzentrationen von 10 ng bis 100 ng eingesetzt. Der Reaktionsansatz (10-15  $\mu$ l) beinhaltete ferner T4 DNA-Ligase-Puffer unter Zusatz von ca. 5 U T4 DNA-Ligase. Die Reaktion erfolgte in der Regel über Nacht bei RT.

### 3.2.11 Direkte Klonierung von PCR-Produkten (TA-Cloning)

Mit Amplitaq-DNA-Polymerase generierte PCR-Produkte konnten direkt in den DNA-Vektor pCR4<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup> aus dem *TA Cloning™ Kit* (Invitrogen) ligiert werden. Für den Klonierungserfolg sind 3'Adenin-Überhänge, wie sie vom Typ der *Taq*-DNA-Polymerasen synthetisiert werden, ausreichend. Ebenso können diese 3'A-Überhänge auch nachträglich an DNA-Fragmente angefügt werden. Hierzu gab man 1 U *Taq*-/ Amplitaq-DNA-Polymerase zu seiner entsprechend gepufferten DNA (100  $\mu$ g) und inkubierte für 10 min bei 72 °C. Die so adenylierte DNA konnte direkt in die Klonierungsreaktion eingesetzt werden.

Der Ligationsansatz aus 1  $\mu$ l pCR4<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup> Vektor und 1-4  $\mu$ l einer typischen PCR-Reaktion, bzw. der nachträglich adenylierten DNA, wurde bei Bedarf mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 5  $\mu$ l aufgefüllt und für höchstens 5 min bei RT inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis belassen. Das entstandene zirkuläre Ligations-Produkt konnte direkt zur Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen (3.2.1) verwendet werden.

### 3.2.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR; (Mullis and Faloona, 1987); (Saiki *et al.*, 1988) dient der enzymatischen *in vitro*-Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Die Reaktion besteht aus aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen, die jeweils durch drei Phasen unterschiedlicher Temperatur charakterisiert sind. In der ersten Phase, der Denaturierungsphase, wird eine doppelsträngige DNA-Matrize bei einer Temperatur von 95–99 °C in eine von Sekundärstrukturen freie Einzelstrang-DNA überführt. In der zweiten, der sog. Anlagerungs-Phase („*annealing*“) wird die Temperatur soweit abgesenkt, dass sich spezifische Oligodesoxynukleotide (Primer), die sich jeweils in entgegengesetzter Orientierung flankierenden Bereichen, die der zu amplifizierenden Zielregion in einer Duplex-DNA homolog sind, an den jeweils komplementären Strang der denaturierten Template-DNA anlagern. Die Temperatur ist Primer-spezifisch und abhängig von der Gesamtlänge des Oligonukleotids, sowie dessen GC-Gehaltes. Sie errechnet sich nach der Formel :

$$T_{\text{Anneal.}} = 69,3 + 0,41 \times (\% \text{ GC}) - (650/\text{Länge Oligo})$$

In der Extensionsphase bei meist 72 °C werden dann die Oligodesoxynukleotide durch eine thermostabile DNA-Polymerase in 5'→3'-Richtung komplementär zur Zielregion verlängert. In den aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen kommt es idealerweise zur exponentiellen Anreicherung der durch die beiden Primer flankierten Ziel-Sequenz. Um optimale Anlagerungsbedingungen für beide Primer zu schaffen und damit eine spezifische Amplifikation zu gewährleisten, sollten sich die eingesetzten Oligodesoxynukleotide nur wenig im Schmelzpunkt und GC-Gehalt voneinander unterscheiden. Zusätzlich sollten selbst-komplementäre Sequenzen innerhalb der Oligodesoxynukleotide vermieden werden, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen oder Dimeren zu unterdrücken. Eine Vorabkontrolle der Primer im Hinblick auf diese Phänomene und deren theoretischen Schmelzpunkt ( $T_m$ ) erfolgte mit dem Programm *Primer-Calculator* (Williamstone). Für die Amplifikationen kamen *AmpliTaq*<sup>®</sup>-, *Vent*<sup>®</sup>- sowie *PfuTurbo*<sup>®</sup>-DNA-Polymerase zum Einsatz. Die PCR-Reaktionen wurden in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen in 50-100 µl-Ansätzen in der Polymerase entsprechenden 1x PCR-Puffer durchgeführt, die 10 bis 100 ng Template-DNA, dNTPs (je 2,5 mM) und 20-50 pmol von beiden Primern enthielten.

Die PCR-Reaktionen wurden entweder vor Beginn der Reaktion komplett zusammen pipettiert oder es wurde ein sog. „*hot start*“ durchgeführt. Dies bedeutet, dass die DNA-Polymerase erst nach dem ersten Aufschmelzschritt in ersten Zyklus zum Ansatz gegeben wurde. Auf diese Weise konnte die Bildung unspezifischer PCR-Produkte vor dem Beginn der Reaktionszyklen verhindert werden. Diese könnten durch die Verlängerung falsch angelagerter oder durch Ausbildung von Sekundärstrukturen veränderter Primer entstehen. Eine weitere Optimierungsmethode war der Zusatz von max. 5 % DMSO zum Reaktionsansatz. Dieses fungierte als zusätzliche Aufschmelzhilfe bei DNA, die einen hohen GC-Gehalt aufweist.

Für die Reaktionen wurde das PCR-Gerät von Biometra (Trio) verwendet, das mit einem beheizbaren Deckel ausgestattet ist, so daß auf eine Übersichtung mit Mineralöl oder Wachs als Verdunstungsschutz verzichtet werden konnte. Die PCR-Programme wurden jeweils den unterschiedlichen Primerpaaren und Template-Bedingungen angepaßt. In der Regel wurden die Reaktionen mit 30 aufeinanderfolgenden Zyklen durchgeführt. Nach Beendigung des letzten Zyklus wurde bei 72 °C ein Restsyntheseschritt für 10 min durchgeführt.

### 3.2.13 Direkte PCR-Mutagenese eines Zielvektors (QCM-Verfahren), modifiziert nach (Li *et al.*, 1997); (Wang and Malcolm, 2002)

Mit dem PCR-basierten Quik™-Change Mutagenesis (QCM)-Verfahren (Stratagene) als einer Spielart der *site-directed mutagenesis* lassen sich einzelne oder mehrere Basen (z. B. ein oder einige aufeinander folgende Codons) sequenzspezifisch direkt im bestehenden Vektorkontext mutieren, deletieren oder inserieren, ohne daß eine Subklonierung nötig wäre. Dabei werden zwei direkt zueinander komplementäre Oligonukleotide, die beide die gewünschte Mutation beinhalten, in eine PCR eingesetzt, wobei diese Primer sich mit ihren beiderseits der Mutagenesestelle völlig zum Template komplementären Bereichen anlagern und von dort in mehreren Zyklen der gesamte Zielvektor (mit den Mutationen) amplifiziert wird. Da hier normalerweise recht lange DNA-Fragmente amplifiziert werden müssen, bedient man sich zur Fehlerunterdrückung der *PfuTurbo*®-DNA-Polymerase, da diese eine sog. „*proofreading*“-Funktion besitzt. Dabei entstehen doppelsträngige Plasmide mit jeweils einem Einzelstrangbruch (*nick*) am 5'-Ende der eingebauten Primer. Die Abtrennung des parentalen Plasmides (ohne Mutation) und der Hybride mit nur einem

mutierten DNA-Strang, die anteilmäßig immer erhalten bleiben, bzw. entstehen, erfolgt durch den Verdau dieser Spezies mit der methylierungsabhängigen Restriktionsendonuklease *DpnI*, welche ausschließlich 5'-Gm<sub>6</sub>ATC-3'-Sequenzen schneidet. Die *in vitro* amplifizierte DNA ist nicht methyliert und bleibt daher intakt. Die Amplifikation der DNA wurde nach zwei verschiedenen Protokollen durchgeführt (s.u.). Der Verdau der methylierten Moleküle geschah direkt im PCR-Reaktionsgefäß durch Zugabe von 1 - 4 µl *Dpn I* für 1-2 h bei 37 °C. 1-2 µl des Ansatzes wurden direkt zur Transformation von elektro-kompetenten *E. coli* XL1-Blue eingesetzt (3.1.2.1). Die Einzelstrangbrüche der Plasmide wurden dann in den transformierten Zellen geschlossen.

### **3.2.13.1 QCM-PCR unter Zugabe beider Primer**

Es wurde eine Standard-PCR in 50 µl mit *Pfu*-PCR-Puffer, 10-200 ng des zu mutierenden Zielvektors, je 40 pmol der Mutagenese-Primer, 200 mM dNTPs und 1 U *Pfu*-Turbo DNA Polymerase angesetzt. Nach dem Aufschmelzen der Plasmid-DNA bei 95 °C für 1 min wurden für 15-20 Zyklen die Schritte des Aufschmelzens für 30 s bei 95 °C, des Anlagerns der Primer für 1 min bei der primerspezifischen Temperatur und die nachfolgende Elongation für 5-15 min (je nach Templatelänge, ca. 1 min pro 1000 bp des Plasmides) bei 70 °C wiederholt.

### **3.2.13.2 QCM-PCR unter Zugabe von nur einem Primer**

In dieser Methode wurden je zwei Standard-PCRs in 25 µl mit *Pfu*-PCR-Puffer, 10-100 ng des zu mutierenden Zielvektors, 100 mM dNTPs, 0,5 U *Pfu*-Turbo DNA Polymerase aber nur jeweils einem Primer (40 pmol) angesetzt. Nach dem Aufschmelzen bei 95 °C für 1 min wurde für 50 Zyklen das Aufschmelzen für 30 s bei 95 °C, das Anlagern des Primers bei der primerspezifischen Temperatur und die Elongation bei 70 °C wiederholt. Danach wurden beide Ansätze (*forward* und *reverse* Primer) vereinigt und das *Annealing* der beiden synthetisierten Stränge wurde bei 55 °C – 65 °C für 15 min durchgeführt.

### 3.2.14 PAA-Gelelektrophorese

Zur Analyse kürzerer DNA-Fragmente (< 700 bp) bietet sich Polyacrylamid (PAA) als Matrix für die Elektrophorese (Ogden and Adams, 1987) an, da hierdurch eine bessere Auftrennung kleiner Fragmente als bei Agarosegelen erreicht werden kann. Zudem sind PAA-Gele dünner, so daß auch Fragmente unter 100 bp noch detektiert werden können. Je hochprozentiger die PAA-Lösung und der Anteil an Bisacrylamid gewählt wird (bis zu einer minimalen Porengröße), desto besser lassen sich kurze Nukleinsäuren in dieser netzartigen Matrix auftrennen.

Zu 10 ml 12 %iger PAA-Lösung wurden 25 µl TEMED und 50 µl APS gegeben und somit die Polymerisation gestartet, wobei Acrylamid zu langen Molekülketten kondensierte, die durch das ebenfalls enthaltene Bisacrylamid stochastisch quervernetzt wurden. Die noch flüssige Lösung wurde zwischen zwei mit Abstandhaltern und einer Gummidichtung versehenen Glasplatten gegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurden die Platten in eine Vertikalgelelektrophoreseapparatur (Biometra) eingespannt. Als Laufpuffer für die Elektrophorese bei 25 mA wurde TBE-Puffer verwendet.

### 3.2.15 Mikrodialyse von Ligationsansätzen

Um bei der Elektroporation von *Escherichia coli* (3.1.2.1.) einem Kurzschlussstrom durch die Zellsuspension (*arcing*) vorzubeugen, wurde die Konzentration an Elektrolyten in den Ligationsansätzen gesenkt, indem der Ligationsansatz auf eine Nitrocellulosemembran (0,025 µm, Schleicher und Schüll) pipettiert wurde, welche auf demineralisiertem Wasser schwamm. Die Mikrodialyse erfolgte für 30 min bei RT. Der von den Filtern mittels Pipette aufgenommene Ligationsansatz wurde direkt für die Elektrotransformation eingesetzt.

### 3.2.16 Dephosphorylierung von Vektorfragmenten

Mit dem aus Krabben stammenden Enzym Alkalische Phosphatase (*Shrimps alkaline phosphatase*, SAP) lassen sich 5'-Phosphatgruppen von DNA-Molekülen abspalten. So dephosphorylierte, linearisierte Vektorfragmente können beispielsweise in einem Ligationsansatz (3.2.10) nicht wieder religiert werden, da die Ligase die 5'-Phosphatgruppe am Substrat benötigt. Diese wird ihr von der zu klonierenden Insert-DNA

zur Verfügung gestellt, so daß die Ligase die 5'-Enden des Inserts mit dem Vektor kovalent verknüpfen kann. Das zirkuläre Produkt enthält noch zwei Einzelstrangbrüche, die erst nach Transformation *in vivo* repariert werden. Durch Verwendung dephosphorylierter Vektoren kann der Hintergrund an Religanden bei einer Klonierung gesenkt werden. Da SAP in allen verwendeten Restriktionspuffern eine hohe Aktivität aufweist, konnte nach der Restriktion (3.2.9) von Vektoren dem Ansatz das Enzym zugesetzt werden (etwa 1 U pro 20 pmol 5'-Enden) und die Dephosphorylierung für 20-30 min bei 37 °C ablaufen. Um eine Dephosphorylierung der zu klonierenden Insert-Fragmente durch verschleppte SAP zu verhindern, wurde das Enzym bei 65 °C für 10 min inaktiviert.

### 3.2.17 Sequenzierung von Plasmid-DNA nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977)

Alle Sequenzierungsarbeiten wurden vom *Göttingen Genomics Laboratory* (G2L) dieses Institutes durchgeführt. Dabei wurde die Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977) verwendet. Fluoreszenz-markierte ddNTPs wurden dazu der Sequenzierungs-PCR zugesetzt, welche nach Einbau in den neusynthetisierten DNA-Strang zum Abbruch der Elongation führen, weil sie kein 3'-OH zur Verknüpfung mit dem nachfolgenden dNTP zur Verfügung stellen. Die ddNTPs werden in einem so starken Unterschuß im Vergleich zu den dNTPs eingesetzt, daß im statistischen Mittel etwa ein Abbruch pro Molekül erfolgt. Da für die 4 verschiedenen ddNTPs unterschiedliche Fluorophore verwendet werden, können sie zusammen in einer PCR-Reaktion eingesetzt werden. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mit dem DNA-Sequenzer ABI-Prism 377 oder dem Megabase-Sequenzer (kapillar-) elektrophoretisch aufgetrennt, detektiert und die Sequenz automatisch ausgelesen. Die Überprüfung der Sequenzen auf Lese-Fehler und Abweichungen erfolgte von eigener Hand mit Hilfe des Programms *Chromas* V1.45.

### 3.3. Proteinchemische Arbeitsmethoden

#### 3.3.1 Isolierung von cytoplasmatischen Proteinen aus *Escherichia coli*

##### 3.3.1.1 Nachweis der Expression von cytoplasmatischen Proteinen aus *Escherichia coli* im analytischen Maßstab

Aus einer Einzelkolonie des Produktionsstammes (*XLI-Blue*) wurde eine 5 ml Vorkultur in LB/Amp hergestellt. Mit 0,5 ml dieser Vorkultur wurde je eine 50 ml Kultur inokuliert und bei 37 °C und 150 Upm im Schüttler inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 wurde mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG als nicht-metabolisierbarer Induktor des *lac*-Promotors die Produktion der Enzyme induziert. Zur Überprüfung des Expressionslevels wurden zum Zeitpunkt der Induktion, nach einer, zwei, drei sowie fünf Stunden je eine Probe von 5 ml entnommen. Die entnommenen Proben wurden für 15 min bei 4.000 Upm und 4 °C zentrifugiert (Hettich Rotanta/RPC). Nach Aufnahme in 1000 µl-Puffer erfolgte der Aufschluß der Zellen (3.3.4). Durch erneutes Abzentrifugieren (Hettich Mikro Rapid, 4.000 Upm, 15 min, 4 °C) wurden die Zelltrümmer entfernt.

##### 3.3.1.2 Nachweis der Expression von cytoplasmatischen Proteinen aus *Escherichia coli* im präparativen Maßstab

Aus einer Einzelkolonie des Produktionsstammes (*XLI-Blue*) wurde eine 5 ml Vorkultur in LB/AMP hergestellt. Mit dieser Kultur wurden 1000 ml LB/AMP angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C und 150 Upm inkubiert. Sobald die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 erreicht hatte wurde die Produktion der Enzyme mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert. Das weitere Wachstum erfolgte für 12 bis 22 Stunden bei 37 °C, bevor die Zellen geerntet wurden. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert (Hettich RotoSilenta/RP, 4.000 Upm, 30 min, 4 °C), und auf Eis in 20 ml eiskaltem IMAC-I-Puffer resuspendiert. Nach dem Zellaufschluß (3.3.4) wurden die Zelltrümmer ebenfalls durch Abzentrifugieren (Hettich Rotanta/RPC, 4.000 Upm, 15 min, 4 °C) entfernt.

### 3.3.1.3 Isolierung von cytoplasmatischen Proteinen aus *Escherichia coli* für Kristallisationsexperimente

Hierfür wurde das Plasmid pQEB-MCS-*FBI88* HDAH in den Expressionsstamm B834 (DE3) pLysS (Leahy *et al.*, 1992; Wood, 1966) transformiert. Dieser Stamm ist u.a. Methionin-auxotroph und man kann somit Proteine mit Selenomethionin oder <sup>35</sup>S-Methionin markieren.

Dazu wurde der Stamm bei 37 °C im 1 Liter Maßstab im Schüttelinkubator bei 150 Upm inkubiert (Reuter and Ficner, 1999). Als Medium wurde M9 Minimalmedium verwendet, welches mit Biotin und Thiamin (je 2 mg/l) und L-Methionin (50 mg/l) angereichert wurde. Zur Selektion wurden Ampicillin (100 mg/l) und Chloramphenicol (10 mg/l) hinzugefügt. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wurden die Zellen abzentrifugiert (Hettich RotoSilenta/RP, 30 min, 4.000 Upm, 4 °C) und in neuem M9 Minimalmedium ohne Methionin resuspendiert. Nach einer Stunde wurde DL-Selenomethionin in einer Konzentration von 50 mg/l hinzugefügt. Nach weiteren 30 Minuten wurde die Expression der HDAH durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Das Wachstum der Zellen erfolgte dann für weitere 4 bis 6 Stunden, bevor diese abzentrifugiert wurden (Hettich RotoSilenta/RP, 30 min, 4.000 Upm, 4 °C)

## 3.3.2 Zellaufschluß

### 3.3.2.1 Disruption

Um die cytoplasmatisch exprimierten Enzyme freizusetzen, wurden die OD<sub>600</sub> der Zellen der 1 l-Expressionskulturen gegen Medium bestimmt, diese geerntet (Hettich Silenta, 30 min, 4000 Upm, 10 °C) und in 50 ml des jeweiligen kalten Aufschlußpuffers resuspendiert. Mit Hilfe eines Zelldisruptors (mit wassergekühltem (auf 12 °C) Basic Z Aufschluß-Kopf, IUL Instruments GmbH) wurden die Zellen lysiert, indem sie unter hohem Druck (1,5 – 1,8 kbar) durch eine Düse (0,18 mm) geschossen wurden. Zusätzlich zu den Scherkräften prallte der Strahl der Zellsuspension danach gegen ein Metallhindernis. Das aufgefangene Lysat wurde durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit (Sorval, 30 min, 9000 Upm, 4 °C) und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

### 3.3.2.2 Sonifizierung

Bei Testexpressionen im 50 ml-Maßstab wurde das Zellpellet in 1 ml des entsprechenden Aufschlußpuffers resuspendiert und auf Eis mittels der *Micro tip* des Ultraschallgerätes (Branson Sonifier) 2 mal für 30 s Ultraschall ausgesetzt (Duty cycle 50 %, Output control Stufe 5). Die lysierte Probe wurde nach Abnahme eines 100 µl Aliquots ebenfalls durch Zentrifugation geklärt (Eppendorf 5804R, 30 min, 13000 Upm, 4 °C) und der ÜS auf Eis gelagert.

### 3.3.3 Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC)

(Porath *et al.*, 1975)

Exprimierte rekombinante Proteine mit einem terminalen Hexahistidinschwanz (Histag) wurden über Affinitätschromatographie an immobilisierten Ni<sup>2+</sup> bzw Zn<sup>2+</sup>-Ionen weiter aufgereinigt. Dies ist möglich, weil der His-tag mit den sechs Histidinen 3 freie Valenzen eines bereits über 3 Valenzen an die über einen 7-Atomspacer gekoppelten Iminodiacetylsäuregruppen der Sepharose-Matrix gebundenen Ni<sup>2+</sup> bzw Zn<sup>2+</sup>-Ions komplexieren kann. Proteine ohne diesen Polyhistidin-Schwanz haben normalerweise keine Affinität zum Liganden und eluieren grösstenteils im Durchlauf einer IMAC-Säule, während jene mit His-tag an die Säule binden und sich mit Imidazol wieder eluieren lassen, weil dieses dabei mit dem Histidin um die Komplezierungsstellen am Nickel bzw. Zink konkurriert. In dieser Arbeit wurden selbst hergestellte IMAC-Säulen verwendet, wobei die gesamte Chromatographie mit der Flußrate durchgeführt, die durch Gravitation vorgegeben wurde. IMAC-Säulen wurden gepackt, indem in eine geleerte MIDI100-Kartusche 4 ml in demineralisiertem Wasser gewaschene Chelating-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech AB) gefüllt wurde und nach dem Setzen der Matrix eine obere Fritte eingesetzt wurde. Nach zweimaligem Waschen der Matrix mit je 10 ml demineralisiertem Wasser wurde die Säule durch zweimal 5 ml 100 mM NiCl<sub>2</sub> bzw. ZnCl<sub>2</sub> beladen und nach Fortspülen des überschüssigen Nickels/Zinks mit zweimal 10 ml demineralisiertem Wasser durch zweimal 10 ml IMAC-Puffer I äquilibriert. Variable Volumina an Probe wurden auf die Säule geladen und der Durchfluß (FT) aufgefangen. Ein- bis dreimal wurde mit je 10 ml IMAC-Puffer I gewaschen und die Fraktionen ebenfalls aufgefangen (W1 bis W3), bevor mit einem Stufengradienten steigender Imidazol-Konzentration (je 10 ml von 20, 40, 60, 100, 200, 300, 500 mM Elutions-Puffer, hergestellt durch Mischung von Puffer I mit

Puffer II) das Zielprotein eluiert wurde. Je 50 µl des Durchflusses und der Fraktionen wurden zur Analyse über SDS-PAGE vorbereitet (3.3.3). Die Fraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Einige Fraktionen wurden normalerweise anschließend in Dialyseschläuche (Ausschlußgrenze  $M_r \sim 12000$ ) gefüllt und ü. N. bei 4 °C unter leichtem Rühren gegen 3 l des entsprechenden Puffers ohne Imidazol (10 mM IMAC I) dialysiert.

### 3.3.4 Perfusionschromatographie

Die Perfusionschromatographie erlaubt eine sehr hohe Flußrate ohne nennenswerte Beeinträchtigung der Auflösung oder der Kapazität der Säule aufgrund des speziellen Säulenmaterials (Poros 20, Pharmazia) und beschleunigt dadurch die Proteinaufreinigung erheblich. Daher konnte die Reinigung der *FB188* HDAH auch bei RT statt bei 4 °C erfolgen, wobei das Lysat und die relevanten Fraktionen dabei die meiste Zeit auf Eis gelagert wurden. Die Chromatographie wurde mit einer an die Vision Workstation (Perseptive Biosystems) angeschlossener Anionenaustauschersäule (Poros 20 HQ, 7,5 ml SV) und sterilfiltriertem Wasser und Puffern nach einem spezifischen Programm bei einer Flußrate von 10 ml/min durchgeführt. Dabei wurde ein biphasischer, linearer Salz-Gradient durch Mischen von Tris-Puffer A und B erzeugt. Vorab wurde sowohl die Säule als auch alle relevanten Schläuche und Bauteile (wie z. B. Pumpen) mit ca. 5 SV 1 M NaCl bei 10 ml/min gespült, um etwaige Proteinreste zu entfernen. Danach wurde mit ca. 5 SV Wasser das Salz aus dem System gewaschen. Das verwendete Programm beinhaltete folgende Schritte:

- Äquilibrierung mit 5 SV Tris-Puffer A
- Laden von 10 ml Lysatüberstand und Sammeln von 5 ml Fraktionen
- Waschen mit 2,5 SV Tris-Puffer A und Sammeln von 5 ml Fraktionen
- Elution mit einem Gradienten mit 5 SV von 0-1 M NaCl in Tris-Puffer bei  
Sammeln von 1 ml Fraktionen
- Stufe mit 1 SV Tris-Puffer B
- Zurückfahren der Salzkonzentration auf 25 mM in 3 SV
- Äquilibrierung mit 4 SV Tris-Puffer A

Während der gesamten Chromatographie wurde die OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> verfolgt. Elutionsfraktionen mit OD<sub>280</sub> > OD<sub>260</sub> wurden auf Eis gelagert und zur weiteren Analyse dem Aktivitätstest (3.4.5) unterzogen.

### 3.3.5 Gelfiltration

Die Ausschlußchromatografie trennt Substanzgemische vornehmlich nach der Grösse der Komponenten. Gelfiltrations-Säulen sind aus Polymerkügelchen mit definierter Porengrösse aufgebaut. Hochmolekulare Substanzen können aufgrund ihrer Grösse nicht in die Poren der Kügelchen des Säulenmaterials eindringen und wandern dadurch schneller durch das Säulenmaterial als niedermolekulare Substanzen, welche in die Kügelchen eindringen und aufgrund dieser Verzögerung erst später eluiert werden.

Die Gelfiltration erfolgte zur weiteren Aufreinigung der Wildtyp HDAH aus *FB188* nach der Perfusionschromatografie. Es wurde eine HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 Säule (Säulenvolumen 318 ml) verwendet. Zur Äquilibration wurde die Säule mit 1,5 Säulenvolumen Hepes KOH-Puffer (pH 7,4) gespült. Nach Einzug der Probe (umgepuffert in Hepes-KOH-Puffer) durch die Probenschleife wurde sie auf die Säule geladen. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min und das Fraktionsvolumen 5 ml. Mit der Aufzeichnung der OD<sub>280</sub> wurde die Elution per Schreiber dokumentiert.

### 3.3.6 Einkonzentrieren von Proteinlösungen durch Ultrafiltration

Das Einkonzentrieren mittels Vivaspin™-Zentrifugationsröhrchen basiert auf dem Prinzip der Ultrafiltration. Hierbei wird die zu konzentrierende Lösung auf eine Membran mit definierter Porengrösse gegeben. Es sind im Handel Membranen mit unterschiedlicher Ausschlussgrenze erhältlich. Die zu konzentrierende Lösung wird durch Zentrifugalkraft gegen die Membran gepresst und kleinere Stoffe können diese passieren. Stoffe die größer als die Porengröße, also das Ausschlußvolumen, sind, können nicht passieren und reichern sich im oberen Teil des Zentrifugationsröhrchens an.

Es wurden Vivaspin™ Zentrifugationsröhrchen mit 10.000 und 30.000 relativem Molekulargewicht an Ausschlussvolumen verwendet. Die Zentrifugation erfolgte bei 3000 g, das entspricht ca. 3200 rpm, in einer Hettich Rotanta Zentrifuge bei 4° C. Die Zentrifugationszeiten richteten sich jeweils nach dem Grad der Einkonzentrierung.

### 3.3.7 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine lassen sich unter denaturierenden Bedingungen mittels Elektrophorese in Polyacrylamidgelen der Größe nach auftrennen (Laemmli, 1970). Die Porengröße der inerten Matrix lässt sich über die Acrylamidkonzentration und den Anteil an Quervernetzer steuern. Das im Proben- und Gelpuffer enthaltene SDS ist ein stark negativ geladenes amphipatisches Molekül, welches sich mit seinem hydrophoben Kohlenwasserstoffschwanz an hydrophobe Bereiche von Proteinen anlagert und dabei die hydrophoben, stabilisierenden Wechselwirkungen in den Proteinen selbst aufbricht. So werden Strukturen höherer Ordnung aufgelöst und insbesondere Untereinheiten voneinander getrennt. Die zahlreichen negativen Ladungen des SDS überlagern die proteinspezifische Ladung, so dass im elektrischen Feld die Wanderungsgeschwindigkeit der SDS-Peptid-Micellen nur durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird. Bei der häufig angewendeten Variante der diskontinuierlichen Gelelektrophorese durchlaufen die Proben ein dem Trenngel vorgeschaltetes Sammelgel, welches durch langsamen Einlauf der Proben aus den Taschen und den sogenannten Stapel-effekt einer Aggregation der Proteine vorbeugt und diese grob vorsortiert und konzentriert. Die Proteine werden zwischen den schnell wandernden Cl<sup>-</sup>-Ionen und den kaum bewegten Glycinat-Zwitterionen im Sammelgel fokussiert, bei dem veränderten pH-Wert im Trenngel wandern die Glycin-Ionen dann vor der Protein-Front. Bei der Elektrophorese im Trenngel mit SDS erhält man über einen bestimmten Bereich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungstrecken der Proteine. Über den Abgleich mit einem Proteinstandard lassen sich die Molekulargewichte abschätzen.

Es wurden ausschließlich 10 und 12 %ige (v/v) SDS-Polyacrylamidgele verwendet.

### 3.3.7.1 Herstellung 10 und 12 %iger Polyacrylamidgele

Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen. Das (untere) Trenngel wurde zuerst gegossen. Für zwei 10 %ige Gele wurden 6 ml 30 %iges *Protogel*<sup>®</sup>, 4,5 ml 4 x Trenngelpuffer, 7,5 ml Wasser, 40 µl TEMED und zuletzt 80 µl APS zusammengebracht und bis zu einer Höhe von ca. 2/3 zwischen die Platten gegossen. Jedes Gel wurde mit 500 µl H<sub>2</sub>O überschichtet, was für eine wellen- und blasenfreie Gelkante sorgte. Nach vollständiger Polymerisation des Acrylamids zu Polyacrylamid wurde das H<sub>2</sub>O vollständig von den Gelen entfernt. Nach Ansetzen der Sammelgellösung aus 2 ml 30 % *Protogel*<sup>®</sup>, 3 ml 4 x Sammelgelpuffer, 7 ml Wasser, 25 µl TEMED und 50 µl APS wurde diese bis zur Oberkante der Platten eingefüllt und sofort der jeweilige Taschenkamm gesteckt.

Bei 12 %igen Gelen bestand das Trenngel aus 7,2 ml 30 %igem *Protogel*<sup>®</sup>, 4,5 ml 4 x Trenngelpuffer, 6,3 ml Wasser, 40 µl TEMED und 80 µl APS.

### 3.3.7.2. Probenvorbereitung

Proteinhaltige Proben wurden mit 0,2 Vol. an Proteinprobenpuffer versetzt und für 5-10 min bei 99 °C im Heizblock inkubiert. Dabei bewirkt das im Puffer enthaltene β-Mercaptoethanol eine Reduktion von möglichen Disulfidbrücken. Das SDS wirkt denaturierend auf die Proteine. Bei nicht-sofortiger Verwendung wurden die Proben bei –20 °C eingefroren.

### 3.3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamidgele wurden in die Laufkammer (Biometra) eingesetzt und der Taschenkamm entfernt. Die obere und untere Kammer wurden mit Laemmli-Puffer befüllt und die Taschen des Gels gespült, bevor die Proben aufgetragen wurden. Als Protein-Molekulargewichtsstandard dienten 5 µl des *BenchMark*<sup>™</sup> Prestained Protein-Standards. Die Elektrophorese wurde bis zum Einlauf der Farbmarkerbande in das Trenngel bei einer Stromstärke von 10 mA pro Gel durchgeführt, dann wurde die Stromstärke auf 25 mA pro Gel erhöht.

Die aufgetrennten Proteinbanden wurden durch Färben des Polyacrylamidgels in einer Schale mit *Coomassie Brilliant Blue R250* Protein-Färbelösung für mindestens 45 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln sichtbar gemacht. Zum Entfärben wurde das Gel

mehrmals für 2-3 min in einem Mikrowellengerät (Brother Powerwave) in H<sub>2</sub>O aufgekocht, wobei das Wasser jeweils gewechselt wurde.

### 3.3.8 Bestimmung der Konzentration von Proteinen in einer wässrigen Lösung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Affinitätschromatographie wurde der Coomassie<sup>®</sup> Protein Assay Reagent Kit (Pierce, USA) verwendet. Die Bezeichnung Coomassie wurde von Hersteller gewählt und sollte nicht mit der *Coomassie Brilliant Blue R250* Protein-Färbelösung zum Anfärben von Proteingelen verwechselt werden. Der Kit arbeitet nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Mit diesem Kit lässt sich der Proteingehalt in den Konzentrationsordnungen zwischen 1 µg und 25 µg Gesamtprotein pro ml ermitteln. Eine BSA-Stocklösung (2 mg/ml) wurde gemäß der Herstelleranleitung auf 25, 20, 15, 10, 5 und 2,5 µg/ml verdünnt. Je 150 µl dieser Verdünnungen sowie 150 µl des Coomassie<sup>®</sup>-Reagenz wurden zusammen gegeben und die Absorption bei 580 nm bestimmt. Die Messungen wurden im dreifachen Ansatz durchgeführt und die Absorptionseinheiten gegen die Konzentration graphisch aufgetragen. Durch Bestimmung einer Geradengleichung konnten nun die Proteinlösungen, welche in gleichen Verhältnissen wie oben beschrieben mit Coomassie<sup>®</sup> Reagenz versetzt wurden, in ihrer Konzentration anhand ihres Absorptionsverhaltens zugeordnet werden. Eine Kalibrierungsgerade von BSA ist im Anhang dargestellt.

### 3.3.9 Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen über die Bindung von Antikörpern und Alkalischer Phosphatase-Nachweis (*Western Blot*)

Zum Nachweis von auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteinen wurden diese mittels Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurden je sechs Filterpapiere (Whatman MM) in der Größe des Polyacrylamidgels zugeschnitten. Die Anodenplatte einer NOVOBLOT<sup>®</sup>-Apparatur wurde mit Anodenpuffer I befeuchtet und mit zwei in Anodenpuffer I getränkten Filterpapieren belegt. Darauf wurden ein in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier und eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt. Das PAA-Gel wurde für 5 min in Kathodenpuffer geschwenkt und dann auf die PVDF-Membran gelegt. Es folgte das Auflegen von drei in Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren und das Schliessen der Apparatur durch Aufsetzen der Kathode und des Deckels. Die Proteine wurden für 30- 35 min bei einer konstanten Stromstärke von 175 mA pro Blot, ermittelt nach :

$$\text{Stromstärke} = \text{Gesamtgelfläche (10x7 cm)} \times 2,5 \text{ mA} ,$$

aus dem Gel auf die PVDF-Membran transferiert. Ein positiver Transfer ließ sich über den übertragenen *BenchMark*<sup>™</sup> Prestained Protein-Marker nachweisen. Die Membran wurde in einem Plastik-Beutel mit 20 ml BB-Puffer luftblasenfrei verschweißt und ü.N. bei 4 °C geblockt. Am nächsten Morgen wurde die Membran in einem Beutel mit 15 ml in BBT-Puffer verdünntem Antikörper für 1 h unter leichtem Schwenken inkubiert, bevor einmal mit PBST- für 10 min und dreimal mit PBS für je 5 min gewaschen wurde. Zum Einsatz kam hier ein polyklonaler Anti-Amidase-Antiserum aus dem Hasen und ein monoklonaler Anti-tetraHis-tag-Antikörper aus Maus (Sigma) zum Nachweis der Amidase und ein monoklonaler Anti-acetylated-proteins-Antikörper (abcam, ab193). Danach folgte eine einstündige Inkubation der Membran mit Anti-Maus-Antikörper oder Anti-Hase-Antikörper (10 µl) in 15 ml PBS/BBT-Puffer. Nach erneutem einmaligen Waschen in PBST- und dreimaligen Waschen mit PBS-Puffer wurde der "*Western Blot*" in 50 ml Entwicklungspuffer mit 150 µl NBT und 200 µl BCIP gefärbt. Nach Inkubation von ca. 15 min unter Lichtausschluß wurden die Banden sichtbar. Um die Reaktion zu stoppen, wurde die Membran mit Wasser gewaschen. Die angefärbte Membran wurde luftgetrocknet und das Ergebnis durch Scannen dokumentiert.

### 3.4 Enzymatische Aktivitätstests

Im Verlauf dieser Arbeit wurden mehrere Methoden zur Bestimmung kinetischer Parameter durchgeführt. Bevor auf die einzelnen Assays eingegangen wird, sollen grundsätzliche Theorien der zu ermittelnden Werte erläutert werden.

Kalibrierungsgeraden für Enzymatische Aktivitätsassays sind im Anhang dargestellt.

#### 3.4.1 Bestimmung von $K_m$ - und $V_{max}$ -Werten

Der  $K_m$ -Wert oder auch die *Michaelis-Menten*-Konstante gibt die Substratkonzentration ( $a$ ) an, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $1/2 V_{max}$ ) erreicht wird. Die Geschwindigkeit  $V$  bezieht sich auf die Bildung des Produktes, welche in unserem Fall durch einen Anstieg von Absorption bzw. Fluoreszenz pro Zeiteinheit verfolgt werden kann. Die Substratkonzentration  $a$  wird in mol/l ausgedrückt. Um Werte einer Messreihe graphisch aufzutragen und den  $K_m$ -Wert zu bestimmen, bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Die Erste ist der Graph  $v$  gegen  $a$ , die sog. *Michaelis-Menten*-Auftragung, wobei man als Ergebnis eine Hyperbel erhält. Da  $V_{max}$  experimentell nicht erreicht wird, nähert sich die Messkurve nur asymptotisch der  $V_{max}$ -Linie, was eine Ermittlung von  $K_m$  nicht wirklich exakt möglich macht.

Eine Weiterentwicklung dieser Auftragung ist der sog. *Lineweaver-Burk*-Plot, in dem die hyperbolische *Michaelis-Menten*-Gleichung durch Kehrwertbildung in eine lineare Beziehung umgeformt wird. Die Auftragung von  $1/V$  gegen  $1/a$  ergibt den Schnittpunkt auf der negativen Abszisse mit  $-1/K_m$ . Nachteil dieser Form der Darstellung ist die relativ große Streuung von Werten bezüglich einzelner Meßreihen. Das Aufstellen einer Geradengleichung und folglich eine genaue Abbildung des  $K_m$ -Wertes wird dadurch erschwert.

Eine andere Art der Darstellung ist der sog. *Hanes*-Plot, in der  $a/v$  gegen  $a$  aufgetragen wird. In dieser Auftragung ist der negative  $K_m$ -Wert ( $-K_m$ ) als Schnittpunkt auf der negativen Abszisse ablesbar. Dieser Plot gibt die Werte mehrerer Messungen in geringerer Streuung als der *Lineweaver-Burk*-Plot wieder, so dass dieses Verfahren eine genauere Abbildung des  $K_m$ -Wertes liefert und heute die häufigste Anwendung findet (Cornish-Bowden, 1995).

Experimentell wurde eine Verdünnungsreihe von Substratlösung in den Konzentrationen zwischen 0,05  $\mu\text{M}$  und 325  $\mu\text{M}$  vermessen und die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes unter Zuhilfenahme der Fluostar-Software und des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel (Microsoft) durchgeführt. Hierbei ist zu erwähnen, dass nur lineare Anstiege der Fluoreszenz für die Berechnung der Kinetiken herangezogen wurden.

Die Ermittlung der  $V_{\text{max}}$ -Werte erfolgte ebenfalls über den *Hanes*-Plot und wurde über die Steigung der Geraden ermittelt. Hierbei gilt:  $V_{\text{max}} = 1/\text{Steigung}$ .

Durch das Erstellen einer Kalibrierungskurve mit freiem AMC kann man eine Relation zwischen umgesetztem Substrat und entstehendem Fluoreszenzsignal setzen. Somit wurden die eingesetzten Substratkonzentrationen in Stoffmengen umgerechnet, um einen einheitsgemäßen Wert für  $V_{\text{max}}$  zu erhalten.

### 3.4.2 Fluorescamin-Assay

In diesem Verfahren macht man sich die Eigenschaft von Fluorescamin (4-Phenyl-spiro-furan-2(3H)1'-phthalan) zu nutze, welches mit freien, primären Aminogruppen reagiert (Udenfriend *et al.*, 1972). Freies Fluorescamin zerlegt sich in wässrigen Lösungen innerhalb von Sekunden in nicht fluoreszierende Produkte, während mit Aminotermini-abreagiertes Fluorescamin in eine stark fluoreszierende Verbindung überführt wird. Die dabei entstehende Fluoreszenz kann bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Detektionswellenlänge von 460 nm gemessen werden. Dieser Assay wurde während der ersten Aufreinigung des Enzyms aus *FB188* als Nachweis für aktive Fraktionen verwendet.

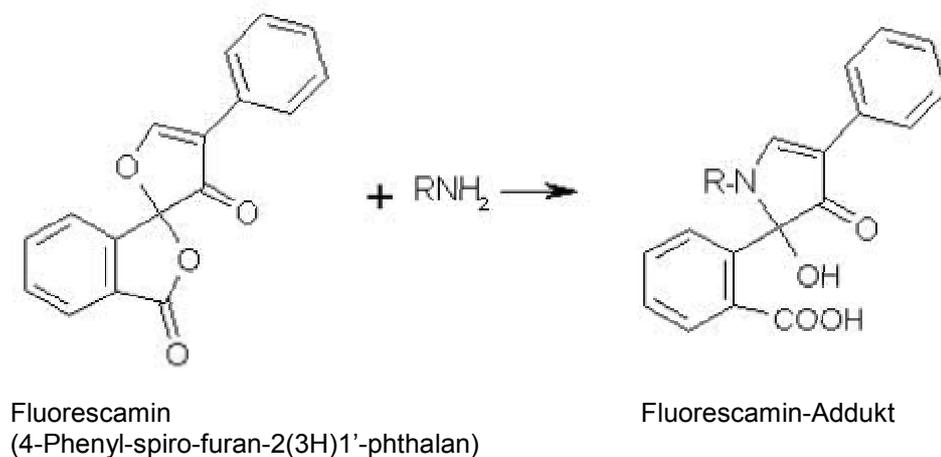


Abb. 3.1 Nachweis von freien Aminogruppen über Anlagerung von Fluorescamin

Sämtliche Durchführungen dieses Assays geschahen in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,5). Substrate wurden ebenfalls in diesem Puffer gelöst und die verwendeten Enzymlösungen auf diese Pufferbedingungen eingestellt. Fluorescamin wurde in einer Konzentration von 0,3 Volumenprozent mit wasserfreiem Aceton (100 %) gelöst. Substrat und Enzym wurden in o.g. Puffer in einer 96 well-MTP in einem Volumen von 150  $\mu$ l zusammengegeben und bei 37° C für 30 bis 60 min inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 50  $\mu$ l der 0,3 % Fluorescamin-Lösung. Dieser Schritt diente gleichzeitig dem Abstoppen der Reaktion, da das Enzym bei dieser Acetonkonzentration seine Aktivität verliert. Nach Überführung der MTP konnte das Fluoreszenzsignal im BMG-Reader unter o.g. Bedingungen und bei Empfindlichkeitsstufe (Gain) 73 ausgelesen werden.

Zur Bestimmung des  $K_m$ -Wertes der Deacetylierung von NAA durch FB188 HDAH wurden verschiedene Substratkonzentrationen (0,5 bis 10 mM) in einer Dreifachbestimmung im BMG-Reader vermessen (gain 73). Dazu wurden 50  $\mu$ l einer 500  $\mu$ g/ml konzentrierten Enzymlösung (Endkonzentration im Assay 25  $\mu$ l/ml) pipettiert. Die Proben zur Festlegung des ersten Zeitpunktes wurden nach 15 min ( $t_{15}$ ), der verbleibende Proben nach 60 min ( $t_{60}$ ) abgestoppt. Danach wurde die Platte ausgelesen. Es konnte nun der Anstieg der Fluoreszenz innerhalb dieses Zeitfensters ( $t_{60} - t_{15}$ ) ermittelt und der  $K_m$ -Wert mit einer graphische Auftragung in dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel über den sog. *Hanes Plot* (3.4.1) ermittelt werden. Durch Anlegen einer Glycin-Standardreihe konnte das entstehende Fluorezenzsignal in Zusammenhang mit der Stoffmenge gebracht werden somit der  $V_{max}$ -Wert berechnet werden.

### 3.4.3 Acetic Acid Standard Test (Roche Diagnostics, Katalog Nr.148261)

Dieser Assay dient zum Nachweis des freigesetzten Acetyls. Die Detektion ist an mehrere Reaktionen gekoppelt und wird indirekt durchgeführt. Im ersten Schritt wird ein beliebiges Substrat durch Enzymwirkung deacetyliert. Das freigewordene Acetyl wird dann im zweiten Schritt unter dem Einfluss von Acetyl-Coenzym A (CoA) Synthetase zu Acetyl-CoA umgesetzt. Dieses wird durch Citrat Synthetase mit Oxalacetat zu Citrat konvertiert. Das für diese Reaktion notwendige Oxalacetat wird durch L-Malat und NAD durch L-Malat Dehydrogenase unter Umwandlung von NADH zu NAD gebildet. Der eigentliche Nachweis wird über eine Abnahme der Absorption von NADH bei 340 nm erbracht. Dieser Assay wurde unter anderem zur Aktivitätsbestimmung der *FB188* HDAH in Bezug auf Acety-Polyamine verwendet.

### 3.4.4 Assay zur Deacetylierung von radioaktiv markierten Histonen

Dieser Assay basiert auf der Basis der Deacetylierung von radioaktiv markierten Histonen (Kölle *et al.*, 1998) (Abb. 3.2). Diese Histone werden aus Retikulozyten von Hühnerembryonen gewonnen, die zuvor mit radioaktiv markierten Acetylquellen versorgt

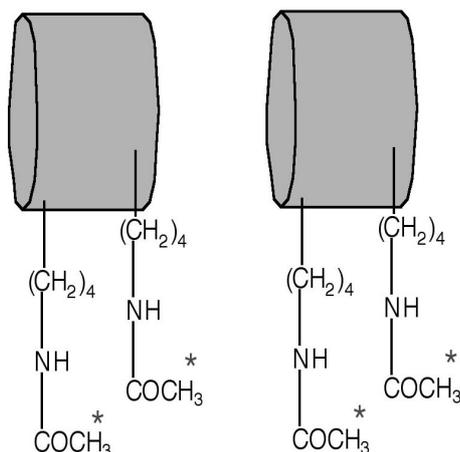


Abb. 3.2

Histone mit Tritium-(\*) markierten, acetylierten Lysinen

wurden. Die Retikulozyten wurden mit Tritium [ $^3\text{H}$ ]-gelabelter Essigsäure inkubiert wobei man die acetylierten Lysine radioaktiv markieren kann. Nach der eigentlichen Deacetylierungsreaktion kann man abgespaltene, radioaktiv markierte Acetylgruppen aus dem Reaktionsansatz extrahieren und eine Szintillationsmessung durchführen. 4  $\mu\text{g}$  gelabelten Histone haben

in der Regel 26.000 – 30.000 cpm. Diese Methode wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. P. Loidl im Institut für Molekularbiologie der medizinischen Universität Innsbruck durchgeführt.

### 3.4.5 HDAC-Assay (Wegener *et al.*, 2003a; Wegener *et al.*, 2003c)

Eine weitere Bestimmungsmöglichkeit der HDAC-Enzymaktivität liefert ein homogener, zweistufiger, gekoppelter Assay mit peptidischen, fluorogenen Substraten (Abb. 3.3). In der ersten Teilreaktion erfolgt durch das Zielenzym eine Deacetylierung der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysylrestes eines peptidischen Substrates, welches nur dadurch in der zweiten Teilreaktion als Substrat von Trypsin erkannt und gespalten werden kann. Trypsin spaltete dabei die Amidbindung zwischen dem Lysyl-Rest und dem nachfolgenden Fluorophor Aminomethyl-Coumarin, welches nur in freier Form eine starke Fluoreszenz bei 460 nm nach Anregung bei 390 nm zeigt (Ninkovic *et al.*, 2001; Zimmerman *et al.*, 1977).

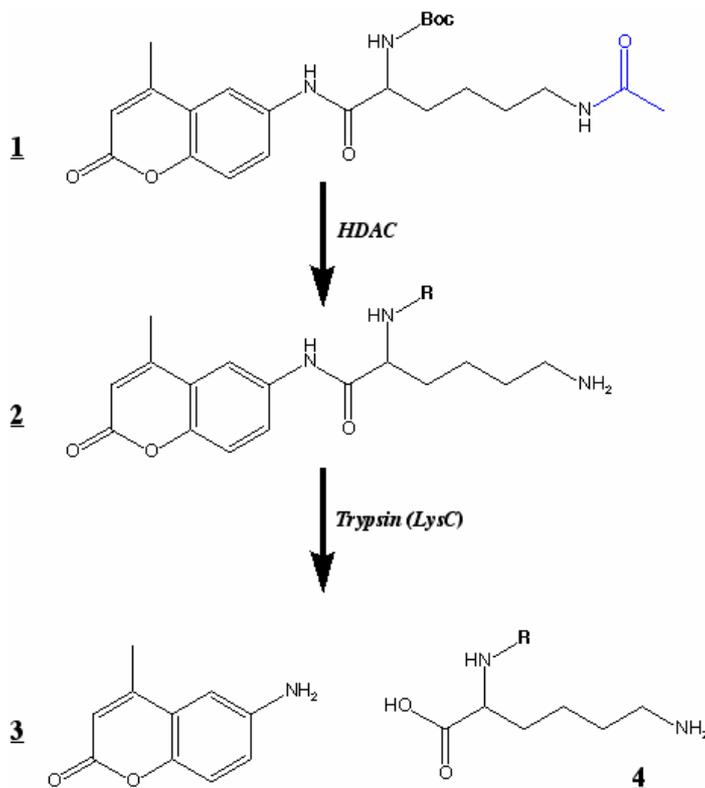


Abb. 3.3

#### Ablauf des zweistufigen HDAC Assays.

Deacetylierung des Substrates Boc-Lys(Ac)-MCA (1) durch HDAC-/ähnliche Enzyme (2) und Freisetzung des Fluorophors Aminomethyl-Coumarin (AMC) (3) durch Trypsin

Dieser Assay konnte im Gegensatz zur Messung von HDAC aus Rattenleber und humaner HDAC8 mit den bakteriellen HDAC-ähnlichen Enzymen kontinuierlich durchgeführt werden, da die letztgenannten Enzyme eine Resistenz gegenüber Trypsin aufweisen und keiner Proteolyse unterliegen.

Die jeweilige Trypsinkonzentration im Assay richtete sich nach der Art der jeweils vermessenen Substrate. Zur Spaltung von Mono-peptidyl-MCA-Substraten wurden eine 10

mg/ml Trypsinlösung eingesetzt (Endkonzentration im Assay 500 µg/ml), zur Spaltung von Tripeptidyl-MCA-Substraten reichte eine 10-100 fach geringere Trypsinkonzentration aus. Diese Konzentrationen wurden anhand von Vortests ermittelt, in denen die Substrate ohne Zugabe von Enzym vermessen und die Auswirkungen von Trypsin in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Hydrolyse des Substrates untersucht wurden. Tripeptidyl-Substrate zeigten eine bessere Spaltbarkeit durch Trypsin, weshalb die Trypsinkonzentration im Assay auf den Faktor 10 (Endkonzentration 50 µg/ml) gesenkt werden konnte. Alle Messungen erfolgten, wenn nicht explizit anders angeführt, in einem MTP-Fluoreszenzreader (BMG Polarstar) bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Detektionswellenlänge von 460 nm bei 30 °C und bei Empfindlichkeitsstufe (Gain) 73. Im Standard HDAC-Assay wurde hauptsächlich, wenn nicht anders aufgeführt, das Substrat Boc-Lys(Acetyl)-MCA (Abb.3.3, 1) verwendet. Kontrollen wurden immer in Form von Ansätzen ohne Enzym als Nachweis für Trypsinspaltbarkeit von acetylierten Substraten bzw. Maß zur Spontandeaetylierung der Substrate mitgeführt. Ebenso wurden Kontrollen ohne Trypsin (Spontanhydrolyse der Peptid-MCA Bindung) und ohne Substrat (Fluoreszenzhintergrund) vermessen.

#### **3.4.5.1 Bestimmung der $K_m$ - und $V_{max}$ -Werte für HDAC-Substrate im 96 well- Format**

Zur Bestimmung des  $K_m$ -Wertes eines fluorogenen Substrates für Trypsin wurden in Dreifachbestimmungen verschiedene Substratkonzentrationen (0,1-325 µM) im BMG-Reader vermessen (Gain 73). Dazu wurden Mengen von HD-Puffer, Substratstocklösung und Enzym in unterschiedlichen Verhältnissen und 10 µl Trypsinlösung in die Kompartimente einer 96 well-MTP (Totalvolumen 200µl) gegeben und die Fluoreszenz in 1minütigen Abständen über einen Zeitraum von 30 bis 60 min vermessen. Die Berechnung des  $K_m$ -Wertes erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel durch Auftragung des Quotienten aus der Substratkonzentration und der Reaktionsgeschwindigkeit ( $a/V$ ) über der Substratkonzentration ( $a$ ) aus einem sogenannten *Hanes plot* (Cornish-Bowden, 1999) (3.4.1). Die Berechnung des  $V_{max}$ -Wertes erfolgte aus der Steigung des *Hanes plot* nach:

$$V_{max} = 1 / \text{Steigung}$$

Bei der Vermessung von Boc-Lys-MCA wurde eine 10 mg/ml Trypsinlösung verwendet, für Tripeptidyl-MCA-Substrate eine 10-fache Verdünnung (1 mg/ml).

#### **3.4.5.2 Bestimmung der IC<sub>50</sub> –Werte von Inhibitoren im 96 well-Format**

Zur Bestimmung der Konzentration an HDACI, welche die HDAC-Aktivität um 50 % inhibiert (IC<sub>50</sub>), wurde der Standard-HDAC-Assay (3.5.3) leicht modifiziert, indem zusätzliche Volumina einer HDACI-Verdünnung (in HD-Puffer) durch die Reduzierung des Volumens an Assay-Puffer um dieses Volumen ausgeglichen wurde. Im allgemeinen wurden HDACI-Verdünnungen hergestellt und in einer 96 well-MTP vorgelegt. Nach Zugabe von Puffer und Enzym wurden die Ansätze für 10 min bei RT inkubiert, um auch *slow-binding* HDACI korrekt zu erfassen, bevor die Reaktion mit Zusetzen des Substrates (Boc-Lys(Ac.)-MCA) gestartet wurde. Dabei wurde darauf geachtet, dass die DMSO-Konzentration des in DMSO gelösten Inhibitors im Ansatz nicht über 2 %, in aller Regel nicht über 1 % lag, da die Anwesenheit von DMSO das Enzym inaktivieren könnte (Wegener *et al.*, 2003a). Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und die relativen Fluoreszenzeinheiten gegen die HDACI-Konzentration halblogarithmisch aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism, das durch die Messpunkte eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve mit variabler Steigung fittete.

#### **3.4.5.3 Bestimmung der pH-Abhängigkeit von HDAH**

Um die Abhängigkeit der Enzyme bezüglich des pH-Wertes zu ermitteln, wurde gemäß des Standard-HDAC Assays verfahren. Anstatt HD-Puffer wurden allerdings 200 mM Kaliumphosphat-Puffer von pH 5 bis pH 10 verwendet. Nach dem Auslesen der Fluoreszenzen wurden die Ansätze mit pH-Indikatorpapier auf die Einhaltung der vorgegebenen pH-Werte überprüft.

#### **3.4.5.4 Bestimmung der Salz- und Lösungsmitteltoleranz von HDAH**

Die Toleranz des Assays bzw. der Zielenzyme gegenüber verschiedenen Agenzien, vor allem häufig verwendeter Lösungsmittel (wie z. B. DMSO) wurde getestet, indem Standard-HDAC-Assays in Triplikaten für verschiedene Konzentrationen der fraglichen Stoffe durchgeführt wurden. Ziel dieser Versuche war es, Produkthemmung oder den Einfluss von häufig verwendeten Lösungsmitteln zu bestimmen. Hierzu wurde analog dem Standard-HDAC Assay verfahren, mit der Ausnahme, dass zusätzlich in HD-Puffer gelöste Salze oder Lösungsmittel in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet wurden. In der Regel wurden Umsatzkurven aufgenommen oder  $IC_{50}$ -Bestimmungen durchgeführt.

### **3.5 Biophysikalische Arbeitsmethoden**

#### **3.5.1 ICP-Analyse (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry) zur Bestimmung des Zinkgehaltes der HDAH**

Die ICP-Spektrometrie arbeitet nach dem Prinzip der sog. optischen Emissionsspektrometrie. Die ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry) beruht auf der Ionisierung des zu analysierenden Materials in einem Plasma bei etwa 5000 °C. Zur Erzeugung des Plasmas wird ein hochfrequenter Strom in ionisiertem Argon induziert. Aus diesem Plasma werden die freigesetzten Atome und Ionen durch zwei Blenden, die als Sampler und Skimmer bezeichnet werden, in das Vakuum-System des Spektrometers überführt. Die emittierte Strahlung wird an das optische System geleitet, wo sie in einzelne spektrale Komponenten zerlegt wird. Von den zahlreichen Wellenlängen, die jedes in der Probe enthaltene Element bzw. Ion typischerweise emittiert, wird die für die jeweilige Applikation am besten geeignete Linie mit Hilfe eines CCD-Detektors gemessen. Die Strahlungsintensität, die sich in einem geeigneten Konzentrationsbereich proportional zur Konzentration des Elements in der Probe verhält, wird intern weiterverarbeitet und mit im Gerät gespeicherten Kalibrationsdaten verglichen.

Dieses Verfahren eignet sich u.a. zum Nachweis von bivalenten Ionen (Ca-, Mg-, Fe-, Mn-, Zn-, Ni-, Co- und Cd-Ionen). Durch die Verwendung von unterschiedlich stark konzentrierten Proben und Kontrollen mit definiertem Ionen-Gehalt kann so der

Ionengehalt einer Proteinprobe ermittelt werden. Die Konzentrationen erhält man in ppm, welche man in Stoffmengenkonzentrationen umrechnen kann. Die Nachweisgrenze für Zn liegt bei 0,01 ppm (Spectro Modula, Spectro, Kleve).

Die Proteinproben (10 ml) wurden vor der Messung mit 100 µl HNO<sub>3</sub> (konz.) versetzt, um sie vollständig zu dissoziieren.

Die Durchführung dieser Experimente geschah durch Dr. Norman Loftfield im Institut für Bodenkunde und Waldernährung der Universität Göttingen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Isolierung, Amplifikation und Klonierung der *FB188*

#### HDAH

Um Organismen zu finden, welche die Substanz NAA in einer Deacetylierungsreaktion umsetzen, wurden Abwasserproben auf Minimalmedium mit NAA als einziger Kohlenstoffquelle ausgestrichen und aerob angezogen. Hierbei konnten Stämme isoliert werden, die auf diesen Platten wuchsen, also potentiell die Deacetylierung des NAA durchführten. Einer dieser Stämme wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) nach partieller Sequenzierung der 16S ribosomalen DNA und Analyse des Fettsäurespektrums in die Klasse *Bordetella* / *Alcaligenes* eingeordnet. Zudem bekam dieser Stamm die DSMZ Nummer 11172.

Eine Anzucht dieses Stammes wurde unter aeroben Bedingungen und mit NAA als einziger Kohlenstoff-Quelle im Medium im Zehn-Liter Maßstab durchgeführt.

Die Proteinisolierung erfolgte über Fraktionierung nach Anionenaustauscher- und Hydroxyapatit-Chromatografie. Aktive Fraktionen wurden im Aktivitätsassay nachgewiesen. Dieser basiert auf der Tatsache, dass Fluorescamin mit freien, primären Aminotermini von Verbindungen reagieren kann (3.4.4). Unter Verwendung von NAA konnte also die Deacetylierung als Fluoreszenzsignal bei 460 nm Wellenlänge ( $\lambda_{em.}$ ) und einer Anregungswellenlänge ( $\lambda_{ex.}$ ) von 390 nm detektiert werden.

Nach erfolgreicher Isolierung des Enzyms konnte dieses nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese als sauber eingestuft werden (Abb 4.1(A)). Ein Vergleich mit einem Proteingrößenstandard ergab eine apparente Molekülmasse von ca. 37 kDa.

Proteinsequenzinformationen wurden über Sequenzierung nach Edmann-Abbau und Massenspektroskopie gewonnen. Neben dem N-Terminus konnten verschiedene interne Peptide nach Trypsinverdau sequenziert werden. Für den N-terminus des Proteins wurde folgende Sequenz erhalten: AIGYVWNTLYGWVDTGTGSLAAANL. Hierbei fällt auf, dass die Start-Aminosäure Methionin fehlt. Diese wurde sehr wahrscheinlich durch eine Methionin-spezifische Aminopeptidase abgespalten (Gonzales and Robert-Baudouy, 1996; Hirel *et al.*, 1989). Für zwei interne Peptide konnten die folgenden Sequenzen erhalten werden: T-7 (VSNLPTGGDTGDGITMMGNGGLEIAR) und T-16 (IVFVQEGGYSPHYLPFCGLA VIEELTGVR). Eine Homologiesuche für diese drei

Aminosäuresequenzen in Sequenzdatenbanken brachte keine Identität mit bekannten Proteinen hervor. Für alle Peptidsequenzen wurden degenerierte Primersequenzen entworfen (Abb. 4.1 (B)).

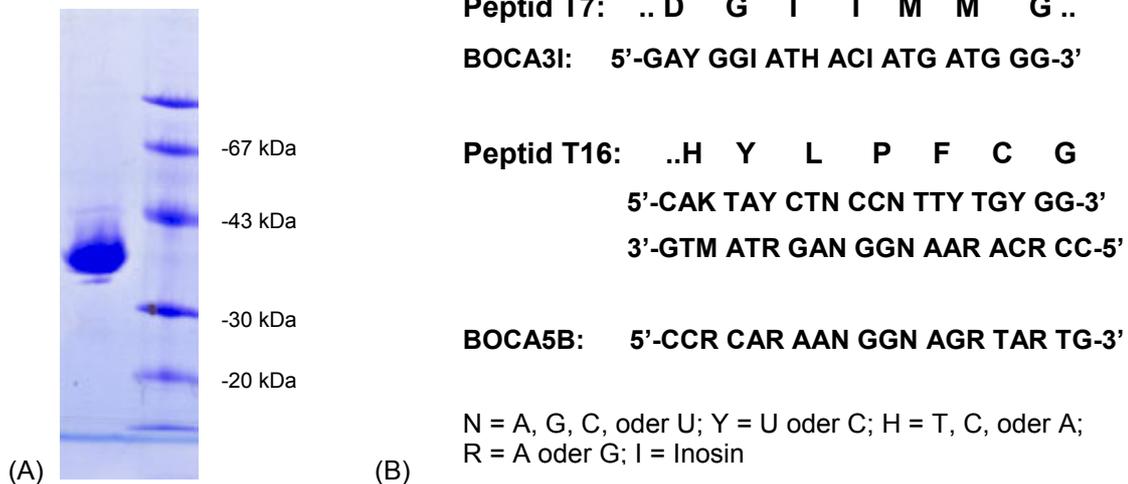


Abb. 4.1

A) *FB188* HDAH, 12% SDS-PAGE, Coomassie-Färbung, (B) Ableitung der degenerierten Primer von den internen Peptidsequenzen T7 und T16 zur Amplifikation des HDAH-Gens

Über PCR mit o.g. Primern und genomischer DNA aus *FB188* konnte ein 675 bp grosses Fragment amplifiziert werden. Dieses wurde mit *EcoRI* *linkern* versehen, mit *EcoRI* gespalten und mit einem *EcoRI*-verdauten pBluescript Vektor ligiert. Nach Sequenzierung des so generierten Plasmids pBOCA3.5 fand man die nicht Primer-kodierten Teilsequenzen aus T-7 und T-16 wieder.

Um das zugehörige Gen in der genomischen DNA zu kartieren, wurde das die Gensequenz enthaltene *EcoRI*-Fragment aus pBOCA3.5 radioaktiv mit  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP markiert und in einem *southern blot* Experiment als Sonde gegen vorher verdaute genomische DNA aus *FB188* eingesetzt. Nach Restriktionsverdau der genomischen DNA mit einem oder zwei Enzymen konnten verschieden große Fragmente im *southern blotting* markiert werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.2 zusammengefasst.

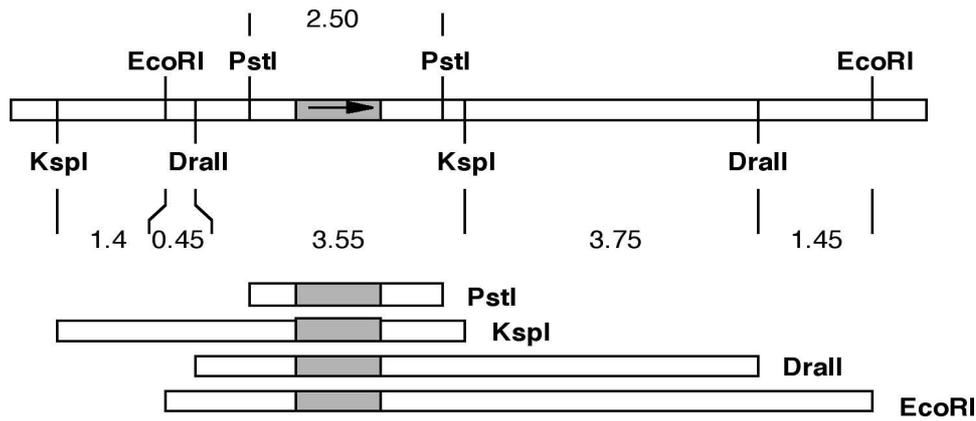


Abb.4.2

Restriktionskarte von genomischer DNA von *FB188*. Grau hinterlegt ist das HDAH Gen. Der Pfeil gibt die Richtung vom Start- zum Stop-Codon des Gens an. Darunter sind die 9,2 kb (*EcoRI*), 7,3 kb (*DralI*), 5,4 (*KspI*) und 2,5 kb (*PstI*) großen Fragmente nach Verdau dargestellt.

Nach den Ergebnissen des *southern blots* war das *PstI*-Fragment der Länge 2,5 kb als das kleinste Fragment mit der wahrscheinlich vollständigen Sequenz des gesuchten Gens identifiziert worden. Dieses Fragment wurde daher als Gegenstand weiterer Untersuchungen herangezogen. Nach Aufreinigung von *PstI*-verdauten Fragmenten der Länge 2,4 – 2,6 Kb der genomischen DNA mittels Agarosegelen und anschließender Gelextraktion wurden diese durch Ligation der *PstI*-Schnittstellen in verdünnter Lösung zirkularisiert und eine inverse PCR (Collins and Weissman, 1984) mit den Primern Lon1B und Lon2A durchgeführt (s. Abb. 4.3). Diese Primer beinhalten beide eine *EcoRI* Schnittstelle.

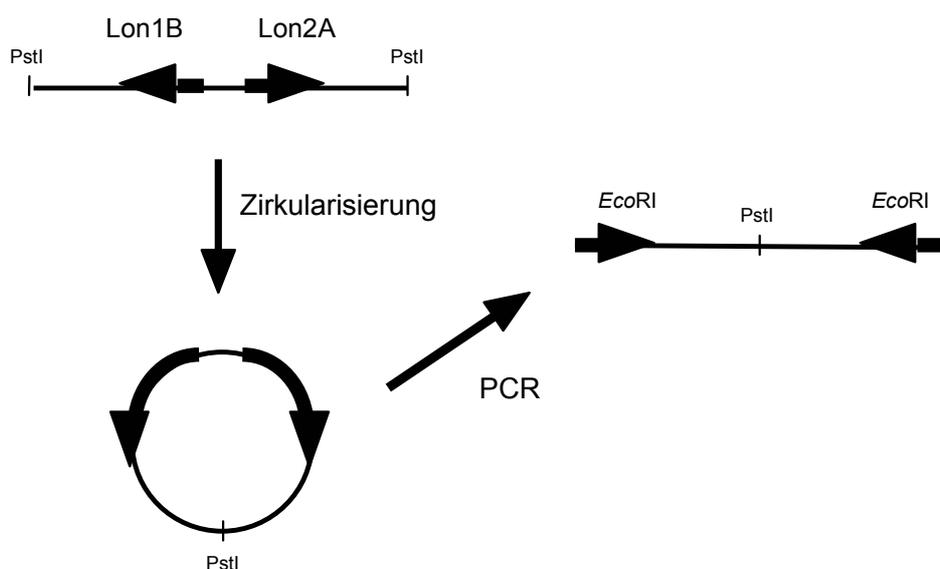


Abb. 4.3

Schema der direktionalen Klonierung von DNA-Fragmenten

Zwei Produkte in den Grössen von 800 bp und 2300 bp konnten generiert werden. Da die kodierende DNA eines ca. 37 kDa-großen Proteins mindestens eine Größe von 1000 kb haben muss, wurde das 2,3 kb-große Fragment für weitere Experimente eingesetzt. Nach *EcoRI* Verdau dieses Fragments wurde es in einen mit *EcoRI*-verdauten pUC19 Vektor ligiert. Nach Sequenzierung dieses Inserts konnte nun der gesamte Leserahmen der HDAH identifiziert und somit einer PCR-Reaktion mit den Primern pQEB-RV und pQEB-FW bzw. pQEB-(N-his)FW und genomischer DNA von *FB188* als Template amplifiziert werden. Die Primer beinhalten eine *EcoRI*- (pQEB-FW/pQEB-(N-his)FW) bzw. eine *HindIII*-(pQEB-RV) Restriktionsschnittstelle und ermöglichen so die gerichtete Klonierung des Gens. Nach Ligation über die *EcoRI/HindIII*-Schnittstellen in den Expressionsvektor pQEB-MCS erfolgte die Transformation der Expressionsstämme BL21 und XL1 blue. Hierbei wurde neben einer Wildtyp-Variante auch eine Variante generiert, die einen Hexa-Histidinschwanz am N-Terminus trägt. Die Richtigkeit dieser Varianten wurden per Sequenzanalyse überprüft.

Bis zu dieser Stelle wurden die Arbeiten weitgehend von Milena Ninkovic und Rüdiger Dietrich, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie, Universität Göttingen, durchgeführt.

## 4.2 Genanalyse des *FB188* HDAH-Gens

Nach der Sequenzierung des HDAH-Gens konnte ein 1110 bp grosser Leserahmen identifiziert werden. Das daraus abgeleitete Polypeptid umfasst 369 Aminosäuren mit einem kalkuliertem Molekulargewicht von 39,421 Da. Diese Angabe korreliert gut mit der über SDS-PAGE experimentell ermittelten apparenten Molekülmasse von ca. 37,000 Da. Innerhalb der Peptidsequenz konnten alle drei durch Proteinsequenzierung ermittelten Peptidsequenzen (N-Terminus, T7 und T16) identifiziert werden.

Die vollständige Aminosäuresequenz wurde an Swiss-Prot (<http://us.expasy.org/sprot/>) weitergeleitet und ist unter der *Accession Number* Q70I53 einseh- und abrufbar.

### 4.2.1 Analyse der regulatorischen Elemente des *FB188* HDAH-Gens

Als erstes wurde die *upstream* Region des Gens der *FB188* HDAH analysiert. Hier konnten signifikante Homologien zu bekannten bakteriellen Promotorbereichen gefunden werden. So zeigt die Sequenz 5'-GCGCGA-16bp-TACCAT-3' große Ähnlichkeiten zur Sequenz des *E. coli lacI* Promoters (5'-GCGCAA-16bp-CATGAT-3')(Winnacker, 1990), aber auch zu der Sequenz des Promotors des *cbb*-Operons (5'-TTTACC-16bp-TATCTT-3') von *Ralstonia eutropha* (vorher *Alcaligenes eutrophus*) (Bowien and Kusian, 2002). Ein Sequenzvergleich ist in Abb. 4.4(A) dargestellt.

Im Vergleich mit der *upstream*-Region des APAH-Gens von *Mycoplana ramosa* (Sakurada *et al.*, 1996) konnte eine mögliche Ribosomenbindestelle (RBS) identifiziert werden (Abb. 4.4(B)).

-35	-10			
<b>GCGCGA</b>	TCCGGGCC-GGCCCGCC- <b>TACCAT</b>	GAGCCTGTGTCGCAAATC	HDAH ( <i>FB188</i> )	
<b>GCGCAA</b>	AACCTTTTCGCGGTATGG- <b>CATGAT</b>	AGCGCCCGGAAGAGAGTC	<i>lacI</i> ( <i>E. coli</i> )	
<b>TTGCCA</b>	CAAGCGGCGCTTCAAGGCT <b>TAACGT</b>	CCGCGCAACCAACGCAGG	APAH ( <i>M. ramosa</i> )	
<b>TTTACA</b>	GCGGCGCG-TCATTTGA- <b>TATGAT</b>	GCGCCCCGCTTCCCATA	tRNA <sub>Tyr</sub> ( <i>E. coli</i> )	
(A) <b>TTTACC</b>	TTATGTGGGTGGGCTTA- <b>TATCTT</b>	TGCATCAACGCAGCAGCC	<i>cbb</i> ( <i>R. e.</i> )	
	-10	RBS	Start	
	<b>TACCAT</b>	GAGCCTGTCATCACTGATAGGGACA <u>AGGAGAC</u> GGGC	ATG	HDAH ( <i>FB188</i> )
(B)	<b>TAACGT</b>	CCGCGCAACCAACGC <u>AGGGGAG</u> CATATGGGA	ATG	APAH ( <i>M. ramosa</i> )

Abb. 4.4

Analyse der *upstream* Region des *FB188* HDAH-Gens. In (A) ist der Promotorbereich mit den -10 und -35 Regionen (jeweils fett) dargestellt. Die Sequenz für tRNA<sub>Tyr</sub> stammt ebenfalls aus

(Winnacker, 1990). In (B) sind die potentiellen Ribosomenbindestellen (RBS) der Gene dargestellt (unterstrichen).

Eine Analyse der *downstream*-Region nach dem Stop-Codon erfolgte durch RNA-Sekundärstruktur-Vorhersage (Hofacker, 1994). Hierbei ergab sich ein langer invertierter *repeat* der einen stabilen *hairpin loop* bildet und somit potentiell als Transkriptionsterminator fungieren kann. Ähnliche Beobachtungen wurden ebenfalls bei dem *aphA*-Gen von *Mycoplana ramosa* gemacht (Sakurada *et al.*, 1996).

#### 4.2.2 Sequenzvergleich und Charakterisierung *FB188* HDAH

Anhand der gewonnenen Sequenzinformationen der *FB188* HDAH wurde die Nukleotidsequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzt und ein *blast search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Hierbei wurden Ähnlichkeiten zu Sequenzen der folgenden Enzymklassen gefunden: Acetylpolyamin-Amidohydrolasen (APAH), Histondeacetylasen (HDAH) und den *Acetoin utilisation proteins* (AcuC). Eine vergleichende Analyse der *FB188* HDAH Sequenz konnte nun mit Sequenzen ähnlicher Enzyme, durchgeführt werden. Ausgehend von einem von Leipe (Leipe and Landsman, 1997) durchgeführten Sequenzalignment wurden für unsere Betrachtung Sequenzen von Acetylpolyamin- Amidohydrolasen (APAH) prokaryontischen Ursprungs ausgewählt. Die größte Ähnlichkeit zu eukaryontischen Sequenzen gibt es zur HDAC6 des Menschen, so dass diese ebenfalls in den Vergleich miteinbezogen wurde.

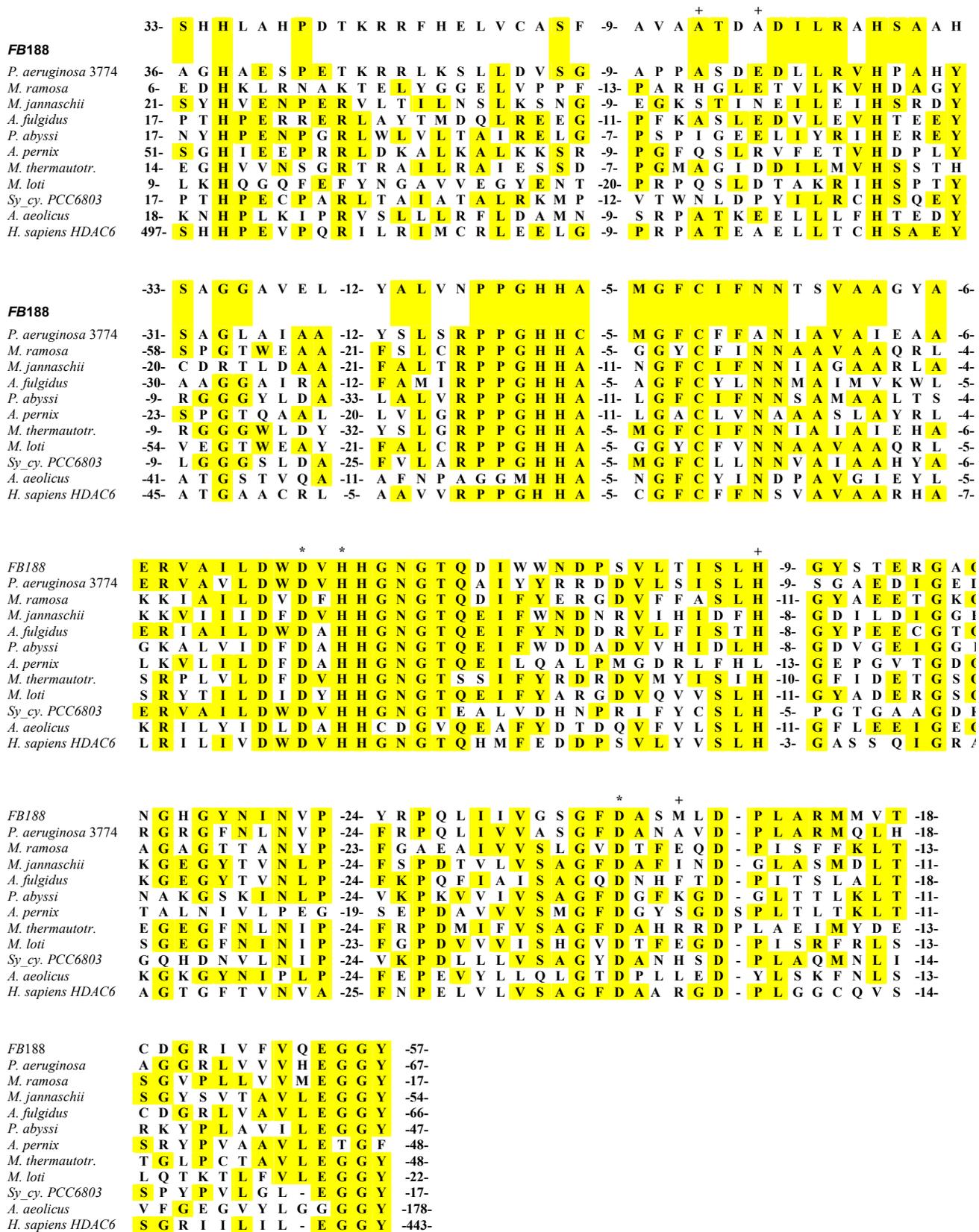


Abb. 4.5

Multiples Sequenzalignment von Regionen mit signifikanter Ähnlichkeit der *FB188* HDAH und bakteriellen Acetylpolymamin-Amidohydrolasen (APAH) sowie der humanen HDAC 6. Identische

Positionen in den verschiedenen Enzymen sind in gelb hinterlegt. Folgende Sequenzen wurden ausgewählt: *FB188* HDAH, eine putative APAH (*PA3774*) aus dem Proteobakterium *Pseudomonas aeruginosa*, eine APAH aus dem Proteobakterium *Mycoplana ramosa*, eine putative APAH aus dem Archäon *Methanococcus jannaschii*, eine putative APAH aus dem Archäon *Archeoglobus fulgidus*, eine putative APAH aus *Pyrococcus abyssi*, eine putative APAH aus *Aeropyrum pernix*, eine putative APAH aus dem Archäon *Methanococcus thermautotrophicus*, eine putative APAH aus *Mesorhizobium loti*, APAH aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803, HDLP aus *Aquifex aeolicus* und HDAC6 aus *H. sapiens* (AF132609\_1). Die Positionen der putativen Zink-Bindungsstellen in *M. ramosa* (Sakurada *et al.*, 1996) sind mit (+) gekennzeichnet, die Zink-bindenden Aminosäuren der *A. aeolicus* HDLP (Finnin *et al.*, 1999) mit (\*) markiert.

Eine putative APAH aus *P. aeruginosa* (*PA3774*) zeigt mit 47 % Identität über 369 Aminosäuren die größte Ähnlichkeit zur *FB188* HDAH. Diese Tatsache führte dazu, dass auch dieses Enzym Gegenstand weitere Untersuchungen werden sollte. Interessanterweise gibt es innerhalb der im Sequenzvergleich gezeigten Enzyme hoch konservierte Bereiche, vor allem im mittleren Teil der Proteine und am Ende. Diese sind sowohl in Archäen als auch in der Sequenz des hyperthermophilen Bakteriums *A. aeolicus*, dessen Struktur aufgeklärt wurde, zu finden. Ebenso sind diese Regionen in der HDAC6 des Menschen vorhanden. Die drei nach Strukturaufklärung der HDLP nachgewiesenen Zink-Bindungsstellen (Finnin *et al.*, 1999) sind hochkonserviert sowohl in der *FB188* Sequenz als auch bei den anderen Enzymen enthalten. Lediglich eine (H203) der vier postulierten Zink-bindenden Aminosäuren in *M. ramosa* (Sakurada *et al.*, 1996) ist ebenso konserviert, die anderen drei weichen in allen betrachteten Sequenzen davon ab. Dazu ist zu erwähnen, dass die vier postulierten Zink-Bindungsstellen in *M. ramosa* nach einem Sequenzvergleich mit eukaryontischen Carboxypeptidasen abgeleitet wurden. In diesem Zusammenhang scheinen die Zink-Bindungsstellen der HDLP aufgrund ihrer Konserviertheit wahrscheinlicher zu sein.

### 4.3 Expression von rekombinanter *FB188* HDAH und Aufreinigung mittels Affinitätschromatografie an immobilisierten Metallionen (IMAC)

#### 4.3.1 Expression der *FB188* HDAH in XL1 blue und Aufreinigung über Ni<sup>2+</sup>-IMAC

Die Histondeacetylase-ähnliche Acetylpolymamin-Amidohydrolase *FB188* wurde zunächst in pQEB-AH-NHis/XL1 blue im 50 ml Maßstab (3.3.3.1.) exprimiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wurde die Proteinproduktion mit 1 mM IPTG induziert und die Zellsuspension 8 Stunden bei 37 °C weiter geschüttelt. Nach Zentrifugation des Zellmaterials wurde dieses durch Sonifizieren (3.3.2.2) aufgeschlossen und über IMAC (mit NiCl<sub>2</sub> beladen) aufgereinigt.

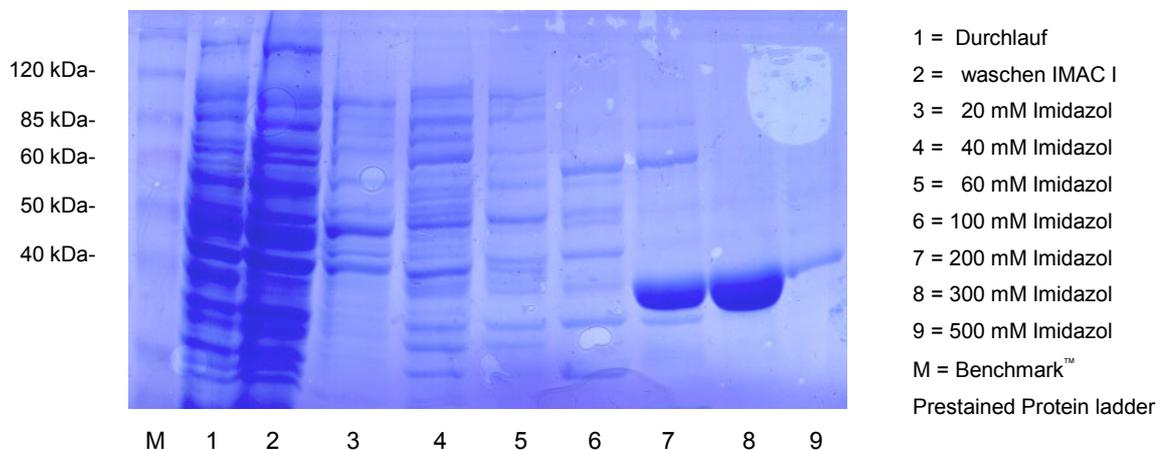


Abb. 4.6

Ni<sup>2+</sup>-IMAC Aufreinigung der *FB188* HDAH (XL1 blue), 12 % SDS-PAGE, Coomassie-Färbung

In Abb. 4.6 ist die IMAC-Aufreinigung der *FB188* HDAH dokumentiert. Man kann sehr gut erkennen, wie unspezifisch gebundene Proteine nach und nach bei steigender Imidazolkonzentration von der Säule eluiert wurden. Ab Spur 7 (200 mM Imidazol) erfolgte die Elution der überproduzierten HDAH. Allerdings sind hier noch leichte Verunreinigungen im Bereich von 60 kDa zu erkennen. In Spur 8 und 9 (300 mM und 500 mM Imidazol) eluierte das Protein schließlich sauber bei der erwarteten Größe von 39 kDa von der Säule.

### 4.3.2 Expression der *FB188* HDAH in XL1 blue, Aufreinigung über $Zn^{2+}$ -IMAC und ICP-Analyse

Da es sich bei der homologen HDLP aus *A. aeolicus* (Finnin *et al.*, 1999) um ein Zink-abhängiges Enzym handelt, stellt sich die Frage ob auch die *FB188* HDAH Zink-Ionen im aktiven Zentrum enthält. Wenn dies der Fall ist, so könnte eine Aufreinigung der *FB188* HDAH unter Einsatz hoher Nickelkonzentrationen einen Einfluss auf die Funktion des Enzyms haben, da Nickel das Zink im aktiven Zentrum verdrängen könnte. Um dies zu untersuchen, wurde die Aufreinigung über IMAC derart modifiziert, dass die Säulen statt mit  $NiCl_2$  mit  $ZnCl_2$  beladen wurden. Expression und Aufschluss geschahen unter den gleichen Bedingungen wie oben genannt.

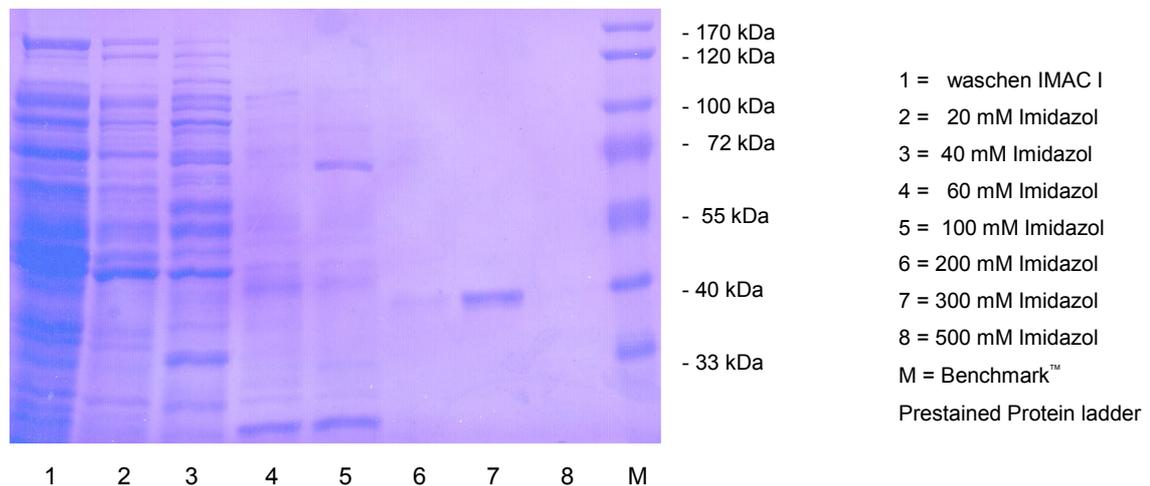


Abb. 4.7

$Zn^{2+}$ -IMAC Aufreinigung der *FB188* HDAH (XL1 blue), 12 % SDA-PAGE, Coomassie-Färbung

Auch in diesem Fall erfolgte die Elution der überproduzierten HDAH ab einer Imidazolkonzentration von 200 mM. Ebenfalls zeigt die Fraktion der 300 mM Imidazolösung (Spur 7) eine saubere Bande der korrekten Grösse (39 kDa). Auffällig ist, dass die Ausbeute in diesem Fall wesentlich geringer ausfällt als bei einer Aufreinigung über  $NiCl_2$ -beladene IMAC-Säulen.

### 4.3.2.1 ICP-Analyse der *FB188* HDAH zur Untersuchung der Kofaktorenabhängigkeit des Enzyms

Um zu überprüfen, ob es sich bei der *FB188* HDAH ebenfalls um ein Zink-abhängiges Enzym handelt, wurde dieses nach Aufreinigung über Zn-IMAC einer ICP-Analyse unterzogen. Hierzu wurden Proteinproben definierter Konzentration (115 µg/ml), Dialysepuffer und Wasser verwendet. Diese Proben wurden rein und mit Zusatz von 3 nM und 6 nM Zinkchlorid untersucht (s. Tab 4.1).

**Tabelle 4.1: Ergebnisse der ICP-Analyse der *FB188* HDAH**

Probe	Zusammensetzung	ppb Zn <sup>2+</sup>	nM Zn <sup>2+</sup>
1	<i>FB188</i> HDAH (3 nM )	3870	59,17
2	<i>FB188</i> HDAH (3 nM ) + 3 nM ZnCl <sub>2</sub>	4030	61,62
3	<i>FB188</i> HDAH (3 nM ) + 6 nM ZnCl <sub>2</sub>	4180	63,91
4	Dialyse-Puffer	513	7,84
5	Dialyse-Puffer + 3 nM ZnCl <sub>2</sub>	690	10,55
6	Dialyse-Puffer + 6 nM ZnCl <sub>2</sub>	860	13,15
7	H <sub>2</sub> O	4	0,06
8	H <sub>2</sub> O + 3 nM ZnCl <sub>2</sub>	180	2,75
9	H <sub>2</sub> O + 6 nM ZnCl <sub>2</sub>	344	5,26
	2 – 1		2,45
	3 – 1		4,74
	5 – 4		2,71
	6 – 4		5,31

Über Bradford Proteinkonzentrationsbestimmung wurde eine Konzentration von 115 µg/ml für die HDAH-Fractionen ermittelt. Diese entspricht bei einem Molekulargewicht von 39 kDa einer Konzentration von ca. 3 nM ( 2,948 nM). Für die Zinkkonzentration im Enzym ohne Zusatz von ZnCl<sub>2</sub> erhalten wir einen Wert von 59,17 nM. Dieser Wert ist ca. 20-mal höher (19,7 mol/mol Enzym) als die erwartete Zn<sup>2+</sup>-Konzentration von 3 nM. Nach Abzug der unbehandelten Proteinprobe von den erhaltenen Werten der Proben nach Zusatz von Zink (3 nM und 6 nM) erhalten wir für diese Fractionen Konzentrationen von 2,45 und 4,74 nM Zink.

Als Kontrollexperimente wurden ebenso die Proben mit zugesetztem ZnCl<sub>2</sub> im Puffer sowie in H<sub>2</sub>O betrachtet. Nach Abzug der Konzentrationen der unbehandelten Proben sollte

als Ergebnis die Konzentration der zugesetzten Menge  $\text{ZnCl}_2$  herauskommen. Für für den Dialyse-Puffer kamen 2,71 nM (Tab. 4.1 ; 5-4) und 5,31 nM (Tab. 4.1 ; 6-4) für erwartete 3 nM bzw. 6 nM heraus. Für die  $\text{H}_2\text{O}$ -Kontrollen erhalten wir Werte von 0,06 nM ohne Zink-Zusatz und 2,75 nM bzw. 5,26 nM für 3 nM bzw. 6 nM Zusatz.

Nickel konnte in diesen Ansätzen so gut wie nicht nachgewiesen werden. ICP-Messungen mit Enzym aus einer Nickel-IMAC-Präparation ergaben Nickel-Konzentrationen von 1,47 mol pro mol Enzym während Zink nur in einer Konzentration von 0,19 mol/mol Enzym nachgewiesen werden konnte.

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass es sich bei der *FB188* HDAH ebenfalls um ein Zink-haltiges und -abhängiges Enzym handelt. Dieser Befund konnte in weiteren Untersuchungen (4.7.3; 4.7.4; 4.9.1; 4.10.1) manifestiert werden.

### 4.3.3 Expression der *FB188* HDAH in B834 und Aufreinigung über $Zn^{2+}$ -IMAC

Für Kristallisationsstudien sollte eine Selenomethionin-Variante (3.3.1.3) der HDAH hergestellt werden. Hierzu wurde das Plasmid pQEB-AH-NHis in dem Stamm B834 im 1 Liter Maßstab angezogen. Nach Erreichen von  $OD_{600}$  von 0,8 wurden die Zellen abzentrifugiert und in neuem, Methionin-freien Medium aufgenommen. Nach 1 Stunde wurde dem Medium DL-Selenomethionin zugesetzt und nach weiteren 30 min die Proteinproduktion durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Das Wachstum der Zellen erfolgte danach für weitere 18 Stunden.

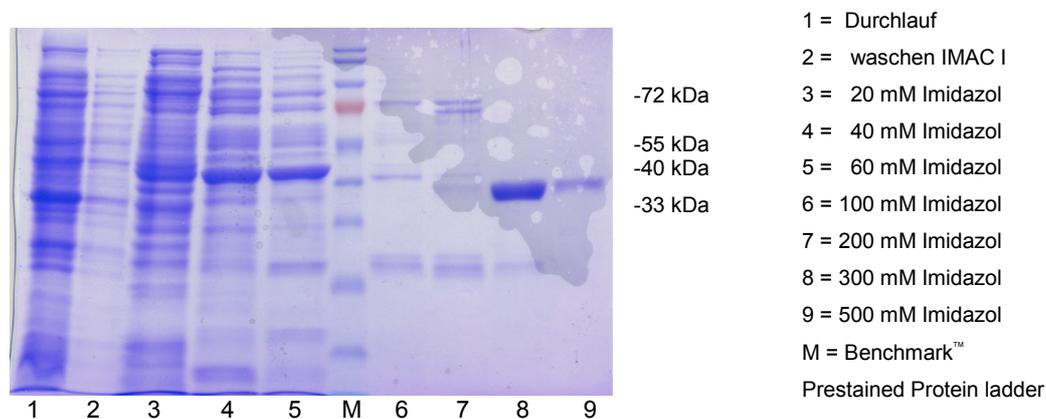


Abb. 4.7

$Zn^{2+}$ -IMAC Aufreinigung der *FB188* HDAH (B834), 12 % SDS-PAGE, Coomassie-Färbung

Auch in diesem Fall eluiert das Protein bei 300 mM Imidazol, allerdings mit einer leichten Verunreinigung. Die 500 mM Imidazol-Fraktion ist sauber und wurde für weitere Experimente an T. Kragh Nielsen in die Abteilung Molekulare Strukturbiologie unseres Institutes gegeben.

Zu dieser Methode ist zu erwähnen, dass auf Zugabe eines Oxidationsschutzes in Form von DTT verzichtet wurde, da dieses bei der IMAC-Aufreinigung das an der Säule komplexierte Zink reduzieren und somit die Bindungseigenschaften der Säule negativ beeinflussen würde.

#### 4.3.4 Produktion nativer *FB188* HDAH und Aufreinigung über Perfusionschromatografie und Gelfiltration

Zur Charakterisierung der *FB188* HDAH wurde ebenfalls das Wildtyp Enzym aus *FB188* untersucht. Dies diente vor allem dazu, mögliche negative Eigenschaften des zur Aufreinigung über IMAC notwendigen Affinitäts-tags, des Hexa-Histidin-tags zu erforschen. Dieser kann bekanntlich (Nygren *et al.*, 1994), (Li *et al.*, 2004) die Eigenschaften des Enzyms beeinflussen oder sogar das Enzym in der heterolog exprimierten Form mit His-tag inaktivieren, da diese zusätzlich angebrachten, homologen Aminosäuren Einfluss auf die Faltung des gesamten Polypeptids haben können. Um später den möglichen Einfluss des His-tags auf das Enzym in Form von Aktivitätstests zu untersuchen, war eine Expression von nativer *FB188* HDAH unerlässlich.

Eine Expression erfolgte in Minimalmedium mit NAA als einziger Kohlenstoffquelle im 1 Liter Maßstab bei 37 °C für 8 Stunden. Das Aufschlussprozedere gleicht den oben bereits erwähnten Methoden. Nach Umpufferung des Gesamtzellextraktes aus *FB188* in Tris-Puffer A konnte die Aufreinigung über Perfusionschromatografie (Perseptive Vision Workstation) unter Verwendung einer Poros 20 HQ Anionenaustauschersäule mit 7,5 ml Säulenvolumen begonnen werden (3.3.4). Die Fraktionierung der Probe wurde in 5 ml Schritten durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen einem Aktivitätsnachweis über den Standard-HDAC Assay (3.4.5) unterzogen. In Abb. 4.8 ist das Chromatogramm eines typischen Laufes zu sehen. Fraktionen 23, 24 und 25 (Blaues Kästchen) konnten als aktive Fraktionen im HDAC Standardassay nachgewiesen werden.



(A)

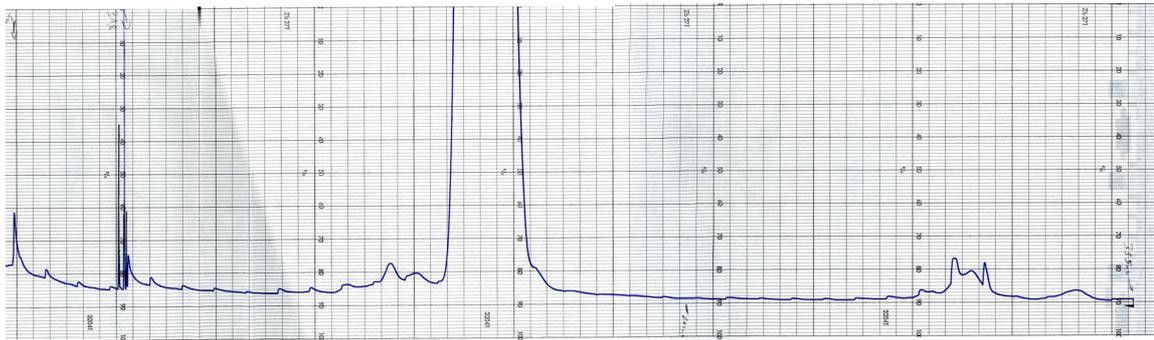


Abb. 4.9 (A)

Chromatogramm der Gelfiltration mit einer HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 Säule



-72kDa-  
-55kDa-  
-40kDa-  
-33kDa-



(B) 1 / 2 / M / 23 / 24 / 25 / 26 / 27 / 28

(C) 26 / 27 / 28 / 29 / 30 / 31 / 32 / M

Abb. 4.9. (B/C)

12% SDS-Page/Coomassie-Färbung der aktiven Fraktionen. M entspricht der *Benchmark™ Prestained Protein ladder* und die Numerierungen geben mit Ausnahme von 1 und 2 die Numerierung der jeweiligen Fraktionen wieder. In (B) sind die aktiven Fraktionen nach Poros 20 HQ Säulenaufreinigung zu sehen. In Spur 1 ist Gesamtzellextrakt und in 2 rekombinant exprimierte und aufgereinigte HDAH aufgetragen. In (C) sind die aktiven Fraktionen nach der zweiten Gelfiltrationsaufreinigung dargestellt.

### 4.3.5 Nachweis der exprimierten *FB188* HDAH über *Western Blotting*

Um eine erfolgreiche Expression nachzuweisen wurde die Methode des *Western Blottings* angewandt. Hierbei kamen zwei verschiedene primäre Antikörper zum Einsatz. Zum einen konnte zur Detektion des His-tag-Fusionproteins ein monoklonaler Maus-AntiPenta-His Antikörper der Firma Sigma eingesetzt werden. Des weiteren bestand die Möglichkeit, das exprimierte Enzym direkt mit einem polyklonalen Hase-Anti-HDAH Antikörper nachzuweisen. Dieser Antikörper wurde von der Firma Eurogentec hergestellt, wo ein Kaninchen gegen ein bestimmtes Peptid immunisiert wurde. Dieses Peptid wurde aus der N-terminalen Sequenz der *FB188* HDAH abgeleitet und in der eigenen Arbeitsgruppe in hoher Reinheit synthetisiert (C. Morys-Wortmann). Nach Inkubation mit dem jeweiligen zweiten Antikörper (Anti-Maus AK bzw. Anti-Hase AK) sollte nach Anfärben dieses Antikörpers eine Bande im Bereich von ca. 39 kDa erwartet werden.

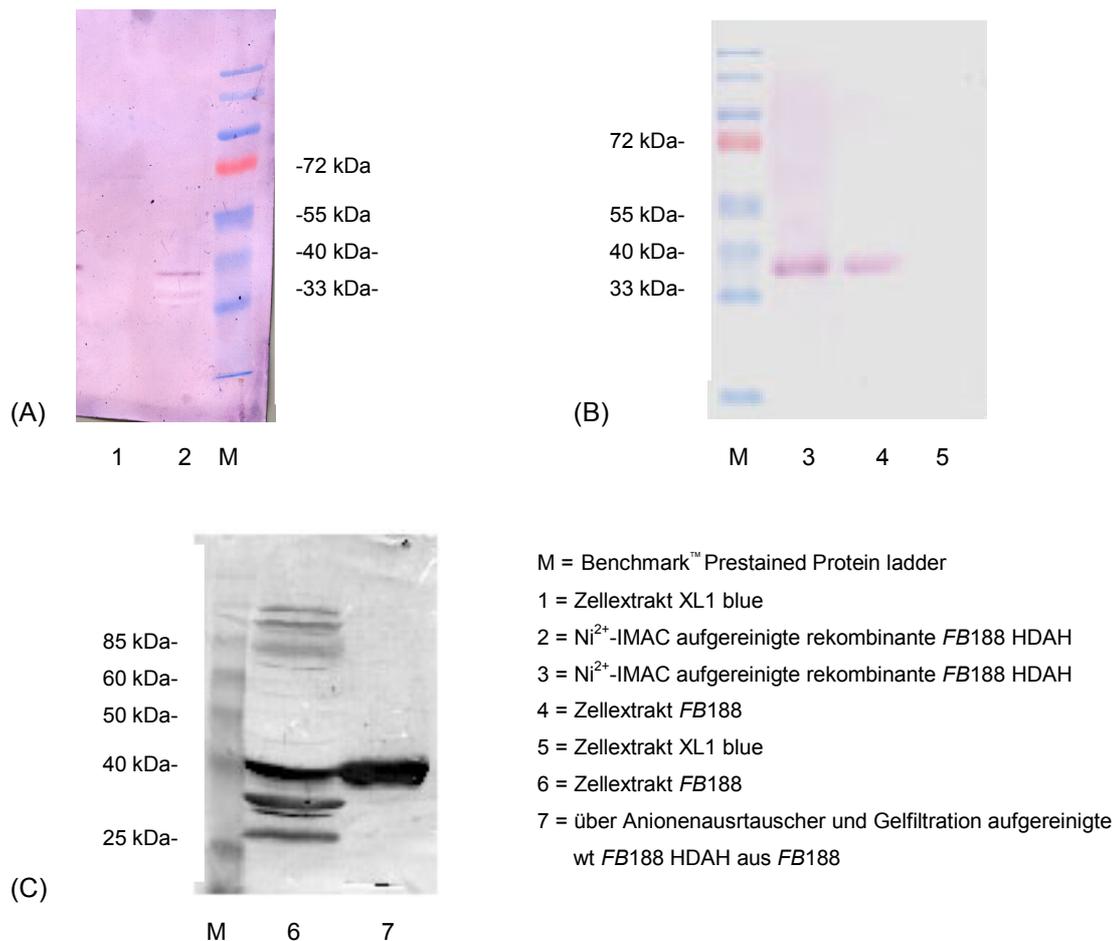


Abb.4.10

*Western Blot* zum Nachweis der *FB188* HDAH. (A) Nachweis der rekombinanten HDAH über Maus-Anti-PentaHis-AK und Anti-Maus-AK als zweiten Antikörper. (B) Nachweis des

rekombinanten Enzyms mit Hase-Anti-HDAH-AK und Anti-Hase-AK. (C) Nachweis des nativen Enzyms über Hase-Anti-HDAH-AK und Anti-Hase-AK.

Es konnten über die Methode des *Western blottings* alle Expressionen erfolgreich nachgewiesen werden, sowohl über den Anti-Penta-His-AK als auch über den Anti-HDAH-AK. Ebenso konnte die Expression des nativen Enzyms in *FB188* nachgewiesen werden.



Zur Sicherung dieser PCR-Produkte erfolgte eine direkte Zwischenklonierung in den pCR4<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup>-Vektor und den Expressionsstamm XL1-blue. Nach Überprüfung der putativen positiven Klone 2 und 3 (siehe Abb. 4.12(A)) durch *Bam*HI-/*Hind*III-Restriktionsverdau wurden diese sequenziert und die Sequenz bestätigt. Nach Anzucht im präparativen Maßstab wurde das Plasmid isoliert, ein *Bam*HI-/*Hind*III-Restriktionsverdau durchgeführt und das zu klonierende *Insert* über Gelextraktion aufgereingt. Die Ligation erfolgte in den ebenfalls *Bam*HI-/*Hind*III-geschnittenen und mit *shrimps alkaline phosphatase* (SAP) dephosphorylierten Vektor pQEB-CH. Das ligierte Plasmid wurde dann in den Stamm XL1-blue transformiert. Nach Ausplattierung der Transformationsansätze und Wachstum über Nacht wurden von ca. 50 Kolonien 7 Klone gepickt und Plasmid-DNA aufgereinigt. Klone 2 (PA2) und 5 (PA5) erwiesen sich nach Verdau (Abb. 4.12(B)) und anschließender Sequenzierung als richtig.

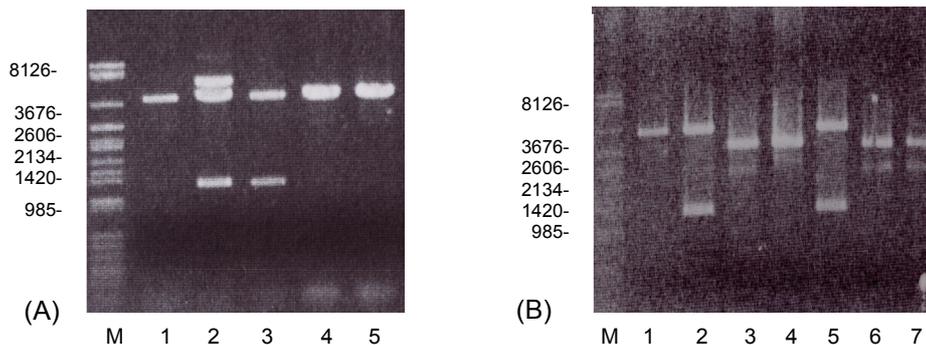


Abb.4.12 (A) *Bam*HI-/*Hind*III-Restriktionsverdau PA3774 HDAH in pCR4<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup>/XL1 blue  
(B) *Bam*HI-/*Hind*III-Restriktionsverdau PA3774 HDAH in pQEB-CH/XL1 blue

Nach der Sequenzierung des HDAH-Gens konnte in der Sequenz ein 1143 bp grosser Leserahmen des Enzyms identifiziert werden. Dieser kodiert für ein Polypeptid von 380 Aminosäuren mit einem kalkuliertem Molekulargewicht von 41.157 Da.

## 4.5 Expression der PA3774 HDAH in XL1 blue und Aufreinigung über Zn<sup>2+</sup>-IMAC

Die analytische Expression der HDAH (beider Klone) erfolgte im 50 ml Maßstab in LB-Medium. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wurde die Proteinproduktion mit 1mM IPTG induziert und die Zellen 8 Std. weiter wachsen gelassen. Nach Zentrifugation der Zellen wurden diese über Ultraschall aufgeschlossen (3.3.2.2). Die Aufreinigung des Enzyms erfolgte über Zn<sup>2+</sup>-IMAC.

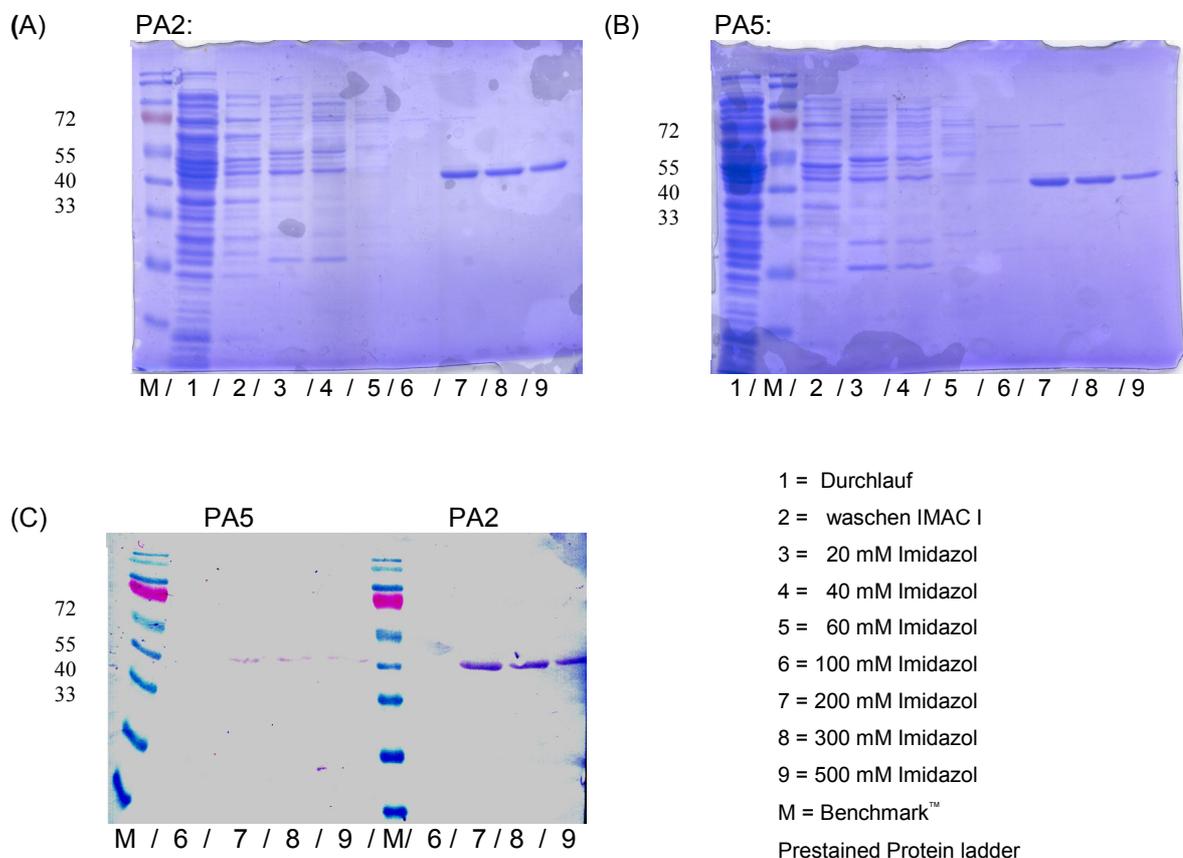


Abb. 4.13

Zn<sup>2+</sup>-IMAC Aufreinigung von PA2 und PA5, (A) zeigt die Expression des Klons PA2 und (B) PA5 (12 % SDA-PAGE, Coomassie-Färbung), in (C) ist der *Western Blot* mit Anti-PentaHis-AK dargestellt.

Das Protein eluiert sauber in den 200, 300 und 500 mM Imidazol Fraktionen in beiden Klonen mit einer apparenten Molekülmasse von ca. 42 kDa (Abb. 4.13 (A) und (B)). Ebenso lässt es sich im *Western Blot* in diesen Fraktionen mit Anti-PentaHis-AK

nachweisen (Abb. 4.13 (C)). Da das Signal des Nachweises über *Western Blot* in Klon PA5 bei gleicher Auftragsmenge geringer ausfällt, Klon PA5 also weniger produktiv als Klon PA2 zu sein scheint, wurde Klon PA2 für die weiteren Betrachtungen und Expressionen dieses Enzyms ausgewählt.

## 4.6 Untersuchungen zur Substratspezifität der FB188

### HDAH

Um die natürliche Funktion der FB188 HDAH zu untersuchen, wurden unterschiedliche Experimente zur Verifizierung der Substratspezifität durchgeführt. Grundsätzlich wurden vier verschiedene Methoden zum Nachweis der Deacetylierung durch das Enzym verwendet. Diese leiten sich aus vorhergesagten Funktionen des Enzyms, bzw. bekannten Funktionen verwandter Enzyme ab. Zum einen wurde eine Methode zum Nachweis der Deacetylierung von Acetylpolyaminen verwendet. In diesem mehrstufigen gekoppelten Assay wurde das bei der Deacetylierungsreaktion entstandene Acetat detektiert (3.4.3). Ein anderer Nachweis wurde über den nach erfolgreicher Deacetylierung entstandenen freien  $\epsilon$ -Aminoterminus des Substrates erbracht, indem dieser mit Fluorescamin angefärbt wurde (3.4.2). Ein drittes Verfahren stellt der Assay zum Nachweis der Deacetylierung von radioaktiv markierten Histonen dar (3.4.4). Die vierte Methode stellt der Standard-HDAC-Assay (3.4.5) dar, der in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelt wurde (Wegener *et al.*, 2003a; Wegener *et al.*, 2003c). Experimente zu diesem Assay sind in gesonderten Kapiteln aufgeführt, da dieser Assay bei einem Großteil der kinetischen Untersuchungen Anwendung fand.

#### 4.6.1 Umsatz von Acetylpolyaminen und Nachweis über den *Acetic acid standard test*

Um die biologische Funktion der FB188 HDAH analog der Acetylpolyamin-Amidohydrolase aus *Mycoplana ramosa* (Sakurada *et al.*, 1996) zu verifizieren, wurde die Acetylpolyamin-Amidohydrolase- (APAH) Aktivität untersucht. Acetylputrescin (Ac.-Put.), Acetylcadaverin (Ac.-Cad.) und Acetylspermidin (Ac.-Sperm.) kamen in einem gekoppelten mehrstufigen Assay als Standard-Acetylpolyamin-Substrate (Abb.4.14) zum Einsatz. Im ersten Schritt dieses Experimentes wurde die Deacetylierungsreaktion durch die FB188 HDAH durchgeführt. Das freigesetzte Acetat konnte dann im zweiten Schritt in einem Standard-Acetat Assay (3.4.3) (Roche, Cat.No.148261) nachgewiesen werden.

1 mg der FB188 HDAH konnten 0,66  $\mu\text{M}$  Ac.-Put., 0,48  $\mu\text{M}$  Ac.-Cad. und 0,24  $\mu\text{M}$  Ac.-Sperm. in einer Stunde umsetzen. Verglichen mit den  $V_{\text{max}}$ -Werten von *Mycoplana ramosa* von 29,1  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ , 28  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  und 17,4  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  stellt dies eine relativ

schwache Aktivität bezüglich dieser Standard-APAH-Substrate dar. Tendenziell kann man sagen, dass kleine Acetylpolyamine besser deacetyliert werden als größere.

Diese Versuche wurden von M. Ninkovic und R. Dietrich mit  $\text{Ni}^{2+}$ -IMAC aufgereinigtem Enzym durchgeführt.

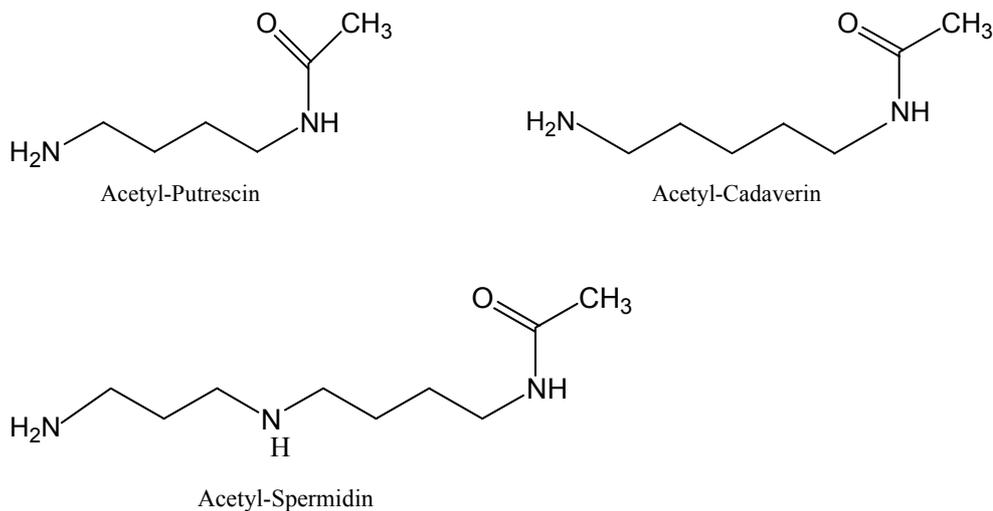


Abb. 4.14

Struktur von Standard-APAH-Substraten

#### 4.6.2 Umsatz von NAA und Nachweis über Fluorescamin

Um die gewünschte Reaktion der Deacetylierung von NAA nachzuweisen, wurde der Fluorescamin-Assay durchgeführt. Die Entstehung eines Fluoreszenzsignals ist nach Fluorescaminanlagerung an den freien  $\epsilon$ -Aminoterminus die Folge der Deacetylierung. In diesem Versuchsteil wurde die *FB188* HDAH ( $\text{Ni}^{2+}$ -IMAC aufgereinigt) diesem Assay unterzogen. Zeitpunkte des Abstoppens der Deacetylierungsreaktion wurden bei 15 und 60 min gewählt. NAA wurde in den Konzentrationen 0,5 bis 2,5 mM eingesetzt und die Reaktionen in Triplikaten bei 30 °C durchgeführt. Der  $K_m$ -Wert konnte mit **4,31 mM** ( $\pm 1,90$  mM) ermittelt werden. Für den Parameter  $V_{\text{max}}$  kam ein Wert von **27,75 nmol/sec/mg** ( $\pm 12,85$  nmol/sec/mg) heraus.

### 4.6.3 Umsatz der *FB188* HDAH von radioaktiv markierten Histonen

Die Durchführung des HDAC-Radioaktiv-Assays geschah in der Arbeitsgruppe von Prof. P. Loidl in der Abteilung für Molekularbiologie der medizinischen Universität Innsbruck. Ausgangspunkt dieser Methode (Kölle *et al.*, 1998) sind Retikulozyten-Histone aus Hühnern. Diese werden mit Tritium [<sup>3</sup>H]-gelabelter Essigsäure inkubiert wobei die Lysine mit radioaktiv gelabeltem Acetat markiert werden. Nach der eigentlichen Deacetylierungsreaktion kann man abgespaltene, radioaktiv markierte Acetatgruppen über eine Szintillationsmessung nachweisen. 4 µg gelabelte Histone haben in der Regel 26.000–30.000 cpm. In einem Standardassay mit der *Bordetella/Alcaligenes FB188* Amidohydrolase (Zn<sup>2+</sup>-IMAC aufgereinigt) bekam man ein Signal von 2400 cpm. Dies stellt eine signifikante Histondeacetylase-Aktivität dar. Der K<sub>m</sub>-Wert für dieses Enzym konnte mit 40 µM ermittelt werden. Dies stimmt gut mit bisher ermittelten K<sub>m</sub>-Werten von Histondeacetylase eukaryotischen Ursprungs überein, welche im Bereich von 30 µM bis 82 µM liegen (Lechner *et al.*, 1996). So wurde z.B. der K<sub>m</sub>-Wert von HDAC 1 aus Mais mit 30 µM ermittelt, Präparationen von HDAC 1 und HDAC 2 aus *Physarum* ergaben Werte von 50 µM bzw. 36 µM. Eine HDAC-Präparation aus Hühnern ergab einen K<sub>m</sub>-Wert von 77 µM.

Darüberhinaus wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Die höchste Sequenzähnlichkeit zu HDACs weist die *FB188* HDAH gegenüber der HDAC 6 auf. Diese HDAC ist als cytoplasma-lokalisiertes Enzym für die Deacetylierung von Tubulinstrukturen verantwortlich (Hubbert *et al.*, 2002). Als Ergebnis kam hierbei heraus, dass Tubulin die Aktivität des Enzyms stark hemmt (persönliche Mitteilung, P.Loidl).

## 4.7 Aktivitätsbestimmung der HDAHs im Standard HDAC-Assay

Mit diesem Verfahren wurde der Grossteil der Untersuchungen der HDAHs durchgeführt. Dieser Assay bietet viele Vorteile gegenüber den o.g. anderen Verfahren, er ist innerhalb der Arbeitsgruppe Schwienhorst fest etabliert und bietet somit die besten Voraussetzungen zur Durchführung. Gängige sowie neuartige HDAC-Substrate und Inhibitoren sind innerhalb der Arbeitsgruppe verfügbar und einsetzbar. Auch das Auflösungsvermögen ist bei diesem Assay weitaus größer als bei den vorher aufgeführten Methoden. Bei dem Fluorescamin Assay (3.4.2) können eventuell freie Aminotermini des eingesetzten Enzyms ebenfalls abreagieren und somit das Ergebnis verfälschen. Im „acetic acid standard test“ (3.4.3) ist der Nachweis der freien Acetat-Moleküle an mehreren Folgereaktionen gekoppelt. Die Deacetylierungsreaktion wird in diesem mehrstufigen Assay über mehrere Folgereaktionen nachgewiesen, bis schließlich der Nachweis durch Absorption von NADH bei 340 nm erfolgt. Somit ist dieser Assay von einer Vielzahl vorgeschalteter Reaktionen, Enzymen und Chemikalien abhängig, was im Vergleich zu direkteren Nachweismethoden eine schlechtere Empfindlichkeit darstellt.

### 4.7.1 Assay-Entwicklung

Im Vergleich zum Standard HDAC Assay konnte diese Methode weiterentwickelt werden. Da beide verwendeten HDAHs inert gegen Trypsin-Verdau sind, wurde der Assay kontinuierlich durchgeführt. Trypsin konnte dem Reaktionsansatz von Beginn an zugesetzt und somit der Reaktionsverlauf direkt beobachtet werden. Man musste keine Start- und Stoppunkte für kinetische Bestimmungen wählen. Trypsin konnte dadurch auch in hohen Konzentrationen (10 bzw 1 mg/ ml) eingesetzt werden, um eine schnelle und komplette Abspaltung des Fluorophors AMC vom Rest des Substrates zu gewährleisten. Die Aktivität der Enzyme konnte durch Zusatz von 50 mM Kaliumphosphat-Puffer zum Reaktionspuffer (HD-Puffer) erhöht werden.

### 4.7.2 pH-Abhängigkeit der Aktivität der HDAHs

Um die Auswirkungen des pH-Wertes auf die Aktivität der Enzyme zu untersuchen, wurde der Standard HDAC-Assay mit Boc-Lys(Ac.)-MCA Substrat unter Zuhilfenahme von unterschiedlichen Kaliumphosphat-Lösungen (200 mM) mit definierten pH-Werten durchgeführt. Die pH-Werte wurden nach Auslesen des Fluoreszenzsignals mit pH-Indikatorpapier überprüft und bestätigt.

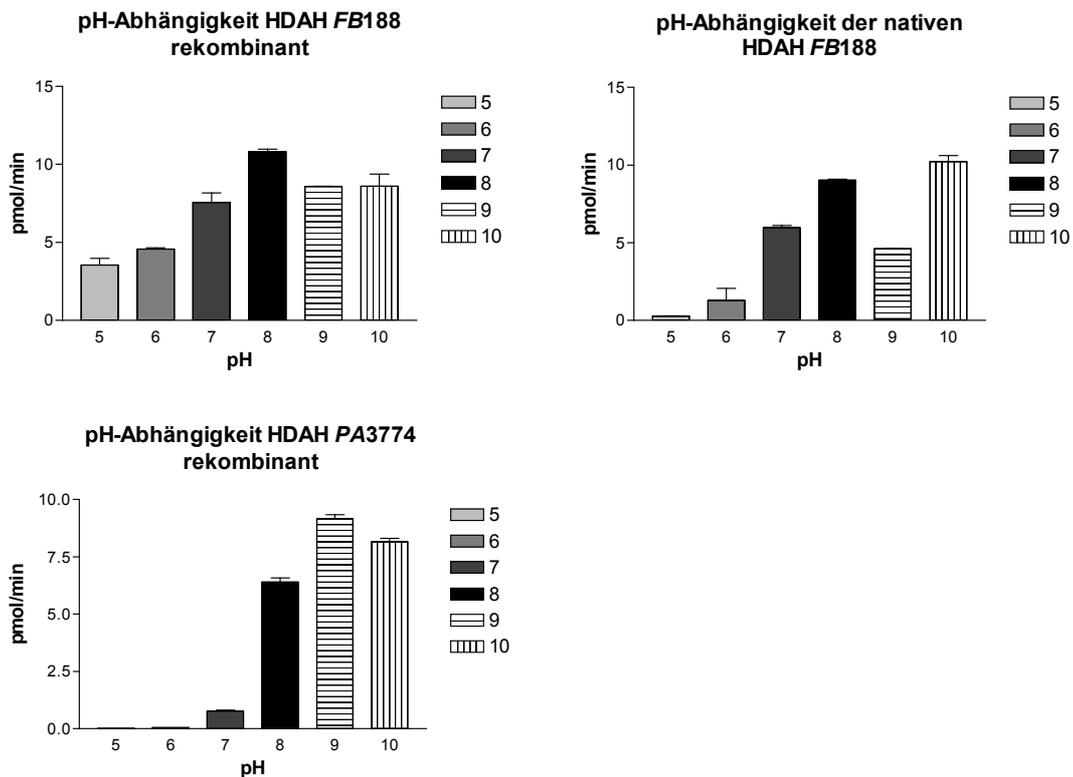


Abb.4.15

pH-Abhängigkeiten der Aktivitäten der bakteriellen HDAHs

Die *FB188* HDAH (rekombinant) besitzt ihr Aktivitätsmaximum im pH-Bereich von 8. Aber auch bei pH 9 bzw. 10 zeigt das Enzym noch eine beachtliche Aktivität. Unterhalb von pH 7 ist der Substratumsatz relativ schwach. Ähnlich verhält es sich mit der nativen *FB188* HDAH (4.2.4), die ebenfalls bei pH 8 ein Optimum aufweist. Allerdings ist hier die Abnahme bei pH 9 wesentlich signifikanter. Anders als die rekombinante Form zeigt dieses Enzym bei pH 10 ein zweites Optimum mit der höchsten Aktivität.

Die HDAH aus *Pseudomonas* hat ihr Aktivitätsmaximum im alkalischen pH-Bereich. Bei pH 9 ist der Umsatz am höchsten, selbst bei pH 10 ist die Aktivität noch höher als bei pH 8.

#### 4.7.3 Abhängigkeit der *FB188* HDAH von bivalenten Kofaktoren

Da Histondeacetylasen der Klassen 1 und 2 bekanntlich  $Zn^{2+}$  im aktiven Zentrum beherbergen, wurde die *FB188* HDAH Wildtyp-Variante bezüglich ihrer Abhängigkeit von bivalenten Kofaktoren untersucht. Dem Standard HDAC-Assay wurden unterschiedliche Konzentrationen von EDTA,  $ZnSO_4$ ,  $CoCl_2$ ,  $NiCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$  und  $MnCl_2$  zugesetzt und das Enzym hinsichtlich seiner Aktivität vermessen.

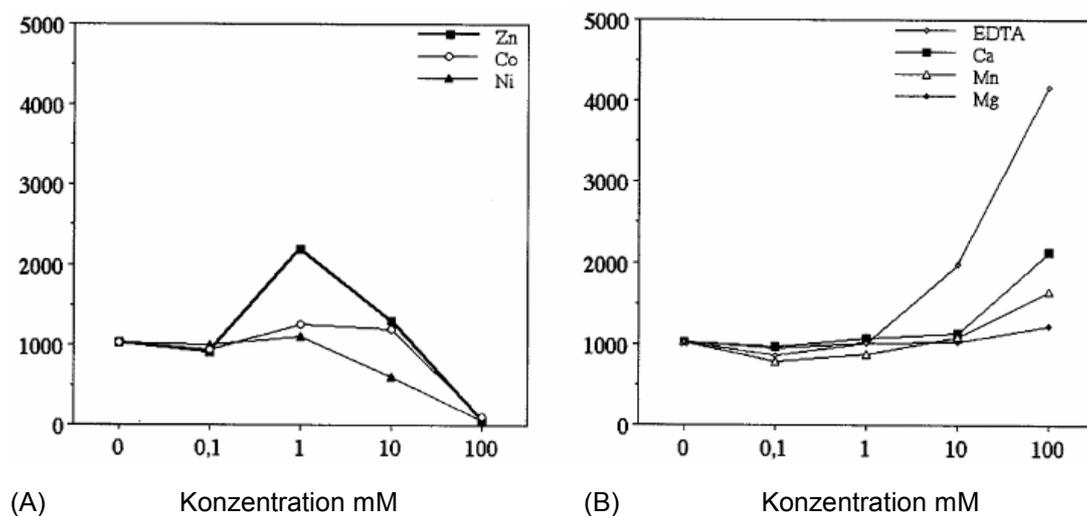


Abb. 4.16

Abhängigkeit der *FB188* HDAH (wt) in Bezug auf zweiwertige Ionen. Auf der Ordinate ist der Umsatz in Fluoreszenseinheiten pro Minute (FE/min) dargestellt.

Hierbei kann eine Unterscheidung der Ionen in zwei Klassen vorgenommen werden. Zum einen vermögen lediglich  $ZnSO_4$ ,  $CoCl_2$  und  $NiCl_2$  die Aktivität des Enzyms bei geringen Konzentrationen zu steigern (4.16 (A)). Bei einer Konzentration von 1 mM immerhin 2,2-, 1,3- sowie 1,1-fach. Höhere Konzentrationen haben einen inhibitorischen Effekt. Im Gegensatz dazu zeigen  $CaCl_2$ ,  $MnCl_2$  und  $MgCl_2$  keinen Effekt bei geringeren Konzentrationen von 0,1 bis 10 mM. Bei sehr hohen Konzentrationen von 100 mM rufen sie jedoch eine gesteigerte Aktivität hervor (1,2- bis 2,1-facher Substratumsatz). EDTA

zeigt ab 10 mM eine Aktivitätssteigerung, obwohl es als Komplexbildner die Ionen des Enzyms binden sollte. Es ist jedoch bekannt, dass HDACs und auch APAH aus *M. ramosa* das  $Zn^{2+}$  des aktiven Zentrums nur unter extremen Bedingungen abgeben.

Letztlich ist hier herauszustellen, dass 1 mM Zink die Aktivität steigert und dies als Indiz gesehen werden kann, dass es sich bei der *FB188* HDAH um ein Zink-abhängiges Enzym handelt.

#### 4.7.4 Bestimmung von $K_m$ - und $V_{max}$ -Werten der HDAHs mit dem Standard-Substrat Boc-Lys( $\epsilon$ -Acetyl)-MCA im Standard-HDAC-Assay

Um die *FB188* HDAH hinsichtlich ihrer Aktivität zu untersuchen, wurde der Standard-HDAC-Assay unter Verwendung des Substrates Boc-Lys(Ac)-MCA durchgeführt. Diese Tatsache lässt auch später vergleichende Betrachtungen zu Histondeacetylasen zu, welche unter denselben Bedingungen vermessen wurden. Für die rekombinante Form der *FB188* HDAH, welche über Nickel-beladene IMAC-Säulen aufgereinigt wurde, konnte ein  $K_m$ -Wert von **127,97  $\mu$ M** bei einer Standardabweichung von 24,51  $\mu$ M. ermittelt werden. Der entsprechende  $V_{max}$ -Wert kann mit **175,27 ( $\pm$ 18,85) pmol/sec/mg** angegeben werden.

Nachdem sich durch weiterführende Untersuchungen herausgestellt hatte, dass es sich bei diesem Enzym vermutlich um ein Zink-anhängiges Enzym handelt, wurde die Aufreinigungsprozedur derart umgestellt, dass die IMAC-Säulen mit Zinkchlorid beladen wurden, um mögliche negative Nebeneffekte durch hohe Konzentrationen an Nickel, eine eventuelle Verdrängungen des Zinks durch Nickel aus dem aktiven Zentrum des Enzyms, zu vermeiden. Die Messungen zur Bestimmung der Reaktionskinetik wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt und die Ermittlung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte soll für dieses Beispiel an dieser Stelle einmal exemplarisch gezeigt werden. Zunächst wurden unterschiedliche Konzentrationen an Substrat verwendet, in dessen Bereich sich später auch der ermittelte  $K_m$ -Wert wieder finden sollte. In dieser Messung wurde in einem Bereich von 1,25 bis 25  $\mu$ M Substrat gemessen.

Tab. 4.2:

Ermittelte Werte zu Bestimmung von  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werten der FB188 HDAH nach  $Zn^{2+}$ -IMAC

	1,25	2,5	5	7,5	10	15	20	25	a ( $\mu\text{M}$ )
1	454,2369	812,9315	1473,023	1953,684	2568,632	3322,972	3104,085	3187,484	v1
2	0,888462	844,9238	1368,984	2125,822	2664,396	3301,243	3578,063	3588,116	v2
3	437,9585	898,1538	1386,468	2236,328	2712,122	3327,829	3769,997	3917,625	v3
1	2,751868	3,07529	3,39438	3,838902	3,893122	4,514031	6,443122	7,843177	a/v1
2		2,958847	3,652344	3,528047	3,753196	4,543744	5,589616	6,967444	a/v2
3	2,854152	2,783487	3,606285	3,353712	3,68715	4,507443	5,305044	6,381417	a/v3
	250	500	1000	1500	2000	3000	4000	5000	a2 (pmol)
1	0,007539	0,008425	0,0093	0,010518	0,010666	0,012367	0,017652	0,021488	V1 (pmolAMC/min)
2		0,008106	0,010006	0,009666	0,010283	0,012449	0,015314	0,019089	V2 (pmolAMC/min)
3	0,00782	0,007626	0,00988	0,009188	0,010102	0,012349	0,014534	0,017483	V3 (pmolAMC/min)
1	200,8864	224,4961	247,7897	280,2398	284,1979	329,5243	470,3479	572,5519	a2/V1
2		215,9958	266,6211	257,5474	273,9833	331,6933	408,042	508,6234	a2/V2
3	208,3531	203,1946	263,2588	244,821	269,1619	329,0433	387,2682	465,8435	a2/V3

In Tab. 4.2 sind die Steigungswerte der Reaktion als v1 bis v3 dargestellt. Diese wurden mit Hilfe des Programms FluoStar Galaxy 4.01 direkt aus der Messung abgeleitet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Bereich der Auswahl immer nur im Bereich eines linearen Reaktionsverlaufes lag. Bei Messung 2 und Stoffmengenkonzentration von 1,25  $\mu\text{M}$  lag ein Pipettierfehler vor, dieser Wert wurde gestrichen und nicht mehr in weitere Betrachtungen miteinbezogen. Für die Anfertigung eines *Hanes Plots* wurde der Quotient der Stoffmengenkonzentration a ( $\mu\text{M}$ ) und der Steigung (v) errechnet. Dieser Quotient wurde dann gegen die Stoffmengenkonzentration graphisch aufgetragen (Abb 4.17).

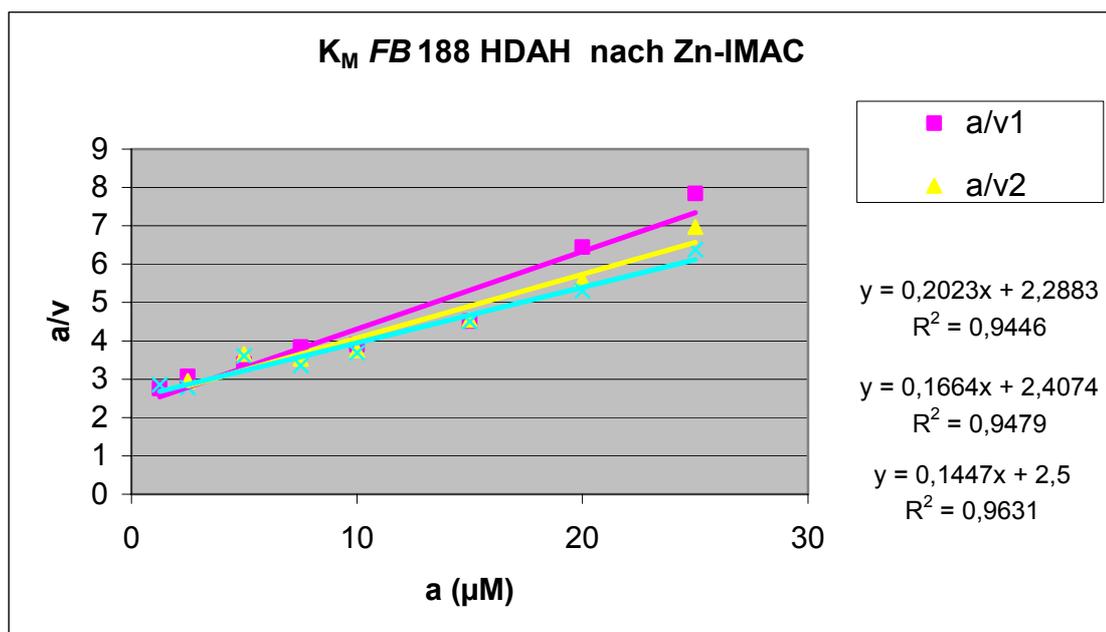


Abb. 4.17

Hanes Plot zur Ermittlung des  $K_m$ -Wertes FB188 HDAH

Für  $y = 0$  und  $x = -K_m$  gilt nach Einsetzen in die Geradengleichung am Beispiel der Messung 1 (■) :  $y = 0,2023 x + 2,2883$  und nach Umformung:  $2,2883/0,2023 = K_m$

Nach Umformung aller drei Gleichungen erhalten wir  $K_m$ -Werte von 11,31 (■), 14,49 (▲) und 17,28 (x)  $\mu\text{M}$ . Dies ergibt im Mittel einen Wert von **14,35**  $\mu\text{M}$  bei einer Standardabweichung von 2,98  $\mu\text{M}$ . Dieser Wert stellt eine ca. 9-fach höhere Affinität gegenüber dem Substrat dar, wenn man ihn mit dem vorher errechneten Wert von 127,79 des über  $\text{Ni}^{2+}$ -IMAC aufgereinigten Enzyms vergleicht.

Zur Verifizierung des  $V_{\max}$ -Wertes musste die eingesetzte Stoffmengenkonzentration  $a$  ( $\mu\text{M}$ ) in eine absolute Stoffmenge  $a_2$  (pmol) umgerechnet werden (Tab. 4.1). Anhand einer Standardreihe mit freiem AMC (siehe Anhang) kann man nun die umgesetzte Stoffmenge durch Bildung des Quotienten aus der Steigung der Reaktion und dem ermittelten Wert 365 (abgeleitet aus der Geradengleichung der Standardreihe  $\text{FE} = 365 \times \text{pmol AMC}$ , d.h.  $\text{pmol AMC} = \text{FE} / 365$ ) errechnet werden. Diese Werte sind mit V1 bis V3 in Tab. 4.2 angegeben. Durch Bildung des Quotienten aus  $a_2$  (pmol) und V1-3 und Auftragung dieses Quotienten gegen  $a_2$  kann ebenfalls ein *Hanes Plot* angefertigt werden (Abb 4.18).

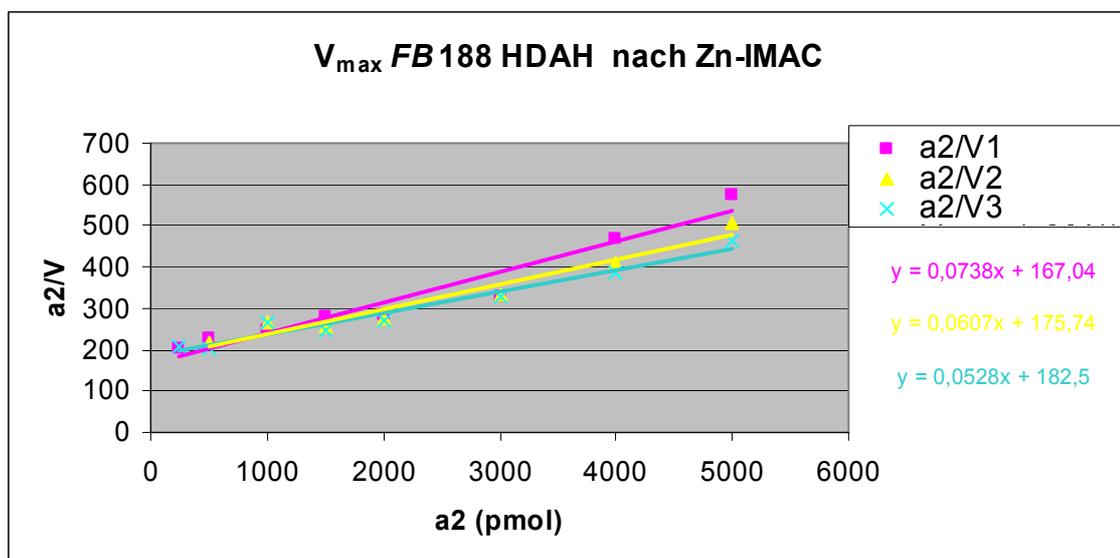


Abb. 4.18

*Hanes Plot* zur Ermittlung des  $V_{\max}$ -Wertes FB188 HDAH

Aus den erhaltenen Geradengleichungen lässt sich nun ein  $V_{\max}$ -Wert von **136,01** ( $\pm 22,48$ ) **pmol/sec/mg** kalkulieren. Hierbei muss noch die Menge an eingesetztem Enzym (20  $\mu\text{l}$  einer 100  $\mu\text{g/ml}$  Lösung in 200  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen, also 2  $\mu\text{g}$ ) in die Betrachtung mit eingebunden werden. Auch hier zeigt sich, dass der maximale Substratumsatz bei dem über  $\text{Zn}^{2+}$ -IMAC aufgereinigtem Enzym im Gegensatz zum  $\text{Ni}^{2+}$ -IMAC aufgereinigten Enzym

schon bei einer geringeren Konzentration erreicht wird, also eine Aktivitätssteigerung durch die Veränderung in der Isolierung des Enzyms eingetreten ist.

Für das native Enzym aus *FB188* konnten Werte von **91,91** ( $\pm 30,70$ )  $\mu\text{M}$  ( $K_m$ ) und **97,52** ( $\pm 20,17$ )  $\text{pmol/sec/mg}$  ( $V_{\max}$ ) generiert werden.

Eine Aktivitätsbestimmung der Histondeacetylase-ähnlichen Amidohydrolase aus *P. aeruginosa* (*PA3774* HDAH) ergab einen  $K_m$ -Wert von **57,66** ( $\pm 13,81$ )  $\mu\text{M}$  und einen  $V_{\max}$ -Wert von **526,81** ( $\pm 42,04$ )  $\text{pmol/sec/mg}$ .

**Tab.4.3: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten  $K_m$ - und  $V_{\max}$ -Werte**

<b>Enzym und Aufreinigung</b>	<i>FB188</i> HDAH rek. $\text{Ni}^{2+}$ -IMAC	<i>FB188</i> HDAH rek. $\text{Zn}^{2+}$ -IMAC	<i>FB188</i> HDAH nativ Anionenaustauscher und Gelfiltration	<i>PA3774</i> HDAH rek. $\text{Zn}^{2+}$ -IMAC
<b><math>K_m</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>127,97</b>	<b>14,35</b>	<b>91,91</b>	<b>57,66</b>
<b><math>V_{\max}</math> (<math>\text{pmol/sec/mg}</math>)</b>	<b>175,27</b>	<b>136,01</b>	<b>97,52</b>	<b>526,81</b>

#### 4.7.5 Umsatz der FB188 HDAH mit tripeptidischen Substraten

Auf der Suche nach den natürlichen Substraten der *FB188* HDAH konnte in 4.5.1 gezeigt werden, dass der Umsatz von Acetylpolyaminen nur mäßig ist. Da die Aminosäuresequenz des Enzyms große Ähnlichkeiten zu HDACs aufweist, stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob (poly-)peptidische Substrate als natürliche Substrate in Frage kommen oder andere acetylierte Verbindungen als natürliche Targets fungieren. Als Indiz für polypeptidische Substrate kann der Umsatz von radioaktiv markierten Histonen (4.6.3) gesehen werden. In diesem Zusammenhang wurde das Enzym aus *FB188* mit tripeptidischen Substraten vermessen. Diese Substrate haben noch zwei weitere Aminosäuren vor dem Lysin gekoppelt und geben somit unterschiedliche Sequenzkontexte wieder. Diese wurden aus dem Sequenzkontext von Histon H4 abgeleitet (Kervabon *et al.*, 1979) und sollen Rückschlüsse auf die Bindung des Enzyms im Zusammenhang mit der näheren Umgebung des Substrates geben. Dies scheint im Hinblick auf die Deacetylierung von Histonen, welche immer nur an bestimmten Lysinen acetyliert und deacetyliert werden, von großem Interesse. Untersuchungen dieser Art könnten nicht nur ein Unterscheidungsmerkmal der beiden Histondeacetylase-Klassen geben, sondern auch die Substratspezifität der einzelnen HDACs wiedergeben.

In diesem Versuchsansatz kamen folgende Substrate zum Einsatz:

Z-His-Arg-Lys( $\epsilon$ -Acetyl)-MCA (Z-HRK[Ac]-MCA),

Ac-Arg-Gly-Lys( $\epsilon$ -Acetyl)-MCA (Ac-RGK[Ac]-MCA),

Ac-Gly-Ala-Lys( $\epsilon$ -Acetyl)-MCA (Ac-GAK[Ac]-MCA),

Tos-Gly-Pro-Lys( $\epsilon$ -Acetyl)-MCA (Tos-GPK[Ac]-MCA)

Ac-Gly-Gly-Lys( $\epsilon$ -Acetyl)-MCA (Ac-GGK[Ac]-MCA),

Als Vergleichsmöglichkeit wurde das Standardsubstrat Boc-Lys( $\epsilon$ -Acetyl)-MCA ebenfalls in den Messungen mitgeführt. Die Umsätze der jeweiligen Substrate sind in Abb. 4.19 dargestellt.

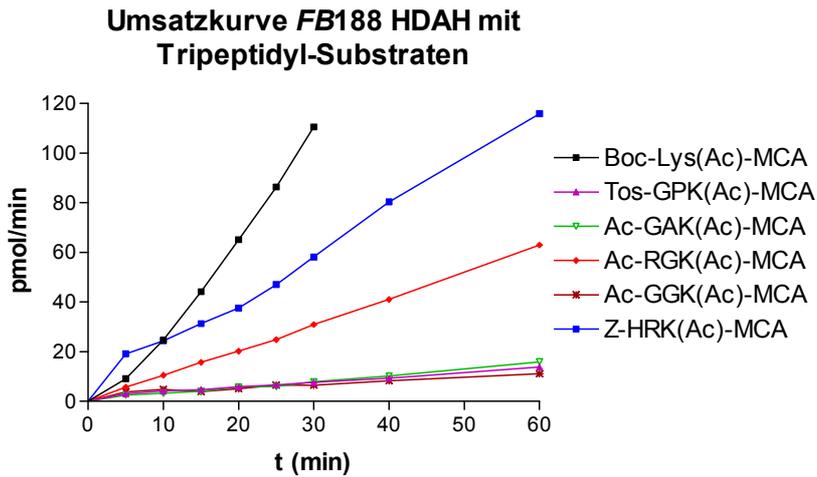


Abb. 4.19

Umsatzkurven *FB188* HDAH mit Tripeptidyl-Substraten im Standard-HDAC-Assay

Während Z-HRK(Ac)-MCA und Ac-RGK(Ac)-MCA noch relativ gut umgesetzt werden, ist der Umsatz bei den anderen Substraten moderat. Im Kontrast dazu setzt Ratten-Leber HDAC, welche hauptsächlich aus HDAC1, 2. und 3 besteht (Riester *et al.*, 2004) alle tripeptidischen Substrate um. Das Ac-GAK(Ac)-MCA Substrat wird sogar von der Ratten-Leber HDAC am besten umgesetzt (Wegener *et al.*, 2003c), während mit der *FB188* HDAH nur ein sehr geringer Umsatz erzielt wurde.

#### 4.7.6 Untersuchung der Substratspezifität der HDAHs - Austausch des Acetyl-Restes durch andere Substituenten

Um den Kreis möglicher natürlicher Substrate einzuengen, sollte die Substratspezifität der HDAHs näher untersucht werden. Ergebnisse einer vorangegangenen Dissertation deuteten bereits an, dass die Sequenz peptidischer Substrate keinen dramatischen Einfluss auf den Substratumsatz hatte (Wegener *et al.*, 2003a; Wegener, 2004).

In diesem Versuchsteil wurde die  $\epsilon$ -Position des Lysins genauer betrachtet. Das Interesse bestand darin, den Acetylrest an der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins durch andere Reste zu ersetzen. Zum einen sollte durch Variation der Größe des Acylrestes die Größe der entsprechenden Bindetasche des Enzyms ausgelotet werden.

Zum anderen gab es Substratvarianten, bei denen sich die  $pK_a$ -Werte der Abgangsgruppe (als freie Säuren) deutlich vom  $pK_a$ -Wert der Essigsäure unterscheiden. Dadurch sollte der von Finnin postulierte Reaktionsmechanismus (Finnin *et al.*, 1999) überprüft werden. In diesem Zusammenhang wurden Substrate mit Trifluoracetyl- und Methylsulfonyl-Substitutionen im Assay eingesetzt, die einen wesentlich niedrigeren  $pK_a$ -Wert gegenüber Acetyl besitzen. Nach dem postulierten Reaktionsmechanismus von Finnin sollten sie eine bessere Abgangsgruppe als der Acetylrest darstellen. Alle verwendeten Substrate sind in Abb. 4.20 aufgeführt. Die bekannten  $pK_a$ -Werte sowie die Atomradien (Xiang and Anderson, 1998) sind ebenfalls darin dargestellt. Die Synthese der im folgenden verwendeten Substrate (Riester *et al.*, 2004) wurde von D. Riester aus der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt. Eine Analyse der Substrate in Hinblick auf Identität und Reinheit erfolgte über *Liquid Chromatographie Mass Spectroscopy* (LC-MS).

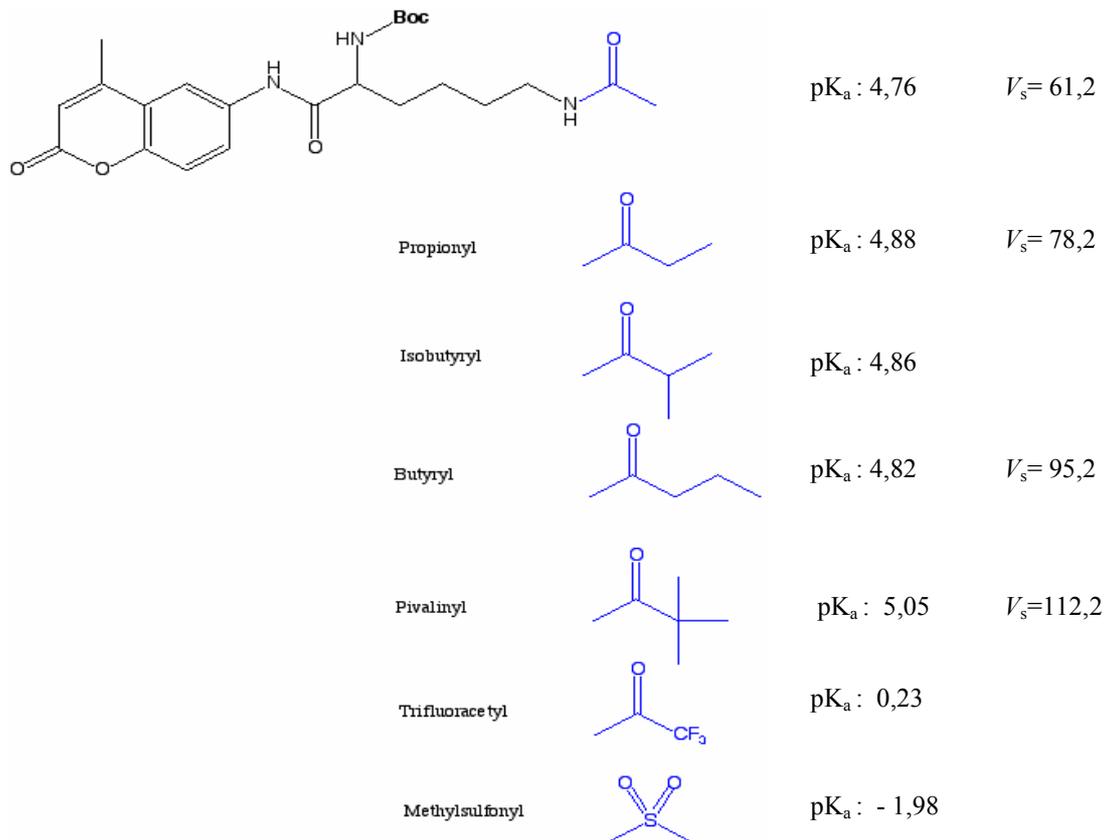


Abb. 4.20

Boc-Lys(R)-MCA Substrates der HDAH mit unterschiedlichen Substitutionen am der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins. Bekannte Eigenschaften der freien Säuren sind in Form von  $pK_a$ -Werten (<http://www.research.umbc.edu/~dfrey1/acidbase>) und dem Molekylvolumen  $V_s$  in  $\text{\AA}^3$  (Xiang and Anderson, 1998) angegeben.

Bei diesen Untersuchungen (Abb. 4.21) stellte sich heraus, dass die Trifluoroacetyl-Substratvariante von der *FB188* HDAH in etwa so gut wie das acetylierte Boc-Lys-MCA Substrat umgesetzt wird. Bei der *PA3774* HDAH übertrifft der Umsatz der Trifluoroacetyl-Variante den Umsatz des Boc-Lys(Ac)-MCA-Substrates sogar bei weitem. Mit dieser Ausnahme konnte ansonsten mit keinem der anderen Substrate ein nennenswerter Umsatz erzielt werden. Beide HDAHs können somit keine Substrate spalten, deren  $\epsilon$ -Acylrest ein größeres Volumen als der des Acetyl-Restes selbst aufweist. Die Methylsulfonyl-Substratvariante, welche ein ähnliches Volumen wie das des Acetyl-Restes aufweist, zeigte mit *FB188* HDAH einen geringen Umsatz, wurde von der *PA3774* HDAH aber überhaupt nicht prozessiert. Aus diesen Versuchen lässt sich ableiten, dass die Enzyme der Klasse der HDAHs sehr stringent die Prozessierung von acetylierten Substraten verfolgen, ähnliche aufgebaute Substrate aber nicht verarbeiten. Die einzige Ausnahme stellt hier die

Trifluoracetyl-Variante dar. Diese unterscheidet sich strukturell nur sehr geringfügig von einem Acetyl-Rest. Der Austausch der Methylgruppe durch eine Trifluormethylgruppe stellt lediglich eine geringe Vergrößerung des Moleküls dar. Trifluoracetat ist allerdings eine bessere Abgangsgruppe, da die elektronegativen Fluoratome die Elektrophilizität des Carbonyl-Kohlenstoffatoms erhöhen und damit das durch Abspalten entstehende Säureanion stabilisieren. Dadurch wird ein Abspalten der Trifluoracetyl-Gruppe erleichtert.

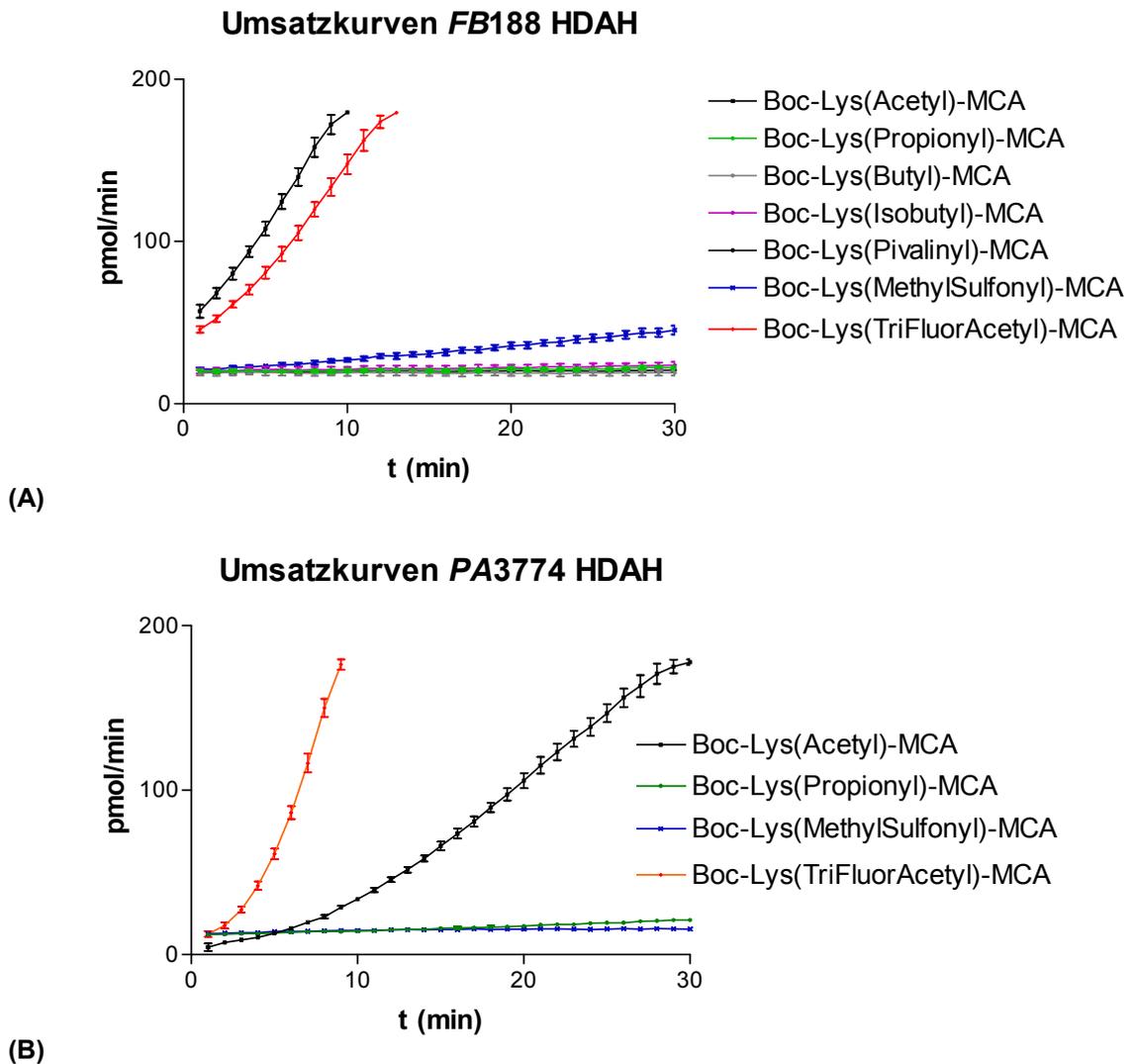


Abb. 4.21

Umsatzkurven der HDAHs *FB188* (A) und *PA3774* (B) mit den Acetyl-substituierten Substraten

#### 4.7.7 Untersuchungen zur Enantioselektivität der HDAHs und zur Seitenkettenlängenvariation des Lysins

In diesem Versuchsteil sollte die Substratspezifität der HDAHs in Bezug auf die Enantioselektivität verifiziert werden. Dazu wurde eine acetylierte Boc-geschützte D-Lysyl-MCA Variante hergestellt, die sich von der natürlichen L-Lysin-Variante strukturell nur in ihrer dreidimensionalen Ausrichtung unterscheidet. Enzyme sind bekannt dafür, in den meisten Fällen streng enantioselektiv zu arbeiten. Zum Beispiel prozessieren die bekannten Aminopeptidasen mit wenigen Ausnahmen nur L-Aminosäuren (Gonzales and Robert-Baudouy, 1996). Eine dieser Ausnahmen stellt die D-Alanin spezifische Aminopeptidase aus *Ochrobactrum anthropi* dar, die wiederum ausschließlich D-Alanyl-Substrate spaltet (Asano *et al.*, 1989).

Neben der Betrachtung der Enantioselektivität der Enzyme wurde hier ebenso der Einfluss der Kettenlänge des acetylierten Substrates untersucht. Hierzu wurde ein Boc-(L)-Ornithin(Acetyl)-MCA Substrat synthetisiert, welches eine Verkürzung des Lysins um eine CH<sub>2</sub>-Einheit darstellt (Abb 4.22). Dies dient der Fragestellung, ob auch kürzere acetylierte Substrate von den Enzymen erkannt und prozessiert werden.

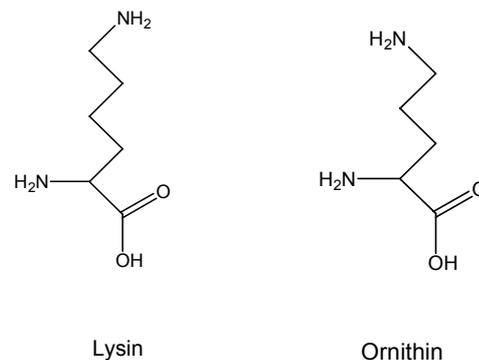


Abb. 4.22 Strukturen von Lysin und Ornithin

Beide Substrate wurden von D. Riester synthetisiert (Riester *et al.*, 2004). Ein Test der nichtacetylierten Varianten (Boc-L-Lys-MCA und Boc-L-Orn-MCA) auf Trypsinspaltbarkeit wurde zuvor durchgeführt und beide Varianten erwiesen sich als positiv. Die Umsatzkurven der oben beschriebenen Substrate sind für beide Enzyme in Abb. 4.23 dargestellt.

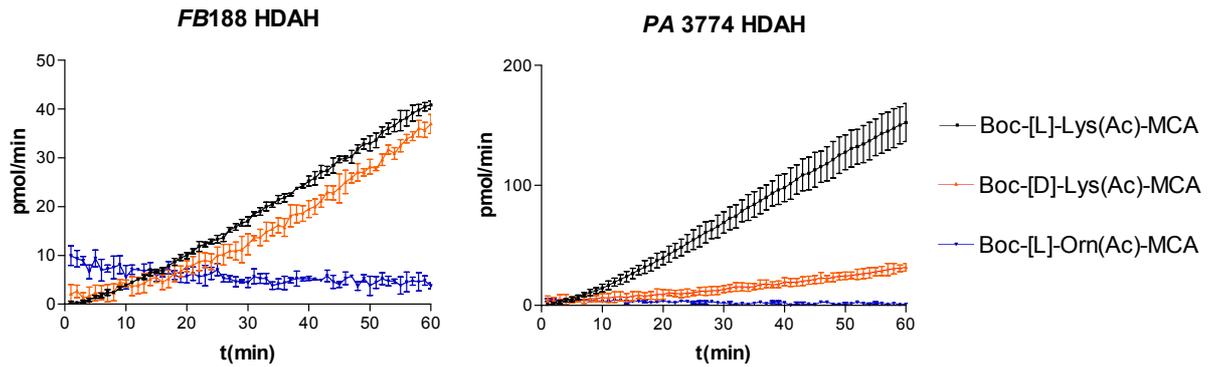


Abb. 4.23

Umsatz von Boc-D-Lys(Ac)-MCA (rot) und Boc-L-Orn(Ac)-MCA (blau) im Vergleich mit Boc-L-Lys(Ac)-MCA (schwarz)

Es ist zu sehen, dass die *FB188* HDAH keinen nennenswerten Unterschied zwischen der L- und D-Form bei der Erkennung von Lysin-Substraten im Umsatz macht. Die Variante des D-Enantiomers wird in fast gleicher Weise gespalten wie die L-Form, was für eine gewisse Flexibilität im reaktiven Zentrum des Enzyms spricht. Die *PA3774* HDAH vermag die D-Form nur in sehr geringem Umfang zu prozessieren.

Kürzer ausgerichtete Lysin-Substituenten in Form des Boc-L-Orn(Ac)-MCA werden von keinem der beiden Enzyme umgesetzt, was für eine Mindestlänge des in die Reaktionstasche ragenden Substrates spricht.

## 4.8 Wettbewerbsexperimente mit HDAHs

### 4.8.1 Wettbewerb durch Säureanionen

Ein anderer Aspekt, Informationen über Substratspezifität zu erlangen, ist die Methode, das Reaktionsprodukt als Kompetitor im Assay einzusetzen. In diesem Versuchsteil wurden die verfügbaren Reaktionsprodukte der vorher untersuchten Substrate (4.7.6) als Kompetitoren in Form ihrer Natrium-Salze untersucht. Dazu wurden sie in einer Konzentration von 50 mM dem Standard-HDAC Assay zugesetzt. Kontrollen in Form von Ansätzen mit 50 mM NaCl (Nachweis über Einfluss  $\text{Na}^+$  im Assay) und Ansätze ohne Substrat, Enzym und Trypsin wurden ebenso durchgeführt. Die relative Aktivität der beiden HDAHs unter Zusatz dieser potentiellen Kompetitoren ist in Abb. 4.24 dargestellt.

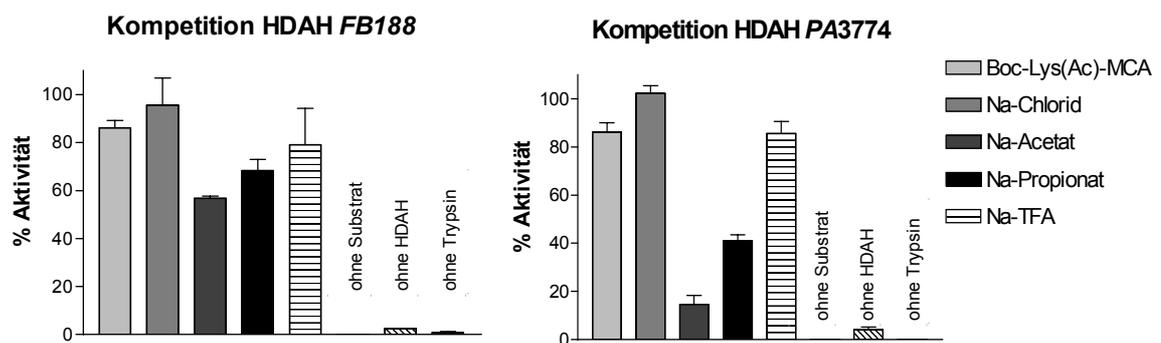


Abb. 4.24

Relative Aktivitäten der HDAHs unter Einsatz der verschiedenen Kompetitoren in der Konzentration von 50 mM

Bei der *FB188* HDAH ist zu erkennen, dass bei hohen Konzentrationen (50 mM) von Kompetitor nur eine geringe Hemmung des Enzyms erreicht wird. Diese ist bei Na-Acetat am höchsten, die Aktivität des Enzyms beträgt aber immer noch ca. 60 %. Na-Propionat inhibiert das Enzym zu ca. 30 % (70 % Restaktivität) und Na-Trifluoracetat hat keinen großen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms. Die HDAH aus *P. aeruginosa* lässt sich wesentlich besser durch den Einsatz dieser Kompetitoren hemmen. So verzeichnen wir nur ca. 15 % Restaktivität unter Zusatz von Acetat und 40 % Restaktivität bei Verwendung von Propionat. Trifluoracetat hat hier ebenfalls keinen nennenswerten Einfluss auf den Reaktionsverlauf. Interessanterweise wird durch Zusatz von 50 mM NaCl die Aktivität im

Vergleich zur Positivkontrolle (Boc-Lys(Ac)-MCA, HD-KP-Puffer) um ca. 10 % gesteigert.

In einem zusätzlichen Experiment (nicht gezeigt) wurde das Kompetitionsverhalten von Methylsulfonat untersucht. Hierbei konnte ein  $IC_{50}$ -Wert von ca. 35 mM ermittelt werden.

#### 4.8.2 Konkurrenz der HDAHs mit Polyaminen

Da sowohl die HDAH aus *FB188* als auch aus *PA3774* einen hohen Verwandtschaftsgrad zu der in ihrer Funktion experimentell bestätigten Acetylpolyamin-Amidohydrolase (APAH) aus *Mycoplana ramosa* (Sakurada *et al.*, 1996) aufweisen, wurden beide Enzyme in Hinblick auf Konkurrenz durch Polyamine untersucht. Hierbei kamen die bisher bekannten Standardsubstrate für Acetylpolyamin-Amidohydrolasen (Abb.4.14) zum Einsatz. Acetyl-Putrescin ist das natürliche Abbauprodukt des Ornithins und Acetyl-Cadaverin das von Lysin. Diese Substanzen und Acetyl-Spermidin wurden in Konzentrationen von 10 und 50 mM dem Standard-HDAC Assay zugesetzt. In Abb. 4.25 sind die Umsätze in pmol/min dargestellt.

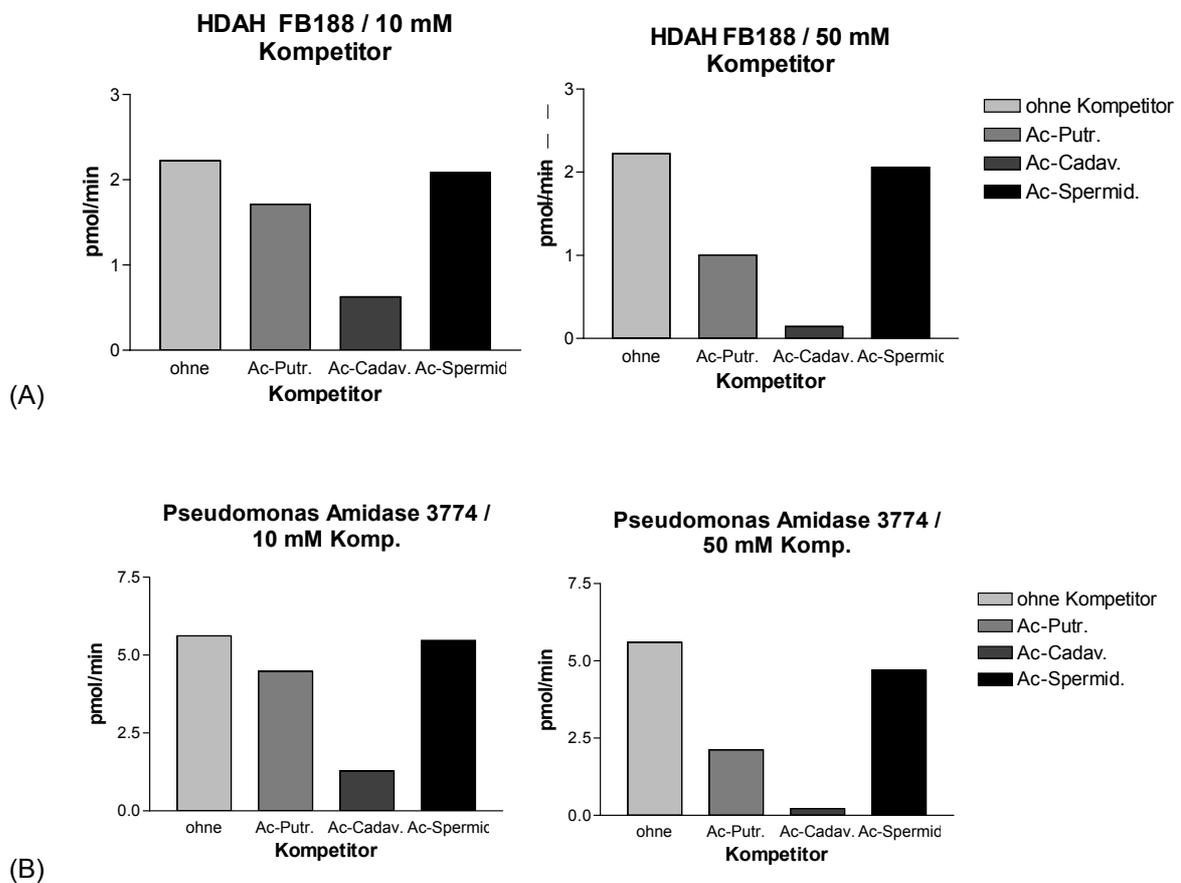


Abb. 4.25

Umsätze der *FB188* HDAH (A) und *PA3774* HDAH (B) in Anwesenheit von APAH-Substraten in den Konzentrationen 10 und 50 mM als Kompetitoren.

Grundsätzlich ist zu erkennen, dass beide HDAHs ein ähnliches Verhalten in diesem Kompetitionsassay aufweisen. Dabei zeigt sich, dass Ac-Cadaverin die HDAHs am besten inhibiert. Vor allem bei 50 mM Konkretorkonzentration sind die Aktivitäten der HDAHs sehr gering. In einem weiteren Experiment konnte bewiesen werden, dass Diacetyl-Cadaverin die HDAHs in gleichem Maße hemmt (Abb. 4.26). Ac-Putrescin führt ebenfalls in hoher Konzentration (50 mM) zu einer signifikanten Hemmung, während bei Ac-Spermidin keine nennenswerte Hemmung zu verzeichnen ist. In Abschnitt 4.5.1 konnte über den *acetic acid standard test* nachgewiesen werden, dass die Prozessierbarkeit der acetylierten Polyamine als Substrate sehr gering ist und mit zunehmender Länge des Kohlenstoff-Grundgerüsts abnimmt. Somit sollte, wenn überhaupt Ac-Putrescin die Enzyme am besten inhibieren, da auch der höchste Umsatz mit Acetyl-Putrescin erzielt wurde. Allerdings scheint das Ac-Cadaverin wesentlich besser in die Substratbindungstasche zu binden als die beiden anderen Acetyl-Polyamine. Gleiches gilt auch für die diacetylierte Variante.

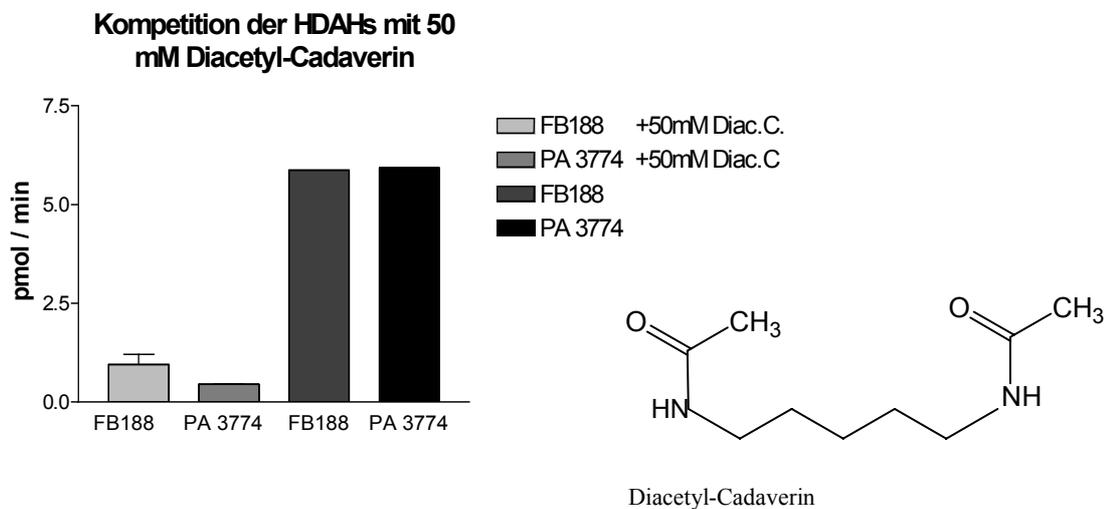


Abb. 4.26

Umsätze der *FB188* HDAH und *PA3774* HDAH mit 50 mM Diacetyl-Cadaverin

## 4.9 Inhibition der HDAHs mit Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACI)

Um weitere Erkenntnisse über den Reaktionsmechanismus der HDAHs zu erlangen, wurden Inhibitionsexperimente mit den aus der Literatur bekannten, reversibel hemmenden HDACI, Trichostatin A (TSA, Abb. 4.27(A)) (Yoshida *et al.*, 1990) und Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Abb. 4.27(B)) (Richon *et al.*, 1998) durchgeführt. Diese beiden Inhibitoren besitzen als funktionelle Gruppe am Ende jeweils einen Hydroxamat-Rest. Dieser ist für die Inhibition der Enzyme der Klasse der HDACs verantwortlich, da die zweizählige Hydroxamatgruppe das  $Zn^{2+}$ -Ion des aktiven Zentrums mit der Carboxylgruppe und mit der Hydroxylgruppe komplexiert, was in der Strukturauflösung der HDLP (Finnin *et al.*, 1999) nach Co-Kristallisation mit beiden Inhibitoren nachgewiesen werden konnte. Als gemeinsame strukturelle Merkmale dieser beiden Inhibitoren lassen sich weiterhin eine Linker-Region sowie die sog. Kappengruppe erkennen. Die Linker-Region erstreckt sich innerhalb der Substratbindungstasche und bildet Kontakte zu aromatischen Resten des Enzyms aus. Auch die aromatische Kappengruppe bildet Kontakte zu Aminosäuren des Enzyms aus. Diese liegen vermutlich an der Oberfläche des Enzyms um den Eingangsbereich der Substratbindungstasche.

Um die Anwesenheit von  $Zn^{2+}$  in beiden Enzymen nachzuweisen, wurde neben SAHA dessen Carbonsäure-Analog Suberoylanilide carboxylic acid (SAOH, Abb.4.27(D)) verwendet. Diese Substanz sollte mit seinem Carbonsäure-Rest nicht so wirkungsvoll in der Lage sein,  $Zn^{2+}$  zu komplexieren und somit das Enzym zu hemmen.

Darüberhinaus wurde ein neuer potentieller Inhibitor, Cyclopentyl-Propionyl-Hydroxamsäure (CypX, Abb. 4.27 (C)) mit in die Betrachtungen einbezogen. Diese Substanz stammt ebenfalls aus der Klasse der Hydroxamate, weist aber einen kürzeren Linker und eine Kappengruppe auf, die nicht-aromatischen Charakters ist. Mit Ausnahme des käuflich erwerbbaaren TSA (Sigma) wurden alle Substanzen von D. Riester synthetisiert.

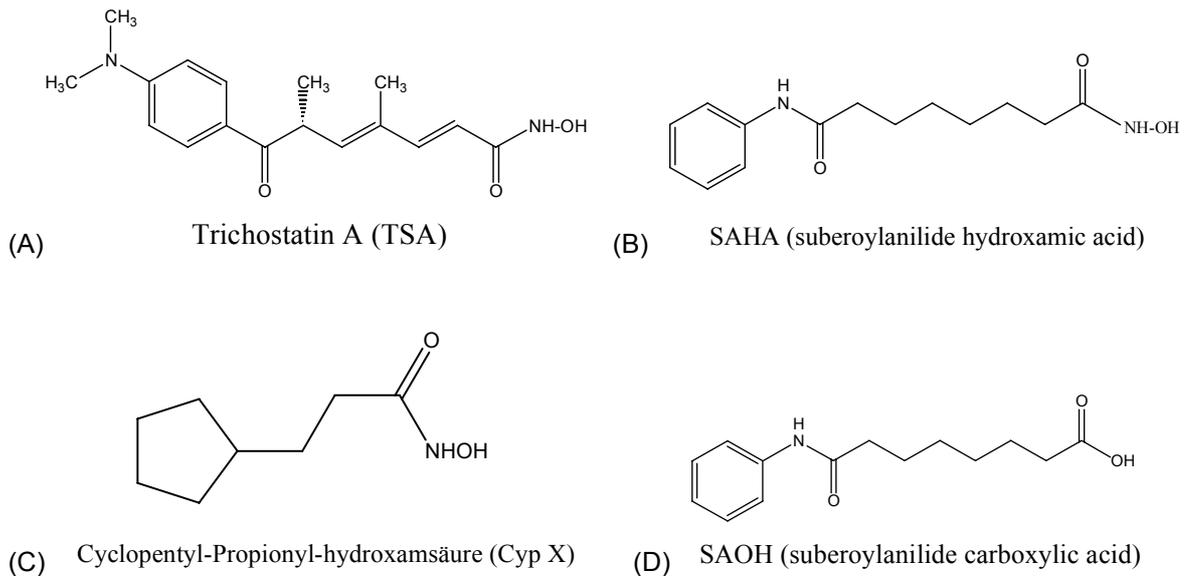


Abb. 4.27

Strukturen der verwendeten HDACI.

#### 4.9.1 Inhibition der *FB188* HDAH mit Trichostatin A (TSA), Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) und Cyclopentyl-Propionyl-Hydroxamsäure (CypX) – Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte

Zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte wurde der Standard-HDAC-Assay unter zusätzlichem Einsatz der o.g. Substanzen über einen breiten Konzentrationsbereich durchgeführt. Der  $IC_{50}$ -Wert gibt die Konzentration von Inhibitor an, bei der 50 % der Enzymaktivität gemessen werden kann. Dieser lässt sich nach halblogarithmische Auftragung aus der sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve ableiten. Die Berechnung des  $IC_{50}$ -Wert wurde mit dem Programm Graph Pad Prism 3.03 durchgeführt. In Abb. 4.28 sind die Graphen mit den jeweils ermittelten  $IC_{50}$ -Werten dargestellt.

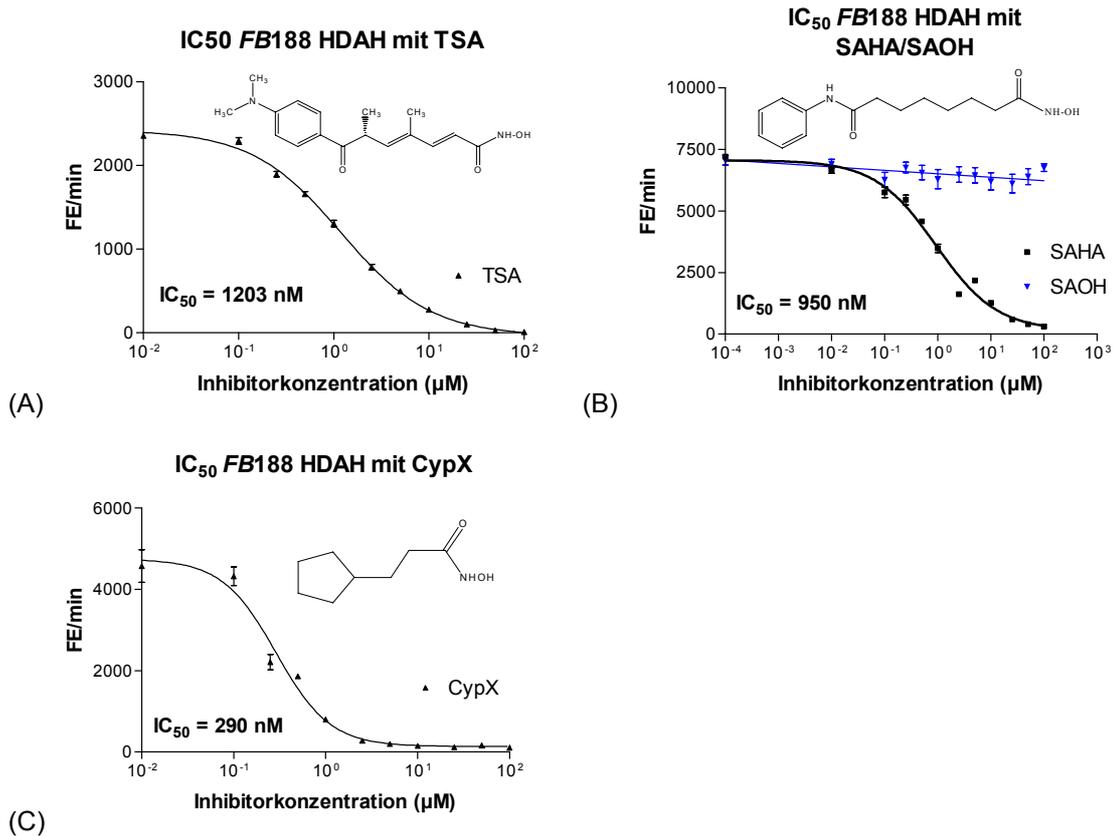


Abb. 4.28

IC<sub>50</sub>-Bestimmung von *FB188* HDAH mit TSA (A), SAHA/SAOH (B) und CypX (C). Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte sind jeweils unter der Kurve angegeben.

Für TSA (4.28(A)) konnte ein IC<sub>50</sub>-Wert von 1203 nM ermittelt werden. Dieser Wert liegt weitaus höher, als bisher bekannte Werte für HDACs. Für eine HDAC-Präparation aus Rattenleber, bzw. rekombinant exprimierte HDAC8 konnte über den Standard-HDAC-Assay ein Wert von 1,4 nM (Wegener *et al.*, 2003a) bzw. 53 nM (Wegener, 2004) errechnet werden. Aus der Literatur sind ebenfalls IC<sub>50</sub>-Werte für TSA bekannt, wobei diese in anderen Testsystemen oder unter Verwendung anderer Substrate ermittelt wurden. So wird für Rattenleber-Enzym ein Wert von 2,6 nM (Hoffmann *et al.*, 2001) und für HDAC8 100-300 nM (Hu *et al.*, 2003) angegeben. Alle aufgeführten Werte liegen deutlich unter denen für die für *FB188* HDAH ermittelten.

SAHA (4.28(B)) inhibiert die *FB188* HDAH in einem ähnlichen Konzentrationsbereich. Hier kann der IC<sub>50</sub>-Wert mit 950 nM angegeben werden. Aus der Literatur sind Werte von 9,6 nM (Wegener, 2004), 127 nM (Heltweg and Jung, 2002) und 259 nM (Heltweg and Jung, 2003), gemessen mit dem Rattenleber-Enzym, bekannt. Für die HDAC8 können

Werte von 400 nM (Wegener *et al.*, 2004.), 270 nM (Kapustin *et al.*, 2003) und 4000 nM (Vannini *et al.*, 2004) angegeben werden. Auch hier liegt der Wert für die *FB188* HDAH tendenziell etwas über den Literaturwerten, das Enzym scheint schlechter hemmbar. Der Einsatz von SAOH brachte keine nennenswerte Hemmung, ein Wert konnte nicht sinnvoll abgeleitet werden. Dies ist als Indiz zu sehen, dass es sich hier um ein Zink-abhängiges Enzym handelt ( s. 4.3.2).

Für CypX (4.28(C)) kann der  $IC_{50}$ -Wert mit 290 nM angegeben werden. Für Rattenleber-Enzym und HDAC8 sind Werte von 1000  $\mu$ M bzw. 2000  $\mu$ M veröffentlicht (Wegener, 2004). Somit ist CypX nicht nur als bester Inhibitor der verwendeten Substanzen zu betrachten, sondern gleichzeitig der erste selektive Inhibitor, der die *FB188* HDAH besser hemmt als Enzyme der Klasse der HDACs.

#### 4.9.2 Inhibition der *PA3774* HDAH mit Trichostatin A (TSA), Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) und Cyclopentyl- Propionyl-Hydroxamsäure (CypX) – Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte

Die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der HDAH aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde analog der *FB188* HDAH durchgeführt. Hierzu konnten folgende Werte ermittelt werden: Für TSA 92,5 nM, für SAHA 71,9 nM und für CypX 35,25 nM. Diese Werte entsprechen einer 10-bis 12- fach besseren Inhibition als bei der *FB188* HDAH. SAOH zeigte wie schon bei der *FB188* HDAH keinen inhibitorischen Effekt, womit auch bei der *PA3774* HDAH davon auszugehen ist, dass es sich um ein Zink-abhängiges Enzym handelt. In Tabelle 4.4 sind alle erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte plus die aus der Literatur bekannten  $IC_{50}$ -Werte zur Verdeutlichung in übersichtlicher Darstellung wiedergegeben.

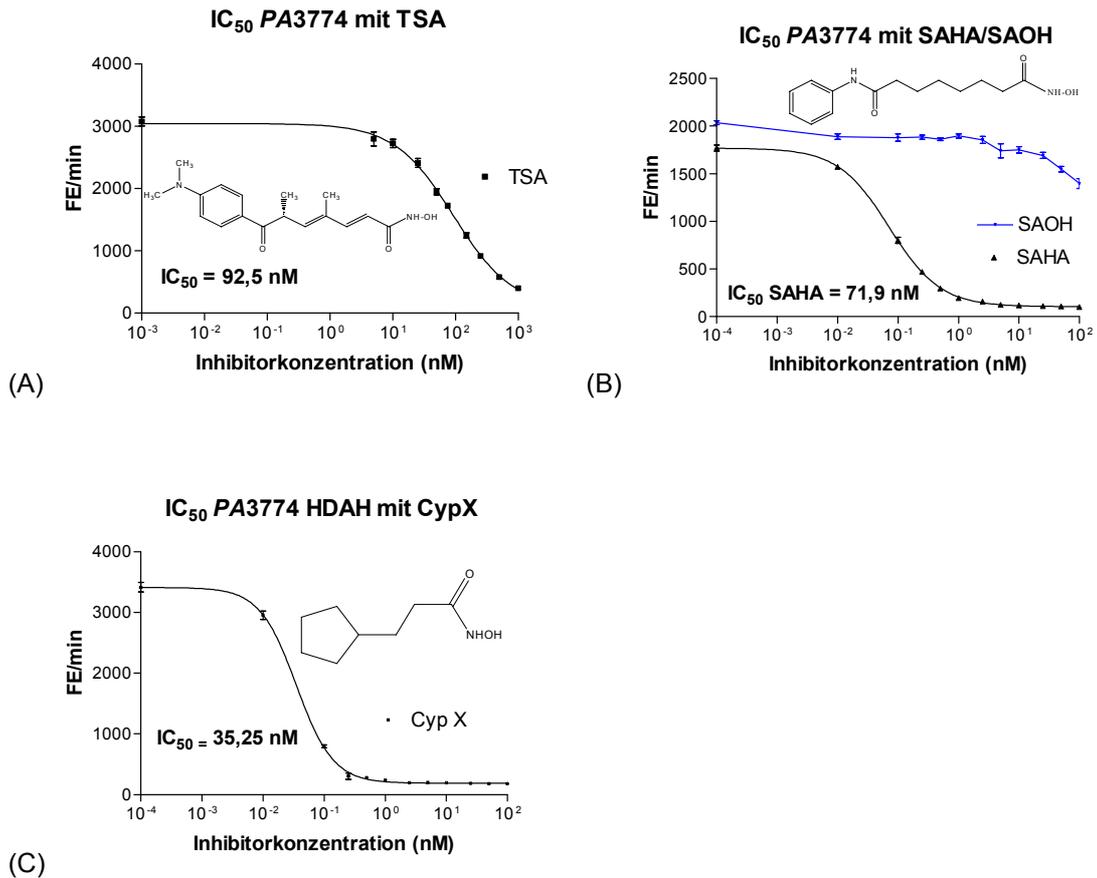


Abb. 4.29

IC<sub>50</sub>-Bestimmung von PA3774 HDAH mit TSA (A), SAHA/SAOH (B) und CypX (C). Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte sind jeweils unter der Kurve angegeben.

**Tab. 4.4: Darstellung der ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte (nM) im Vergleich mit bekannten Werten aus der Literatur. Mit # gekennzeichnete Werte wurden anhand anderer Testsysteme gewonnen**

Enzym	IC <sub>50</sub> TSA (nM)	IC <sub>50</sub> SAHA (nM)	IC <sub>50</sub> CypX (nM)
<b>FB188 HDAH</b>	1203 <sup>(1)</sup>	950 <sup>(1)</sup>	290
<b>PA3774 HDAH</b>	92,5	71,9	35,25
<b>Rattenleber HDAC</b>	1,4 <sup>(2)</sup> 2,6 <sup>(4)</sup> #	9,6 <sup>(3)</sup> 127 <sup>(6)</sup> # 259 <sup>(7)</sup> #	1000 <sup>(3)</sup>
<b>HDAC8</b>	53 <sup>(3)</sup> 100-300 <sup>(5)</sup> # 490 <sup>(8)</sup> #	400 <sup>(3)</sup> 4000 <sup>(8)</sup> # 270 <sup>(9)</sup>	2000 <sup>(3)</sup>

Referenzen: <sup>(1)</sup> (Hildmann *et al.*, 2004), <sup>(2)</sup> (Wegener *et al.*, 2003a), <sup>(3)</sup> (Wegener, 2004), <sup>(4)</sup> (Hoffmann *et al.*, 2001), <sup>(5)</sup> (Hu *et al.*, 2003), <sup>(6)</sup> (Heltweg and Jung, 2002), <sup>(7)</sup> (Heltweg and Jung, 2003), <sup>(8)</sup> (Vannini *et al.*, 2004), <sup>(9)</sup> (Kapustin *et al.*, 2003)

### 4.9.3 Inhibition durch putative Übergangszustandsmimetika

Finnin und Mitarbeiter leiteten aus der Röntgenstruktur des bakteriellen HDAC-ähnlichen Enzyms HDLP aus *Aquifex aeolicus* im Komplex mit den Inhibitoren TSA bzw. SAHA einen potentiellen Katalysemechanismus ab, den sie an jenen der Zink-Metalloproteasen und Serinproteasen anlehnten (Finnin *et al.*, 1999). Nach diesem Modell kommt es kurz vor der Spaltung der Amidbindung zur Ausbildung eines tetrahedralen Übergangszustandes am Carbonyl-Kohlenstoffatom mit Kontakten des Oxyanion-Intermediates zur Hydroxylgruppe des Tyrosin<sup>297</sup> und gleichzeitig zum Zink-Ion am Boden des hydrophoben Tunnels von der Enzymoberfläche zum aktiven Zentrum. Unter der berechtigten Annahme, dass nicht nur die Primärsequenzen sondern auch die Topologien der verschiedenen Enzyme der Deacetylase-Super-Familie (Leipe and Landsman, 1997) konserviert sind, sollten nicht-spaltbare Lysin-Derivate, die diesen tetrahedratischen Übergangszustand nachahmen potente HDAC-Inhibitoren sein.

Eine in der Literatur bekannte Substanzklasse, die diesen Übergangszustand nachahmt, sind die Phosphoamidate, wie am Beispiel des Thermolysins bewiesen ist (Holmes and Matthews, 1981; Nishino and Powers, 1979). Diese vermögen aber keine gesteigerte Inhibition von HDACs im Vergleich zu SAHA zu bewirken (Kapustin *et al.*, 2003). Um auch HDACs daraufhin zu überprüfen, wurde eine Methylsulfonsäure-Variante synthetisiert (D. Riester, Abb 4.30) und dem Standard-HDAC-Assay unterzogen. Allerdings zeigte diese Variante in Bezug auf die FB188 HDAH selbst bei Konzentrationen um 500  $\mu\text{M}$  keine nennenswerte Inhibition. Diese Ergebnisse gehen mit der Durchmusterung einer Inhibitorbibliothek von 9 verschiedenen Substanzen einher, bei denen Rattenleber-HDAC und rekombinant exprimierte HDAC8 ebenfalls keiner Inhibition unterlagen (Wegener, 2004).

Ac-Pro-Lys(R)-3-aminomethyl-benzoesäureamide [AcPK(R)-Ambs]

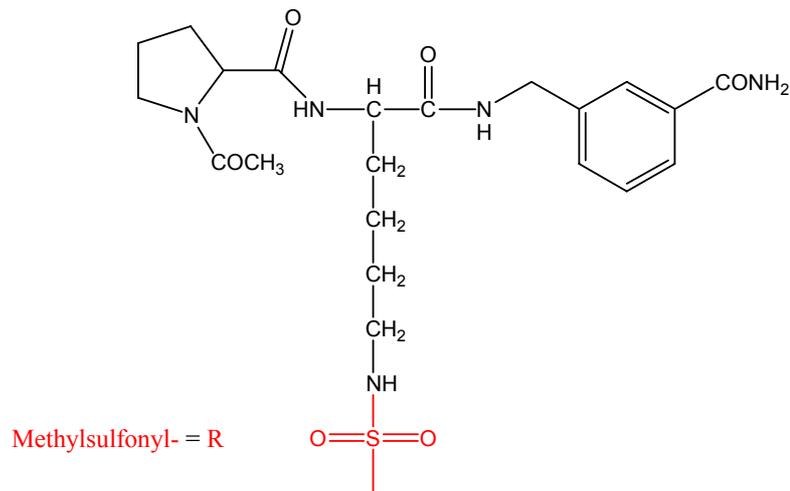


Abb. 4.30

Struktur des potentiellen Inhibitors Ac-Pro-Lys(Methylsulfonyl)-3-Aminomethyl-Benzoesäureamid.

4.9.4 Wachstumskurven von *FB188* mit HDAC-Inhibitoren

Um die biologische Funktion der *FB188* HDAH zu verifizieren, wurden Wachstumskurven vom Stamm *Bordetella/Alcaligenes FB188* in LB-Medium in Gegenwart der o.g. HDAC Inhibitoren aufgenommen. Die Konzentrationen der eingesetzten Inhibitoren lagen dabei weit über den ermittelten  $IC_{50}$ -Werten.

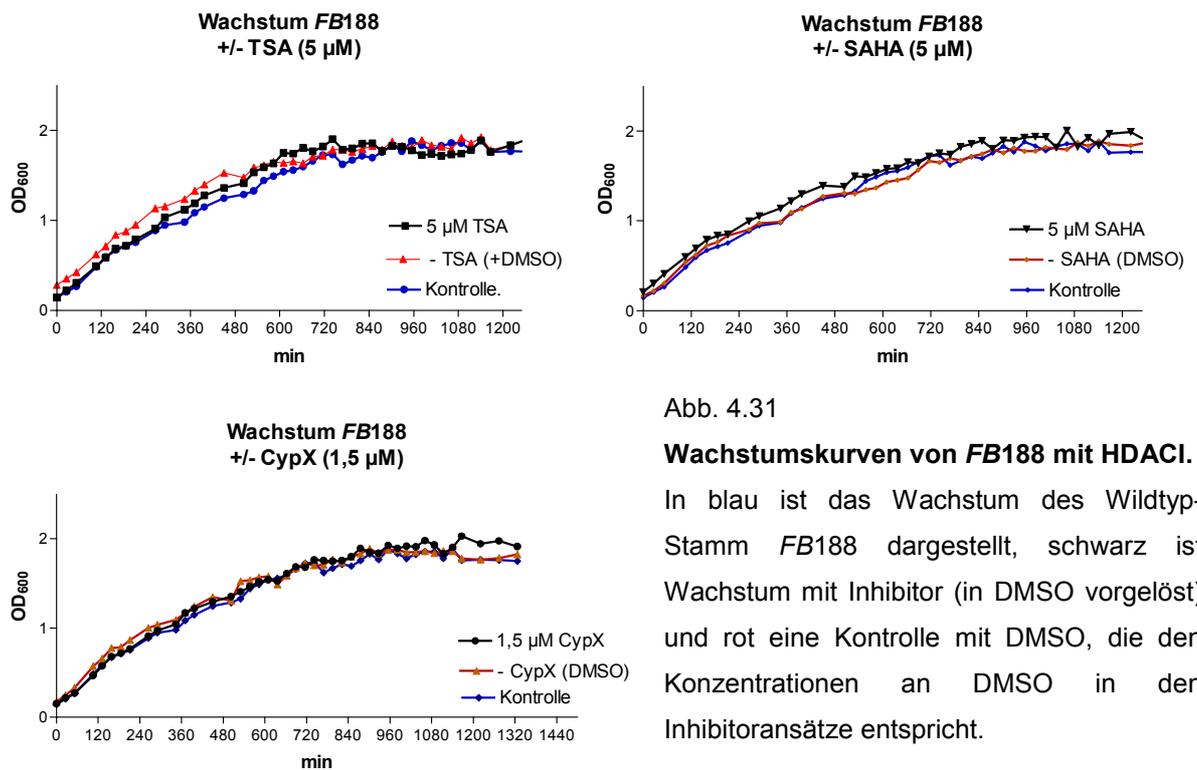


Abb. 4.31

**Wachstumskurven von *FB188* mit HDACI.**  
In blau ist das Wachstum des Wildtyp-Stamm *FB188* dargestellt, schwarz ist Wachstum mit Inhibitor (in DMSO vorgelöst) und rot eine Kontrolle mit DMSO, die den Konzentrationen an DMSO in den Inhibitoransätze entspricht.

In diesen Experimenten ist zu erkennen, dass die zugesetzten Inhibitoren keinen Einfluss auf das Wachstum des Stammes *FB188* (DMSZ 11172) haben.

## 4.10 Mutagenese-Studien der *FB188* HDAH zur Untersuchung des Katalysemechanismus – Austausch von essentiellen Aminosäuren

Anhand von Mutagenese-Studien sollte überprüft werden, ob der von Finnin (Finnin *et al.*, 1999) postulierte Reaktionsmechanismus auch für die *FB188* HDAH zutrifft. Die Zink-Abhängigkeit des Enzyms konnte bisher durch eine ICP-Analyse (4.3.2.1), Inhibitorstudien (SAHA im Vergleich zu SAOH, 4.9.1) und Salz-Abhängigkeitsstudien (4.7.3) verifiziert werden.

In der Aminosäuresequenz der *FB188* HDAH findet man alle essentiellen Aminosäuren die für den Katalysemechanismus des HDLP aus *A. aeolicus* verantwortlich sind (s. Einleitung) streng konserviert (Abb. 4.5) wieder. So sind die drei putativen Zink-Liganden Asp168, Asp 258 sowie His170 (Nummerierung nach HDLP *A. aeolicus*) genauso vorhanden (Asp180, Asp258 und His182) wie das Tyrosin 297 (Tyr312 in HDAH). Lediglich Asp173 als Komponente des zweiten His-Asp *charge relay* Systems kommt in der Sequenz der HDAH, Position 185, nicht vor. Diese Position ist mit einem Asparagin besetzt. Das erste His-Asp *charge relay* System ist mit den Aminosäuren His142 und Asp178 vertreten und zumindest das His132 des zweiten *charge relay* Systems aus *A. aeolicus* findet man konserviert in der Aminosäure His143 wieder.

Zur Untersuchung dieser und weiterer Aminosäuren sollten Mutanten generiert werden. Eine Darstellung der betreffenden Aminosäuren ist in Abb. 4.32 dargestellt. Die Aminosäuren sollten unter Änderung ihrer funktionellen Gruppen ausgetauscht werden, wobei Charakteristika, wie z.B. Größe, teilweise beibehalten werden sollten. Primer wurden unter Berücksichtigung der *codon usage* von *E. coli* gemäß den in Abb. 4.32 gezeigten Mutationen entworfen und die Mutanten über die Methode der *Quik<sup>TM</sup> change* Mutagenese (QCM) über PCR (3.2.13) hergestellt.

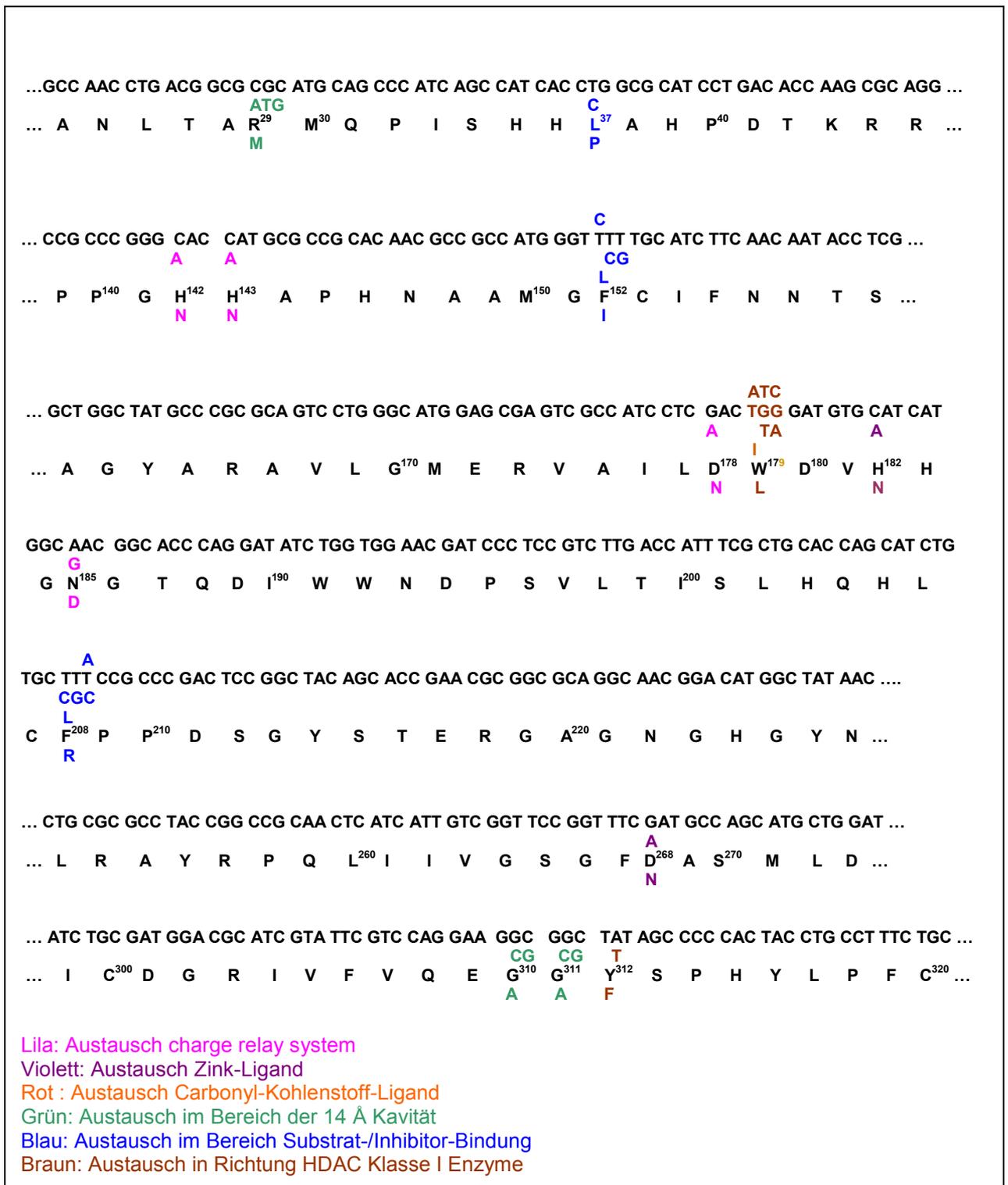


Abb. 4.32

Auszüge aus den Nukleotid- (jeweils obere Reihen) und Aminosäure-Sequenzen (jeweils untere Reihen) mit den vorgesehenen Austauschen. Farblich hervorgehoben sind die Austausche in den jeweiligen unterschiedlichen Regionen. Zahlenindizes an den Aminosäuren geben die Positionen in

FB188 HDAH an, Unterbrechungen in der Aminosäure- und Nukleotidabfolge sind mit ... gekennzeichnet.

Nach der Transformation von XL1 blue mit *DpnI*-verdauten PCR-Ansätzen wurden nach Ausplattieren und Wachstum ü.N. Einzelklone gepickt, diese ü.N. angezogen und Plasmid-DNA isoliert. Über eine Sequenzanalyse wurden die jeweils richtigen Klone identifiziert. Alle angestrebten Varianten konnten so hergestellt werden.

Eine Expression und Aufreinigung der Enzymvarianten erfolgte wie bereits beschrieben (3.3.1, 4.3.2). Mit Ausnahme der Mutante G311A konnten alle Enzymvarianten exprimiert werden. Zur Untersuchung der Mutanten wurde der Standard-HDAC-Assay verwendet. Neben dem Standardsubstrat Boc-Lys(Ac)-MCA wurde bei einigen Varianten zusätzlich Boc-Lys(TFA)-MCA eingesetzt. In Tab. 4.5 sind die kinetischen Parameter in Form von  $K_m$ - und  $v_{max}$ -Werten für die einzelnen Enzymvarianten dargestellt. Die Messungen erfolgten jeweils in Triplikaten. Zur Ermittlung dieser Werte ist zu erwähnen, dass die Substratkonzentration nicht mehr als 350  $\mu$ M im Assay betrug, also bei einigen Varianten nicht im Sättigungsbereich gemessen werden konnte.  $K_m$ -Werte wurden über den *Hanes-Plot* interpoliert und ermittelt, so dass Werte über 350  $\mu$ M Näherungswerte darstellen. Als Kontrolle wurde die Wildtyp-Variante ebenfalls gemessen, um bei späteren Vergleichen Werte, die unter den gleichen Bedingungen erhalten wurden, zu betrachten. Hierbei kamen leicht höhere  $K_m$ - (0,85 mM) und  $V_{max}$ -Werte (365 pmol/sec/mg) heraus, als in der vorherigen Bestimmung (4.7.4).

Tab. 4.5: Darstellung der kinetischen Parameter der FB188 HDAH Mutanten.

Position in HDAH FB188	Position in HDLP A. aeolicus	Funktion	Boc-Lys(Ac)-MCA		Boc-Lys(TFA)-MCA	
			K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (pmol/sec/mg)	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (pmol/sec/mg)
H142N	H131	inneres charge relay System	k.A.	k.A.		
D178S	D166	inneres charge relay System	k.A.	k.A.		
H143N	H132	äußeres charge relay System	1.095	48		
N185D	D173	äußeres charge relay System	0,200	70		
H182N	H170	Zn <sup>2+</sup> -Ligand	k.A.	k.A.		
D268N	D258	Zn <sup>2+</sup> -Ligand	0.728	23		
Y312F	Y297	Carbonyl-ligand	0.829	25	0,035	2241
G310A	G295	14 Å-Kavität	0.802	34	0,020	626
R29M	R27	14 Å-Kavität	0,082	431		
L37A	P22	Inhibitor-Bindung	2,142	229	n.e.	n.e.
F152I	F141	Inhibitor-Bindung	0,229	349		
F152R	F141	Inhibitor-Bindung	0.364	109		
F208L	F198	Inhibitor-Bindung	0.428	50		
F208R	F198	Inhibitor-Bindung	0.708	157		
W179I	L167	-> Klasse I	0,091	300		
W179L	L167	-> Klasse I	0.101	284		
Wt Kontrolle			0,085	365		
Wildtyp			0.014	136	0,039	137

k.A. bedeutet, dass keine Aktivität im HDAC-Standard-Assay nachgewiesen werden konnte. n.e. heisst nicht ermittelbar.

#### 4.10.1 Austausch der Aminosäuren des aktiven Zentrums

Die Veränderung der Aminosäuren des aktiven Zentrum hat gravierende Folgen bezüglich der Aktivität des Enzyms. So konnte in den Varianten für den Austausch der Zink-Liganden keine Aktivität (H182N) bzw. eine Verschlechterung des Umsatzes (D268N) nachgewiesen werden. Eine Abschwächung des Substratumsatzes lässt sich an einem niedrigeren  $V_{\max}$ -Wert ablesen. Gleichzeitig steigt der  $K_m$ -Wert, was für eine geringere Affinität des Enzyms gegenüber dem Substrat spricht, da die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erst bei höheren Substratkonzentrationen erreicht wird.

Mutanten mit Veränderungen im inneren His-Asp *charge relay* System (H142N, Abb. 4.33 B und D178S), welches für die Positionierung des für die Reaktion unerlässlichen Wassermoleküls und die Aufnahme eines Protons von diesem verantwortlich ist, zeigten ebenfalls keinen Umsatz. Die H143N-Variante (äußeres *charge relay* System) war ebenfalls nur sehr schwach aktiv. Der Austausch von N185D, welcher gemäss des Sequenzalignments (Abb. 4.5) das in dem HDLP vorhandene und damit das postulierte His-Asp *charge relay* System wiederherstellt, führte zu einer leichten Aktivitätsminderung des Enzyms.

Die Mutante mit dem Austausch des für die Bindung der Carbonyl-Gruppe verantwortlichen Tyrosins 297 (Position 312 in FB188 HDAH, Abb. 4.33 C) zu Phenylalanin zeigt ebenfalls nur einen schwachen Umsatz des acetylierten Substrats. Unter Verwendung des Boc-Lys(TFA)-Substrates lässt sich dieser Negativeffekt jedoch nicht feststellen, der  $K_m$ -Wert liegt im Bereich des Wertes vom Wildtyp-Enzym, der  $V_{\max}$ -Wert weit über dem für das Wildtyp-Enzym gemessenen.

In Abb. 4.33 sind zur Verdeutlichung die Auswirkung der Aminosäureaustausche auf das Bindungsverhalten am Beispiel des Inhibitors TSA exemplarisch für die beiden Mutanten H142N und Y297F dargestellt.

Zusammenfassend ist zu diesen Ergebnissen zu sagen, dass sämtliche Austausche der für den postulierten Reaktionsmechanismus verantwortlichen Aminosäuren einen negativen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hatten. In den deutlichsten Fällen konnte keine Restaktivität mehr verzeichnet werden. Zusätzlich erhärten sich hiermit die schon vorher gewonnen Evidenzen für eine Zink-Abhängigkeit des Enzyms, da diese entsprechenden Zinkliganden-Mutanten das Substrat nur schwach bis gar nicht umsetzten.

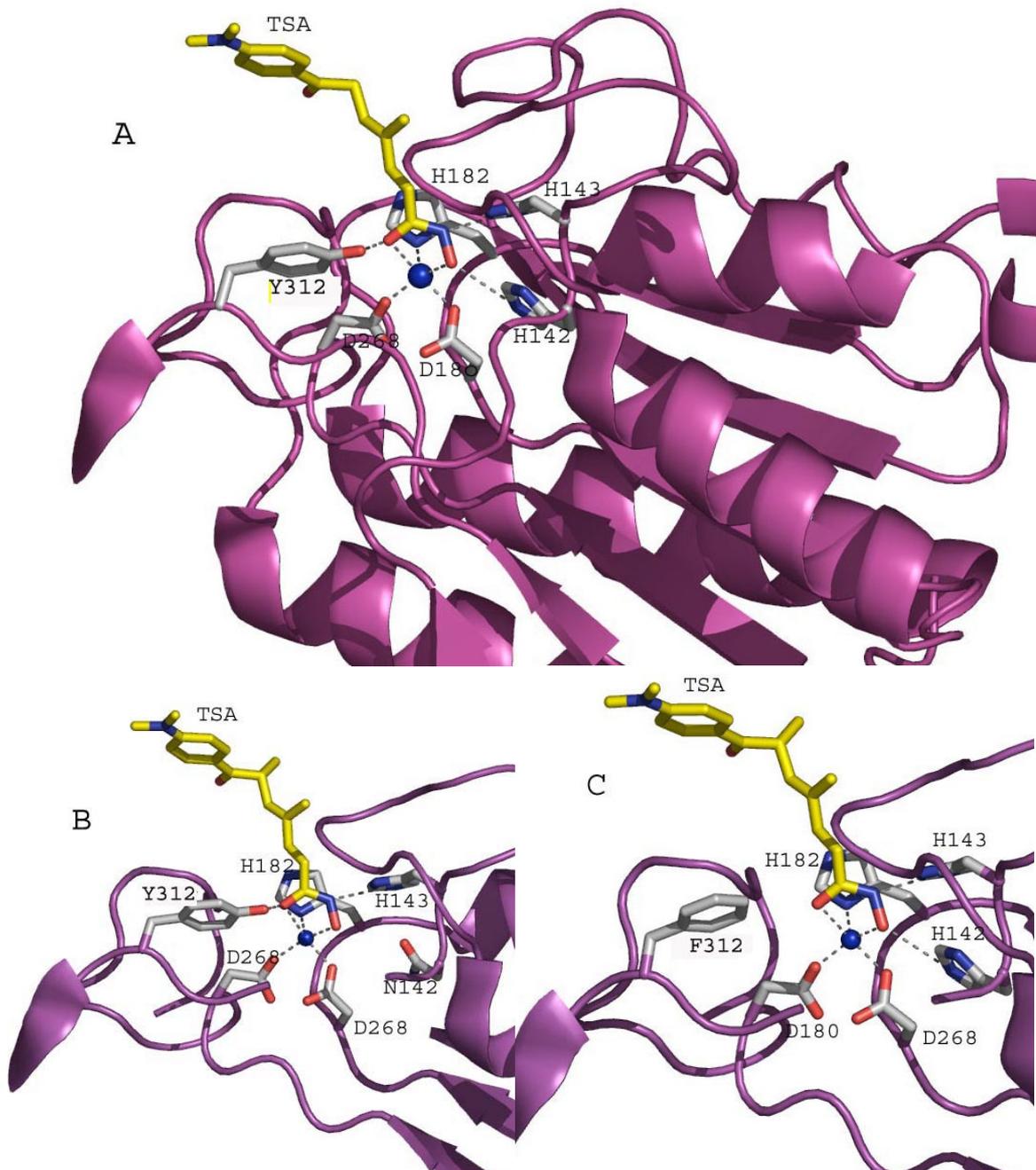


Abb. 4.33

**Darstellung des reaktiven Zentrum der FB188 HDAH**

(A) Wt-FB188 HDAH, (B) H142N, (C) Y312F

Modellierung des reaktiven Zentrum der FB188 HDAH auf Basis des *A. aeolicus* HDLP (Finnin *et al.*, 1999). Datensatz 1C3P (<http://www.rcsb.org>) diente als Grundlage, nachträgliches Einfügen von TSA und den Mutationen H142N sowie Y312F in pyMol (V.0.97). Die Beschriftungen entsprechen den Aminosäuren der FB188 HDAH, das Zink-Atom ist blau dargestellt. Wechselwirkungen zwischen den jeweiligen Atomen sind durch gestrichelte Linien (schwarz) dargestellt. In diesen Abbildungen wurde nur das reaktive Zentrum dargestellt, für diese Betrachtungen störende Aminosäuren wurden nicht abgebildet.

#### 4.10.2 Austausch von Aminosäuren in der Substratbindungstasche

Neben der gezielten Mutagenese von Aminosäuren des aktiven Zentrums wurden zusätzlich Mutanten generiert, die Aufschluss über Substrat-Bindung bzw. Inhibitor-Bindung geben sollten. Diese ausgewählten Aminosäuren kleiden mit ihren aliphatischen Resten die Innenseite der Substratbindungstasche aus und bilden Kontakte zum Substrat bzw. Inhibitor aus. Für die ausgewählten Positionen (F141, F198 in HDLP, F152 und F208 in HDAH), die potentielle Wechselwirkungspartner mit dem aromatischen Ring von Inhibitoren wie TSA oder SAHA sind, wurden jeweils zwei Mutanten hergestellt. Zum einen wurden beide Positionen mit einem Arginin ausgetauscht, zum anderen wurde eine Variante mit einem Leucin (F208L) und eine Variante mit einem Isoleucin (F152I) generiert. Beide Varianten der Position 152 zeigten einen geringfügig niedrigeren Umsatz bezüglich des acetylierten Substrates, die Mutanten der Position F208 einen wesentlich geringeren Umsatz. Die dritte Aminosäureposition die untersucht wurde, war das Prolin 22 am potentiellen Eingangsbereich der Substratbindetasche des *A. aeolicus* HDLP. Diese Position bildet vermutlich ebenfalls Kontakte zu den aromatischen Ringen der Inhibitoren aus. In der *FB188* Sequenz fehlt dieses gänzlich und das *Alignment* zeigt an dieser Position ein Leucin (L37). Hier wurde ein Austausch gegen Alanin vorgenommen, der einen erheblich schlechteren  $K_m$ -Wert hervorruft als die Wildtyp-Variante. Der  $V_{max}$ -Wert bleibt davon jedoch fast unberührt. Für den Umsatz von Boc-Lys(TFA)-MCA konnten leider keine Werte ermittelt werden. Hier war am Reaktionsverlauf zu erkennen, dass dieses Substrat schneller umgesetzt wird als vom Wildtyp-Enzym, was an einer höheren Fluoreszenzentwicklung pro Minute abzulesen war. Allerdings scheint dieser Reaktionsverlauf keiner üblichen Michaelis-Menten-Kinetik zu folgen, da über einen Hanes-Plot keine kinetischen Parameter in Form von  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werten abgeleitet werden konnten.

Um nicht nur die Auswirkungen der Aminosäureaustausche auf den Substrat-Umsatz sondern auch auf das Verhalten der Substrat-/Inhibitor-Bindung zu untersuchen, wurden einige der Mutanten mit SAHA und zwei neue Inhibitoren, SpABaHA (suberoyl-para-Amino-Benzoeacid-Hydroxamic-Acid) und SGlyHA (suberoyl-glycin-Hydroxamic-Acid) vermessen (siehe Tab. 4.6). Die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte erfolgte analog der bereits durchgeführten Experimente (3.4.5.2; 4.9). Die o.g. Inhibitoren sind an der Grundstruktur von SAHA angelehnt, die Hydroxamsäure sowie die Linker-Regionen sind identisch, die

Kopfgruppe wurde allerdings ausgetauscht (Abb. 4.34). Die SpABaHA-Variante ist im Vergleich zu SAHA mit einem zusätzlichen Carbonsäurerest am Aromaten versehen, was zu einer geladenen Kopfgruppe führt. Bei der SGlyHA-Variante wurde der Aromat gegen einen Glycin-Rest ausgetauscht, was zu einem kleineren Volumen bei Einführung einer Ladungskomponente (Carbonsäure) führt.

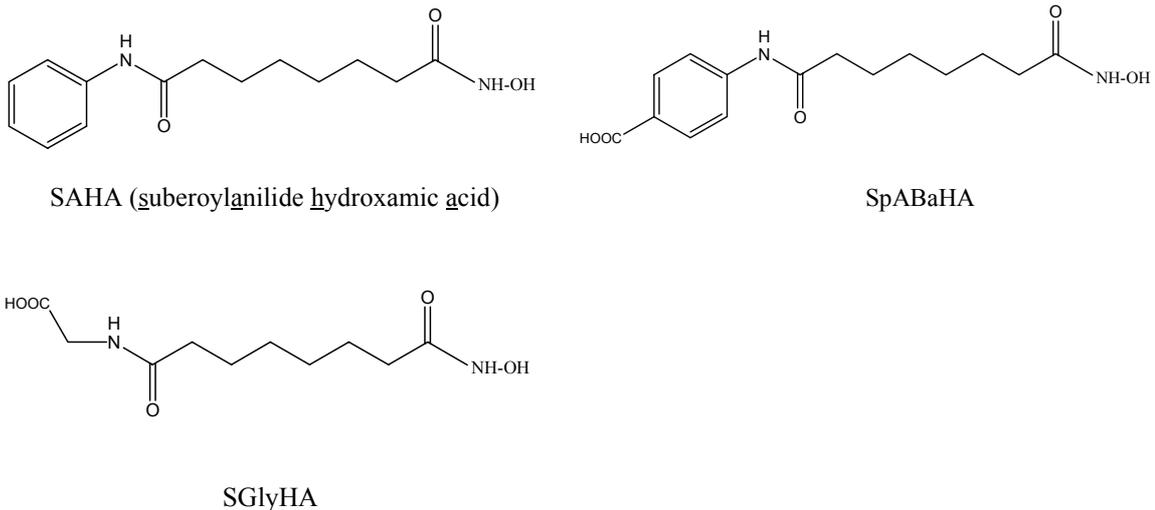


Abb. 4.34

Strukturen des Inhibitors SAHA und der modifizierten SAHA-Varianten SpABaHA und SGlyHA

Mit dem Wildtyp-Enzym und dem Boc-Lys(Ac)-MCA zeigten alle drei Inhibitoren vergleichbare  $IC_{50}$ -Werte. Für SAHA wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von  $0,95 \pm 0,06 \mu\text{M}$ , für SGlyHA ein Wert von  $3.189 \pm 0,828$  und für SpABaHA ein Wert von  $0,661 \pm 0,044$  erhalten. Mit dem Boc-Lys(TFA)-MCA-Substrat ergaben sich deutlich höhere  $IC_{50}$ -Werte, wobei zusätzlich die Unterschiede zwischen den  $IC_{50}$ -Werten verschiedener Inhibitoren deutlicher wurden. Für SAHA wurde hier ein  $IC_{50}$ -Wert von  $7,89 \pm 4,017$  ermittelt und für SGlyHA ergab sich ein  $IC_{50}$ -Wert von  $58,36 \pm 233$ .

Für die F152I-Mutante erhalten wir  $IC_{50}$ -Werte von  $1,355 \pm 0,197$  für SAHA, 2748 für SGlyHA und  $5,654 \pm 3,674$  für SpABaHA.

Die  $IC_{50}$ -Werte der F152R-Mutante können mit  $1.327 \pm 0,361$  (SAHA), 2816 (SGlyHA) und  $3,104 \pm 1,288$  (SpABaHA) angegeben werden.

Aus diesen Versuchen kann als Ergebnis herausgestellt werden, dass die Bindung von SpABaHA im Gegensatz zu SAHA im Wildtyp-Enzym verbessert werden konnte. Hier scheint die Einführung einer Ladungskomponente (Carbonsäure am Aromaten) die

Bindungseigenschaften des Inhibitors zu verbessern. SGlyHA zeigt schon ein schlechteres Bindungs- und somit Inhibitions-Verhalten. Ein Austausch des Phenylalanins<sup>152</sup> führt in beiden Mutanten unter Einsatz von SAHA nur zu einem leicht höheren IC<sub>50</sub>-Wert. Hier scheint der Austausch des Aromaten hin zu einem kleineren ungeladenen Rest (F152I) bzw. zu einem länger-kettigen, polaren Rest (F152R) keine größeren Auswirkungen zu haben. IC<sub>50</sub>-Bestimmungen mit SGlyHA hingegen führen zu einer drastischen Abnahme der Bindungsaffinität des Inhibitors bei beiden Varianten. Fehlt die aromatische Komponente des Phe 152, ist zumindest die Bindungseigenschaft bezüglich Inhibitoren mit nicht aromatischer Kopfgruppe drastisch reduziert.

Unter Verwendung des Boc-Lys(TFA)-MCA-Substrates ist die Inhibition durch SAHA und SGlyHA beim Wildtyp-Enzym schlechter als im Vergleich zum Boc-Lys(Ac)-MCA-Substrat.

**Tab. 4.6. Darstellung der Ergebnisse der Inhibitionsversuche mit SAHA, SGlyHA und SpABaHA mit den FB188 HDAH Substrat-/Inhibitor-Bindungsmutanten**

Position in HDAH FB188	Position in HDLP A. <i>aeolicus</i>	Boc-Lys(Ac)-MCA			Boc-Lys(TFA)-MCA	
		IC <sub>50</sub> SAHA (µM)	IC <sub>50</sub> SGlyHA (µM)	IC <sub>50</sub> SpABaHA (µM)	IC <sub>50</sub> SAHA (µM)	IC <sub>50</sub> SGlyHA (µM)
F152I	F141	1,355 ± 0,197	2748	5,654 ± 3,674		
F152R	F141	1.327 ± 0,361	2816	3,104 ± 1,288		
Wildtyp		0,95 ± 0,06	3.189 ± 0,828	0,661 ± 0,044	7,89 ± 4,01	58,36 ± 233

### 4.10.3 Austausch von Aminosäuren in der unteren Kavität sowie Mutationen in Richtung der HDAC-Klasse I - Enzyme

Am Übergang des aktiven Zentrums zur sog. 14Å-Kavität liegen die beiden Glycine 295 und 296 (gemäß HDLP), die ebenfalls in der *FB188* HDAH zu finden sind (G310 und G311). Diese bilden nach Betrachtung der Struktur der HDLP den Eingangsbereich dieser Kavität aus.

In der neuesten Literatur wurde eine Theorie diskutiert, bei der das abgespaltene Acetat über die untere Kavität das Enzym wieder verlässt (Wang *et al.*, 2004). Dieser Austritt des Acetats soll über zwei, in der Kavität liegende Arginine katalysiert werden (R16 und R27), an denen das Acetat sozusagen „entlang gereicht“ wird. Diese beiden Arginine sind jedoch nicht in der Sequenz der *FB188* HDAH konserviert. Mit Hilfe eines Sequenzvergleiches konnte in der näheren Umgebung ein Arginin (R29) identifiziert werden, welches für diesen Vorgang in Frage kommt. Um nun die Hypothese des Acetylübertrags innerhalb der internen Kavität über Arginin(e) zu überprüfen, wurde eine R29M Mutante hergestellt. Ein Fehlen dieses Arginins könnte zum schlechteren Abtransport und somit zu einer Anhäufung des Acetyls in der Kavität führen, was einen schlechteren Substratumsatz erwarten lassen würde. Diese Variante zeigt jedoch keine verminderte Aktivität,  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wert liegen im Bereich des Wildtyp-Kontroll-experiments. Somit kann diese hypothetische Vorstellung zumindest für die *FB188* HDAH nicht bestätigt werden.

Die Variante G311A konnte nicht exprimiert werden, die Variante G310A zeigt eine um Faktor 10 abgeschwächte Aktivität gegenüber dem Wildtyp-Enzym (s. Tab.4.5). Der  $K_m$ -Wert ist 10-fach höher und der  $V_{max}$ -Wert ist um das 10-fache niedriger. Man kann hier die Vermutung äußern, dass die geringfügige Vergrößerung durch Einführung einer zusätzlichen Methylgruppe durch Substitution von Glycin durch Alanin den Eingang zur Kavität teilweise blockiert und so für den geringeren Substratumsatz verantwortlich ist, da das abgespaltene Acetat diese Stelle nicht mehr ideal passieren kann.

Als letztes wurde die Position 167 (HDLP) untersucht. Während HDACs der Klasse II hier streng konserviert ein Tryptophan aufweisen (W179 in HDAH), beherbergen HDACs der Klasse I dort ein Leucin oder Isoleucin (Grozinger and Schreiber, 2002). Um mögliche Unterscheidungen von Klasse I und Klasse II Enzymen zu verifizieren, wurden zwei Mutanten (W179I, W179L) hergestellt und deren Reaktionskinetiken untersucht.

Allerdings hatten beide Mutationen keine Auswirkung auf die Aktivität der Enzyme. Die  $K_m$ - bzw.  $V_{max}$ -Werte der Varianten W179I und W179L lagen im Bereich der Werte der für das Wildtyp-Enzym ermittelten.

## 4.11 Erste Experimente zur Identifikation des natürlichen Substrates der *FB188* HDAH

In den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Polyamine aufgrund ihres nur sehr moderaten Umsatzes vermutlich nicht die natürlichen Substrate der Histondeacetylase-ähnlichen Amidohydrolase aus *FB188* darstellen (4.6.1). Nachdem die Fähigkeit zur Deacetylierung von radioaktiv markierten Histonen nachgewiesen wurde (4.6.3), stellte sich die Frage, ob vielleicht (poly)-peptidische Substrate die natürlichen *targets* der HDAHs sind. Zu diesem Zweck wurde die *FB188* HDAH mit tripeptidischen Substraten vermessen (4.7.5). Hier kam als Ergebnis heraus, dass einige Substrate umgesetzt werden, andere wiederum nicht, also die Prozessierung des Substrats stark von der Aminosäureabfolge abhängig ist.

Grundsätzlich ist zu sagen, dass ein acetyliertes Lysin als Substrat (z.B. Boc-Lys(Ac)-MCA) vom Enzym erkannt wird und die Spaltung von tripeptidischen Substraten (AS<sub>1</sub>-AS<sub>2</sub>-Lys(Ac)-MCA) vom unmittelbaren Sequenzkontext abhängig ist (Hildmann *et al.*, 2004). Dies führt zu der Annahme, dass durchaus peptische Substrate die natürlichen Aktionspartner der *FB188* HDAH darstellen könnten. Nach dieser Annahme sollten im Zellextrakt von *FB188* acetylierte (Poly-)Peptide zu finden sein.

Um diesen Ansatz zu überprüfen, wurde Zellextrakte aus verschiedenen Organismen untersucht. Hierbei kamen Zellextrakte aus *FB188*, *E. coli* XL1 blue, *Bacillus subtilis*, *Methanosarcina mazei* und *Thermotoga maritima* zum Einsatz. Extrakte aus *FB188*, *E. coli* XL1 blue und *B. subtilis* wurden selbst aus ü.N.-Kulturen hergestellt, Extrakte aus *M. mazei* und *T. maritima* waren freundliche Leihgaben von R. Schmitz-Streit (*M. mazei*) bzw. W. Streit (*T. maritima*). Der Nachweis von acetylierten Proteinen sollte mit Hilfe des polyklonalen *anti-acetylated-proteins Antibody* (ab193) der Firma Abcam erbracht werden. Hierbei handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper, der in, gegen Histon H4 immunisierten Kaninchen, hergestellt wurde. Laut Hersteller- und Literaturangaben (Hebbes *et al.*, 1988) reagiert dieser Antikörper auch gegen andere,  $\epsilon$ -acetylierte Proteine, unter anderem Histone, BSA, E2F, PCAF, Importin, GATA1, BRCA2 und Rb. Allerdings befindet sich hierunter kein Beispiel aus Prokaryonten. Eine Kreuzreaktion gegenüber N-terminalen Acetylierungen konnte nicht nachgewiesen werden (Hebbes *et al.*, 1988).



10% SDS-PAA Gel, Western Blot  
 1.AK: ab193, *anti-acetylated proteins-antibody* aus Kaninchen (Abcam)  
 2.AK: anti rabbit (Sigma)  
 M: Prestained Protein Ladder  
 1: *E.coli* (XL1blue)  
 2: *FB 188*  
 3: *Thermotoga maritima*  
 4: *Methanosarcina mazei*  
 5: *Bacillus subtilis* (DSM 347)

Abb. 4.35 Western Blot von Gesamtzellextrakten verschiedener Bakterien

In Abb. 4.35 kann man erkennen, dass es in den Zellextrakten aller getesteten Stämmen mit dem Antiserum markierbare und somit acetylierte Proteine gibt. Diese sind sowohl in gram-negativen Bakterien (*E. coli*) als auch in Archäen (*M. mazei*) zu finden. Im *Western Blot* erkennt man in relativ guter Auflösung Banden im Bereich zwischen 40 kDa und 70 kDa. Hier fallen vor allem die Banden bei ca. 70 kDa in Spur 1, 2, und 4 auf. Man könnte die Vermutung aufstellen, dass es sich hierbei um homologe Proteine ähnlicher Größe handelt. Das bisher bekannte CheY aus *E. coli* (Barak and Eisenbach, 2001) besitzt eine Größe von ca. 14 kDa, somit liegt es nicht im Bereich der dicken Bande in Spur 1.

Nachdem der Nachweis von acetylierten Proteinen in Prokaryonten erbracht worden war, stellt sich die Frage, ob die *FB188* HDAH in der Lage ist, diese acetylierten Proteine zu prozessieren. Dazu wurden gleiche Mengen Zellextrakt sowohl mit als auch ohne *FB188* HDAH ü.N. inkubiert und als Folgeaktion sollte bei erfolgreicher Deacetylierung eine Abnahme bzw. ein Verschwinden von Banden im *Western Blot* zu verzeichnen sein. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Form eines *Western Blots* in Abb. 4.36 dargestellt. In diesem Versuchsteil wurde zusätzlich noch Zellextrakt aus *Staphylococcus simulans* (DSM 20322) verwendet.

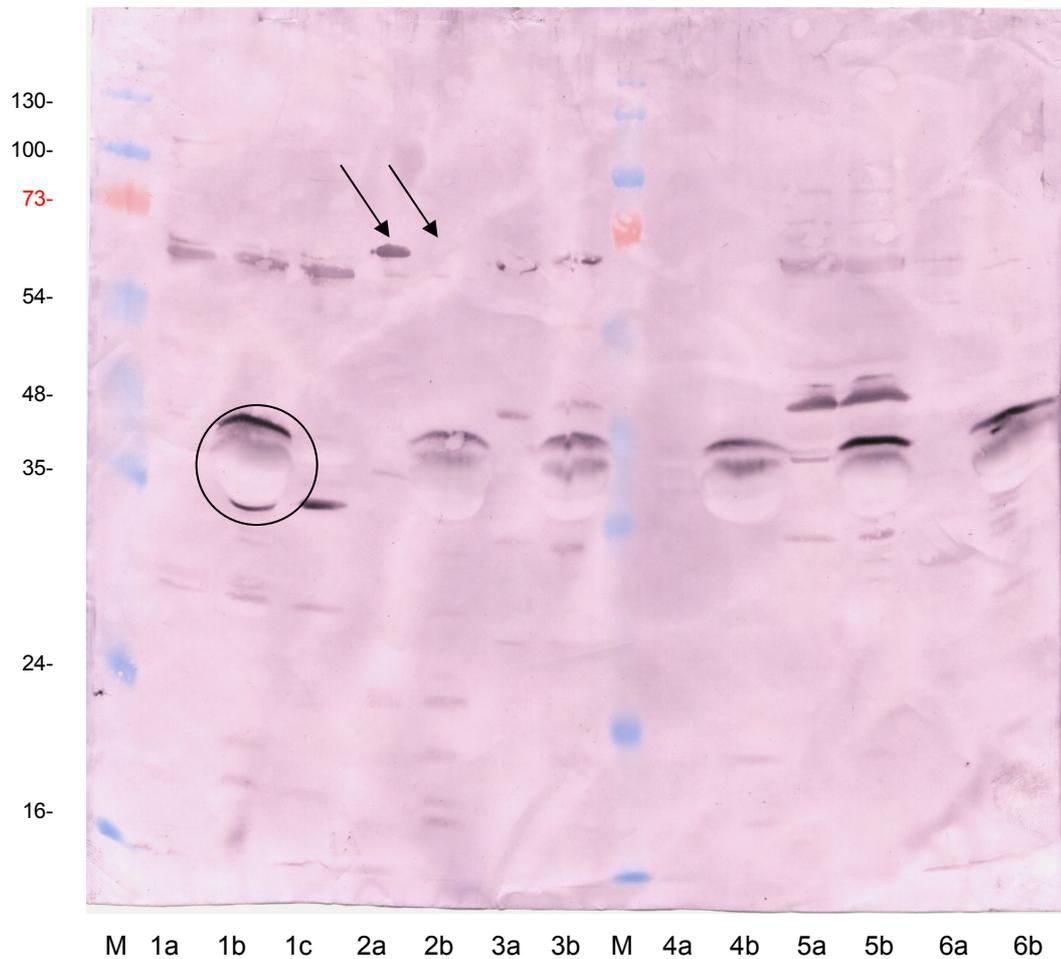


Abb. 4.36 Western Blot von Gesamtzell-extrakt jeweils mit und ohne HDAH-Behandlung. Die Pfeile geben die die Position des Signals ohne / mit HDAH-Behandlung von FB188 Zell-extrakt an. Der Kreis zeigt beispielhaft eines der durch HDAH hervorgerufenen Artefakte im *Western Blot*.

12% SDS-PAA Gel, Western Blot

1.AK: ab193, anti-acetylated proteins- antibody aus Kaninchen (Abcam)

2.AK: anti rabbit (Sigma)

1: *Escherichia coli* (XL1-blue)

2: *FB 188*

3: *Methanosarcina mazei*

4: *Staphylococcus simulans* (DSM 20322)

5: *Thermotoga maritima*

6: *Bacillus subtilis* (DSM 347)

M: Prestained Protein Ladder (MBI, ~10-180kDa)

a: Gesamtzell-extrakt (ohne HDAH-Behandlung )

b: Gesamtzell-extrakt (mit HDAH-Behandlung )

c: Gesamtzell-extrakt von XL1-blue mit Coexpression HDAH *FB188*

Alternierend wurden Ansätze ohne und mit HDAH-Behandlung aufgetragen. Im Bereich von ca. 35-45 kDa erkennt man in jeder zweiten Spur eine Doppelbande (siehe Kreis) auf dem *Western Blot*. Hierbei handelt es sich um die Verdauansätze mit HDAH. Diese ist in sehr hoher Konzentration vorhanden und verursacht eigenartiger Weise ebenfalls ein Signal. Dies ist ebenfalls in Spur 1c zu erkennen, indem die HDAH in XL1 Blue koexprimiert wurde.

In dem Stamm FB188 kann das Wegfallen einer Bande beobachtet werden. Hier scheint die HDAH ein Protein in Höhe von ca. 65 kDa deacetyliert zu haben. In allen anderen Spuren konnte keine Veränderung des Bandenmusters nach Zugabe von HDAH festgestellt werden. Dieser Versuch wurde mehrere Male wiederholt, um einen deutlicheren *Western Blot* zu erhalten. Zudem wurde versucht, die HDAH vor Auftrag auf das PAA-Gel über  $Zn^{2+}$ -Sephrose aus den Reaktionsansätzen zu entfernen. Leider gelang es nicht, diesen Versuch mit einem kompletten Verschwinden der Bande bei ca. 65 kDa in FB188 zu reproduzieren. Es konnte immer nur eine teilweise Abnahme der Intensität der Bande in Höhe von 65 kDa verzeichnet werden.

Um das Signal im *Western Blot* weiter zu analysieren, wurden Proteinase K-, Trypsin- und Pepsin-Verdaue des FB188 Zellextraktes durchgeführt. Hierbei konnte ein Verschwinden der Bande im Bereich von 65 kDa nach Zusatz dieser Proteasen beobachtet werden. Zusätzlich wurde der Zellextrakt mit DNase, Ethidiumbromid und RNase inkubiert. Nach dieser Behandlung blieb das Bandenmuster im *Western Blot* allerdings unverändert. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass es sich bei der Bande von ca. 65 kDa um ein Protein zu handeln scheint, da ein Protease-Verdau positiv verläuft. Ein Nukleinsäure-Ursprung kann ausgeschlossen werden, da DNase- und RNase-Verdau negativ sind und auch eine Ethidiumbromid-Behandlung keine Auswirkungen (*shift*, o.Ä.) auf die Bande im *Western Blot* zeigt.

## 4.12 Kristallisation der *FB188* HDAH

Für röntgenkristallographische Analysen sollten Kristalle der *FB188* HDAH hergestellt werden. Diese Versuche wurden nach erfolgreicher Expression der *FB188* HDAH und Aufreinigung über  $\text{Zn}^{2+}$ -IMAC (4.3.2) und nach Herstellung einer Selenomethionin-Variante des Enzyms (4.3.3), welche ebenfalls über  $\text{Zn}^{2+}$ -IMAC aufgereinigt wurde, von T. Kragh Nielsen aus der Abteilung Molekulare Strukturbiologie unseres Institutes durchgeführt. Hierzu wurden zahlreichen Kristallisationsbedingungen getestet und es konnten auf Anhieb Kristalle unter verschiedenen Bedingungen der *FB188* HDAH generiert werden. Exemplarisch sind in Abb. 4.37 einige Kristalle abgebildet.

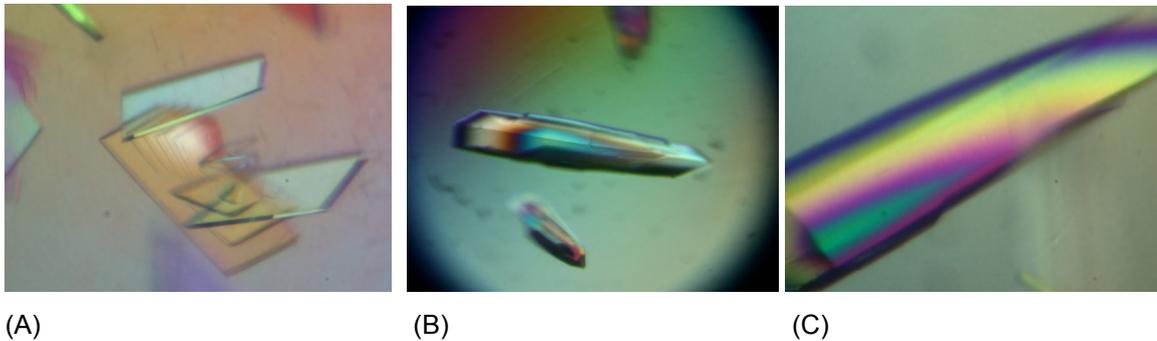


Abb. 4.37

Kristallisation der *FB188* HDAH

(A) Imidazol-Malat-Puffer, pH = 5.25, 5% PEG 400, (B) Imidazol-Malat-Puffer, pH = 7.0, 10-15 % PEG 600, (C) Imidazol-Malat-Puffer, pH = 7.0, 22,5 % PEG 4000

## 5. Diskussion

Auf der Suche nach einem Enzym für den Einsatz in Biotransformationen konnte gemäß der gewünschten Reaktion, einer Deacetylierung, ein Enzym isoliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die Funktion dieses Enzyms näher charakterisiert werden. Hierzu wurde zunächst ein *blast search* mit der erhaltenen Sequenz nach erfolgreicher Klonierung des Leserahmens durchgeführt, um Verwandtschaften zu anderen Enzymen aufzuklären und eventuell eine Zugehörigkeit in eine bestimmte Enzymklasse zu finden. Hierbei kamen hohe Verwandtschaftsgrade zu drei Enzymklassen zu Tage. Zum einen handelt es sich um die Acetylpolyamin-Amidohydrolasen (APAHS), welche größtenteils in Bakterien anzutreffen sind und als natürliche Substrate Acetyl-Polyamine in Form von Acetyl-Cadaverin, Acetyl-Putrescin, Acetyl-Spermidin und ähnlichen Substanzen deacetylieren. Als Beispiel dieser Enzymklasse sei an dieser Stelle die APAH aus *M. ramosa* erwähnt, welche von der Arbeitsgruppe um Sakurada charakterisiert wurde (Sakurada *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurde ein hoher Anteil von Sequenzähnlichkeiten in den eukaryontischen Histon-Deacetylasen (HDACs) wiedergefunden. Die dritte Klasse stellen die *acetoin utilisation proteins* (AcuCs) dar. Somit bieten sich Vergleichsmöglichkeiten mit Enzymen dieser drei Klassen an.

Nach der Zusammenstellung eines Sequenz-*alignments* (Abb. 4.5), bestehend aus Sequenzen, die hauptsächlich ihren Ursprung in der Klasse der APAHS haben, aber auch unter Berücksichtigung der HDAC6 (weist den höchsten Ähnlichkeitsgrad innerhalb der Klasse der HDACs mit der Sequenz der FB188 HDAH auf) und des *histone-deacetylase like proteins* (HDLP) aus *A. aeolicus*, konnten einige Unterschiede zu Enzymen dieser beiden Klassen herausgestellt werden.

Eine der großen Fragestellungen ist in diesem Zusammenhang, ob es sich bei der FB188 HDAH um ein Zink-haltiges und -abhängiges Enzym handelt.

Einen weiteren Betrachtungspunkt stellt die Substratspezifität der HDAHs dar. Hier wurden in verschiedenen Assays unterschiedliche, mögliche Substrate der HDAHs vermessen und analysiert. Darüberhinaus wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt und verschiedene bekannte HDAC-Inhibitoren sowie auch neuartige Inhibitoren ausgelotet.

Schließlich wurde über Mutagenese-Studien versucht, einen postulierten Katalysemechanismus (Finnin *et al.*, 1999) zu verifizieren. Essentielle Aminosäuren

wurden per *Quick change* Mutagenese ausgetauscht und diese Mutanten, unter der Annahme, dass sie in Analogie zum Wildtyp-Enzym falten, untersucht.

All diese Experimente sollten zur Charakterisierung der Enzyme der Klasse der HDAHs, hauptsächlich der *FB188* HDAH, aber auch der *PA3774* HDAH, beitragen, um die Funktion dieser neuartigen Enzymklasse besser zu verstehen.

## **5.1 Analyse der Gene der *FB188* HDAH und der *PA3774* HDAH**

Nach erfolgreicher Klonierung des Leserahmens der *FB188* HDAH konnte die vollständige Sequenz dieses Gens per Sequenzanalyse ermittelt werden. Hiernach ließ sich auch die komplette Aminosäure-Sequenz ableiten. Die dabei errechnete theoretische Masse von 39,421 Da stimmt gut mit der über SDS-PAGE ermittelten apparenten Masse von etwa 37 kDa überein. Aus der DNA-Sequenz konnten auch Informationen über die *up-* und *downstream*-Regionen des Gens gewonnen werden. Ein möglicher Promotorbereich in der *upstream*-Region des *FB188* HDAH-Gens konnte anhand von Sequenzvergleichen mit anderen bakteriellen Sequenzen identifiziert werden (4.2). Ebenso sind sich die Sequenzen der Ribosomenbindestellen der APAH aus *Mycoplana ramosa* und der HDAH aus *Bordetella/Alcaligenes FB188* sehr ähnlich. Eine Bestätigung der ausgemachten, potentiellen regulatorischen Sequenzen ist mit gängigen DNase *footprint-* oder *band-shift-assay*-Methoden möglich, wie sie in der Literatur beschrieben sind (Docherty, 1996). Diese Methoden könnten auch bei der Suche nach einem möglichen Promotorbereich in der *upstream*-Region des *PA3774*-Gens zur Anwendung kommen. Hier ergaben vorläufige Sequenzvergleiche mit anderen bakteriellen Sequenzen noch keine eindeutigen Ergebnisse im Hinblick auf die Existenz von regulatorischen Elementen. Allerdings kann man auch hier davon ausgehen, dass es sich bei der Sequenz der *PA3774* HDAH um einen kodierenden Bereich handelt. Zum einen stimmt auch in diesem Vergleich die apparente Masse der *PA3774* HDAH, die über SDS-PAGE ermittelt wurde (42 kDa) gut mit der theoretisch errechneten Masse (41.157 Da) überein. Zum anderen konnte auch in diesem Fall aktives Enzym im Standard-HDAC-Assay nachgewiesen werden.

## 5.2 Zink-Abhängigkeit der beiden HDAHs

Von den Enzymen der Klasse der APAHs ist das Enzym aus *M. ramosa* bisher am besten charakterisiert (Sakurada *et al.*, 1996). Hier wurden Metall-Kofaktor-Studien durchgeführt. Um die Abhängigkeit der Enzyme von Metall-Kofaktoren zu belegen wurde versucht, eine Kofaktor-freie Enzympräparationen durch Behandlung mit Chelatoren herzustellen, die später wieder mit unterschiedlichen bivalenten Ionen angereichert wurde. Hier konnte als Ergebnis herausgestellt werden, dass eine Aktivitätsabnahme nach Inkubation mit  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Ni}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen im Vergleich zum  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen angereicherten Enzym zu verzeichnen war, wobei  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  ebenfalls in der Lage waren, die Aktivität des Enzyms zu steigern. Dieses Verhalten konnte zuvor bei Carboxypeptidasen (Auld and Vallee, 1970; Makinen *et al.*, 1979) beobachtet werden. Diese Enzyme gehören ebenfalls zur Familie der Metallo-Proteasen und besitzen nachweislich ein Zink-Bindungsmotiv. Nach einem *alignment* auf Aminosäureebene der APAH mit bekannten Carboxypeptidasen konnten homologe Regionen in der Proteinsequenz aus *M. ramosa* gefunden werden, und u. a. vier putativ Zink-bindende Aminosäuren identifiziert werden. Diese sind jedoch bis auf eine Ausnahme nicht in der FB188 HDAH vertreten. Zwei dieser vier Aminosäuren sind in der HDAH aus *P. aeruginosa* (PA3774) zu finden.

Es wurden nach der Röntgenstrukturanalyse des HDLP durch Finnin *et al.* (Finnin *et al.*, 1999) drei Aminosäure-Positionen als Zink-Liganden beschrieben. Die Aminosäuren an diesen Positionen sind in allen HDACs streng konserviert und sowohl in der FB188 HDAH als auch in der PA3774 HDAH vorhanden. Allein diese Tatsache macht glaubhaft, dass diese Positionen als Zink-Liganden fungieren. Zudem konnten diese Zink-Bindungsstellen auch experimentell durch Röntgenstrukturanalyse in Ko-Kristallisation mit den bekannten HDAC-Inhibitoren Trichostatin A (TSA, Abb. 4.27.A) (Yoshida *et al.*, 1990) und Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Abb. 4.27.B) (Richon *et al.*, 1998) nachgewiesen werden.

Der von Sakurada vorgeschlagene Vergleich mit den Carboxypeptidasen scheint also nicht angebracht und unzutreffend zu sein. Die in der gesamten HDAC-Superfamilie feststellbare, strenge Konservierung der drei Aminosäurepositionen, die im *A. aeolicus*-HDLP als Zink-Liganden fungieren, kann also als ein erster (theoretischer) Anhaltspunkt für eine Zink-Abhängigkeit der FB188 HDAH als auch der PA3774 HDAH gelten.

Im Weiteren wurden umfangreiche Experimente zur Zink-Abhängigkeit der *FB188* HDAH durchgeführt. Als erstes, experimentelles Indiz für eine Zink-Abhängigkeit kann der Einfluss des Aufreinigungsprozesses auf die Enzymaktivität gelten. Die IMAC-Aufreinigung wird standardmäßig mit Nickel-beladenen Säulen durchgeführt. Es ist bekannt, dass Metallo-Proteasen auch andere zweiwertige Liganden einbauen können (Ando *et al.*, 1999), was allerdings zu Einbußen hinsichtlich der Aktivität des Enzyms führen kann. In unserem Fall wurde die Aufreinigungsprozedur in der Art verändert, dass die Säulen mit Zink-Chlorid beladen wurden. Das nach dieser geänderten Aufreinigungsmethode (4.3.2) erhaltene Enzym zeigte einen ca. 8-fach niedrigeren  $K_m$ -Wert im Vergleich zu Enzympräparationen, welche über  $Ni^{2+}$ -IMAC aufgereinigt wurden (4.7.4). Einen ähnlichen Befund hatten Sakurada *et al.* für das Enzym aus *M. ramosa* erhalten.

Zweites experimentelles Indiz für die Zink-Abhängigkeit ist das Ergebnis der ICP-Analyse (4.3.2.1). Hierbei wurde eine Konzentration von ca. 20 mol  $Zn^{2+}$  / mol Enzym nach  $Zn^{2+}$ -IMAC ermittelt, während Nickel so gut wie nicht nachgewiesen werden konnte. Für Enzyme nach  $Ni^{2+}$ -IMAC konnten Konzentrationen von ca. 1,5 mol  $Ni^{2+}$  / mol Enzym und nur ca. 0,2 mol  $Zn^{2+}$  / mol Enzym ermittelt werden. In diesem Fall scheint das Zink durch hohe Konzentrationen an Nickel aus dem katalytischen Zentrum des Enzyms verdrängt worden zu sein. Für eine Zinkabhängigkeit spricht, dass sich die Enzympräparation mit dem sehr geringen Zinkgehalt als signifikant weniger aktiv erwiesen hatte.

Ein drittes experimentelles Indiz ergibt sich aus Untersuchungen zur Kofaktorenabhängigkeit (4.7.3) am  $Ni^{2+}$ -IMAC-aufgereinigten Enzym (*FB188* HDAH). Nach Inkubation von Enzymchargen mit unterschiedlichen Konzentrationen an  $ZnSO_4$ ,  $CoCl_2$ ,  $NiCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$  und  $MnCl_2$  wurde der Standard-HDAC-Assay zur Ermittlung der jeweiligen Enzymaktivität durchgeführt. Bei den Ansätzen mit  $CoCl_2$  und  $NiCl_2$  konnte eine leichte Aktivitätssteigerung nach Zusatz von niedrigen Konzentrationen dieser Salze erhalten werden. Höhere Konzentrationen hatten einen inhibitorischen Effekt auf das Enzym. Nach Zusatz von  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$  und  $MnCl_2$  konnte eine Aktivitätssteigerung des Enzyms nur bei sehr hohen Konzentrationen beobachtet werden. Eindeutig waren die Ergebnisse in Bezug auf  $Zn^{2+}$ . Hier konnte über den Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 mM eine Aktivitätssteigerung verzeichnet werden, die ihr Maximum bei etwa 1 mM hatte.

Als vierter, experimenteller Beleg für eine Zink-Abhängigkeit können die Ergebnisse der vergleichenden Inhibitorstudien angeführt werden (4.9). Aus der Struktur des HDLP im Komplex mit dem Inhibitor Trichostatin A (Abb. 1.3) ist bekannt, dass die inhibitorische Wirkung von Hemmstoffen aus der Hydroxamat-Klasse u.a. stark von der Bindung des Carboxy-Sauerstoffes und auch des Hydroxyl-Sauerstoffes des Hydroxamatrestes an die zwei freien Valenzen des Zink-Ions abhängig ist. Durch Verwendung eines SAHA-Analogons (SAOH) mit einer Carbonsäure statt eines Hydroxamates als funktioneller Gruppe ist zumindest die Bindung des Zink-Ions durch die Hydroxyl-Gruppe nicht mehr möglich, was zu einer drastischen Abnahme der Inhibition im Fall des HDLP führte (Finnin *et al.*, 1999). Dieser Effekt ist ebenfalls unter Verwendung von SAOH im Vergleich zu SAHA bei der *FB188* und auch der *PA3774* HDAH zu beobachten.

Als weiteres Indiz können die Mutagenese-Studien der *FB188* HDAH (4.10) herangezogen werden. Hier wurden zwei der drei nach Finnin postulierten Zink-bindenden Aminosäuren ausgetauscht (H182N, D268N). Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen der vergleichenden Sequenzanalyse (s.o.). Der Austausch D268N hatte eine erhebliche Aktivitätseinbuße zur Folge. Im Falle von H182N konnte sogar überhaupt keine Restaktivität mehr verzeichnet werden.

All die hier aufgeführten Faktoren sprechen für die Zink-Abhängigkeit der *FB188* HDAH. Bei der HDAH aus *P. aeruginosa* (*PA3774*) sprechen das Vorhandensein der jeweiligen Aminosäuren, der Erhalt von aktiven Enzym über  $Zn^{2+}$ -IMAC und die SAHA/SAOH-Vergleiche dafür. Somit kann man schlussfolgern, dass für beide Enzyme aus der Superfamilie der HDAHs eine Zink-Abhängigkeit wahrscheinlich ist, sofern man den Aufbau des aktiven Zentrums nach Finnin (Finnin *et al.*, 1999) diesen Betrachtungen zu Grunde legt.

### **5.3 Substratspezifität - Auf der Suche nach dem natürlichen Substrat der *FB188* HDAH**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden umfangreiche Untersuchungen in Bezug auf die Verifizierung des natürlichen Substratspektrums der *FB188* HDAH durchgeführt. Unter der Vorgabe, ein Enzym zu finden, welches die Substanz *cis*-(±)-*N*-[4-(hydroxymethyl)cyclopent-2-enyl]acetamide (NAA, Abb. 1.6) umsetzt, wurde dieses Enzym entdeckt. Man konnte einen Stamm isolieren, der mit dieser Substanz als einziger C-Quelle auf Minimal-

Medium wuchs. Aus diesem Stamm konnte schließlich die *FB188* HDAH isoliert werden. Nach Erhalt der Sequenz und anschließendem *blast search* wurden Homologien in folgenden Enzymklassen gefunden: prokaryontische Acetylpolyamin-Amidohydrolasen (APAHs), eukaryontische Histon-Deacetylasen (HDACs) und *acetoin utilisation proteins* (AcuCs). Die natürlichen Substrate sind mit Ausnahme des *acetoin utilisation proteins* bekannt und lassen sich schon vom Namen der Enzymklassen ableiten: Acetylpolyamin-Amidohydrolasen prozessieren Acetyl-Polyamine und Histon-Deacetylasen deacetylieren den  $\epsilon$ -terminalen Lysinrest bestimmter Lysine in Histonen. Somit boten sich für weitere Untersuchungen zwei potentielle Substratklassen der *FB188* HDAH neben NAA an. Diese möglichen Substrate der *FB188* HDAH setzen auch aufgrund ihrer Diversität verschiedene Nachweismethoden voraus. In den Untersuchungen kamen vier verschiedene Assays zur Anwendung.

Eine Verifizierung der Enzymaktivität bezüglich NAA wurde mit dem Fluorescamin-Assay (3.4.2) durchgeführt. Prinzip dieser Methode ist der Nachweis von freien Aminogruppen, die im Falle einer erfolgreichen Deacetylierung durch Kopplung an Fluorescamin ein Fluoreszenzsignal entwickeln (Udenfriend *et al.*, 1972). Somit eignen sich für diese Nachweis-Methode Substrate, deren Aminoterminus acetyliert ist und die darüber hinaus keine weiteren Aminogruppen aufweisen, da diese ebenfalls mit dem Fluorescamin reagieren und somit zusätzliche Fluoreszenzsignale hervorrufen würden. Für die *FB188* HDAH konnten  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte ermittelt werden (4.6.2), die einen moderaten Umsatz des Enzyms belegen. Der  $K_m$ -Wert liegt im millimolaren Bereich (4,31 mM) und der  $V_{max}$ -Wert gibt nanomolare Substratumsätze pro Sekunde und Milligramm Enzym wieder (27,75 nmol/sec/mg). Hier fehlen allerdings Vergleichsmöglichkeiten zu anderen, potentiellen Substraten und Enzymen aus Bakterien, so dass diese Werte für sich alleine stehen. Ein Nachweis für den Umsatz von Acetyl-Polyaminen scheint in diesem Zusammenhang weniger sinnvoll, da zumindest die Standard-APAH-Substrate Acetyl-Cadaverin und Acetyl-Spermidin weitere, freie Aminogruppen aufweisen, die das Ergebnis dieses Assays verfälschen könnten. Ebenso wenig würde sich dieser Nachweis für viele polypeptidische Substrate (z.B. tripeptidische MCA-Substrate, Histone) eignen, da auch die jeweiligen Aminosäuren freie Aminogruppe aufweisen. Lediglich ein Nachweis des Umsatzes des mono-peptidischen Standard-Substrates Boc-Lys(Ac)-MCA (Abb. 3.3) hätte hier erbracht werden können, da in dieser Substanz die relevante Aminogruppe des Lysins acetyliert und der Aminoterminus des Lysins Boc-geschützt ist.

Als erste mögliche Substratklasse wurden Acetyl-Polyamine untersucht (4.6.1). Hier erfolgte der Nachweis der Reaktion über den *acetic acid standard test* (3.4.3, Roche Diagnostics, Katalog Nr.148261). Dieser Assay beinhaltet eine Vielzahl an Enzymen und gekoppelten Reaktionen und der eigentliche Nachweis des freigesetzten Acetats erfolgte über drei Stufen, indem eine Abnahme der Fluoreszenz von NADH detektiert wurde. Als kinetische Parameter konnten hier Umsätze mit 1 mg Enzym von 0,66  $\mu\text{M}$  (Acetyl-Putrescin), 0,48  $\mu\text{M}$  (Acetyl-Cadaverin) und 0,24  $\mu\text{M}$  (Acetyl-Spermidin) pro Stunde erzielt werden. Verglichen mit den  $V_{\text{max}}$ -Werten von *Mycoplana ramosa* von 29,1  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  (Ac-Put.), 28  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  (Ac-Cad.) und 17,4  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  (Ac-Sperm.) stellt dies eine relativ schwache Aktivität bezüglich dieser Standard-APAH-Substrate dar. Dies führt zu der Annahme, dass die FB188 HDAH wohl kein Enzym aus dem Polyamin-Metabolismus darstellt. Zusätzlich kann man sagen, dass kleine Acetyl-Polyamine besser deacetyliert werden als größere.

Außer den Polyamin-Deacetylierungsreaktionen wurden keine weiteren Untersuchungen mit diesem Assay durchgeführt. Da bei diesem gekoppelten Assay eine Vielzahl von Zwischenreaktionen notwendig sind, die wiederum von anderen Enzymen und Substraten abhängen, schien dieser Nachweis keine gute Option, insbesondere bei der Untersuchung von anderen Substraten und Inhibitoren, darzustellen. Es war nicht auszuschließen, dass die dem Reaktionsansatz zugesetzten Substrate bzw. Inhibitoren oder die HDAH selbst, einen Einfluss auf die nachgeschalteten Reaktionen zum Acetat-Nachweis hätten. Zudem stellt dieser Assay auch hinsichtlich seiner Kosten keine gute Alternative für einen hohen Probendurchsatz dar.

Nachdem bis zu diesem Punkt nur niedermolekulare Substanzen (NAA, Acetyl-Polyamine) untersucht wurden, kamen nun (poly-)peptidische Substrate zum Einsatz. Durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. P. Loidl, Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Universität Innsbruck, konnte eine Charge der FB188 HDAH in einem Assay zum Nachweis der Deacetylierung von radioaktiv markierten Histonen untersucht werden (3.4.4). Im Fokus dieser Arbeitsgruppe stehen hauptsächlich Enzyme der Histon-Deacetylase-Klasse. Schwerpunkt der Forschung ist die Isolierung und Charakterisierung von Histon-Deacetylasen, die zumeist pflanzlichen Ursprungs sind (Loidl, 2004; Pipal *et al.*, 2003) oder aus Pilzen isoliert wurden (Brandtner *et al.*, 2002; Trojer *et al.*, 2003). Darüber hinaus werden jedoch auch Fragestellungen zur Inhibition von Histon-

Deacetylasen untersucht (Mai *et al.*, 2003; Mai *et al.*, 2004), sowie die Gegenspieler der Histondeacetylasen, die Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) charakterisiert (Trojer *et al.*, 2004).

Die Nachweismethode über radioaktiv markierte Histone ist in dieser Arbeitsgruppe als Standard etabliert (Graessle *et al.*, 2001; Kölle *et al.*, 1998) und dient dort zur Bestimmung kinetischer Parameter unterschiedlicher Histon-Deacetylasen und Inhibitoren.

Für die *FB188* HDAH konnte im radioaktiven Assay mit acetylierten Hühnerhistonen ein deutlicher Umsatz erzielt werden. Der gemessene  $K_m$ -Wert von 40  $\mu\text{M}$  stimmt gut mit bisher ermittelten  $K_m$ -Werten von Histondeacetylasen eukaryotischen Ursprungs überein, welche im Bereich von 30  $\mu\text{M}$  bis 82  $\mu\text{M}$  liegen (Lechner *et al.*, 1996). Für eine Präparation aus Ratten-Leber HDAC, bestehend aus HDAC1, 2 und 3 (Riester *et al.*, 2004), konnte mit dieser Methode ein  $K_m$ -Wert von 20  $\mu\text{M}$  ermittelt werden (Hoffmann *et al.*, 1999). Somit war nachgewiesen, dass polypeptische Substrate als natürliche Substrate der *FB188* HDAH fungieren können.

Neben der Ermittlung eines  $K_m$ -Wertes wurden zusätzlich Kompetitionsstudien der HDAH durchgeführt. Innerhalb der Familie humaner HDACs weist die *FB188* HDAH die höchste Sequenzähnlichkeit gegenüber HDAC6 auf. Diese HDAC ist im Gegensatz zu den anderen bekannten HDACs im Cytoplasma lokalisiert und für die Deacetylierung von Tubulin (Hubbert *et al.*, 2002), welche zu einer Assemblierung von Mikrotubuli führt, verantwortlich. Laut einer persönlichen Mitteilung von Prof. P. Loidl wird in der Tat auch die Aktivität der *FB188* HDAH im radioaktiv-Histon-Assay durch Zusatz von Tubulin gehemmt. Dies spricht dafür, dass das Enzym Tubulinstrukturen zu erkennen und binden vermag, was ebenfalls eine Aussage im Hinblick auf die Substratspezifität darstellt. Somit könnten Proteine als natürliche Substrate der *FB188* HDAH in Frage kommen.

Nachdem eine signifikante Deacetylierung von Histonen nachgewiesen werden konnte, wurden die *FB188* HDAH und auch die *PA3774* HDAH im Standard-HDAC-Assay weiter auf die Substratspezifität von peptidischen Substraten analysiert. Dieser Assay wurde in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelt (Wegener *et al.*, 2003a; Wegener *et al.*, 2003c; Wegener, 2004). Substrate zur Untersuchung der Spezifität der Enzyme standen hier in großem Umfang zur Verfügung, ebenso bekannte als auch neuartige, potentielle Inhibitoren. Der Assay selbst basiert auf einem Zwei-Stufen Prinzip (3.4.5). Im ersten Schritt wird das Substrat durch die HDAH deacetyliert und kann nun im zweiten Schritt von Trypsin erkannt und gespalten werden, was in einer Freisetzung der fluoreszierenden

Verbindung 7-Amino-4-Methyl-Coumarin (AMC) resultiert. Acetyliertes Substrat wird von Trypsin hingegen nicht umgesetzt. Das erhaltene Fluoreszenzsignal kann mit einer AMC-Standardreihe korreliert und somit kinetische Parameter der Enzyme abgeleitet werden. Von allen verwendeten Nachweismethoden für Deacetylierungsreaktionen stellt dieses Verfahren die bislang beste Alternative dar (Wegener *et al.*, 2003b). Eine Automatisierung im 96-well Format gewährleistet einen hohen Probendurchsatz und auch in Bezug auf Empfindlichkeit stellt dieses Fluoreszenz-basierte Assay ein Optimum der hier angewandten Methoden dar. Zunächst wurde der Umsatz des peptidischen Substrates Boc-Lys(Ac)-MCA bestimmt. Es wurden hierzu Fraktionen von rekombinanter FB188 HDAH vermessen, die über Ni<sup>2+</sup>-IMAC (4.3.1) und über Zn<sup>2+</sup>-IMAC (4.3.2) aufgereinigt wurden. Darüber hinaus wurde natives Enzym aus *Bordetella/Alcaligenes* FB188 nach Aufreinigung über Anionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration (4.3.3), sowie die PA3774 HDAH nach Zn<sup>2+</sup>-IMAC (4.5) analysiert.

In diesen Messungen stellte sich heraus, dass die Enzympräparation nach Zn<sup>2+</sup>-IMAC einen niedrigeren K<sub>m</sub>-Wert besitzt als die nach Ni<sup>2+</sup>-IMAC (s.o.). Der V<sub>max</sub>-Wert ist bei beiden Enzympräparationen ungefähr gleich. Die Werte des nativen Enzyms liegen ebenfalls im Bereich der Werte der rekombinanten Enzympräparationen. Der K<sub>m</sub>-Wert des Enzyms aus *Pseudomonas aeruginosa* (PA3774 HDAH) liegt ebenfalls im Bereich der Werte, die für die FB188 HDAH ermittelt wurden, der V<sub>max</sub>-Wert ist höher. Diese Tatsache, eine ähnliche Affinität zum Substrat und ein etwas höherer Umsatz der PA3774 HDAH, lassen darauf schließen, dass es sich hierbei um Enzyme mit ähnlichem Substratspektrum handelt.

Nachdem nun der Umsatz von einfachen, peptidischen Substraten nachgewiesen werden konnte, wurden auch tripeptidische Substrate der Form AS<sub>1</sub>-AS<sub>2</sub>-Lys(Ac)-MCA im Standard-HDAC-Assay eingesetzt (4.7.5). Diese Substrate wurden aus dem Sequenzkontext von Histon H4 (Kervabon *et al.*, 1979) abgeleitet. Als Ergebnis konnte hier herausgestellt werden, dass nur zwei der fünf getesteten Substrate gut umgesetzt wurden, während die anderen drei nicht prozessiert wurden. Während Z-HRK(Ac)-MCA und Ac-RGK(Ac)-MCA noch relativ gut umgesetzt werden, ist der Umsatz bei den anderen Substraten Ac-GAK(Ac)-MCA, Tos-GPK(Ac)-MCA und Ac-GGK(Ac)-MCA nicht signifikant. Im Kontrast dazu setzt Ratten-Leber HDAC, welche hauptsächlich aus HDAC1, 2 und 3 besteht (Riester *et al.*, 2004) alle tripeptidischen Substrate um. Das Ac-GAK(Ac)-MCA Substrat wird sogar von der Ratten-Leber HDAC am besten umgesetzt

(Wegener *et al.*, 2003c), während mit der *FB188* HDAH kein signifikanter Umsatz erzielt wurde. Da es sich bei der Ratten-Leber HDAC allerdings um einen Enzym-Mix aus HDAC1, 2 und 3 handelt, könnte man vermuten, dass Substrat-Präferenzen einer Enzymkomponente durch andersartige Substrat-Präferenzen einer anderen Komponente ergänzt und folglich alle Substrate umgesetzt werden. Zukünftige Experimente werden zeigen müssen, ob HDAC 1, 2 und 3, einzeln vermessen, Substrat-Sequenzpräferenzen zeigen, oder ob es sich grundsätzlich nicht schon bei diesen Enzymen um sog. *broad-range* Enzyme handelt, die ein breites Substratspektrum aufweisen.

Für die *FB188* HDAH kann man die Vermutung äußern, dass im tripeptidischen Kontext Substrate mit mindestens einem polaren Rest an Aminosäureposition 1 und/oder 2 gespalten (H/R), Substrate mit hydrophoben Aminosäuren an den Positionen 1 und/oder 2 (G/A/P) allerdings nicht prozessiert werden. Dies deutet auf ein unterschiedliches Bindungsverhalten dieser Substrate bzw. dieser Aminosäuren in der Umgebung der Substratbindungstasche hin. Festzuhalten bleibt auf jeden Fall, dass die *FB188* HDAH eine ausgeprägte Selektivität gegenüber der Aminosäuresequenz peptidischer Substrate aufweist.

Einen weiteren Betrachtungspunkt stellen die Untersuchungen zur Enantioselektivität sowie der Seitenkettenlängenvariation des Lysins dar (4.7.7). In diesem Versuchsteil wurde sowohl eine acetylierte D-Lysin-MCA-Substratvariante getestet als auch eine acetylierte L-Ornithin-MCA-Variante. Die Ornithin-Variante weist eine Verkürzung der Seitenkette um eine CH<sub>2</sub>-Einheit im Vergleich zum Lysin auf. Hier konnte ein unterschiedliches Verhalten der beiden HDAHs bezüglich der Enantiomere des Lysins beobachtet werden. Während die *PA3774* HDAH lediglich die L-Lys-Variante prozessiert (Umsatz der D-Lys-Variante ist sehr gering), prozessiert die *FB188* HDAH sowohl die L-Form als auch die D-Form dieses Substrates in fast gleichem Umfang. Dies steht im Gegensatz zu Befunden mit den beiden Enantiomeren von NAA. Hier wurde das eine Enantiomer 100-mal besser umgesetzt als das andere. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Deacetylierung durch die *PA3774* HDAH streng enantioselektiv abläuft, die *FB188* HDAH jedoch flexibler bei der Auswahl der Substrate ist und – je nach Substrat - nicht immer enantioselektiv arbeitet. Dies lässt auf einen geringfügig abweichenden Aufbau des aktiven Zentrums schließen, da die *PA3774* HDAH ihre Substrate viel stringenter auswählt und keine Flexibilität gegenüber enantiomeren Formen des Substrates vorhanden ist.

Zu den Versuchen mit einer verkürzten Substratvariante, dem L-Orn(Ac)-MCA, ist zu sagen, dass keines der beiden Enzyme einen Umsatz mit diesem Substrat zeigte. Dies lässt auf eine Mindestlänge des in die Reaktionstasche ragenden Substrates schließen, die Ornithin-Variante scheint einfach zu kurz zu sein.

Weitere Erkenntnisse zur Substratspezifität wurden man durch Modifikation des Standardsubstrates Boc-Lys(Ac)-MCA (4.7.6) gewonnen. Hier wurden Substitutionen an der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins durchgeführt und diese Derivate vermessen. Diese Substitutionen stellen zum einen eine Vergrößerung der Abgangsgruppe durch Einführung von Propionyl-, Isobutyryl-, Butyryl- oder Pivalinyl-Resten dar. Zum anderen wurden Substitutionen durchgeführt, die in einer stabileren, d.h. „besseren“ Abgangsgruppe resultierten. Hier ersetzen ein Trifluoracetyl- oder ein Methylsulfonyl-Rest den Acetyl-Rest. Bezüglich der Größe des Substrates kann man aussagen, dass größere Abgangsgruppen als Acetat weder von der *FB188* noch der *PA3774* HDAH akzeptiert werden. Ein anderes Verhalten lässt sich bei den Ladungs-Varianten erkennen. Da Trifluoressigsäure einen wesentlich niedrigeren  $pK_a$ -Wert als Essigsäure aufweist, sollte das zugehörige Trifluoracetat eine stabilere, d.h. bessere Abgangsgruppe als das Acetat darstellen. Strukturell, d.h. auch vom Volumen her unterscheidet sich das TFA-Substrat nur geringfügig von der Acetyl-Variante. Dennoch ist der Umsatz des TFA-Substrates bei der *FB188* HDAH in etwa nur gleich dem des acetylierten Substrates. Bei der *PA3774* HDAH sind die Verhältnisse allerdings wie erwartet. Sie prozessiert das TFA-Substrat erheblich besser.

Das Methylsulfonat der zweiten Substratvariante besitzt einen noch niedrigeren  $pK_a$ -Wert als das Trifluoracetat und sollte demnach noch leichter abzuspalten sein. Allerdings ist bei der *FB188* HDAH nur ein sehr schwacher Umsatz zu verzeichnen, bei der *PA3774* HDAH gar kein Umsatz erkennbar. Dieses Verhalten könnte sich dadurch erklären lassen, dass dieses Substrat nicht die räumlichen Anforderungen erfüllt, die die Enzyme zur aktiven Prozessierung eines Substrates benötigen. Diese These wird durch einen Versuch bestätigt, bei dem der neuartige, potentielle HDAC-Inhibitor Ac-Pro-Lys(Methylsulfonyl)-3-Aminomethyl-Benzoesäureamid (4.9.3, Abb.4.30) getestet wurde. Dieser weist an der  $\epsilon$ -Amino-Position des Lysins ebenfalls einen Methylsulfonyl-Rest auf. Allerdings zeigte dieser neuartige Inhibitor überhaupt keine inhibitorische Wirkung, was ebenfalls für ein schlechteres Einpassen der MeS-Gruppe spricht. Eine Rolle könnte aber auch eine

Produktthemmung spielen. Methylsulfonat erwies sich in mM-Konzentrationen als Inhibitor.

Aus den Konkurrenzexperimenten mit Polyaminen (4.8) lässt sich ableiten, dass sich beide Enzyme sowohl von Säureanionen (4.8.1) als auch von Acetyl-Polyaminen (4.8.2) inhibieren lassen. In Anwesenheit von 50 mM Kompetitor zeigt die *FB188* HDAH ein mäßiges Inhibitionsverhalten. Acetat hemmt das Enzym zu ca. 40 %, Propionat zu ca. 30 %. Trifluoracetat scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des Enzyms zu besitzen. Bei den Acetyl-Polyaminen bewirkt Acetyl-Putrescin eine deutliche Reduktion auf etwa 50 % der Grundaktivität, mit Acetyl-Cadaverin ist nur noch eine geringe Restaktivität zu verzeichnen. Acetyl-Spermidin stellt ein schlechtes Substrat für die *FB188* HDAH dar. Es verwundert also nicht, daß mit dieser Substanz auch keine nennenswerte Konkurrenz erreicht werden konnte. Acetyliertes Lysin dagegen stellt ein gutes Substrat dar. Es überrascht nicht, dass Acetyl-Cadaverin, das natürliche Abbauprodukt des Lysins, mit gleicher Kettenlänge ein relativ guter Inhibitor ist. Gleichzeitig zeigt Acetyl-Putrescin, das natürliche Abbauprodukt von Ornithin, ein etwas schlechteres Konkurrenzverhalten. Dies stellt ebenfalls ein erwartetes Ergebnis dar, da acetylierte Ornithin-Substrate so gut wie gar nicht prozessiert wurden (4.7.7).

Bei der *PA3774* HDAH zeigt sich ein fast identisches Verhalten in Vergleich zur *FB188* HDAH bezüglich der Acetyl-Polyamine. Acetyl-Cadaverin hemmt das Enzym fast komplett, Acetyl-Putrescin zu ca. 60 %. In Bezug auf die Säureanionen jedoch lässt sich feststellen, dass die Hemmung durch Acetat und Propionat deutlicher ausfällt als bei der *FB188* HDAH. Die Hemmung von Acetat liegt bei über 80 % und bei Propionat immerhin noch bei 60 %. Trifluoracetat hat auch in diesem Fall keine Hemmwirkung auf das Enzym, obwohl das TFA-Substrat deutlich besser umgesetzt wurde als das acetylierte Substrat.

Weitere Experimente, die sich mit der Klärung der Substratspezifität beschäftigen, wurden mit Zellextrakten von *Bordetella/Alcaligenes FB188* und einigen anderen Bakterien durchgeführt (4.10). Unter der Annahme, dass das natürliche Substrat der *FB188* HDAH polypeptidischen Ursprungs ist, sollte sich dieses im Zellextrakt unter Verwendung eines speziellen Antikörpers, welcher  $\epsilon$ -acetylierte Lysine erkennt (anti-acetylated proteins-antibody, ab193, Abcam), nachweisen lassen. Obwohl die Thematik von posttranslationalen Modifikationen in Form von Proteinacetylierungen in Prokaryonten relativ unerforscht ist und Beispiele selten beschrieben sind, konnten hier auf Antrieb in

fast allen getesteten Zellextrakten (*FB188*, *E. coli* XL1 blue, *Bacillus subtilis*, *Methanosarcina mazei* und *Thermotoga maritima*) Banden im Western Blot identifiziert werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit Proteine mit  $\epsilon$ -acetylierten Lysinen darstellen. Eine Kreuzreaktion des verwendeten Antikörpers mit N-terminalen Acetylierungsmustern sollte anhand der Angaben des Herstellers auszuschließen sein (Hebbes *et al.*, 1988).

Nach Inkubation der Zellextrakte mit *FB188* HDAH konnte im Zellextrakt von *Bordetella/Alcaligenes FB188* das Verschwinden einer Bande in Bereich von ca. 65 kDa beobachtet werden. Unter Einwirkung der HDAH scheint dieses Protein also deacetyliert zu werden und ist folglich im *western blot* mit dem *anti-acetylated proteins-antibody* nicht mehr nachweisbar. Es könnte also gut sein, dass genau dieses Protein der Masse von ca. 65 kDa das natürliche Target der *FB188* HDAH darstellt. Dieser Versuch des Nachweises konnte allerdings nicht wieder in gleich drastischer Form reproduziert werden. Kontrollexperimente mit Protease-Verdau (Proteinase K, Trypsin und Pepsin) vor der gelelektrophoretischen Auftrennung des Zellextraktes zeigten jedoch, dass es sich bei der Bande im *western blot* im Bereich von 65 kDa um ein Protein handeln muss, da die Bande nach Protease-Verdau verschwand. RNase-, DNase-Verdaue sowie Ethidiumbromid-Behandlung hatten keine Auswirkung auf die angesprochene Bande im *western blot*. Damit konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass das 65 kDa-Protein vermutlich keine gebundene Nukleinsäure enthielt.

Sollte dieses Protein das natürliche Zielprotein der *FB188* HDAH darstellen, so ist seine Funktion wohl im Sekundärmetabolismus von *Bordetella/Alcaligenes FB188* zu suchen. Wachstumsversuche dieses Stammes unter Zusatz der bekannten und wirkungsvollen Inhibitoren TSA, SAHA und CypX (4.9.1) zeigten, dass die Inhibitoren keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Stammes haben, eine Inhibition der *FB188* HDAH also keine Auswirkung auf den Primärstoffwechsel des Stammes *Bordetella/Alcaligenes FB188* hat. Alternativ müsste angenommen werden, dass die besagten Inhibitoren die Zellmembranen nicht überwinden und so auch keine Wirkung entfalten konnten.

## 5.4 Reaktionsmechanismus und Substrat-/Inhibitor-Bindung

Um den von Finnin und Mitarbeitern postulierten Reaktionsmechanismus (1.4) für die Enzyme der Klasse der HDAHs zu verifizieren, wurden umfangreiche Experimente durchgeführt. Als erstes können in diesem Zusammenhang die Inhibitionsstudien der *FB188* HDAH (4.9.1) und auch der *PA3774* HDAH (4.9.2) angeführt werden. Wie schon in Kapitel 5.2 erwähnt, sprechen eine Reihe von Indizien für das Vorhandensein eines Zink-Ions im aktiven Zentrums sowohl der *FB188* HDAH als auch der *PA3774* HDAH. Die in der vergleichenden Sequenzanalyse identifizierten Zink-koordinierenden Aminosäuren konnten (teilweise) auch durch Mutagenesestudien betätigt werden. Enzymvarianten der *FB188* HDAH mit je einer Mutation an Liganden-Aminosäurepositionen (H182N, D268N; 5.2) zeigten nur noch geringe oder gar keine Aktivität mehr.

Im Folgenden wurde die Mutagenesestudie auch auf andere, für den Reaktionsmechanismus von Finnin *et al.* als essentiell beschriebene Aminosäurepositionen ausgeweitet und die entsprechenden 1-Fehler-Mutanten hinsichtlich ihres Substratumsatzes untersucht. Alle für den Katalysemechanismus notwendigen Aminosäuren ließen sich auch in der Sequenz der *FB188* HDAH wieder finden, mit Ausnahme des Aspartates 173 (nach *A. aeolicus*), welches Bestandteil des postulierten, äußeren His-Asp *charge relay* Systems ist. Dieses Aspartat 173 ist jedoch ausschließlich in der HDLP (*A. aeolicus*) zu finden. In allen anderen im Sequenz-*alignment* aufgeführten Organismen (Abb. 4.5) ist diese Position mit einem Asparagin (N) besetzt. Sowohl in den prokaryontischen Sequenzen, u.a. in der Sequenz der *FB188* und der *PA3774* HDAH als auch in der Sequenz der humanen HDAC6 ist dieses Asparagin streng konserviert. Betrachtet man darüber hinaus die Sequenzen von weiteren HDACs, so stellt man fest, dass in der HDAC1 und der HDAC8 diese Position, analog zum HDLP, mit einem Aspartat besetzt ist (Vannini *et al.*, 2004). Diese beiden HDACs werden den HDACs der Klasse I zugeschrieben. In der HDAC2 und HDAC3 (Klasse I) findet man ebenfalls ein Aspartat. Klasse II-Enzyme wie die HDAC4, HDAC5, HDAC7 oder die oben erwähnte HDAC6 weisen jedoch an dieser Position ein Asparagin auf. Diese Position könnte also gleichzeitig als ein Unterscheidungsmerkmal dieser beiden HDAC-Klassen dienen und auf einen leicht voneinander abweichenden Reaktionsmechanismus hindeuten. Diese Position ist in der *FB188* HDAH gemäß den

Enzymen der HDAC-Klasse II ebenfalls mit einem Asparagin besetzt. Der Austausch von N185D, welcher gemäß des Sequenz-*alignments* (Abb. 4.5) das in dem HDLP vorhandene und oben bereits erwähnte Aspartat (D173 in *A. aeolicus*) wieder herstellt (und somit auch das postulierte, äußere His-Asp *charge relay* System), führte zu einer leichten Aktivitätsminderung des Enzyms. Diese Position scheint also einen nur geringen Einfluss auf die katalytische Aktivität zu haben. Mit Recht kann die Wichtigkeit des äußeren *charge relay* Systems, und sogar seine Existenz in Zweifel gezogen werden. Ohne Zweifel dagegen ist das, als Bestandteil des äusseren *charge relay* Systems postulierte, Histidin 132 von großer Wichtigkeit für die Aktivität des Enzyms. Der Austausch H132N (in *A. aeolicus*, H143N in FB188 HDAH) führt zu einer signifikanten Abnahme des Substratumsatzes, dennoch wird hier – auf niedrigem Niveau - weiterhin Substrat prozessiert. Unklar ist, auf welche Weise in diesem Falle die Amino-Gruppe des Lysins protoniert werden kann.

Betrachtet man die Aminosäure-Substitutionen, die das innere His-Asp *charge relay* System (H142N und D178S) betreffen, welches für die Positionierung des für die Reaktion unerlässlichen Wassermoleküls und die Aufnahme eines Protons von diesem verantwortlich ist, stellt man fest, dass diese Mutanten keinen Substratumsatz mehr zeigen. Damit ist gezeigt, dass diese Positionen unerlässlich für eine Aufrechterhaltung des Katalysemechanismus sind. In der Literatur wurde dieses *charge relay* System anhand von Rechner-basierten Simulationen ebenfalls verifiziert (Vanommeslaeghe *et al.*, 2003).

Neben den potentiellen Zink-Liganden (siehe 5.2) und den *charge relay* Systemen ist das Tyrosin 297 (nach *A. aeolicus*) eine weitere funktionelle Einheit des postulierten Reaktionsmechanismus. Dieses fungiert laut Finnin als Ligand des Carbonyl-Sauerstoffs des Substrates und ist ebenfalls in allen betrachteten Sequenzen (Abb. 4.5) wieder zu finden (eine Ausnahme stellt hier die putative APAH aus *Aeropyrum pernix* dar, die an dieser Stelle ein Phenylalanin aufweist). Ein Austausch dieses Tyrosins gegen ein Phenylalanin (Y312F), was strukturell den Wegfall der den Carbonyl-Sauerstoff stabilisierenden OH-Gruppe darstellt, führt zu einer etwa 10-fachen Vergrößerung des  $K_m$ -Wertes und einem um etwa einen Faktor 10 kleineren  $V_{max}$ -Wert, bezogen auf das Substrat Boc-Lys(Ac)-MCA. Für den Umsatz der Trifluoracetyl-Substratvariante scheint die OH-Gruppe des Tyrosins dagegen einen aktivitätssteigernden Effekt zu haben. Während der Umsatz des Boc-Lys(TFA)-MCA durch das Wildtyp-Enzym moderat ist, setzt die Y312F-Mutante dieses Substrat wesentlich effektiver um. Trifluoracetat, als wesentlich bessere Abgangsgruppe, braucht die stabilisierende Wirkung der OH-Gruppe des Tyrosins

offensichtlich nicht. Im Gegenteil scheint diese OH-Gruppe das Abspalten des Trifluoracetats sogar zu erschweren. Ein synchroner Elementarprozess mit den Elementen der Hydroxylion-Attacke und der Abspaltung von Acetat über einen tetrahedrigen Übergangszustand (siehe Einleitung, Reaktionsmechanismus, Abb. 2 B) erklärt die Befunde also nicht zwanglos.

Aufgrund dieser Befunde, d.h. dem Fehlen des zweiten, äußeren *charge relay* Systems und der Tatsache, dass das Tyrosin nicht essentiell für einen Substratumsatz zu sein scheint, sollte der angenommene Reaktionsmechanismus von Finnin weiter überdacht werden. Weitere Daten gegen diesen postulierten Reaktionsmechanismus liefern die Substratspezifitäts-Studien mit Substitutionen am Acylrestes des Substrates. Es konnte, zumindest bei der FB188 HDAH keine Umsatzsteigerung der Trifluoracetyl-Substratvariante erzielt werden, eine Methylsulfonyl-Substratvariante wurde gar nicht umgesetzt. Theoretisch sollten diese beiden Substrate, aufgrund ihres besseren Abgangsgruppen-Charakters, in höherem Maße prozessiert werden als das acetylierte Standardsubstrat. Somit scheint die Ablösung der Acyl-Komponente nicht nur von deren Abgangsgruppen-Charakter, sondern auch von anderen Faktoren, die den Aufbau des reaktiven Zentrums betreffen abhängig zu sein, was im Widerspruch zu dem postulierten Mechanismus steht.

Der postulierte Übergangszustand konnte zudem in einem Ansatz, bei dem neue, Phosphor-beihaltende Inhibitoren verwendet wurden, nicht bestätigt werden (Kapustin *et al.*, 2003). In diesem Ansatz wurden SAHA-analoge Inhibitoren mit Phosphoamidat als funktionelle Gruppe hergestellt und auf ihre Hemmwirkung hin untersucht. Inhibitoren aus der Klasse der Phosphoamidate sind in ihrer Funktion als Übergangszustands-Analoga bei Zink-Proteasen bekannt, und ihre Wirkung ist für Thermolysin und Carboxypeptidase A nachgewiesen (Holmes and Matthews, 1981; Nishino and Powers, 1979). In Bezug auf den Bindungsmodus sollten Inhibitoren dieser Klasse sogar verbesserte Übergangszustands-Analoga darstellen. Die Phosphor-Sauerstoff-Bindungen sind länger als die Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungen und sollten somit die langen Bindungen des Übergangszustandes besser nachahmen (Abb. 5.1).

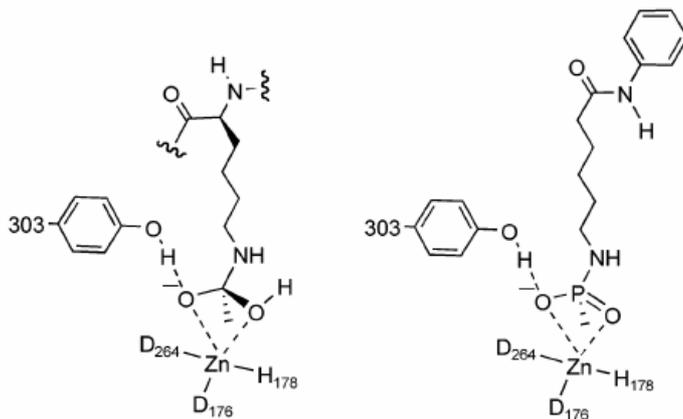


Abb. 5.1

Postulierter Übergangszustand der HDAC1 (links) und ein Modell der Bindung eines Phosphoramidates (rechts). Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht der der HDAC1. (entnommen aus Kapustin *et al.*, 2003).

Mit diesem Phosphoramidat-Inhibitor konnte jedoch keine verbesserte Wirkung gegenüber SAHA erzielt werden, ebenso wenig mit Inhibitoren, die Phosphonat bzw. Phosphinat als funktionelle Gruppe trugen.

Denkbar wäre in diesem Zusammenhang ein abgewandelter Mechanismus, der aus zwei Stufen besteht. In einem ersten Schritt wird die Acetylgruppe auf einen Akzeptor des Enzyms übertragen (geschwindigkeitsbestimmend). In einem zweiten Schritt wird die Bindung zwischen Acetylgruppe und Akzeptor hydrolysiert. Theoretisch könnte die Hydroxyl-Gruppe des Tyrosins 297 durch Wechselwirkungen mit einem Wassermolekül aktiviert werden und somit als Nukleophil fungieren. Dies geht mit Beobachtungen konform, bei dem das durch das Histidin 131 (inneres *charge relay* System) deprotonierte Wassermolekül in *ab initio*-Bindungsstudien in der Nähe des Tyrosins 297 in dem freien, nicht mit einem Inhibitor beladenem HDLP wiedergefunden wurde (Vanommeslaeghe *et al.*, 2003). Die Reaktion könnte also, abweichend vom postulierten Mechanismus, durch Wechselwirkungen des Tyrosins 297 und des deprotonierten Wassermoleküls in der Art ablaufen, dass der nukleophile Angriff auf das Carbonyl-C-Atom durch den Hydroxyl-Sauerstoff des Tyrosins erfolgt (Riester *et al.*, 2004), worauf sich der Acetyl-Rest auf das Tyrosin übertragen würde. In einem zweiten Schritt würde sich dann das Acetyl von Tyrosin wieder ablösen und freigesetzt werden.

Dagegen sprechen allerdings die Mutagenese-Studien, da trotz Austausch des Tyrosins das Substrat weiterhin, zwar in geringerem Umfang, aber dennoch signifikant, prozessiert wurde.

Eine weitere Hypothese aus der Literatur, die es zu überprüfen galt, war der Austritt des Acetats über die 14 Å-Kavität, die unterhalb der Substratbindungstasche liegt und mit dem

reaktiven Zentrum des Enzyms in Verbindung steht (Wang *et al.*, 2004). Wang und Kollegen beschreiben die Übertragung des Acetats über zwei innerhalb dieser Kavität nachgewiesene Arginine, die somit den Austritt des Acetats katalysieren sollen. Im Gegenzug dazu soll das Wasser, welches für die Deacetylierungsreaktion notwendig ist, auf umgekehrtem Weg ins reaktive Zentrum gelangen. Diese beiden Arginine (Arg16 und Arg27 des HDLP) lassen sich jedoch nicht in der *FB188* HDAH an entsprechenden Positionen wieder finden. Lediglich das zweite Arginin (Arg27) könnte dem Arginin 29 der *FB188* HDAH entsprechen. Ein Austausch dieses Arginins 29 der *FB188* HDAH hatte allerdings keine Konsequenzen auf die Aktivität des Enzyms.  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wert lagen ziemlich genau im Bereich der Werte, die für das Wildtyp-Enzym ermittelt wurden. Somit wäre belegt, dass dieser Austausch keine Auswirkungen hat und damit das Postulat eines Acetat-Übertrags innerhalb der 14 Å-Kavität über die angesprochenen Arginine zumindest nicht für die *FB188* HDAH zutrifft.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, auch die beiden Glycine 295 und 296 (gemäß HDLP) zu betrachten. Diese beiden Glycine sind ebenfalls, bis auf wenige Ausnahmen, streng konserviert (Abb. 4.5) und liegen am Übergang des Substrattunnels zum reaktiven Zentrum zu der 14 Å-Kavität. Die beiden Glycine sind ebenfalls in der *FB188* HDAH konserviert und sollten ausgetauscht werden. Eine PCR der *Quik change* Mutagenese konnte für beide Mutanten (G310A, G311A) durchgeführt werden. Allerdings konnte kein Enzym der Mutante G311A exprimiert werden. Die G310A-Mutante zeigte einen in etwa 10-fach schwächeren Substratumsatz, womit die Wichtigkeit dieser Aminosäure belegt wäre. Geht man weiterhin von einem Austritt des Acetats über die 14 Å-Kavität des Enzyms aus, kann es in diesem Zusammenhang sein, dass die Einführung einer zusätzlichen Methylgruppe (G310A) den Übergangsbereich des aktiven Zentrums zur Kavität verengt und das Acetat somit diesen Bereich schlechter passieren kann. Hier könnte man durch Einführung noch größerer bzw. voluminöserer Aminosäuren (Leucin, Phenylalanin) versuchen, den Übergangsbereich noch weiter einzuengen und den postulierten Austritt des Acetats über diese Kavität zum Erliegen zu bringen.

Neben der gezielten Mutagenese von Aminosäuren im aktiven Zentrum der *FB188* HDAH wurden unter anderem Mutanten generiert, die Aufschluss über Substrat-Bindung bzw. Inhibitor-Bindung geben sollten (4.10.2). Diese ausgewählten Aminosäuren kleiden mit ihren unpolaren Resten die Innenseite der Substratbindungstasche aus und bilden Kontakte zum Substrat, bzw. Inhibitor aus. Für die ausgewählten Positionen (F141, F198 in HDLP,

entsprechend F152 und F208 in der *FB188* HDAH), die potentielle Wechselwirkungspartner mit dem aromatischen Ring von Inhibitoren wie TSA oder SAHA darstellen, wurden jeweils zwei Mutanten hergestellt. Die Position F152 wurde jeweils gegen ein Arginin und ein Isoleucin ausgetauscht. Diese Mutanten zeigten leicht schlechtere  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte (Tab.4.5). Die Mutanten des Phenylalanins 208 (F208R, F208L) setzten das Substrat etwas schlechter um als die F152 Mutanten. Dies zeigt, dass die Phenylalanine, welche die Substratbindungstasche auskleiden, einen Einfluss auf das Bindungsverhalten des Substrates haben. Die Einführung der basischen Seitenkette des Arginins führte in der jeweiligen Mutante zu höheren Aktivitätseinbußen als die Einführung einer Aminosäure mit aliphatisch-apolarem Charakter (F152I, F208L). Dennoch scheinen Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten, wie in diesem Fall die ursprünglichen Phenylalanine, die Substratbindung besser zu unterstützen. Um nicht nur die Auswirkungen der Aminosäureaustausche auf den Substrat-Umsatz sondern auch auf das Verhalten der Inhibitor-Bindung zu untersuchen, wurde *FB188* Wildtyp-Enzym und die beiden F152-Mutanten mit SAHA und zwei neue Inhibitoren, SpABaHA (suberoyl-para-Amino-Benzoeacid-Hydroxamic-Acid) und SGlyHA (suberoyl-glycin-Hydroxamic-Acid) vermessen (Abb. 4.34; Tab. 4.6). Diese Inhibitoren unterscheiden sich jeweils in ihren Kopfgruppen. Das Hydroxamat als funktionelle Gruppe und die gleiche aliphatische Linker-Region ist allen gemein, an den Kopfgruppen wurde gegenüber SAHA der Aromat gegen einen Glycin-Rest ausgetauscht, was zu einem kleineren Volumen unter Einführung einer Ladungskomponente (Carbonsäure) führte (SGlyHA), bzw. der Aromat mit einem zusätzlichen Carbonsäure-Rest in para-Stellung versehen (SpABaHA). Durch diese Veränderungen sowohl in der Größe als auch in der Ladung sollte überprüft werden, welchen Einfluss die Aminosäureaustausche an Position 152 haben. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob diese modifizierten SAHA-Varianten das Wildtyp-Enzym nicht sogar besser hemmen als SAHA selbst. Dies war bei der SpABaHA-Variante der Fall, was an einem leicht besseren  $IC_{50}$ -Wert abzulesen ist ( $0,95 \mu\text{M}$  für SAHA;  $0,66 \mu\text{M}$  für SpABaHA; Tab. 4.6). Hier scheint die Einführung einer Ladungskomponente (Carbonsäure am Aromaten) die Bindungseigenschaften des Inhibitors zu verbessern. SGlyHA zeigte leichte Einbußen in ihrer inhibitorischen Funktion ( $IC_{50} = 3,19\mu\text{M}$ ). Die F152-Mutanten zeigten gegenüber dem letztgenannten Inhibitor jedoch eine drastische Resistenz seiner inhibitorischen Wirkung. Sowohl der Arginin- als auch der Isoleucin-Austausch führte zu  $IC_{50}$ -Werten um  $2,8 \text{ mM}$ , was eine Verschlechterung gegenüber dem Wildtyp-Enzym um einen Faktor 1000 darstellt. Auch die  $IC_{50}$ -Werte von SpABaHA

fielen bei Untersuchungen bei den Mutanten höher aus als beim Wildtyp-Enzym ( $IC_{50}$  F152R = 5,65  $\mu$ M;  $IC_{50}$  F152I = 3,10  $\mu$ M). Allein mit SAHA ließ sich bei den untersuchten Mutanten keine signifikante Verschlechterung der Inhibition im Vergleich zum Wildtyp-Enzym nachweisen ( $IC_{50}$  F152R = 1,36  $\mu$ M;  $IC_{50}$  F152I = 1,33  $\mu$ M).

Aus diesen Versuchen kann abgeleitet werden, dass die Substitution des Phenylalanin 152 sowohl durch eine basische Aminosäure (Arginin) als auch durch eine nicht-aromatische Aminosäure (Isoleucin) nicht nur zu einer Verschlechterung der Substrat-Bindung (höherer  $K_m$ -Wert) sondern auch zu einem schlechteren Inhibitor-Bindungsverhalten (höherer  $IC_{50}$ -Wert) führt. Man sollte in diesem Zusammenhang jedoch kritisch anmerken, dass bei genauerer Betrachtung der aktuellen Literatur auffällt, dass die Kopfgruppe der Inhibitoren nicht genau auf der Höhe des hier untersuchten Phenylalanins positioniert ist, sondern ein wenig oberhalb dieser Position seine Wirkung entfaltet. Dies kann sowohl aus einer Darstellung nach röntgenkristallographischer Analyse (Finnin *et al.*, 1999) als auch aus einer leicht davon abweichenden Darstellung nach *AutoDock*-Kalkulationen (Wang *et al.*, 2004) entnommen werden. Dennoch zeigen die hier erbrachten Resultate mit den jeweiligen Inhibitoren (SAHA, SpABaHA und SGlyHA), dass Phenylalanin 152 direkt oder indirekt (über die lokale Struktur) wichtig für die Inhibitorbindung ist. Die Mutation F152R führt zu einem Enzym, das zwischen aliphatischen und aromatischen Inhibitor-Kopfgruppen unterscheiden kann.

Die Aminosäureposition 167 des HDLP scheint zwar nicht direkt in den Katalysemechanismus involviert, stellt aber aufgrund seiner unmittelbaren Nähe zu zwei der drei postulierten Zink-Liganden (D168, H170) eine interessante Position dar. Diese Position dient weiterhin als Unterscheidungsmerkmal der HDAC-Klassen. HDACs der Klasse I (und das HDLP) weisen an dieser Position konserviert Leucin oder Isoleucin auf, während Enzyme der HDAC Klasse II (und die beiden HDAHs) an dieser Position einheitlich mit dem viel größeren Tryptophan besetzt sind (Grozinger and Schreiber, 2002). Um den Einfluß dieser Position auf die Aktivität zu untersuchen, wurden zwei Mutanten der FB188 HDAH (W179I, W179L) hergestellt und ihr Substratumsatz analysiert. Beide Mutationen hatten jedoch keine Auswirkung auf die Aktivität des Enzyms, so dass dieser Position keine Klassen-spezifische Funktion zugeordnet werden konnte.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Da bislang in der Literatur nur wenig über posttranslationale Modifikationen in Form von Acetylierungsmustern von Polypeptiden in Prokaryonten bekannt ist, sollte in dieser Arbeit versucht werden, Erkenntnisse über die Prozesse der Deacetylierung zu erlangen. Es konnte ein Enzym aus einem Stamm *Bordetella/Alcaligenes FB188* isoliert werden, welches eine Deacetylierungsreaktion der Substanz *cis-(±)-N*-[4-(hydroxymethyl)cyclopent-2-enyl]acetamide (NAA) durchführt. Ein zweites Enzym, die *PA3774* HDAC aus *Pseudomonas aeruginosa* konnte ebenfalls isoliert werden. Diese Enzyme weisen signifikante Ähnlichkeiten zu Enzymen der Histondeacetylase-Superfamilie (HDAC, APAH, *acuC*) auf und wurden deshalb als Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolasen (HDAH) klassifiziert. Es stellte sich in diesem Zusammenhang die Frage, warum es trotz des Fehlens von Histon-Proteinen und einer, im Vergleich zu Eukaryonten anderen DNA-Verpackung, Enzyme aus dieser Familie in Bakterien gibt. Um den Kreis der natürlichen Substrate einzuengen, wurde Substratspezifitätsstudien durchgeführt. Acetyl-Polyamine, die natürlichen Substrate der Acetylpolyamin-Amidohydrolasen, können als natürliche Substrate der *FB188* HDAH, trotz einer engen Verwandtschaft zu den APAHs, aufgrund eines nur sehr geringen Umsatzes ausgeschlossen werden. Es scheint anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten wahrscheinlicher, dass acetylierte Proteine das natürliche Substrat dieser Enzymklasse (HDAH) darstellen, da acetylierte Proteinstrukturen in Form von z.B. acetylierten Hühner-Histonen von der *FB188* HDAH umgesetzt wurden. Darüber hinaus zeigten Konkurrenzexperimente mit Tubulin eine signifikante Hemmung des Enzyms, was zumindest für eine Bindung dieses Proteins spricht. Um diese Thesen zu verifizieren wurden sowohl die *FB188* HDAH als auch die *PA3774* HDAH in einem fluorogenen HDAC Assay umfassender untersucht. Das Substrat Boc-Lys(Ac)-MCA wurde von beiden Enzymen in gleichem Umfang prozessiert, tripeptidische Substrate vom Aufbau AS<sub>1</sub>-AS<sub>2</sub>-Lys(Ac)-MCA wurden sequenzspezifisch ebenfalls gespalten. Im Rahmen von Studien mit weiteren Substraten erwies sich die *FB188* HDAH im Gegensatz zur *PA3774* HDAH als nicht enantioselektiv gegenüber Boc-L-Lysin(AC)-MCA bzw. Boc-D-Lys(Ac)-MCA. Des Weiteren wurden Substratpräferenzen auch anhand von Konkurrenz- und Inhibitionsexperimenten untersucht. In diesem Zusammenhang konnte ein neuer, potenter Inhibitor (CypX) identifiziert werden.

Anhand von Mutagenese-Studien der *FB188* HDAH und weiterführenden Untersuchungen zur Substratspezifität konnte ein in der Literatur postulierter Reaktionsmechanismus eines

HDAC-ähnlichen Enzyms (HDLP aus *A. aeolicus*) nicht in allen Einzelheiten für die *FB188* HDAH bestätigt werden. So führten Mutationen von als essentiell postulierten Aminosäuren führten nicht in allen Fällen zum Totalausfall des Enzyms. Auch Substrate mit besseren Abgangsgruppen zeigten nicht den erwarteten, schnelleren Umsatz des Substrates, so dass hier der vorhergesagte Katalysemechanismus, zumindest für die *FB188* HDAH, überdacht werden muss.

Auf der Suche nach dem natürlichen Substrat der *FB188* HDAH konnten zunächst acetylierte Proteine in Zellextrakten aus verschiedenen Bakterien und Archäen nachgewiesen werden, was für sich genommen schon einen interessanten, neuen Befund darstellt. Erste Untersuchungen deuten in diesem Zusammenhang auf ein Protein der Masse von ca. 65 kDa als natürliches Target der *FB188* HDAH hin. Diese Ergebnisse müssen jedoch erst bestätigt werden, bevor eine weitere Identifikation dieses Proteins über 2D-Gelelektrophorese, Isolierung der Proteinbande mit anschließender Protein-Ansequenzierung und letztendlich Klonierung und Charakterisierung dieses potentiellen Targets erfolgen kann.

Die Röntgenkristallographische Analyse und letztendlich die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur stellt ebenfalls ein weiteres Ziel, auch in Bezug auf die Verifizierung des Reaktionsmechanismus, dar. Erste vorbereitende Schritte wurden in diese Richtung unternommen und Kristalle der *FB188* HDAH konnten generiert werden. Weitere Untersuchungen dieser Kristalle werden im Moment durchgeführt und es ist mit einer Strukturaufklärung zu Beginn des Jahres 2005 zu rechnen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Agalioti, T., Chen, G., and Thanos, D. (2002) Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* **111**: 381-392.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964) Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 786-794.
- Ando, S., Ishikawa, K., Ishida, H., Kawarabayasi, Y., Kikuchi, H., and Kosugi, Y. (1999) Thermostable aminopeptidase from *Pyrococcus horikoshii*. *FEBS Lett* **447**: 25-28.
- Asano, Y., Nakazawa, A., Kato, Y., and Kondo, K. (1989) Properties of a novel D-stereospecific aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi*. *J Biol Chem* **264**: 14233-14239.
- Auld, D.S., and Vallee, B.L. (1970) Kinetics of carboxypeptidase A. The pH dependence of tripeptide hydrolysis catalyzed by zinc, cobalt, and manganese enzymes. *Biochemistry* **9**: 4352-4359.
- Bannister, A.J., Miska, E.A., Gorlich, D., and Kouzarides, T. (2000) Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Curr Biol* **10**: 467-470.
- Barak, R., and Eisenbach, M. (2001) Acetylation of the response regulator, CheY, is involved in bacterial chemotaxis. *Mol Microbiol* **40**: 731-743.
- Barak, R., and Eisenbach, M. (2004) Co-regulation of acetylation and phosphorylation of CheY, a response regulator in chemotaxis of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **342**: 375-381.
- Bell, S.D., Botting, C.H., Wardleworth, B.N., Jackson, S.P., and White, M.F. (2002) The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. *Science* **296**: 148-151.
- Berger, S.L. (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 142-148.
- Betz, R., Gray, S.G., Ekstrom, C., Larsson, C., and Ekstrom, T.J. (1998) Human histone deacetylase 2, HDAC2 (Human RPD3), is localized to 6q21 by radiation hybrid mapping. *Genomics* **52**: 245-246.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Bowien, B., and Kusian, B. (2002) Genetics and control of CO(2) assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. *Arch Microbiol* **178**: 85-93.
- Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y., and Ogryzko, V. (1998) Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* **396**: 594-598.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brandtner, E.M., Lechner, T., Loidl, P., and Lusser, A. (2002) Molecular identification of PpHDAC1, the first histone deacetylase from the slime mold *Physarum polycephalum*. *Cell Biol Int* **26**: 783-789.
- Buggy, J.J., Sideris, M.L., Mak, P., Lorimer, D.D., McIntosh, B., and Clark, J.M. (2000) Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem J* **350 Pt 1**: 199-205.
- Bullock (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-Galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-379.
- Chen, H., Lin, R.J., Xie, W., Wilpitz, D., and Evans, R.M. (1999) Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* **98**: 675-686.

- Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2110-2114.
- Collins, F.S., and Weissman, S.M. (1984) Directional cloning of DNA fragments at a large distance from an initial probe: a circularization method. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 6812-6816.
- Covault, J., and Chalkley, R. (1980) The identification of distinct populations of acetylated histone. *J Biol Chem* **255**: 9110-9116.
- Dangond, F., Hafler, D.A., Tong, J.K., Randall, J., Kojima, R., Utku, N., and Gullans, S.R. (1998) Differential display cloning of a novel human histone deacetylase (HDAC3) cDNA from PHA-activated immune cells. *Biochem Biophys Res Commun* **242**: 648-652.
- De Rubertis, F., Kadosh, D., Henchoz, S., Pauli, D., Reuter, G., Struhl, K., and Spierer, P. (1996) The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast. *Nature* **384**: 589-591.
- Docherty, K. (1996) *DNA Protein Interactions: Essential Techniques*: John Wiley & Sons.
- Dockray, G.J. (1987) The biosynthesis of regulatory peptides. *Am Rev Respir Dis* **136**: S9-15.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.
- Driessen, H.P., de Jong, W.W., Tesser, G.I., and Bloemendal, H. (1985) The mechanism of N-terminal acetylation of proteins. *CRC Crit Rev Biochem* **18**: 281-325.
- Emiliani, S., Fischle, W., Van Lint, C., Al-Abed, Y., and Verdin, E. (1998) Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2795-2800.
- Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Breslow, R., and Pavletich, N.P. (1999) Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **401**: 188-193.
- Fischle, W., Emiliani, S., Hendzel, M.J., Nagase, T., Nomura, N., Voelter, W., and Verdin, E. (1999) A new family of human histone deacetylases related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p. *J Biol Chem* **274**: 11713-11720.
- Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C.D. (2003) Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 172-183.
- Frye, R.A. (2000) Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **273**: 793-798.
- Furukawa, Y., Kawakami, T., Sudo, K., Inazawa, J., Matsumine, A., Akiyama, T., and Nakamura, Y. (1996) Isolation and mapping of a human gene (RPD3L1) that is homologous to RPD3, a transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cytogenet Cell Genet* **73**: 130-133.
- Gonzales, T., and Robert-Baudouy, J. (1996) Bacterial Aminopeptidases : Properties and functions. *FEMS Microbiology Reviews* **18**: 319-344.
- Govan, J.R., and Deretic, V. (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**: 539-574.
- Graessle, S., Loidl, P., and Brosch, G. (2001) Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases. *Cell Mol Life Sci* **58**: 704-720.
- Gray, S.G., and Ekstrom, T.J. (2001) The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* **262**: 75-83.
- Gregoretto, I.V., Lee, Y.M., and Goodson, H.V. (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* **338**: 17-31.

- Grozinger, C.M., Hassig, C.A., and Schreiber, S.L. (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4868-4873.
- Grozinger, C.M., and Schreiber, S.L. (2002) Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol* **9**: 3-16.
- Grundy, F.J., Waters, D.A., Takova, T.Y., and Henkin, T.M. (1993) Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **10**: 259-271.
- Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**: 349-352.
- Gu, W., and Roeder, R.G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**: 595-606.
- Hayes, J.J., and Hansen, J.C. (2001) Nucleosomes and the chromatin fiber. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 124-129.
- He, J., Baldini, R.L., Deziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N.T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H.M., and Rahme, L.G. (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2530-2535.
- Hebbes, T.R., Thorne, A.W., and Crane-Robinson, C. (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Embo J* **7**: 1395-1402.
- Heltweg, B., and Jung, M. (2002) A microplate reader-based nonisotopic histone deacetylase activity assay. *Anal Biochem* **302**: 175-183.
- Heltweg, B., and Jung, M. (2003) A homogeneous nonisotopic histone deacetylase activity assay. *J Biomol Screen* **8**: 89-95.
- Hildmann, C., Ninkovic, M., Dietrich, R., Wegener, D., Riester, D., Zimmermann, T., Birch, O.M., Bernegger, C., Loidl, P., and Schwienhorst, A. (2004) A new amidohydrolase from *Bordetella* or *Alcaligenes* strain FB188 with similarities to histone deacetylases. *J Bacteriol* **186**: 2328-2339.
- Hirel, P.H., Schmitter, M.J., Dessen, P., Fayat, G., and Blanquet, S. (1989) Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 8247-8251.
- Hofacker, I.L., W. Fontana, and P. F. Stadler (1994) Fast folding and comparison of (RNA) secondary structures. *Monatsh. Chem.* **125**: 167-188.
- Hoffmann, K., Brosch, G., Loidl, P., and Jung, M. (1999) A non-isotopic assay for histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res* **27**: 2057-2058.
- Hoffmann, K., Heltweg, B., and Jung, M. (2001) Improvement and validation of the fluorescence-based histone deacetylase assay using an internal standard. *Arch Pharm (Weinheim)* **334**: 248-252.
- Holmes, M.A., and Matthews, B.W. (1981) Binding of hydroxamic acid inhibitors to crystalline thermolysin suggests a pentacoordinate zinc intermediate in catalysis. *Biochemistry* **20**: 6912-6920.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- <http://www.research.umbc.edu/~dfrey1/acidbase>.
- Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., Zhu, Y., Kirkpatrick, R., Zhang, G.F., Johanson, K., Sung, C.M., Liu, R., and Winkler, J. (2000) Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *J Biol Chem* **275**: 15254-15264.
- Hu, E., Dul, E., Sung, C.M., Chen, Z., Kirkpatrick, R., Zhang, G.F., Johanson, K., Liu, R., Lago, A., Hofmann, G., Macarron, R., de los Frailes, M., Perez, P., Krawiec, J.,

- Winkler, J., and Jaye, M. (2003) Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther* **307**: 720-728.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., and Yao, T.P. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**: 455-458.
- Huff, J.R. (1999) New drugs-reports of new drugs recently approved by the FDA. Abacavir sulfate. *Bioorg Med Chem* **7**: 2667-2669.
- Kapustin, G.V., Fejer, G., Gronlund, J.L., McCafferty, D.G., Seto, E., and Etzkorn, F.A. (2003) Phosphorus-based SAHA analogues as histone deacetylase inhibitors. *Org Lett* **5**: 3053-3056.
- Katan-Khaykovich, Y., and Struhl, K. (2002) Dynamics of global histone acetylation and deacetylation in vivo: rapid restoration of normal histone acetylation status upon removal of activators and repressors. *Genes Dev* **16**: 743-752.
- Kervabon, A., Mery, J., and Parello, J. (1979) Enzymatic deacetylation of a synthetic peptide fragment of histone H4. *FEBS Lett* **106**: 93-96.
- Khochbin, S., and Wolffe, A.P. (1997) The origin and utility of histone deacetylases. *FEBS Lett* **419**: 157-160.
- Kleppe, K., Ovrebo, S., and Lossius, I. (1979) The bacterial nucleoid. *J Gen Microbiol* **112**: 1-13.
- Kobayashi, Y., T. Azuma, H. Machida, and S. Iwasaki. (1985) Japanese published unexamined patent application no. 43380/.
- Kölle, D., Brosch, G., Lechner, T., Lusser, A., and Loidl, P. (1998) Biochemical methods for analysis of histone deacetylases. *Methods* **15**: 323-331.
- Kouzarides, T. (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *Embo J* **19**: 1176-1179.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leahy, D.J., Hendrickson, W.A., Aukhil, I., and Erickson, H.P. (1992) Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science* **258**: 987-991.
- Lechner, T., Lusser, A., Brosch, G., Eberharter, A., Goralik-Schramel, M., and Loidl, P. (1996) A comparative study of histone deacetylases of plant, fungal and vertebrate cells. *Biochim Biophys Acta* **1296**: 181-188.
- Leipe, D.D., and Landsman, D. (1997) Histone deacetylases, acetoin utilization proteins and acetylpolyamine amidohydrolases are members of an ancient protein superfamily. *Nucleic Acids Res* **25**: 3693-3697.
- Leroy, D., Schmid, N., Behr, J.P., Filhol, O., Pares, S., Garin, J., Bourgarit, J.J., Chambaz, E.M., and Cochet, C. (1995) Direct identification of a polyamine binding domain on the regulatory subunit of the protein kinase casein kinase 2 by photoaffinity labeling. *J Biol Chem* **270**: 17400-17406.
- Li, J., Staver, M.J., Curtin, M.L., Holms, J.H., Frey, R.R., Edalji, R., Smith, R., Michaelides, M.R., Davidsen, S.K., and Glaser, K.B. (2004) Expression and functional characterization of recombinant human HDAC1 and HDAC3. *Life Sci* **74**: 2693-2705.
- Li, S., and Wilkinson, M.F. (1997) Site-directed mutagenesis: a two-step method using PCR and DpnI. *Biotechniques* **23**: 588-590.
- Loidl, P. (2004) A plant dialect of the histone language. *Trends Plant Sci* **9**: 84-90.
- Ludueno, R.F. (1998) Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* **178**: 207-275.
- MacRae, T.H. (1997) Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem* **244**: 265-278.

- Mai, A., Massa, S., Pezzi, R., Rotili, D., Loidl, P., and Brosch, G. (2003) Discovery of (aryloxopropenyl)pyrrolyl hydroxyamides as selective inhibitors of class IIa histone deacetylase homologue HD1-A. *J Med Chem* **46**: 4826-4829.
- Mai, A., Massa, S., Cerbara, I., Valente, S., Ragno, R., Bottoni, P., Scatena, R., Loidl, P., and Brosch, G. (2004) 3-(4-Aroyl-1-methyl-1H-2-pyrrolyl)-N-hydroxy-2-propenamides as a new class of synthetic histone deacetylase inhibitors. 2. Effect of pyrrole-C2 and/or -C4 substitutions on biological activity. *J Med Chem* **47**: 1098-1109.
- Makinen, M.W., Kuo, L.C., Dymowski, J.J., and Jaffer, S. (1979) Catalytic role of the metal ion of carboxypeptidase A in ester hydrolysis. *J Biol Chem* **254**: 356-366.
- Mandel, M., and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-162.
- Miyazaki, K., K. Izu, S. Honda, and K. Kusai. (1985) Japanese published unexamined patent application no. 98982.
- Mogilnaya, O.A., Kiselyova, E.V., Medvedeva, S.E., Puzir, A.P., Guseynov, O.A., Kulyba, N.N., and Kozlov, A.V. (1992) Immunoelectronmicroscopic study of the nucleoid structure of hydrogen bacteria. *J Basic Microbiol* **32**: 381-387.
- Morgan, D.M. (1998) Polyamines. An introduction. *Methods Mol Biol* **79**: 3-30.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Nakanishi, S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* **258**: 597-603.
- Neuwald, A.F. (1997) A shared domain between a spindle assembly checkpoint protein and Ypt/Rab-specific GTPase-activators. *Trends Biochem Sci* **22**: 243-244.
- Ninkovic, M., Riester, D., Wirsching, F., Dietrich, R., and Schwienhorst, A. (2001) Fluorogenic assay for penicillin G acylase activity. *Anal Biochem* **292**: 228-233.
- Nishino, N., and Powers, J.C. (1979) Design of potent reversible inhibitors for thermolysin. Peptides containing zinc coordinating ligands and their use in affinity chromatography. *Biochemistry* **18**: 4340-4347.
- Nygren, P.A., Stahl, S., and Uhlen, M. (1994) Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends Biotechnol* **12**: 184-188.
- Ogden, R.C., and Adams, D.A. (1987) Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Methods Enzymol* **152**: 61-87.
- Okada, M. (1981) Japanese published unexamined patent application no.144088/.
- Persson, B., Flinta, C., von Heijne, G., and Jornvall, H. (1985) Structures of N-terminally acetylated proteins. *Eur J Biochem* **152**: 523-527.
- Pipal, A., Goralik-Schramel, M., Lusser, A., Lanzanova, C., Sarg, B., Loidl, A., Lindner, H., Rossi, V., and Loidl, P. (2003) Regulation and processing of maize histone deacetylase Hda1 by limited proteolysis. *Plant Cell* **15**: 1904-1917.
- Pogo, B.G., Allfrey, V.G., and Mirsky, A.E. (1966) RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**: 805-812.
- Polevoda, B., Norbeck, J., Takakura, H., Blomberg, A., and Sherman, F. (1999) Identification and specificities of N-terminal acetyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **18**: 6155-6168.
- Polevoda, B., and Sherman, F. (2000) N-alpha -terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Biol Chem* **275**: 36479-36482.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599.

- Ramakrishnan, R., Schuster, M., and Bourret, R.B. (1998) Acetylation at Lys-92 enhances signaling by the chemotaxis response regulator protein CheY. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4918-4923.
- Reeve, J.N. (2003) Archaeal chromatin and transcription. *Mol Microbiol* **48**: 587-598.
- Reuter, K., and Ficner, R. (1999) Overproduction, purification, crystallization and preliminary x-ray diffraction studies of the human spliceosomal protein U5-15kD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55 ( Pt 4)**: 888-890.
- Richon, V.M., Emiliani, S., Verdin, E., Webb, Y., Breslow, R., Rifkind, R.A., and Marks, P.A. (1998) A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3003-3007.
- Riester, D., Wegener, D., Hildmann, C., and Schwienhorst, A. (2004) Members of the histone deacetylase superfamily differ in substrate specificity towards small synthetic substrates. *Biochem Biophys Res Commun* **324**: 1116-1123.
- Rundlett, S.E., Carmen, A.A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B.M., and Grunstein, M. (1996) HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14503-14508.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sakurada, K., Ohta, T., Fujishiro, K., Hasegawa, M., and Aisaka, K. (1996) Acetylpolyamine amidohydrolase from *Mycoplana ramosa*: gene cloning and characterization of the metal-substituted enzyme. *J Bacteriol* **178**: 5781-5786.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandman, K., Pereira, S.L., and Reeve, J.N. (1998) Diversity of prokaryotic chromosomal proteins and the origin of the nucleosome. *Cell Mol Life Sci* **54**: 1350-1364.
- Sandman, K., and Reeve, J.N. (1998) Origin of the eukaryotic nucleus. *Science* **280**: 501, 503.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Schlegel (1985) *Allgemeine Mikrobiologie*: Thieme Verlag.
- Schwienhorst, A. (2002) *Advanced Screening Strategies for Biocatalyst Discovery*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Shuman, S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **269**: 32678-32684.
- Smyth, D.G., Massey, D.E., Zakarian, S., and Finnie, M.D. (1979) Endorphins are stored in biologically active and inactive forms: isolation of alpha-N-acetyl peptides. *Nature* **279**: 252-254.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., and Olson, M.V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45.
- Tabor, C.W., and Tabor, H. (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem* **53**: 749-790.

- Tanaka, S., Matsushita, Y., Yoshikawa, A., and Isono, K. (1989) Cloning and molecular characterization of the gene *rimL* which encodes an enzyme acetylating ribosomal protein L12 of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **217**: 289-293.
- Taunton, J., Hassig, C.A., and Schreiber, S.L. (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**: 408-411.
- Trojer, P., Brandtner, E.M., Brosch, G., Loidl, P., Galehr, J., Linzmaier, R., Haas, H., Mair, K., Tribus, M., and Graessle, S. (2003) Histone deacetylases in fungi: novel members, new facts. *Nucleic Acids Res* **31**: 3971-3981.
- Trojer, P., Dangl, M., Bauer, I., Graessle, S., Loidl, P., and Brosch, G. (2004) Histone methyltransferases in *Aspergillus nidulans*: evidence for a novel enzyme with a unique substrate specificity. *Biochemistry* **43**: 10834-10843.
- Turner, B.M. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**: 836-845.
- Turner, B.M. (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**: 285-291.
- Udenfriend, S., Stein, S., Bohlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W., and Weigele, M. (1972) Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. *Science* **178**: 871-872.
- Van den Wyngaert, I., de Vries, W., Kremer, A., Neefs, J., Verhasselt, P., Luyten, W.H., and Kass, S.U. (2000) Cloning and characterization of human histone deacetylase 8. *FEBS Lett* **478**: 77-83.
- Vannini, A., Volpari, C., Filocamo, G., Casavola, E.C., Brunetti, M., Renzoni, D., Chakravarty, P., Paolini, C., De Francesco, R., Gallinari, P., Steinkuhler, C., and Di Marco, S. (2004) Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15064-15069.
- Vanommeslaeghe, K., Van Alsenoy, C., De Proft, F., Martins, J.C., Tourwe, D., and Geerlings, P. (2003) Ab initio study of the binding of Trichostatin A (TSA) in the active site of histone deacetylase like protein (HDLP). *Org Biomol Chem* **1**: 2951-2957.
- Verdin, E., Dequiedt, F., and Kasler, H.G. (2003) Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* **19**: 286-293.
- Wade, P.A., Pruss, D., and Wolffe, A.P. (1997) Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem Sci* **22**: 128-132.
- Wang, A.H., Bertos, N.R., Vezmar, M., Pelletier, N., Crosato, M., Heng, H.H., Th'ng, J., Han, J., and Yang, X.J. (1999) HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol Cell Biol* **19**: 7816-7827.
- Wang, D.F., Wiest, O., Helquist, P., Lan-Hargest, H.Y., and Wiech, N.L. (2004) On the function of the 14 Å long internal cavity of histone deacetylase-like protein: implications for the design of histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* **47**: 3409-3417.
- Wang, W., and Malcolm, B.A. (2002) Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis. *Methods Mol Biol* **182**: 37-43.
- Wardleworth, B.N., Russell, R.J., Bell, S.D., Taylor, G.L., and White, M.F. (2002) Structure of Alba: an archaeal chromatin protein modulated by acetylation. *Embo J* **21**: 4654-4662.
- Wegener, D., Hildmann, C., Riestler, D., and Schwienhorst, A. (2003a) Improved fluorogenic histone deacetylase assay for high-throughput-screening applications. *Anal Biochem* **321**: 202-208.
- Wegener, D., Hildmann, C., and Schwienhorst, A. (2003b) Recent progress in the development of assays suited for histone deacetylase inhibitor screening. *Mol Genet Metab* **80**: 138-147.

- Wegener, D., Wirsching, F., Riester, D., and Schwienhorst, A. (2003c) A fluorogenic histone deacetylase assay well suited for high-throughput activity screening. *Chem Biol* **10**: 61-68.
- Wegener, D. (2004) Entwicklung eines HTS-geeigneten Enzymtests für Histondeacetylasen zur Entwicklung von HDAC-Inhibitoren. Göttingen: Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August Universität Göttingen.
- Winnacker, E.L. (1990) Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie.
- Wood, W.B. (1966) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J Mol Biol* **16**: 118-133.
- Xiang, T.X., and Anderson, B.D. (1998) Influence of chain ordering on the selectivity of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes for permeant size and shape. *Biophys J* **75**: 2658-2671.
- Yang, W.M., Inouye, C., Zeng, Y., Bearss, D., and Seto, E. (1996) Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12845-12850.
- Yang, W.M., Yao, Y.L., Sun, J.M., Davie, J.R., and Seto, E. (1997) Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J Biol Chem* **272**: 28001-28007.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**: 17174-17179.
- Yoshikawa, A., Isono, S., Sheback, A., and Isono, K. (1987) Cloning and nucleotide sequencing of the genes *rimI* and *rimJ* which encode enzymes acetylating ribosomal proteins S18 and S5 of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **209**: 481-488.
- Zhao, K., Chai, X., and Marmorstein, R. (2003) Structure of a Sir2 substrate, Alba, reveals a mechanism for deacetylation-induced enhancement of DNA binding. *J Biol Chem* **278**: 26071-26077.
- Zimmerman, M., Ashe, B., Yurewicz, E.C., and Patel, G. (1977) Sensitive assays for trypsin, elastase, and chymotrypsin using new fluorogenic substrates. *Anal Biochem* **78**: 47-51.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Für Nukleinsäurebausteine und für Aminosäuren wurden die Ein- und Dreibuchstabenkürzel nach dem „white book“ der IUPAC-IUBMB *Joint Commission on Biochemical Nomenclature and Nomenclature Commission of IUBMB* benutzt. Dies gilt ebenfalls für physikalische Größen, Einheiten und eventuelle Präfixe.

Ø	Durchmesser
#	Nummer
aa	amino acid (Aminosäuren)
A	Adenin
AA	<i>cis</i> -(1S,4R)-(4-aminocyclopent-2-enyl) methanol
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetat, Acetyl-
AK	Antikörper
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
amp	Ampicillin (-resistenzgen)
AP	Alkalische Phosphatase
APAH	Acetylpolyamin-Amidohydrolase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BB	blocking buffer, Blockierungspuffer
BBT	blocking buffer Tween 20, Blockierungspuffer mit Tween 20
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bla	Gen für $\beta$ -Laktamase
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	concentration, Stoffkonzentration
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
ca.	circa
Cad.	Cadaverin
cfu	colony forming unit, Koloniebildende Einheit
CypX	Cyclopentyl-Propionyl-Hydroxamsäure
ddNTP	2', 3'-Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dem.	demineralisiert
d. h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

dsDNA	double stranded DNA, doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dYT	double Yeast Tryptone (-Medium)
$\Sigma$	molarer Extinktionskoeffizient
$E_x$	Extinktion bei x nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em	Emission, Abstrahlungswellenlänge
<i>et al.</i>	et alii, und andere
EtOH	Ethanol
$E_x$	Excitation, Anregungswellenlänge
Fa.	Firma
G	Guanin
g	Gramm
G2L	Göttingen Genomics Lab (Göttinger Labor für Genomanalyse)
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HAT	Histonacetyltransferase(n)
HDAC	Histondeacetylase(n)
HDACI	Histondeacetylase-Inhibitor(n)
HDAH	Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolase
His-tag	lineares Epitop aus sechs Histidinen
HMT	Histonmethyltransferase(n)
HPLC	high pressure liquid chromatography
HTS	high-throughput screening, Hochdurchsatz-Durchmusterung
IC <sub>50</sub>	Inhibitorkonzentration bei 50%iger Inhibition
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
kan	Kanamycin(-resistenzgen)
kb	Kilobasenpaare
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
KP	Kaliumphosphat(-Puffer)
L	Liter
lac	zum Laktose-Operon gehörig
LB	Luria Bertani(-Medium)
m	Meter
m	Milli-
M	mol/l, molar
mA	Milliampère
MCS	multiple cloning site, Mehrfachklonierungsstelle
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
ml	Milliliter
M <sub>r</sub>	relatives Molekulargewicht
mRNA	messenger RNA
MTP	Mikrotiterplatte(n)
$\mu$	Mikro-
n	Nano-
NAA	<i>cis</i> -( $\pm$ )- <i>N</i> -[4-(hydroxymethyl)cyclopent-2-enyl]acetamide

NaP	Natriumphosphat-Puffer
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminotermius
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau
Nr.	Nummer
Nt	Nukleotid(e)
OD <sub>260</sub>	Optische Dichte bei 260nm
OD <sub>280</sub>	Optische Dichte bei 280nm
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600nm
ORF	open reading frame, Offenes Leseraster eines Genes
ori	origin of replication, Replikationsursprung
p	Pico
p.A.	pro analysi, höchster Reinheitsgrad, zur Analyse geeignet
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphat buffered saline-Puffer
PBST	phosphat buffered saline Tween 20-Puffer
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PEG	Polyethylenglykol
Prop	Propionat, Propionyl-
Put.	Putrescin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
QCM	Quik™ Change Mutagenesis, Mutagenese nach dem QCM-Verfahren
s	Sekunde(n)
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid
SAOH	suberoylanilide carboxylic acid
SGlyHA	suberoyl-glycin-Hydroxamic-Acid
SpABaHA	suberoyl-para-Amino-Benzoeacid-Hydroxamic-Acid
SAP	shrimp alkaline phosphatase, Alkalische Phosphatase aus Shrimp
SDS	sodiumdodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
s. o.	siehe oben
Sperm.	Spermidin
ssDNA	single stranded DNA, einzelsträngige DNA
s. u.	siehe unten
SV	Säulenvolumen, -volumina
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoracetat, Trifluoracetyl-
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Trichostatin A
U	Uracil
u, U	unit(s), Enzymeinheit(en)
u. a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht

Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	Volumenprozent
Vol.	Volumen
wt	Wildtyp
(w/v)	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

### Einbuchstabenkürzel der Aminosäuren

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

## 8.2 Sequenzen der verwendeten HDAHs

### 8.2.1 HDAH aus *Bordetella/Alcaligenes FB188*

HDAH *FB188* (1110 nt):

```

ATGGCCATCGGATATGTTTGGGAATACGCTTTACGGCTGGGTAGATAACCGGCAC
CGGCAGCCTGGCCGCTGCCAACCTGACGGCGCGCATGCAGCCCATCAGCCATC
ACCTGGCGCATCCTGACACCAAGCGCAGGTTTCACGAACTGGTCTGCGCCTCC
GGTCAGATCGAGCATCTGACGCCGATCGCTGCCGTCGCCGCCACGGATGCGGA
TATTCTGCGCGCCATTCCGCCGCGCACCTGGAAAACATGAAACGCGTCAGCA
ATCTGCCACGGGCGGGGATACTGGCGACGGCATCACCATGATGGGCAACGGT
GGCCTGGAAATCGCCC GGCTGTCTGCCGGTGGGGCCGTTGAGCTGACGCGCCG
GGTTGCAACAGGCGAACTGAGTGCCGGTTATGCACTGGTCAATCCGCCCGGGC
ACCATGCGCCGCACAACGCCGCCATGGGTTTTTGCATCTTCAACAATACCTCG
GTAGCGGCTGGCTATGCCCGCGCAGTCCTGGGCATGGAGCGAGTCGCCATCCT
CGACTGGGATGTGCATCATGGCAACGGCACCCAGGATATCTGGTGGAACGATC
CCTCCGTCTTGACCAATTCGCTGCACCAGCATCTGTGCTTCCGCCCGACTCCG
GCTACAGCACCGAACGCGGGCGCAGGCAACGGACATGGCTATAACATCAACGT
ACCCCTGCCTCCCGGCAGCGGCAATGCCGCCTATCTCCATGCCATGGATCAGG
TCGTCTGCATGCCCTGCGCGCCTACCGGCCGCAACTCATCATTGTGCGTTCCG
GTTTCGATGCCAGCATGCTGGATCCGCTGGCGCGCATGATGGTGACCGCCGAT
GGCTTCCGTCAAATGGCACGCCGGACCATCGACTGCGCAGCGGATATCTGCGA
TGGACGCATCGTATTCGTCCAGGAAGGCGGCTATAGCCCCACTACCTGCCTTT
CTGCGGGCTGGCCGTCATCGAGGAGCTGACCGGCGTACGCAGCCTGCCCGATC

```

CTTACCACGAGTTCCTGGCGGGCATGGGTGGCAATACGCTGCTGGATGCCGAA  
CGCGCCGCCATCGAGGAGATCGTACCGCTGCTGGCGGATATCCGCTGA

HDAH *FB188* (369 As): swiss prot accession number Q70I53

MAIGYVWNTLYGWVDTGTGSLAAANLTARMQPISSHHLAHPDTKRRFHELVCASG  
QIEHLTPIAAVAATDADILRAHSAAHLENMKRVSNLPTGGDTGDGITMMGNNGLE  
IARLSAGGAVELTRRVATGELSAGYALVNPPGHHAPHNAAMGFCIFNNTSVAAGY  
ARAVLGMERVAILDWDVHHGNGTQDIWVNDPSVLTISLHQHLCFPPDSGYSTER  
GAGNGHGYNINVPLPPGSGNAAYLHAMDQVVLHALRAYRPLIIVGSGFDASML  
DPLARMMVTADGFRQMARRTIDCAADICDGRIVFVQEGGYSPHYLPFCGLAVIEE  
LTGVRSLPDYPHEFLAGMGGNTLLDAERAAIEEIVPLLADIR

### 8.2.2 HDAH aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

HDAH *PA3774* (1143 nt):

ATGACCCGACGTACCGCTTTCTTCTTCGACGAACCTCTGCCTCTGGCACGCCGCC  
GGCCCGCACGCGCTGACCCTGCCGGTTCGGCGGCTGGGTGCAACCGCCTGCCGC  
CGCCGGACACGCCGAATCACCGGAAACCAAGCGCCGGCTGAAAAGCCTGCTC  
GACGTGTCCGGCCTGACCGCCCGCCTGCAACTGCGCAGCGCACCGCCGGCGAG  
CGACGAGGACCTGCTGCGCGTGCATCCGGCGCACTATCTGGAACGCTTCAAGG  
CATTGAGCGACGCCGGCGGCGGCAGCCTCGGCCAGGACGCGCCGATCGGCCC  
GGGCAGCTACGAGATCGCCCGGCTCTCCGCCGGCCTGGCCATCGCCGCGCTGG  
ACGCGGTGCTCGCCGGCGAGGCGGACAACGCCTACTCGCTGTGCGGGCCGCCA  
GGTCATCACTGCCTGCCGGACCAGGCGATGGGCTTCTGTTTCTTCGCCAACATC  
GCCGTGGCCATCGAGGCGGCCAAGGCGCGCCACGGCGTCGAGCGGGTCGCGG  
TGCTGGACTGGGACGTGCACCACGGCAACGGCACCCAGGCGATCTACTACCGG  
CGCGACGACGTGTTGAGCATTTCCTGCAACCAGGACGGCTGCTTCCCGCCTGG  
CTACAGCGGCGCCGAAGACATCGGCGAGGATCGCGGTCTGGCTTCAACCTCA  
ACGTGCCGCTGCTTCCCGGCGGCGGTACGACGCCTACATGCAGGCCATGCAA  
CGCATCGTGTTGCCGGCGCTGGAGCGCTTCCGCCCACAATTGATCGTGGTTCG  
CAGTGGCTTCGACGCCAACGCGGTGGACCCGCTGGCACGCATGCAACTGCACA  
GCGACAGCTTCCGGGCGATGACCGCGATGGTCCGCGACGCGGCCGAGCGGCA  
TGCCGGCGGACGCCTGGTGGTGGTCCACGAAGGCGGCTACTCGGAAGCCTACG  
TGCCGTTCTGCGGCTTGGCTGTGATCGAAGA ACTCAGCGGCGTGCGCAGCGCG  
GTGCGCGACCCGCTGCGCGACTTCATCGAGTTGCAGCAGCCCAACGCGGCGTT  
CCGCGACTTCCAGCGCCAGCGCCTCGAAGAGCTGGCCGCACAGTTCGGCCTGT  
GCCC GGCGCAGCCGCTTCAAGCGGCCAGGTAG

HDAH *PA3774* (380 As):

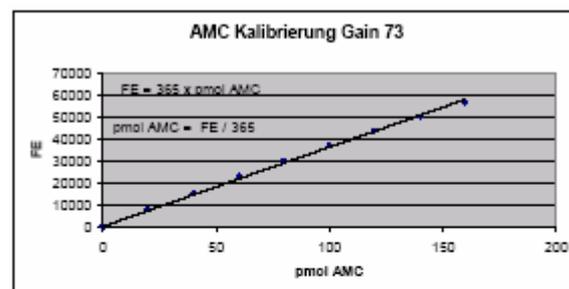
MTRRTAFFFDELCLWHAAGPHALTLPVGGWVQPPAAAGHAESPETKRRLKSLLD  
VSGLTARLQLRSAPPASDEDLLRVHPAHYLERFKALSDAGGGS LGQDAPIGPGSYE  
IARLSAGLAIAALDAVLAGEADNAYSLSRPPGHHCLPDQAMGFCFFANIAVAIEAA  
KARHGVERVAVLDWDVHHGNGTQAIYYRRDDVLSISLHQDGCFFPGYS GAEDIG  
EDRGRGFNLNVPLLPGGGHDAYMQAMQRIVLPALERFRPQLIVVASGFDANAVD

PLARMQLHSDSFRAMTAMVRDAAERHAGGRLVVVHEGGYSEAYVPFCGLAVIEE  
LSGVRS AVR DPLRDFIELQQPNAAFRDFQRQRLEELAAQFGLCPAQPLQAAR

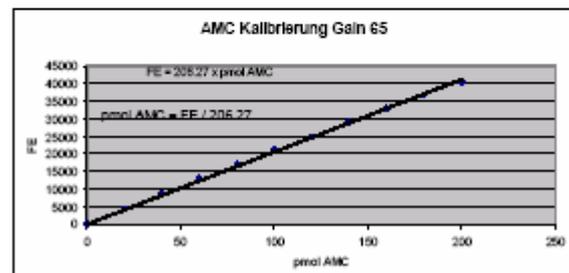
### 8.3 Fluoreszenz-Kalibrierungsgeraden (BMG-Reader)

Um die gerätespezifischen, relativen Fluoreszenzeinheiten (FE) in Stoffkonzentrationen des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes AMC umrechnen zu können, wurden Proben bekannter AMC-Konzentration unter Standard-Assaybedingungen vermessen und die Beziehung zwischen FE und AMC-Stoffmenge für den jeweiligen Verstärkungsfaktor des Fluoreszenz-Readers (Gain) in einer Kalibrierungskurve aufgetragen. Diese lässt über den gesamten relevanten Mess- und Konzentrationsbereich eine lineare Beziehung der beiden Größen erkennen. Es wurde ausschließlich bei  $\lambda = 390$  nm angeregt und bei  $\lambda = 460$  nm detektiert. Die ermittelten Umrechnungsgleichungen lauten wie folgt:

bei Gain 73:  $\text{pmol AMC} = \text{FE}/365$



bei Gain 65:  $\text{pmol AMC} = \text{FE}/206$



**Abb. 8.1**

#### Kalibrierungsgeraden für AMC.

Die Fluoreszenz von 200  $\mu\text{l}$ -Proben bekannter AMC-Konzentration wurden bei Gain 73 bzw. Gain 65 im BMG-Fluoreszenzreader bestimmt und die FE gegen die Menge AMC im well aufgetragen.

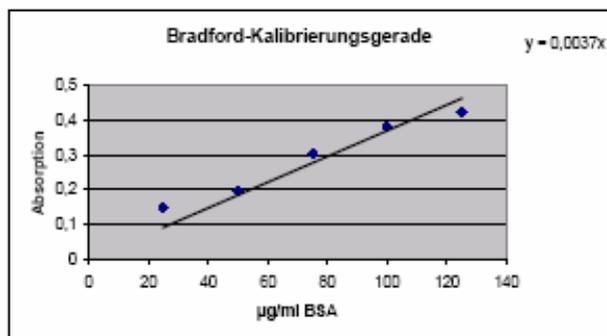
## 8.4 Bradford-Kalibrierungsgerade

Um die gemessenen Extinktionen in Proteinkonzentrationen umrechnen zu können, wurden Proben bekannter BSA-Konzentration vermessen und die Beziehung zwischen Extinktion und  $c$  (BSA) für den jeweiligen Verstärkungsfaktor (Gain 73) des mit einem Absorptionskopf bestückten BMG-Readers in einer Kalibrierungskurve aufgetragen. Diese lässt über den gesamten relevanten Mess- und Konzentrationsbereich eine ausreichend lineare Beziehung der beiden Größen erkennen. Es wurde ausschließlich bei  $\lambda = 580 \text{ nm}$  detektiert. Die ermittelte Umrechnungsgleichung lautet wie folgt:

bei Gain 73:  $[\mu\text{g/ml}] \text{ BSA} = E_{580}/0,0037$

Damit errechnet sich die Konzentration an Gesamtprotein in der Probe unter der Annahme, dass sich die Probe in der Messung wie BSA verhält, folgendermaßen :

$c(\text{Probe}) [\mu\text{g/ml}] = \text{Verdünnungsfaktor} * c(\text{BSA}) [\mu\text{g/ml}] = E_{580}/0,0037$



**Abb. 8.2**

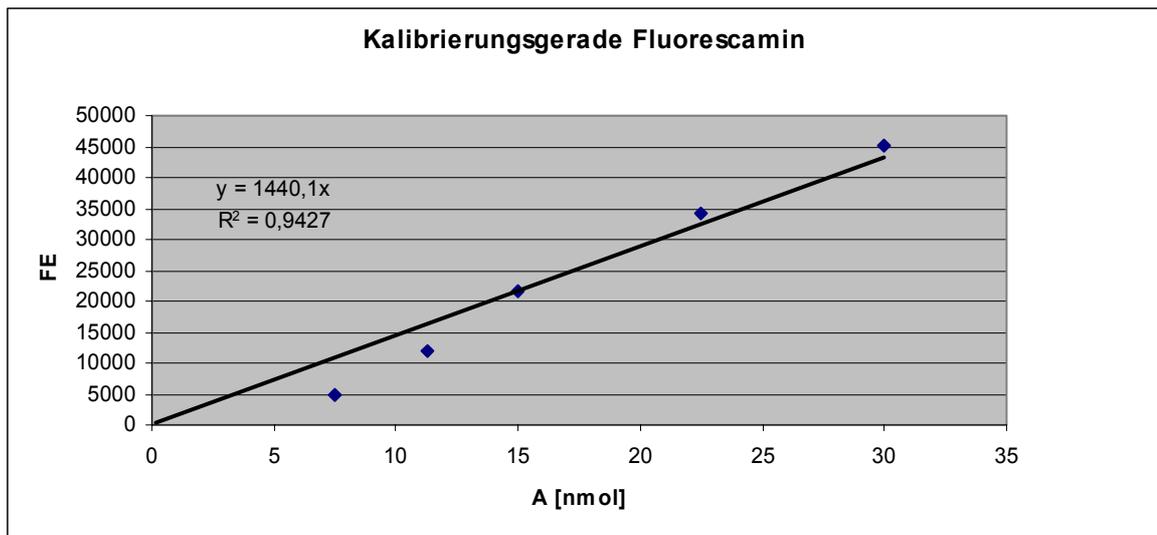
### Kalibrierungsgerade für Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford.

Proben bekannter BSA-Konzentration wurden vermessen und die Beziehung zwischen Extinktion bei 580 nm und  $c$  (BSA) gegeneinander aufgetragen.

## 8.5 Fluorescamin-Kalibrierungsgerade

Um die gemessenen Fluoreszenzeinheiten (FE) in Konzentrationen von Fluorescamin umrechnen zu können, wurden Proben bekannter Glycin-Konzentration vermessen und die Beziehung zwischen Extinktion und  $c$  (Glycin) für den jeweiligen Verstärkungsfaktor (Gain 73) des mit einem Fluoreszenzmesskopf bestückten BMG-Readers in einer Kalibrierungskurve aufgetragen. Da Glycin eine Aminogruppe ausweist, eignet sich diese Aminosäure für diese Kalibrierung. Die Kalibrierungskurve lässt über den gesamten relevanten Mess- und Konzentrationsbereich eine ausreichend lineare Beziehung der beiden Größen erkennen. Es wurde bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Detektionswellenlänge von 460 nm gemessen. Die ermittelte Umrechnungsgleichung lautet wie folgt:

bei Gain 73: nmol umgesetztes Glycin =  $FE/1440,1$



**Abb. 8.3**

### Kalibrierungsgeraden für Fluorescamin.

Die Fluoreszenz von 200  $\mu$ l-Proben bekannter Glycin-Konzentration wurden nach Umsatz mit Fluorescamin bei Gain 73 im BMG-Fluoreszenzreader bestimmt und die FE gegen die Menge AMC im well aufgetragen.

## 8.6 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie des Institutes für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen angefertigt.

Prof. Dr. Hans-Joachim Fritz bin ich dankbar dafür, dass ich alle Einrichtungen und Geräte der Abteilung nutzen durfte.

PD. Dr. Harald Kolmar danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Besonders herzlich möchte ich mich bei PD Dr. Andreas Schwienhorst für sein Interesse an und sein Engagement für meine Arbeit bedanken. Dafür, dass ich viel lernen konnte (nicht nur biologisches), aber auch dafür, dass er meinen Fähigkeiten vertraut hat und mir alle Freiheiten ließ. Auch in schwierigen Zeiten hat er mich immer unterstützt und hatte immer einen „Plan B“ in der Tasche.

Milena Ninkovic und Rüdiger Dietrich danke ich für ihre Bemühungen zum Klonieren der *FB188 HDAH*.

René Hempel und Dennis Wegener danke ich für die Geduld in allen Belangen, die sie mir entgegenbrachten. Ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft gaben mir den nötigen Motivationsschub in vielen Punkten. Ohne sie hätte ich an vielen Stellen nicht mehr weitergewusst. Daniel Riester möchte ich dafür danken, dass er immer „noch mal eben schnell zwischendurch“ ein Paar Substrate oder Inhibitoren in seiner „Hexenküche“ zusammenkochte, ohne die ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Marita Kalck danke ich für ihre Hilfe und Geduld in allen bürokratischen Dingen, Dr. Reiner Merkl und Jarek Sobkowiak für die Beseitigung sämtlicher Probleme in Sachen Computer, Olaf Waase und Patrick Regin für die Wartung und prompte Beseitigung von Schäden an unseren Geräten, Marlies Bartels und Angelika Löffers dafür, dass immer rechtzeitig genügend Medium verfügbar war. Vielen Dank !

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern und Mitstreitern der Abteilung und natürlich besonders denen aus meinem Labor möchte ich meinen Dank aussprechen für die sehr angenehme und kollegiale Atmosphäre – bei Arbeit, Sport und Spiel – und die vielen Tips, Ratschläge und Anregungen, die ich von allen Seiten erhalten konnte (natürlich auch für solche Dinge wie das berühmte „Samstag-mal-Platten-rausnehmen“ oder das ebenso beliebte „Sonntag-mal-animpfen“).

Dem Team des GÖTTINGEN GENOMICS LABORATORY (G2L) gebührt Dank und Anerkennung für die vielen Sequenzierdaten, die ich von Ihnen erhalten habe. Gerade in

Hinblick auf die Identifikation meiner Mutanten lief das ein oder andere Gel nur für mich allein.

Dr. Norman Loftfield, Institut für Bodenkunde und Waldernährung der Universität Göttingen, danke ich für die Durchführung der ICP-Analysen. Prof. Dr. Peter Loidl und allen beteiligten Kollegen bin ich für die Durchführung des radioaktiven Histon-Assay am Institut für Molekularbiologie der medizinischen Universität Innsbruck zu Dank verpflichtet.

Bei Tine möchte ich mich für Ihre Bemühungen zur Auflösung der Kristallstruktur der *FB188* HDAH und für die Generierung der dreidimensionalen Abbildungen bedanken.

All meinen Freunden danke ich dafür, dass sie mir ein sehr schönes Leben neben dem Labor hier in Göttingen ermöglicht haben.

Ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie, meinen Eltern und meinem Bruder, die mich immer in allen Belangen nach Kräften unterstützt haben, sowohl im Studium als auch in allen anderen Dingen des Lebens.

## 8.7 Lebenslauf

**Name:** Christian Bernd Hildmann

**Geburtsdatum:** 25. November 1972

**Geburtsort:** Kassel

**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Familienstand:** ledig

**Eltern:** Jürgen und Renate Hildmann

**Schulbildung:** 1979 bis 1983 Grundschule Hessisch Lichtenau  
1983 bis 1985 Orientierungsstufe der Freiherr-vom-Stein-Schule  
Hessisch Lichtenau  
1985 bis 1992 Freiherr-vom-Stein-Schule Hessisch Lichtenau  
1992 Abitur an der Freiherr-vom-Stein-Schule  
Hessisch Lichtenau

**Wehrdienst** 1992 bis 1994 Soldat auf Zeit beim 2. Panzeraufklärungs-  
bataillon in Hessisch Lichtenau,  
Ausbildung zum Offizier der Reserve

**Studium der Biologie:** 1994 bis 2001 an der Georg-August-Universität zu Göttingen

**Diplomarbeit:** 2000 bis 2001 in der Abteilung für Molekulare Genetik und  
Präparative Molekularbiologie des Instituts für Mikrobiologie und  
Genetik der Georg-August-Universität zu Göttingen.  
  
Titel: „Klonierung, Expression und vergleichende Untersuchungen  
von Amidohydrolasen.“, Gesamtnote: „Gut“

**Dissertation:** seit Oktober 2001 in der Abteilung für Molekulare Genetik und  
Präparative Molekularbiologie des Instituts für Mikrobiologie und  
Genetik der Georg-August-Universität zu Göttingen. Unterstützt  
wurde diese Arbeit vom Bundesministerium für Bildung und  
Forschung (BioFuture Grant 0311852) und der LONZA AG.