

Institut für Biochemie und Biologie
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Silke Leimkühler

**Funktionelle Charakterisierung von prokaryotischen und
eukaryotischen Molybdoflavoenzymen**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Biochemie"**

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

**von
Silvia Schumann
geboren am 11.01.1978
in Leisnig/Sachsen**

Potsdam, den 23.09.2008

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2010/4342/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-43427>
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-43427>

Meinen Eltern

Veröffentlichungen der Dissertation:

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Instituts für Biochemie und Biologie, vertreten durch die Mentorin der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Silke Leimkühler, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Schumann, S.; Saggiu, M.; Möller, N.; Anker, S.D.; Lenzian, F.; Hildebrandt, P.; Leimkühler, S. "The Mechanism of Assembly and Cofactor Insertion into *Rhodobacter capsulatus* xanthine dehydrogenase." *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(24): 16602-11

Schumann, S., Terao, M., Garattini, E., Saggiu, M., Lenzian, F., Hildebrandt, P., Leimkühler, S. „A novel system for the heterologous expression of catalytically active mammalian molybdoflavoenzymes in *Escherichia coli*.“ *Biochemistry*
Eingereicht am 16.07.2008

Tagungsbeiträge:

Schumann, S. and Leimkühler, S. „Purification and Characterization of Mouse Aldehyde Oxidase“
VAAM (Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie)-Jahrestagung, Jena
19. - 22.03.2006

Schumann, S. and Leimkühler, S. „Purification and Characterization of Mouse Aldehyde Oxidase“
Gemeinsame Herbsttagung des Hahn-Meitner-Instituts, Abteilung Molekulare Spurenelementforschung in den Biowissenschaften und des GSF Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, Berlin, 06. - 08.12.2006

Schumann, S., Terao, M., Garattini, E., Leimkühler, S. „Purification and Characterization of Mouse Aldehyde Oxidase“
Gordon-Research-Conferenz on Molybdenum and Tungsten Enzymes, New London (New Hampshire, USA)
01. - 06.07.2007

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die biologische Bedeutung des Spurenelementes Molybdän	1
1.2 Die Entdeckung und die Struktur des Molybdänkofaktors	1
1.3 Die Biosynthese des Molybdänkofaktors	3
1.4 Molybdoenzyme	5
1.5 Modifikation des Moco – der terminale Schwefel der Monooxo-Mo-Hydroxylasen	7
1.6 Die Xanthin-Dehydrogenase aus <i>Rhodobacter capsulatus</i>	11
1.7 <i>Mus musculus</i> Aldehyd-Oxidase (mAOX1) und die humane Aldehyd-Oxidase (hAOX1)	14
Ziele dieser Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	
2.2 Molekularbiologische Methoden	21
2.2.1. Bakterienanzucht	21
2.2.2 Herstellung kompetenter Zellen	21
2.2.3 Transformation von <i>E. coli</i>	21
2.2.4 Plasmid-DNA-Isolierung	22
2.2.5 Isolierung von mRNA und Generierung von cDNA	22
2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und PCR-Mutagenese	22
2.2.7 Klonierungstechniken	22
2.3 Biochemische Methoden	23
2.3.1 Herstellung zellfreier Rohextrakte - Zellaufschluss durch French-Press	23
2.3.2 Expression und Reinigung des XDH-Wildtyps und der chimären Variante über das IMPACT™CN Intein-System	23
2.3.3 Expression und Reinigung der mAOX1, hAOX1 sowie aller erzeugten mAOX1-Varianten über die Ni-NTA Matrix	24
2.3.4 Gelfiltration der AOX1 Varianten mittels Superose12-Säule an einem ÄKTA Basic-System	25
2.3.5 Reinigung der mAOX1-Varianten mittels Benzamidin-Sepharose-6B Matrix	25
2.3.6 Ankonzentrieren von Proteinen	26
2.3.7 Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung	26
2.3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.3.9 Coomassie-Blau-Färbung	27
2.3.10 Immunoblot-Analyse	27
2.4 Analytische Methoden	27
2.4.1 Dünnschichtchromatographie auf einer Zellulose-Acetat-Membran	27
2.4.2 Bestimmung der AOX1-Aktivität mittels Retinaldehyd-Assay nach Vila <i>et al.</i> (2004)	28
2.4.3 Bestimmung der AOX1-Aktivität verschiedener Aldehyde und Purine am Photometer	28
2.4.4 Bestimmung des MPT-Gehaltes mittels High-Pressure-Liquid-Chromatography (HPLC)	29
2.4.5 Elementanalyse mittels ICP-OES	30

2.4.6	Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR)	30
2.4.7	Zirkularer Dichroismus	30
2.4.8	Analytische Gelfiltration	32
2.4.9	Elektrospray-Ionisations (ESI) - Massenspektrometrie und MS/MS	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Charakterisierung des Elektronentransfermechanismus der <i>R. capsulatus</i> XDH	34
3.1.1	Klonierung, Expression und Reinigung einer XDH Variante, die nur eine aktive Untereinheit pro $(\alpha\beta)_2$ Tetramer besitzt	34
3.1.2	Bestimmung des MPT-Gehaltes sowie der Reduktionsfähigkeit der XDH mit Xanthin und NADH	37
3.1.3	CD-Spektroskopie	39
3.1.4	Steady-state Kinetiken der Wildtyp-XDH und der chimären XDH-Variante $[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$	41
3.2	Reinigung und Charakterisierung der Aldehyd-Oxidase aus <i>Mus musculus</i> (mAOX1) und der humanen (hAOX1)	43
3.2.1	Aminosäuresequenzvergleich von mAOX1 und hAOX1	43
3.2.2	Reinigung und Charakterisierung der Substratspezifität der nativen Maus AOX1	45
3.2.3	Klonierung der mAOX1 in den pTrcHis-Vektor und der Maus Mocosulfurase (mMCSF) in den pACYCduet-Vektor	48
3.2.4	Heterologe Expression und Reinigung der Maus Aldehyd-Oxidase	48
3.2.5	Untersuchung der Substratspezifität der rekombinanten mAOX1	52
3.2.6	Charakterisierung der mAOX1 mittels UV-VIS Absorptionsspektroskopie	53
3.2.7	Klonierung der hAOX1 und der hMCSF sowie die Heterologe Expression und Reinigung der hAOX1	55
3.2.8	Charakterisierung der Oligomerisationszustände der mAOX1 und hAOX1 mit Größen-Ausschluss-Chromatografie	58
3.2.9	Vergleich der FeS-Zentren der mAOX1 und hAOX1 durch CD-Spektroskopie	60
3.2.10	Vergleich von zwei mAOX1 – Varianten	61
3.2.11	Steady-state Kinetiken der mAOX1-Wildtyp Variante H1226R/R1230Q (mAOX1*)	62
3.2.12	EPR Spektroskopie von mAOX1	64
3.2.13	Zielgerichtete Mutagenese in der Substratbindungstasche der mAOX1	66
3.2.14	Charakterisierung der FeS-Cluster der mAOX1-Varianten durch CD-Spektroskopie	69
3.2.15	Steady-state Kinetiken des mAOX1-Wildtyp und der Varianten V806E, M884R, V806E/M884R und E1265Q	71
3.2.16	Vergleich der Steady-state Parameter der komplementär eingeführten Aminosäureaustausche (E_B232V , R_B310M und E_B232V/R_B310M) in der <i>R. capsulatus</i> XDH	72
4	Diskussion	75
4.1	<i>R. capsulatus</i> XDH	75
4.1.1	Untersuchungen zum intramolekularen Elektronentransfer der XDH	75
4.1.2	Modell für die Assemblierung der <i>R. capsulatus</i> XDH	78
4.2	<i>Mus musculus</i> AOX1 und humane AOX1	81

4.2.1	Expressionssystem und Reinigung der mAOX1 und hAOX1	81
4.2.2	Unterschiede in der Aldehyd-Oxidase-Aktivität	83
4.2.3	Vergleich von heterolog exprimierten XOR und AOX1	85
4.2.4	Gegenüberstellung der beiden publizierten Reaktionsmechanismen für XOR	86
4.2.5	Charakterisierung der konservierten Aminosäuren im aktiven Zentrum der mAOX1	90
4.2.6	Modell des katalytischen Reaktionsmechanismus der mAOX1	92
5	Zusammenfassung	94
6	Literaturverzeichnis	95

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicilin
AOX	Aldehyd-Oxidase
AP	Alkalische Phosphatase
Arg, R	Arginin (Aminosäure)
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidin-Salz
BHT	butyliertes Hydroxytoluol
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Circular Dichroismus
cDNA	komplementäre DNA (copyDNA)
Cm	Chloramphenicol
Cnx	cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase
Da, kDa	Dalton, kiloDalton
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EtOH	Ethanol
Gln, Q	Glutamin (Aminosäure)
Glu, E	Glutamat (Aminosäure)
GTP	Guanosintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
His, H	Histidin (Aminosäure)
hMCSF	humane Mocosulfurase
HPLC	High-Pressure-Liquid-Chromatography
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
kb	Kilobasen
L, mL, µL	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria Bertani
M, mM, µM	molar, millimolar, mikromolar
mA	Milliampere
MCS	multiple cloning site
mdeg	Millidegree
MeOH	Methanol
Met, M	Methionin (Aminosäure)

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGD	Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid
min	Minute
mMCSF	Maus Mocosulfurase
Mo	Molybdän
Moco	Molybdänkofaktor
MOCS/MOCS	molybdenum cofactor synthesis
mol, mmol, µmol	Mol, Millimol, Mikromol
MPT	Molybdopterin
MWM	Molecular weight marker
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
Na ₂ MoO ₄	Natriummolybdat
Na ₂ S	Natriumsulfid
NaS ₂ O ₄	Natriumdithionit
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
o.D.	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
psi	pound per square inch
<i>R. c.</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Schwefelquelle
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
ü.N.	über Nacht
Val, V	Valin (Aminosäure)
WT	Wildtyp
XDH	Xanthin-Dehydrogenase
XO	Xanthin-Oxidase
XOR	Xanthin-Oxidoreductase
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die biologische Bedeutung des Spurenelementes Molybdän

Das Spurenelement Molybdän (Mo) ist für das Wachstum der meisten pflanzlichen und tierischen Organismen lebensnotwendig (Coughlan, 1980). Es ist als einziges Metall der 2. Reihe der Übergangsmetalle des Periodensystems in Form des Molybdänkofaktors (Moco) ein essentieller Faktor im Stoffwechsel von Eukaryoten. Gebunden im aktiven Zentrum von Metalloenzymen übernimmt es eine Schlüsselfunktion im Metabolismus von Stickstoff-, Schwefel- und Kohlenstoffverbindungen. Molybdän steht nur in Form des Anions Molybdat (MoO_4^{2-}) für biologische Systeme zur Verfügung. Hingegen findet man in stickstoffreichen und sauerstoffarmen Tiefseeegrabenregionen Molybdän in Form von Molybdänit (MoS_2), welches aber nicht biologisch verwertbar ist. Hier sind extremophile Bakterien isoliert worden, die alternativ den Wolframkofaktor (Wco) enthalten. Da beide Übergangsmetalle in biologisch verwertbarer Form die Oxidationszustände zwischen IV und VI einnehmen, gelten sie als potentiell wichtige Koordinationspartner. Die Bedeutung des Molybdäns für Mikroorganismen wurde durch Bartels bereits Anfang des 20. Jahrhunderts erkannt (Bartels, 1930). Reichert und Westerfeld erbrachten 1953 erstmals den Nachweis der Bindung von Mo an die Xanthin-Oxidase in Leber und Magen von Ratten und verdeutlichten damit die Bedeutung von Mo für Mensch und Tier. Im Folgejahr konnte für die tierische Aldehyd-Oxidase aus dem Schwein (Mahler & Green, 1954) und der Nitratreduktase aus dem Ascomyceten *Neurospora crassa* (Nicholas & McElroy, 1954) die Molybdän-Abhängigkeit bestätigt werden. Das für den menschlichen Organismus essentielle Molybdoenzym Sulfit-Oxidase wurde 1971 durch Cohen *et al.* (1971) beschrieben. Der Verlust der SO-Aktivität führt häufig zu frühzeitigem Tod unmittelbar nach der Geburt (Johnson *et al.*, 1995).

1.2 Die Entdeckung und die Struktur des Molybdänkofaktors

Mit Hilfe des filamentösen Pilzes *Aspergillus nidulans* konnten weitere Teilschritte der Molybdänkofaktor-Biosynthese aufgeklärt werden. Pateman *et al.* (1963) isolierten sechs Nitrat-Reduktase-Mutanten, von denen fünf einen gleichzeitigen Ausfall der NR- und XDH-Aktivität zeigten. Die einzige Gemeinsamkeit dieser Enzyme bestand in ihrer Molybdän-Abhängigkeit, welche den Schluss zuließ, dass beide Enzyme einen gemeinsamen Molybdän-haltigen Kofaktor besitzen, welcher in den Mutanten nicht mehr gebildet wurde. Diesen Kofaktor bezeichneten Pateman *et al.* als Molybdänkofaktor (Moco).

Die konservierte Struktur des Moco und damit dessen Austauschbarkeit zwischen verschiedenen Organismen konnte erstmals von Nason *et al.* (1971) gezeigt werden. Mit Hilfe der pleiotropen *nit-1*-Mutante aus *Neurospora crassa*, welche keinen aktiven Moco synthetisieren kann und damit ein inaktives NR-Apoprotein besitzt, konnten Rekonstitutionsversuche durch Zusatz der niedermolekularen Fraktion denaturierter Molybdoenzyme pflanzlicher, tierischer oder bakterieller Herkunft, erfolgreich durchgeführt werden. Dieser sogenannte *nit-1*-Test erzielte jedoch für die Nitrogenase, welche einen Eisen-Molybdänkofaktor (Fe-Moco) enthält, keine Rekonstitution durch ein anderes Molybdoenzym (Pienkos *et al.*, 1977).

Die Struktur des Molybdänkofaktors wurden erstmalig von Johnson *et al.* im Jahre 1980 beschrieben, indem sie Degradations- und Oxidationsprodukte des Moco analysierten. Die organische Grundstruktur bildet dabei ein Pterin, an das sich eine 4C-Alkyl-Seitenkette mit einem terminalen Phosphatester schließt. Am C₁ und C₂-Atom dieser Seitenkette ist über

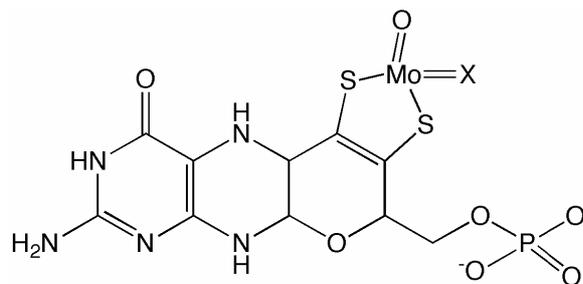


Abb. 1.1 Struktur des Molybdänkofaktor

Gezeigt ist die Tetrahydropyranopterinstruktur des Molybdänkofaktors, charakteristisch ist die einzigartige Dithiolengruppe welche das Molybdänatom koordiniert. Das X am Molybdän kann je nach Enzymfamilie ein Sauerstoff oder ein Schwefelatom sein. In eubakteriellen Organismen sind Varianten bekannt, bei denen die Alkylseitenkette über eine Pyrophosphatgruppe mit einem zusätzlichen Nukleotid verbunden ist.

die einzigartige Dithiolengruppe das Molybdän komplexiert. Dieses Strukturmodell konnte durch die erste Kristallstrukturanalyse der Aldehydoxidoreductase aus dem Bakterium *Desulfovibrio gigas* durch Romao *et al.* (1995) bestätigt werden. Mit dieser Publizierung zeigte sich allerdings, dass die Struktur des Moco (Abb.1.1) eine trizyklische Form ausbildet, da das C₃ der Alkylseitenkette mit dem C₇-Atom des bicyklischen Pterins einen Pyranring ausbildet, wodurch die 5,6,7,8- Tetrahydropyranopterinstruktur entsteht. Die Aufklärung der Strukturen weiterer bakterieller Molybdoenzyme in den folgenden Jahren bestätigte die Form des Moco als 5,6,7,8- Tetrahydropyranopterinstruktur (Schindelin *et al.*, 1996; Boyington *et al.*, 1997) und wurde unter allen Organismen als konserviert vorgeschlagen.

Im Gegensatz zu höher entwickelten Organismen kann bei Eubakterien der Moco eine zusätzliche Modifizierung erhalten. Dabei assoziiert das Nukleotid GMP an die Pyrophosphatbindung des C₄-Atoms der Alkylseitenkette des MPTs und es entsteht die bis-MGD-Form des Moco (Johnsen *et al.*, 1990). Modifikationen durch weitere Nukleotide wie AMP und CMP wurden durch Börner *et al.* beschrieben.

1.3 Die Biosynthese des Molybdänkofaktors

Der Moco ist ubiquitär verbreitet und die Synthese läuft in den bisher untersuchten Organismen im Wesentlichen nach dem gleichen Mechanismus ab. Für den Modellorganismus *Escherichia coli* ist die Moco-Biosynthese am besten charakterisiert und wird im Folgenden beschrieben.

In *E. coli* sind an der Biosynthese (Abb. 1.2) neun Proteine beteiligt, die von Genen in den Operons *moa*, *mob*, *moe* und *mog* kodiert werden. Das vorgeschlagene Modell für die Moco-Biosynthese in *E. coli* wurde in vier Schritte unterteilt (Rajagopalan, 1992, 1996).

Im ersten Schritt katalysieren die beiden Proteine MoaA und MoaC aus GTP den so genannten Precursor Z, welches ein schwefel- und metallfreies Pterinderivat ist (Wuebbens & Rajagopalan, 1995; Hänzelmann & Schindelin, 2004; Santamaria-Araujo *et al.*, 2004).

Der zweite Schritt beinhaltet die Umwandlung des Precursor Z zu Molybdopterin (MPT), welches durch eine Dithiolengruppe charakterisiert ist. Die an dieser Reaktion beteiligten Proteine sind MoaD, MoaE und MoeB, wobei MoaD und MoaE einen heterotetrameren Komplex bilden, der als MPT-Synthase bezeichnet wird. Diese übernimmt die Einführung zweier SH-Gruppen in den Precursor Z, wobei es zur Ausbildung der Dithiolengruppierung und zur Dezyklisierung der Phosphatgruppe kommt (Pitterle und Rajagopalan, 1993; Pitterle *et al.*, 1993). Für eine weitere Schwefelübertragung muss die MPT-Synthase reaktiviert werden. Hierfür katalysiert MoeB unter ATP-Verbrauch die Ausbildung eines Acyl-Adenylat-Komplexes an der Carboxylatgruppe am C-terminalen Glycin von MoaD (Leimkühler *et al.*, 2001; Lake *et al.*, 2001). Der Schwefel für die Thiocarboxylierung MoaDs wird in *E. coli* allerdings nicht von MoeB übertragen. Leimkühler *et al.* (2001) konnte dies mit Hilfe von Mutationsstudien aller konservierten Cystein-Reste in MoeB zeigen. Keiner dieser Aminosäurereste ist für die Thiocarboxylierung von MoaD relevant. Eine alternative Sulfurtransferase muss also die Schwefelübertragung des zuvor von MoeB adenylierten MoaD übernehmen. Leimkühler *et al.* haben ebenfalls gezeigt, dass für diese Funktion *in vitro* verschiedene Sulfurtransferasen wie IscS dazu in der Lage sind, welche L-Cystein als Substrat nutzen. Ist MoaD sulfuriert, dissoziiert dieses von MoeB und bildet mit MoaE die aktive MPT-Synthase.

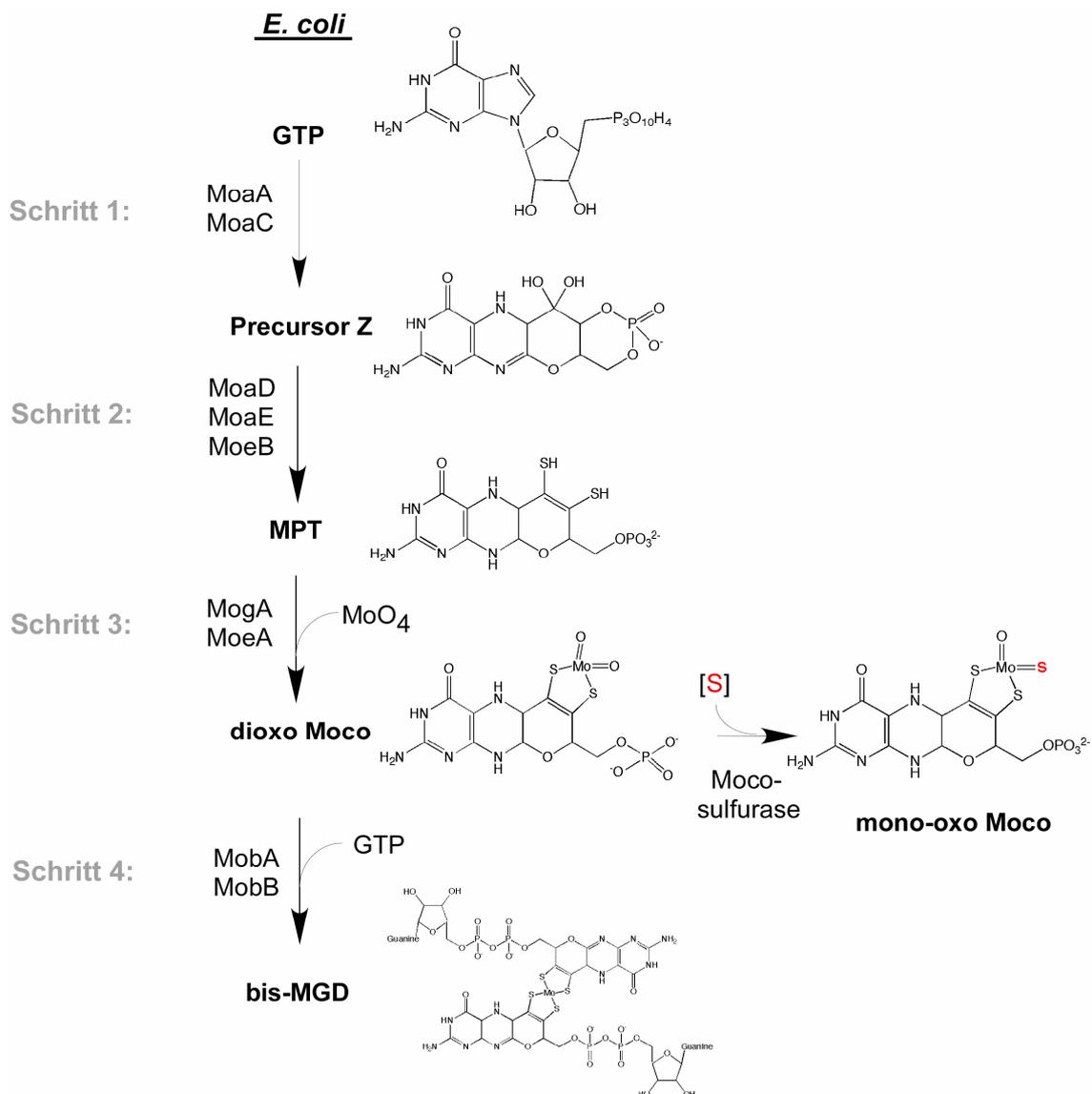


Abb. 1. 2 Schematische Darstellung der Biosynthese des Moco und des bis-MGD in *E. coli*: Gezeigt sind das Schema des Biosyntheseweges des Moco in *Escherichia coli* und die an der Reaktion beteiligten Proteine. In *E. coli* wird der Moco im vierten und letzten Schritt durch Anhängen eines GMP's modifiziert und formt sich zu einem bis-MGD Kofaktor. Weitere Modifizierungen des Moco, wie die Sulfurierung des dioxo Moco übernimmt eine Sulfutransferase.

Im dritten Schritt erfolgt der Einbau des Molybdäns welches in Form von Molybdat (MoO_4^{2-}) mit Hilfe eines ABC-Transportersystems in die Zelle gelangt (Rech *et al.*, 1995; Self *et al.*, 2001). An der Molybdäninsertion und der Bildung eines aktiven Moco sind die Proteine MogA und MoeA beteiligt. Die Funktion von MogA wurde durch eine Studie mit *E. coli-mogA*-Mutanten herausgefunden, indem diese durch Zugabe hoher Molybdatkonzentrationen in der Lage sind, MPT zu synthetisieren und somit aktive Molybdoenzyme aufwiesen (Hinton & Dean, 1990; Joshi *et al.*, 1996). Weiterführend zeigte Nichols *et al.* in einem *in-vitro* System,

dass mit Hilfe von gereinigten Proteinen und MPT, Moco synthetisiert und die Aktivität der humanen Sulfid-Oxidase rekonstituiert werden kann. Sie fanden heraus, dass MoeA allein in Lage war, die Insertion des Molybdänatoms an die Dithiolengruppe des MPT zu übernehmen. Durch Zugabe von Mg-ATP und MogA konnte die Katalyse von MoeA zusätzlich gesteigert werden.

In Bakterien kann der Moco in einem vierten Schritt durch Anhängen eines Guanin-Nukleotids an das MPT, weiter modifiziert werden (Johnson *et al.*, 1990). In *E. coli* wird die Anlagerung eines GMP an den Moco von den Proteinen MobA und MobB katalysiert (Palmer *et al.*, 1994, 1996) und resultiert in der aktiven Form des Molybdänkofaktors für Eubakterien, dem Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (MGD). Bisher ist aber noch nicht aufgeklärt, wann der bis-MGD aus je zwei MGD Molekülen geformt wird.

1.4 Molybdoenzyme

Nachdem der Molybdänkofaktor als Pterin- und Mo-haltiger Kofaktor charakterisiert war, erfolgte eine Subklassifizierung der entsprechenden Molybdoenzyme.

Bislang wurden mehr als 40 Molybdoenzyme in Bakterien, Archaeen, Pilzen, Pflanzen und Tieren identifiziert, die unterschiedliche Redoxreaktionen katalysieren. Die verschiedenen Molybdoenzyme werden nach ihrer Struktur des Molybdänzentrums in drei Familien unterteilt (Abb.1.3), die Sulfid-Oxidase- (SO), die Xanthin-Oxidase- (XO) sowie die DMSO-Reduktase-Familie.

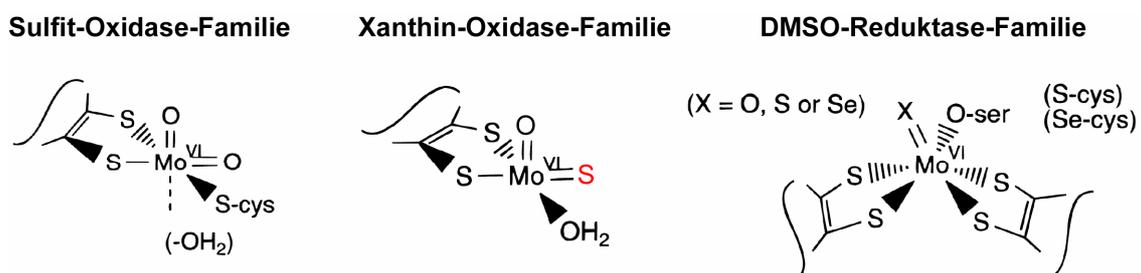


Abb. 1.3 Darstellung der Struktur des aktiven Zentrums von Molybdoenzymen

Basierend auf den Strukturen des Molybdänzentrums wurden folgende drei Enzymfamilien eingeführt: die Sulfid-Oxidase-Familie, die Xanthin-Oxidase-Familie und die DMSO-Reduktase-Familie (Hille, 1996).

Molybdoenzyme, welche den Dioxo-Moco enthalten, gehören der Sulfit-Oxidase-Familie an. Enzyme, die der Xanthin-Oxidase-Familie angehören, tragen einen modifizierten Molybdänkofaktor, den so genannten monooxo-Moco, der an Stelle eines Sauerstoffatoms ein Schwefelatom in äquatorialer Position enthält. Alle Enzyme, die der Dimethylsulfoxid-Reduktase-Familie zugeordnet werden, enthalten den bis-Molybdopterin-Guanin-Dinukleotidkofaktor (bis-MGD) (Hille, 1996, 2002).

Enzyme der SO-Familie, zu denen die SO aus verschiedenen Organismen sowie die pflanzliche Nitratreduktase zählen, besitzen ein Äquivalent des Pterinkofaktors mit einem Cysteinliganden im oxidierten Zustand. Diese Enzymfamilie kann ein Sauerstoffatom von oder zu einem freien Elektronenpaar eines Substrates übertragen.

Das Merkmal der Enzyme, die der XO-Familie angehören (z.B. die XO, die XDH oder die AO), ist der Austausch des äquatorialen Sauerstoffatoms am Molybdänzentrum gegen ein Schwefelatom. Im oxidierten Zustand des Enzyms (Mo^{VI}) ist der fünfte Ligand ein Hydroxid. Vorrangig katalysieren diese Enzyme die Hydroxylierung an einem Kohlenstoffatom. Eine Inaktivierung mit Cyanid der Enzyme XO aus Kuhmilch sowie der XDH aus Hühnerleber konnte Massey *et al.* belegen (1970). Dieser Aktivitätsverlust ist durch die Abgabe von Schwefel in Form von Thiocyanat begründet. Der Austausch der $\text{Mo}=\text{S}$ Gruppe gegen eine zweite $\text{Mo}=\text{O}$ erzeugt damit die „desulfo“-Form der Enzyme (Bordas *et al.*, 1980; Massey *et al.*, 1970)

Die DMSO-Reduktase-Familie unterscheidet sich von den beiden anderen Familien hinsichtlich der Struktur des Molybdänkofaktors. Alle dieser Familie zugehörigen Enzyme besitzen zwei Äquivalente des Pterin Kofaktors, gebunden an ein Molybdänatom. Die Koordinationssphäre des Molybdäns wird durch eine $\text{Mo}=\text{O}$ Gruppe und einen sechsten, je nach Enzym und Organismus variablen Liganden vervollständigt. Dieser Ligand kann ein Serin (wie in der DMSO Reduktase; Satoh *et al.*, 1987; McEwan *et al.*, 1991), ein Cystein (wie in der prokaryotischen Nitratreduktase; Guerrero *et al.*, 1981), ein Selenocystein (wie in der Formiatdehydrogenase; Zinoni *et al.*, 1986) oder ein Hydroxidmolekül (wie in der Arsenitoxidase; Anderson *et al.*, 1992) sein.

1.5 Modifikation des Moco – der terminale Schwefel der Monooxo-Mo-Hydroxylasen

Der Moco kann in Enzymen der XO-Familie in Pro- und Eukaryonten weiter modifiziert werden, indem der äquatoriale Sauerstoffligand des dioxo Moco durch ein Schwefelatom ersetzt wird (Abb. 1.4).

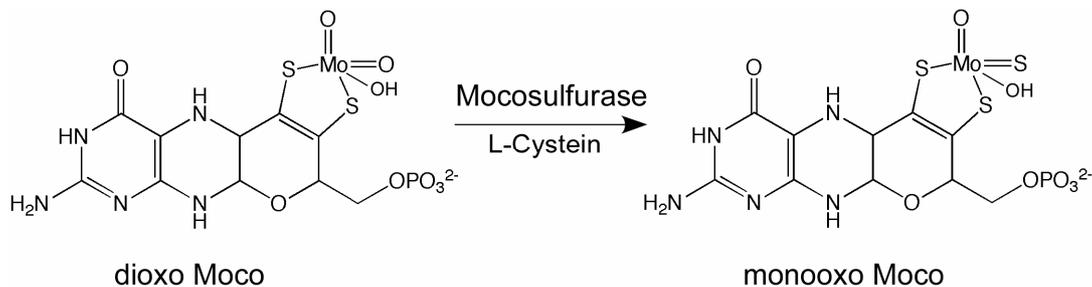


Abb. 1.4 Sulfurierung des Moco: In Eukaryonten wird der Austausch des äquatorialen Sauerstoffliganden durch Moco-Sulfurasen katalysiert, die am N-Terminus eine L-Cystein Domäne für die Schwefelmobilisierung enthalten.

Wie bereits erwähnt, haben Massey *et al.* (1970) durch die Behandlung mit Cyanid (CN^-) die Inaktivierung der Molybdoenzyme XO aus Kuhmilch und XDH sowie AO aus Hühnerleber nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnten nicht alle Molybdoenzyme durch CN^- inaktiviert werden, wie Coughlan 1980 an der SO aus Hühnerleber feststellte. Er folgerte daraus, dass der cyanolysierbare Schwefel in Form eines Persulfids oder Cysteins gebunden sein kann bzw. der Moco der XDH/XO und AO im Gegensatz zum Moco der SO einen Schwefelliganden enthalten kann. Wahl und Rajagopalan erbrachten zwei Jahre später (1982) den Beweis, dass der cyanolysierbare Schwefel auf keinen Fall dem Apoprotein noch der Pterinkomponente des Moco entstammt sondern anorganischer Natur sein muss. Dafür bauten sie radioaktiv markierten Schwefel [^{35}S] in die Desulfo-XDH ein und konnten anschließend aus der reaktivierten XDH durch Behandlung mit SDS oder Guaninhydrochlorid den Schwefel wieder entfernen. Einen weiteren Hinweis, dass der Schwefel anorganischer Natur sein muss, erbrachte der sogenannte Methylenblau-Test. Dabei wird der „säure-labile“ Schwefel aus der XDH herausgelöst und bildet einen [^{35}S]Methylenblau-Komplex. Da kein anders gebundener Schwefel derart säure-labil ist, postulierten Wahl und Rajagopalan (1982), dass der cyanolysierbare Schwefel am Mo-Atom ligandiert sein muss und keinesfalls an das Pterin oder das Apoprotein gebunden sein kann. EXAFS-Analysen (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) von Bordas *et al.* (1980) an

XO aus Kuhmilch erbrachten allerdings zwei Jahre zuvor bereits hinreichende Belege, dass das Mo der aktiven XO durch ein terminales Sulfid, eine terminale Oxogruppe und zwei Cysteine ligandiert ist. Da die XO aus Kuhmilch immer als Gemisch aus aktivem und inaktivem Enzym vorliegt, konnte man bei der inaktiven Form einen zweiten terminalen Oxo-Liganden anstelle des Sulfo-Liganden erkennen. So wurde durch Wahl & Rajagopalan (1982) und Bordas (1980) unabhängig voneinander bestätigt, dass der für die XO-Familie zugehörigen Enzyme notwendige Schwefel terminal am Mo-Atom gebunden ist.

Mit Hilfe von *maroon-like (ma-l)* Mutanten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ergaben sich Hinweise auf eine enzymatische Aktivität zur Insertion des terminalen Schwefels am Mo-Atom. Das Merkmal dieser Mutanten ist aufgrund des Fehlens jeder XDH-Aktivität eine kastanienbraune Augenfarbe, die aus der Reduktion des roten Augenfarbstoffes Drosoplerin resultiert. Weiterhin zeichneten sich die Mutanten durch das Fehlen der Aktivität der AO (Courtright, 1967), XDH (Glassman & Mitchel, 1959) und der bisher nur für *Drosophila* beschriebenen Pyridoxaloxidase (PO; Forrest *et al.*, 1961) aus. Alle drei Enzyme gehören der Monooxo-Mo-Hydroxylasen an. Ein viertes, in *Drosophila* vorkommendes Molybdoenzym ist die SO, welche jedoch in der *ma-l* Mutante nicht betroffen ist (Bogaart & Bernini, 1981). Merkmal dieses Enzyms ist der Dioxo-Moco, der terminale Schwefel wird nicht für die Enzymaktivität benötigt. Warner & Finnerty (1981) zeigten mit dem *nit-1*-Rekonstitutions-Assay, dass die *ma-l* Fliegen normale Mengen des Moco enthalten. Die Moco-Biosynthese ist damit in diesen Mutanten nicht beeinträchtigt. Vermutlich schien in den *ma-l* Fliegen eher eine posttranslationale Modifikation des Moco (der für die PO, XDH und AO erforderlich ist) unterbunden zu sein. Durch eine Behandlung mit Sulfid und Dithionit konnte bei inaktiven PO, XDH und AO- *ma-l*-Rohextrakten die Enzymaktivität wieder hergestellt werden (Wahl *et al.*, 1982). Damit konnte Wahl *et al.* (1982) belegen, dass die *ma-l* Mutation die Inkorporation des terminalen Schwefels unterbindet bzw. die Aktivierung der Monooxo-Mo-Hydroxylasen genetisch kontrolliert wird. Die in Anlehnung an die postulierte Funktion werden die von dem *ma-l*-Locus kodierten Proteine als Molybdän-Kofaktor-Sulfurasen (Moco-Sulfurase, MCS) bezeichnet. Proteine, die Homologien zu den *D. melanogaster* MA-L zeigten, wurden anschließend im Menschen (HMCS (Ichida *et al.*, 2001), bei Rindern (MCSU (Watanabe *et al.*, 2000), in Pilzen (HxB (Amrani *et al.*, 1999, 2000) und in Pflanzen (ABA3 (Leydecker *et al.*, 1995) identifiziert.

Bei Säugetieren äußert sich eine Moco-Sulfurase-Defizienz in der sogenannten Xanthinurie Typ II, die sich durch den simultanen Verlust der Aktivitäten von XDH/XO und AO kennzeichnet, während die SO-Aktivität unbeeinträchtigt bleibt (Reiter *et al.*, 1990). Diese autosomal-rezessive Erbkrankheit wird wesentlich durch die XDH bestimmt, welche die Degradation von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure katalysiert. Homozygote Mutanten akkumulieren allerdings Xanthin und im geringen Maße auch Hypoxanthin anstelle von

Harnsäure. Die damit verbundenen Symptome reichen von einer drastischen Reduktion des Harnsäuregehaltes im Blutplasma und Urin, Xanthin-Steinen in den Nieren über Harnwegs-Infektionen bis hin zu akuten Nierenversagen (Van Acker & Simmonds, 1991). Symptome, die auf den Verlust der AO-Aktivität zurück zu führen sind, treten bei diesen Mutanten nicht eindeutig hervor. Da bekannt ist, dass die vorrangig in der Leber exprimierte Aldehyd-Oxidase 1 (AOX1) eine Art Entgiftungsfunktion übernimmt (Beedham, 1985), könnten heterozyklische Verbindungen nicht abgebaut werden und sich dadurch anreichern.

Die bisher am besten charakterisierte Moco-Sulfurase ist ABA3 aus *Arabidopsis thaliana* (Bittner *et al.*, 2001). So kennzeichnen sich im Pflanzenreich Moco-Sulfurase-Mutanten durch den gleichzeitigen Verlust der Aktivitäten von XDH und AO aus, während die NR-Aktivität erhalten bleibt oder leicht erhöht ist. Der Phenotyp wird hier im Gegensatz zu den Säugern vorrangig durch den Verlust der AO-Aktivität bestimmt. Mutanten aus *Nicotiana glumbaginifolia* (*aba1*-Mutante; Perry *et al.*, 1991; Leydecker *et al.*, 1995), *Lycopersicon esculentum* (*flacca*-Mutante; Sagi *et al.*, 1999) sowie aus *Arabidopsis thaliana* (*aba3*-Mutante; Schwartz *et al.*, 1997) zeigten eine gestörte Stomataregulation, die verbunden mit einem welken Habitus, verminderter Stresstoleranz und reduzierter Samenruhe war. Diese Symptome lassen sich auf das reduziert gebildete Pflanzenhormon Abscisinsäure (ABA) zurückführen. Pflanzen besitzen bis zu vier Isoformen der AO, die alle in unterschiedlicher Effizienz in der Lage sind, die ABA-Vorstufe – Abscisin-Aldehyd – zu ABA umzusetzen (Seo *et al.*, 2000b). Bittner *et al.* (2001) postulierte, dass nach Moco Inkorporation, AO und XDH inaktiv verbleiben, solange nicht eines der beiden Sauerstoffliganden am Moco durch einen Schwefel, der durch die Moco-Sulfurase ABA3 zur Verfügung gestellt wird, ersetzt wird. Da AO und XDH in beiden Formen, der sulfo- und der desulfo-Form vorkommen, sind Pflanzen in der Lage, die Aktivitäten von AO und XDH, ohne eine *de novo* Synthese von Apo-Proteinen, zu erhöhen. Rekombinant erzeugte ABA3 wurde für die *in vitro* Moco-Sulfurierung gereinigter AO aus *A. thaliana* verwendet. Dabei konnte Heidenreich *et al.* (2005) zeigen, dass das konservierte Cys430 in der N-terminalen NifS-ähnlichen Domäne von ABA3 an der Reaktion beteiligt ist. Die C-terminale Domäne hingegen zeigte keine Homologien zu bereits anderen bekannten und beschriebenen Proteinen in Eukaryonten (Wollers *et al.*, 2008), sie wird allerdings für den Schwefeltransfer *in vivo* benötigt und enthält eine [2Fe-2S]-Bindungsdomäne, wie bereits von Sagi *et al.* (2002) für ein Homolog der Tomate beschrieben.

Bislang wurden für Prokaryonten noch keine Moco-Sulfurase-Mutanten bzw. entsprechende Loci beschrieben, obwohl sie Monooxo-Mo-Hydroxylasen, wie die Aldehydoxidoreductase aus *Desulfovibrio gigas* (Romao *et al.*, 1995) und die Xanthin-Dehydrogenase aus *Rhodobacter capsulatus* (Leimkühler *et al.*, 1998) besitzen.

Für die Sulfurierung des Moco in der Xanthin-Dehydrogenase aus *R. capsulatus* wurden von Neumann *et al.* (2007) ein Modell aufgestellt (Abb. 1.5), welches die Rolle von XdhC in der Moco Reifung und dessen Insertion in Apo-XDH näher charakterisiert. XdhC, welches als drittes Gen der XDH unmittelbar downstream von *xdhB* identifiziert wurde (Leimkühler & Klipp, 1999b), ist für die XDH Aktivität erforderlich, ohne dass es eine Untereinheit der XDH ist (Leimkühler & Klipp, 1999b; Truglio *et al.*, 2002). In Abwesenheit von XdhC enthält die inaktive XDH zwar vollständig die Eisen-Schwefel-Zentren und das FAD, der Molybdänkofaktor ist jedoch nicht gebunden. So postulierten Leimkühler & Klipp (1999b) für XdhC eine Rolle als XDH-spezifisches Moco-Transportprotein, als Moco-Insertase oder als Chaperon, welches an der richtigen Faltung während oder nach der Insertion des Moco in die XDH beteiligt sein könnte.

Um zu verhindern, dass der gesamte Moco in der Zelle in MGD umgewandelt wird, muss XdhC sicherstellen, dass ein ausreichender Anteil der monooxo-Moco-Form für die Insertion in XDH zur Verfügung steht. *In vitro* Experimente von Neumann *et al.* (2007b) zeigten, dass XdhC mit MobA interagiert. Diese Interaktion verhindert die Übertragung des Moco auf MobA und damit eine gleichzeitige Bildung von MGD.

Um die Frage der Mocosulfurierung zu klären, haben Neumann *et al.* (2007a) mittels Hefe-Zwei-Hybridanalysen und Oberflächen Plasmon Resonanz (SPR) Experimenten die *R. capsulatus* L-Cystein Desulfurase NifS4 identifiziert. NifS4 mobilisiert den Schwefel von L-Cystein und formt dabei ein proteingebundenes Persulfidintermediat (NifS4-SSH). Dieses interagiert mit XdhC, welches den Dioxo-Moco gebunden trägt, und überträgt ein Schwefelatom auf den Moco. XdhC bietet oxidativen Schutz des sulfurierten Moco, bindet an die XdhB Untereinheit der XDH und integriert den Monooxo-Moco in die Apo-XDH.

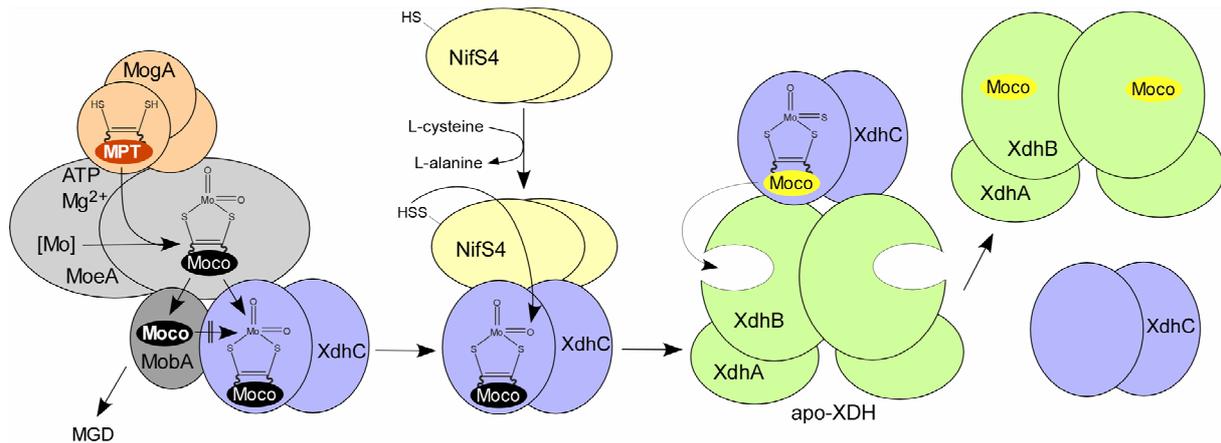


Abb. 1.5 Modell für die Rolle von XdhC in der Moco-Sulfurierung und dessen Insertion in die apo-XDH aus *R. capsulatus*

Der Moco wird durch den Enzymkomplex MoeA/MogA gebildet, indem unter einer ATP-abhängigen Reaktion das Molybdän integriert wird. Der synthetisierte Moco kann, gebunden an MobA, zu MGD umgeformt werden, oder an XdhC binden. Wenn XdhC an MobA bindet, wird eine Übertragung des Moco auf MobA unterbunden. Ein direkter Moco-Transfer von MobA auf XdhC konnte dabei nicht beobachtet werden. Wenn Moco an XdhC gebunden ist, erfolgt die Sulfurierung dessen durch eine Interaktion mit einer L-Cystein Desulfurase und wird anschließend in die apo-XDH integriert (Neumann *et al.*, 2007a,b). *In vivo* Untersuchungen von Leimkühler und Klipp (1999b) haben gezeigt, dass nur sulfurierter Moco in die XDH inseriert wird.

1.6 Die Xanthin-Dehydrogenase aus *Rhodobacter capsulatus*

Rhodobacter capsulatus (*R. capsulatus*) ist ein fakultativ phototrophes Purpurbakterium, das unter anaeroben Bedingungen und in Anwesenheit von Licht, anoxygene Photosynthese betreiben und dabei CO₂ als Kohlenstoffquelle nutzen kann. Im heterotrophen Stoffwechsel ist *R. capsulatus* in der Lage, Carbonsäuren wie Malat als Kohlenstoffquelle zu verwenden. Der Stickstoffbedarf wird dabei aus verschiedenen organischen und anorganischen Verbindungen, wie z.B. Ammonium, verschiedene Aminosäuren, Purinen oder molekularem Stickstoff bezogen. Die Fixierung molekularen Stickstoffs wird von der Nitrogenase katalysiert. Neben diesem Enzym sind bisher zwei weitere Molybdoenzyme mit dem Moco in *R. capsulatus* vollständig charakterisiert worden, die XDH und die Dimethylsulfoxid (DMSO)-Reduktase. Da das Genom von *R. capsulatus* nicht vollständig sequenziert ist, ist es möglich, dass *R. capsulatus* weitere Molybdoenzyme besitzt. Die *R. capsulatus* XDH besitzt große Homologien zur eukaryontischen XDH, was das Bakterium zu einem geeigneten Modellorganismus zur Untersuchung dieses Enzyms macht (Leimkühler, *et al.* 1998).

R. capsulatus XDH ist ein cytoplasmatisches Enzym welches ein ($\alpha\beta$)₂ Heterotetramer mit einer Größe von 275 kDa bildet (Abb. 1.6). Die beiden Untereinheiten werden von den

Genen *xdhA* und *xdhB* kodiert. In der bakteriellen XDH sind die drei Kofaktoren (Moco, 2[2Fe2S], FAD) auf zwei unterschiedlichen Polypeptidketten gebunden. So sind die beiden spektroskopisch unterscheidbaren Eisen-Schwefel-Cluster und das FAD in der XdhA-Untereinheit und der Moco in der XdhB-Untereinheit gebunden. Da bei Eukaryonten alle drei Kofaktoren auf einer Polypeptidkette bzw. in einer Untereinheit liegen (Leimkühler *et al.*, 1998), ist die Umwandlung der XDH in die XO-Form durch proteolytische Spaltung bzw. durch oxidative Disulfid-Brückenbildung bekannter Cysteinreste (Rasmussen *et al.*, 2000) möglich (Hille *et al.*, 1995; Nishino *et al.*, 2005). Kuwabara *et al.* (2003) hat an Hand von Crystalstrukturen der XDH und XO Formen aus Kuhmilch einen Aminosäurecluster entdeckt, der als eine Art variabler Bogen und Lösungsmittelschranke während der Umwandlung zwischen der Dehydrogenase- und der Oxidaseform fungiert. Außerdem folgerte Kuwabara, dass diese Aminosäurefolge (Phe⁵⁴⁹, Arg³³⁵, Trp³³⁶ und Arg⁴²⁷) als funktionelle Einheit fungiert. Diese Einheit aus Aminosäuren zwischen der FAD und der Moco Domäne, vermittelt die Modifikation dieses Linkerpeptides, die durch Ausbildung von Cysteindisulfidbrücken und/oder proteolytischer Spaltung des ‚active site loops‘ (Gln⁴²³-Lys⁴³³) verursacht werden kann. Aufgrund dieser strukturellen Umlagerung in Nähe der FAD Bindungsdomäne ändert sich auch die elektrostatische Umgebung. Das Reduktionspotential des FAD Semiquinons ist bei der Oxidaseform erhöht und damit weniger stabil. Sauerstoff anstelle von NAD⁺ als terminaler Elektronenakzeptor wird deshalb bevorzugt gebunden.

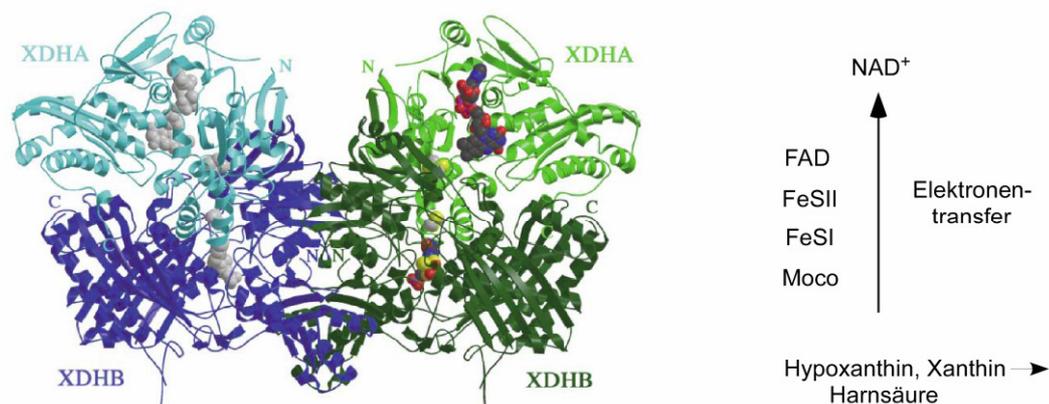


Abb. 1. 6 **Kristallstruktur der *R. capsulatus* XDH (Truglio *et al.*, 2002):** Die Lage des Molybdänkofaktors (in der Untereinheit XDHB dunkelgrün), der Eisen-Schwefel-Zentren sowie des FAD (gebunden in der hellgrünen XDHA Untereinheit) sind schematisch rechts neben der Kristallstruktur dargestellt. Die Substratbindung findet am Moco statt während das NAD⁺ am FADH₂ reduziert wird.

Die Xanthin-Dehydrogenase katalysiert die Reaktion von Hypoxanthin zu Xanthin und Xanthin zu Harnsäure unter dem Verbrauch von Wasser (Abb.1.7). Das Substrat bindet dabei am Moco und das Molybdän wird von seinem +VI Oxidationszustand in den +IV Zustand reduziert.

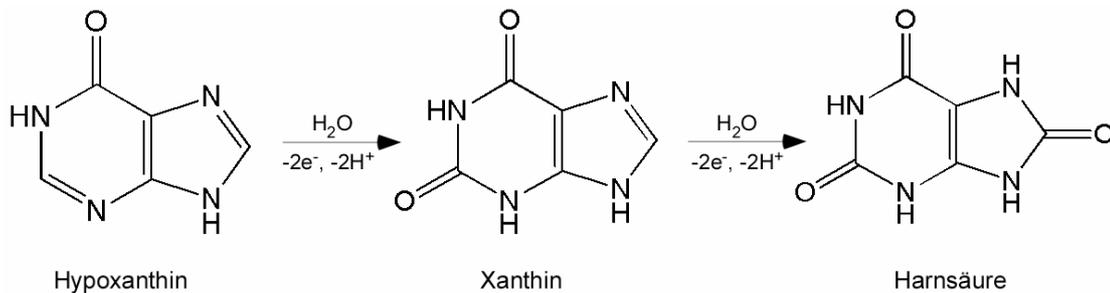


Abb. 1.7 Reaktion katalysiert durch die Xanthin Dehydrogenase: Hypoxanthin wird unter Wasserverbrauch zu Xanthin und abschließend zu Harnsäure oxidiert. Molybdän wird dabei von seinem +VI Oxidationsstatus zu +IV reduziert bevor es durch intramolekularen Elektronentransfer reoxidiert wird.

Truglio *et al.* (2002) identifizierten in der Kristallstruktur der *R. capsulatus* XDH mit gebundenem Alloxanthin, die an der Substratbindung beteiligten Aminosäurereste Glu232, Arg310 und Glu730 (Abb.1.8). Weitere Untersuchungen zur Funktionsaufklärung der an der Katalyse beteiligten Glutamatreste E_B232 und E_B730 wurden durch Leimkühler *et al.* (2004) verdeutlicht. Dabei zeigte die XDH-Variante E_B232A eine signifikante Abnahme in der katalytischen Effizienz (k_{cat} , k_{red}) sowie eine deutliche Zunahme in der Substrat-Bindungsaffinität. Diese Ergebnisse veranschaulichen die Rolle des Glutamatrestes E_B232 für die Substratbindung sowie für die Stabilisierung des Übergangszustandes. Für alle Glutamatvarianten E_B730 (E_B730A , E_B730Q , E_B730R , E_B730D) wurde keine Substrataktivität mehr gemessen, dies bestätigt den postulierten Mechanismus dieser Aminosäure als Initiator der Katalyse. Hierbei greift diese Aminosäure nukleophil die Mo-OH Gruppe an und nimmt ein Proton auf, die so entstandene Mo-O $^-$ Gruppe greift ihrerseits ebenfalls als Nukleophil das C-Atom des gebundenen Substrates an, welches später hydroxyliert wird. Indem ein Proton vom Substrat auf die Mo=S Gruppe übertragen wird (Mo-SH), kann das Substrat an das Mo Atom binden, es entsteht der Übergangszustand mit Mo^{IV} .

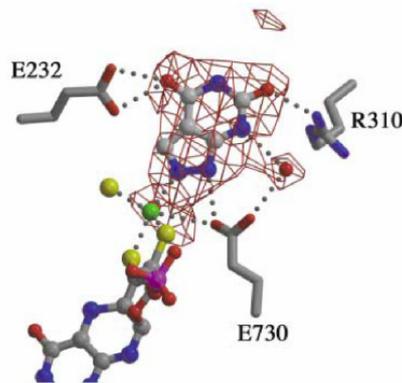


Abb. 1.8 Kristallstruktur der Substratbindungstasche der *R. capsulatus* XDH: Gezeigt ist die Struktur der Allopurinol-inhibierten *R. capsulatus* XDH. Die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren Glutamat (E232), Arginin (R310) und Glutamat (E730) sind gekennzeichnet (Truglio et al., 2002).

Die dritte konservierte Aminosäure Arginin 310 ist für die Stabilisierung des Übergangszustandes während der Substratbindung notwendig (Pauff *et al.*, 2007). Die delokalisierte Ladungsverteilung über den beiden Aminogruppen im Arginin unterstützt die Neutralisation der negativen Ladungsverteilung des Substrates Xanthin am C₆=O Kohlenstoffatom. Der Austausch gegen die ebenfalls positive Aminosäure Lysin zeigte eine nur gering erniedrigte Reaktivität gegenüber Xanthin. Die Methioninvariante R_B310M besitzt jedoch für alle untersuchten Purinsubstrate sehr schwache katalytische Aktivitäten ($0,00167 \geq k_{\text{red}} \geq 0,00640$; Pauff *et al.*, 2007).

1.7 *Mus musculus* Aldehyd-Oxidase (mAOX1) und die humane Aldehyd-Oxidase (hAOX1)

Die Aldehyd-Oxidase (AO) (EC 1.2.3.1) gehört neben der Xanthin-Dehydrogenase zur Xanthin-Oxidase Familie die durch einen äquatorialen Schwefelliganden am Moco charakterisiert ist. In seiner katalytisch aktiven Form besitzt die AO eine molekulare Masse von ca. 300 kDa und besteht aus zwei identischen monomeren Untereinheiten mit je 150 kDa. Ebenfalls charakteristisch für die AO sind die Anwesenheit von zwei unterscheidbaren Eisen-Schwefel-Zentren, eines Flavinadeninindinukleotids und eines Moco pro Untereinheit. Diese Struktur ist der der XOR sehr ähnlich und weist eine Aminosäureidentität zur AO von 49 % auf (Vila *et al.*, 2003). Northern Blot und *in situ* Hybridisierungsanalysen zeigten eine hohe Expressionsrate für die *Mus musculus* AO mRNA in Hepatozyten, Kardiozyten, Lungenendothel- und Lungenepithelzellen sowie in Speiseröhrenepithelzellen. Dabei steht jedoch die mRNA Expressionsrate nicht immer in direkter Korrelation zur entsprechenden

Proteinmenge (Kurosaki *et al.*, 1999). Dies lässt den Schluss zu, dass die Enzymsynthese unter translationaler oder post-translationaler Kontrolle steht. So haben Kurosaki *et al.* (1999) herausgefunden, dass die AO Proteinsynthese zusätzlich geschlechtsspezifisch ist. Bei männlichen Mäusen ist trotz ähnlicher mRNA Gehalte die Menge an AO Enzym signifikant höher im Vergleich zu weiblichen Tieren. Behandlungen der weiblichen Mäuse mit Testosteron konnten dabei die Menge an exprimiertem AO Protein auf die der männlichen Tiere anheben (Kurosaki *et al.*, 1999).

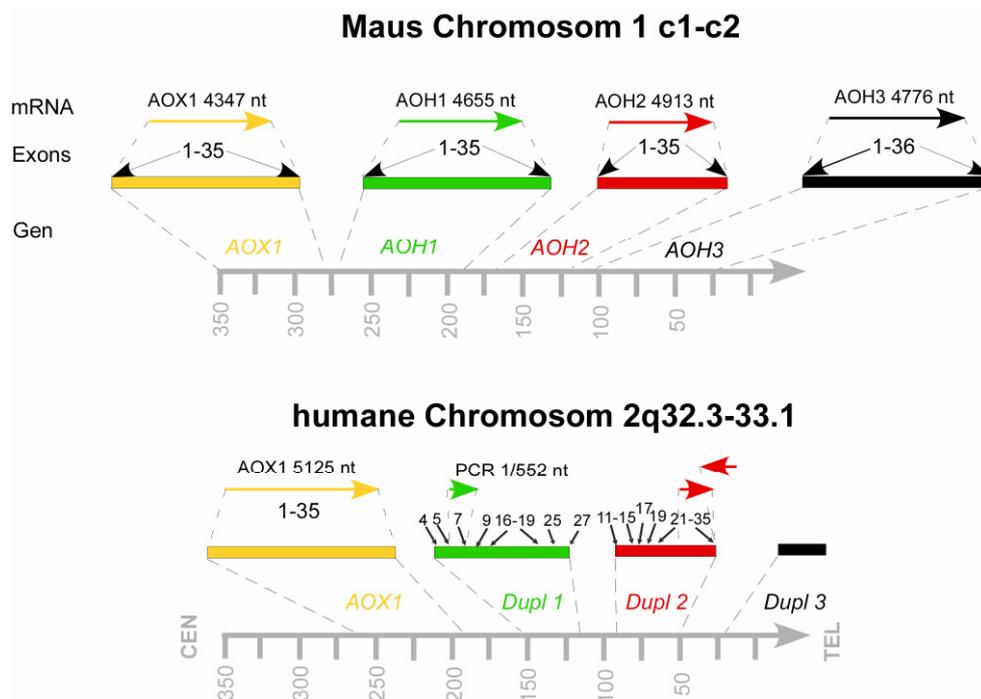


Abb. 1.9 Darstellung der Molybdoflavoenzym-(MFE)-Gencluster aus Maus und Mensch (nach Garattini *et al.*, 2003): In dieser Abbildung sind die Gencluster der Maus auf Chromosom 1 und das des Menschen auf Chromosom 2 dargestellt. In der Maus existieren vier Gene, *AOX1*, *AOH1*, *AOH2* und *AOH3*, die jeweils 35 Exons bzw. 36 Exons umfassen, die für ein Transkript (farbliche Pfeile) sowie für ein funktionales MFE kodieren. Die Länge jedes Transkriptes ist in der jeweiligen Nukleotidanzahl über den Pfeilen erwähnt. Im Menschen existiert hingegen nur ein funktionales Gen (*AOX1*), hinter dem sich 3 DNA-Regionen anschließen, die eine unvollständige Exonanzahl aufweisen, jedoch sehr hohe Ähnlichkeiten zu den drei Maus Homologen gezeigt. Die Namen und Längen der Klone die durch Hybridisierungsscreenings humaner Leber-cDNA Bibliotheken bzw. durch PCR Amplifikationen humaner mRNA isoliert wurden, sind über den farbigen Pfeilen gekennzeichnet.

AOs katalysieren allgemein zwei Arten von Reaktionen, zum einen die Hydroxylierung von Heterozyklen und zum anderen die Oxidation von Aldehyden zu deren entsprechenden Karbonsäuren. So oxidieren sie aza-heterozyklische Verbindungen die als chemische Gruppe $-\text{CH}=\text{N}-$ tragen (wie z.B. Phthalazin und Purin), aromatische oder nichtaromatische aza-heterozyklische Komponenten mit einer $-\text{CH}=\text{N}^+$ - Gruppe (wie N1-Methylnicotinamid und N-Methylphthalazin) oder Aldehyde wie Benzaldehyd, Retinaldehyd und Vanillin. Aufgrund der umfassenden Substratspezifität ist dieses Enzym besonders für den Metabolismus von Medikamenten und der Biotransformation von Xenobiotika in der Leber interessant und wird somit auch zum Schlüsselenzym in diesem Gewebe.

Säugetiere sind durch eine unterschiedliche Anzahl von AO Genen charakterisiert. Nagetiere besitzen z.B. neben der AOX1 drei weitere Gencluster in unmittelbarer Abfolge, bei der Maus liegen alle AO Gene auf dem Chromosom 1 c1-c2. Das zweite Gen in diesem Cluster, *AOH1*, liegt ungefähr 5 kb vom *AOX1* Gen und ca. 20 kb vom *AOH2* Gen entfernt. Das Gencluster von *Mus musculus* wird durch das vierte Gen *AOH3*, vervollständigt und liegt ca. 10 kb vom *AOH2* downstream entfernt. Diese vier Genprodukte haben untereinander auf Aminosäureebene eine Ähnlichkeit von ca. 60 % (Garattini *et al.*, 2007). Innerhalb von fünf Jahren gelang es der Arbeitsgruppe von Garattini das Aldehyd-Oxidase Gencluster in der Maus vollständig zu charakterisieren. Ihr Focus galt dabei der genetischen Struktur, der Identifizierung der Expressionsorte der vier Gene auf diesem Cluster sowie eine erste Einschätzung von metabolisierten potentiellen Substraten der nativ gereinigten Maus AO Proteine. Das Homolog 1 (*AOH1*) ist dem der *AOX1* am ähnlichsten, es wird ebenfalls im Leber-, Lungen-, Herz- und Nierengewebe exprimiert und zeigt übereinstimmende Substratumsetzungen. Die Verbreitung des Homolog 2 (*AOH2*) ist dagegen auf Epithelzellen in der Mundhöhle, der Speiseröhre, des Magens sowie der Haut beschränkt. Das dritte Homolog (*AOH3*) der Maus, welches von Kurosaki *et al.* (2004) erstmalig aus der Nasenschleimhaut gereinigt wurde, konnte bisher nur im Riechorgan der Maus mittels RT-PCR Analyse und *AOH3*-spezifischen Amplimeren lokalisiert werden. Phthalazin, ein Substrat, welches bereits von den drei anderen Aldehyd-Oxidasen metabolisiert wurde, wird auch von *AOH3* oxidiert. Da bislang noch kein monogenetischer Ausfall der AO im Menschen bekannt und beschrieben wurde, soll mit Hilfe der Erzeugung von knockout Tieren die Möglichkeit für die Untersuchung der funktionellen Wichtigkeit der AO-Enzyme sichergestellt werden (unveröffentlichte Daten von Garattini *et al.*)

In anderen Wirbel- und Säugetieren variiert aufgrund von Genduplikationen bzw. Genlöschungen die Anzahl der funktional aktiven Genabschnitte stark. So besitzt der Mensch im Vergleich zu den Nagetieren nur ein einzelnes aktives Gen. Auf dem humanen Chromosom 2q liegen direkt hinter dem *AOX1* Gen zwei DNA Abschnitte (*Dupl1*, *Dupl2*) mit scheinbaren Exons die für Proteinfragmente kodieren, die auffällig hohe Ähnlichkeiten zum

Maus Aldehyd-Oxidase-Homolog 1 (AOH1) und Homolog 2 (AOH2) aufweisen (Abb. 1.9). Da die transkribierten mRNAs dieser humanen Duplikationselemente für keinerlei Proteinprodukte kodieren, geht man von integrierten Stoppcodons im Leserahmen aus.

Im Gegensatz zur XDH nutzt die AO molekularen Sauerstoff als finalen Elektronenakzeptor. Studien über den Mechanismus von Aldehyden veranschaulichten die Produktion von signifikanten Sauerstoffradikal- und Wasserstoffperoxidwerten (Kundu *et al.*, 2007; Rubio-Gayosso *et al.*, 2006; Baudry *et al.*, 2008). Durch die Reaktion der durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildeten sekundären Radikale kann eine Kettenreaktion ausgelöst werden, die erhebliche Zellschäden, wie z.B. Nekrosen, Fibrosen und auch Tumorgenese zur Folge hat.

Das Kennzeichen der meisten Molybdoflavoenzyme ist eine dreiteilige Proteinstruktur, mit einer ungefähren 20 kDa großen N-terminalen Domäne, eine zentrale 40 kDa und einem 85 kDa großen C-terminalen Bereich. Alle Vertreter dieser Enzymfamilie haben ähnliche Aminosäuresequenzen für diese drei Domänen, welche durch zwei nichtkonservierte Linkersequenzen miteinander verbunden sind. Die N-terminale Domäne ist durch zwei unterschiedliche Eisen-Schwefel-Zentren gekennzeichnet, die zentrale Domäne enthält die FAD-Bindestelle wohingegen in der C-terminalen Domäne die Substratbindungstasche und die Moco-Bindungsstelle liegen.

Mit Kristallisation der Xanthin-Oxidase aus Kuhmilch wurden Aminosäuren (Glu¹²⁶¹, Arg⁸⁸⁰, Glu⁸⁰²) in der Nähe der Moco-Bindungsdomäne identifiziert, die als essentiell für die Substraterkennung und Substratbindung gelten (Enroth *et al.*, 2000). Die äquivalenten Aminosäuren in der Maus XOR sind Glu¹²⁶⁴, Arg⁸⁸³ und Glu⁸⁰⁵ (Cazzaniga *et al.*, 1994; Terao *et al.*, 1992; Garattini *et al.*, 2003). Dabei scheint die Glutamat-Aminosäure in allen Organismen konserviert zu sein, denn sie ist für die Initialisierung der Katalyse verantwortlich (Okamoto *et al.*, 2004; Pauff *et al.*, 2007). Die geladenen Aminosäuren Arg⁸⁸³ und Glu⁸⁰⁵ sind bei der mAOX1 gegen die neutralen Met⁸⁸⁴ und Val⁸⁰⁶ substituiert.

mXOR	mAOX1	mAOH1	mAOH2	mAOH3
Glu ⁸⁰⁵	Val ⁸⁰⁶	Ala ⁸⁰⁷	Val ⁸⁰⁹	Val ⁸¹⁷
Arg ⁸⁸³	Met ⁸⁸⁴	Tyr ⁸⁸⁵	Phe ⁸⁸⁷	Phe ⁸⁹⁵
Glu ¹²⁶⁴	Glu ¹²⁶⁵	Glu ¹²⁶⁷	Glu ¹²⁶⁷	Glu ¹²⁷⁶

Abb. 1.10 Darstellung der konservierten Aminosäuren in der Substratbindungstasche aus mXOR, mAOX1 und den drei Homologen aus der Maus

Ziele dieser Arbeit:

Gegenstand dieser Arbeit sollte die Funktionsanalyse der *R. capsulatus* XDH sowie der Charakterisierung der Struktur und Funktion der Aldehyd-Oxidase aus der Maus sein. Um zu klären, warum die XDH ein Dimer bildet, sollte eine chimäre *R. capsulatus* XDH Variante (α)₂(β ₁wt/ β ₂E_B730A) erzeugt und in *E. coli* exprimiert werden. Mit Hilfe dieser Variante sollte untersucht werden, ob die beiden ($\alpha\beta$) Untereinheiten der XDH unabhängig voneinander agieren und ob ein intramolekularer Elektronentransportmechanismus zwischen den beiden β -Untereinheiten stattfindet.

Da die Reinigung nativer Aldehyd-Oxidase aus Mausleber nur geringe Mengen an Enzym liefert, sollte ein System für die heterologe Expression katalytisch aktiver mAOX1 in *E. coli* etabliert werden. Charakteristisch für die Aldehyd-Oxidasen in Säugetieren ist deren ausgedehnte Substratspezifität, gleichzeitig ist die physiologische Aufgabe der AOs immer noch nicht vollständig geklärt. Hierbei sollten die Substratspezifität des rekombinanten Enzyms mit verschiedenen Purin- und Aldehyds substraten bestimmt werden sowie die kinetischen Parameter determiniert werden. Um die Funktion konservierter Aminosäuren im aktiven Zentrum zu untersuchen, sollten zielgerichtete Mutagenesen einzelner Aminosäuren (Val806Glu, Met884Arg, Glu1265Gln) durchgeführt werden und die Auswirkungen der Aminosäureaustausche auf die Enzymaktivität untersucht werden.

Da die bakterielle *R. capsulatus* XDH große Homologien mit eukaryotischer XOR in der Aminosäuresequenz und in der sekundären und tertiären Proteinstruktur aufweist sowie der Reaktionsmechanismus (Leimkühler *et al.*, 2004) im Detail beschrieben ist, sollte dies im zweiten Teil dieser Arbeit für eine Vergleichsstudie mit der mAOX1 dienen. Hierfür sollten der Wildtyp und die bereits vorhandenen Varianten (E232V, R310M) auf die Reaktivität verschiedener Purin- und Aldehyds substrate getestet werden.

Da für den Menschen bislang noch keiner monogenetischer Ausfall der Aldehyd-Oxidase bekannt und beschrieben wurde, ist das Interesse der genauen biochemischen Funktion der AOX1 besonders groß. Die humane AOX1 wird wie die mAOX1 vorrangig in der Leber exprimiert, die gleichzeitige Verfügbarkeit menschlichen Lebergewebes aber stark beschränkt ist, soll auch hierfür ein heterologes Expressionssystem für ein funktionell aktives rekombinantes Enzym aufgestellt werden. Das Expressionssystem für die mAOX1 sollte auf die humane AO übertragen und das Protein charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Escherichia coli-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz	Verwendung
DH5 α	supE4 Δ lac U169 (Δ 80lacZ Δ M15) had R17 recA endA1gyrA96 thi-1 relA1	Hanahn, 1983	Klonierung
RK4353 Δ mobA	Δ lacU169 araD139 rpsL gyrA non	Stewart, 1982	Expression von pTYB2
TP1000	araD Δ (argF-lac)U169 rpsL relA flbB ptsF devC rbsR mobAB::kan	Palmer, 1996	Expression von pTrCHis-Vektoren

Plasmide

Nummer	Bezeichnung	Referenz	Verwendung
pAK22	pTYB-xdhB-wt (<i>NdeI/KpnI</i>)	Annika Krause	Co-Expression mit pSL239
pSL239	pACYCduet1, xdhAB in MCS1; xdhC in MCS2	Leimkühler	Co- Expression mit pAK22
pSS2	pTYB2-xdhB-E730A	diese Arbeit	Co- Expression mit pSL239
pSL205	pTrcHis-mAOX1-5000bp (<i>NdeI-Sall</i>)	Leimkühler	Co- Expression mit pSS110
pSS60	pTrcHis-mAOX1-V806E	diese Arbeit	Co- Expression mit pSS110
pSS70	pTrcHis-mAOX1-M884R	diese Arbeit	Co- Expression mit pSS110
pSS80	pTrcHis-mAOX1- V806E/M884R	diese Arbeit	Co- Expression mit pSS110
pSS90	pTrcHis-mAOX1-E1265Q	diese Arbeit	Co- Expression mit pSS110
pSS100	pTrcHis-mAOX1-wt- H1226R/R1230Q	diese Arbeit	Co- Expression mit pSS110
pSS110	pACYCduet1-mMCSF- (<i>NdeI-XhoI</i>)	diese Arbeit	Co-Expression
pSS120	pACYCduet1-hMCSF- (<i>NdeI-AatII</i>)	diese Arbeit	Co-Expression mit pSS130
pSS130	pTrcHis-hAOX1- (<i>NdeI-Sall</i>)	diese Arbeit	Co-Expression mit pSS120

Oligonukleotide

Primer-Bezeichnung	Basenfolge 5'-> 3'	Verwendung
V806E-forward	GGA GGG AAG GAA GGC AAG ACC AGC	Klonierung mAOX1-V806E in pTrcHis
V806E-reverse	GCT GGT CTT GCC TTC CTT CCC TCC	Klonierung mAOX1-V806E in pTrcHis
mAOX1-AatII-forward	GAC CCC ATT GGA CGT CCC ATC	Klonierung von pSS60,pSS70,pSS80 in pTrcHis
mAOX1-EcoRI-reverse	CTT CCA GGA ATT CTC TGC	Klonierung von pSS60, pSS70, pSS80 in pTrcHis
M884R-forward	GGT GAT AGA AAG AGG GCT TCT GAA GC	Klonierung mAOX1-M884R in pTrcHis
M884R-reverse	GCT TCA GAA GCC CTC TTT CTA TCA CC	Klonierung mAOX1-M884R in pTrcHis
V806E-forward	GGA GGG AAG GAA GGC AAG ACC AGC	Klonierung mAOX1-V806E/M884R in pTrcHis (Template pSS60)
V806E-reverse	GCT GGT CTT GCC TTC CTT CCC TCC	Klonierung mAOX1-V806E/M884R in pTrcHis (Template pSS60)
E1265Q-forward	GGC CTG GGA CAG TCT GGG GTG	Klonierung mAOX1-E1265Q in pTrcHis
E1265Q-reverse	GAA ACA CCC CAG ACT GTC CCA GGC C	Klonierung mAOX1-E1265Q in pTrcHis
mAOX1-EcoRI-forward	GCA GAG AAT TCC TGG AAG AAG	Klonierung von pSS90, pSS95, pSS100 in pTrcHis
pTrcHis-mAOX1-reverse	GTC TTT CGA CTG AGC CTT TG	Klonierung von pSS90, pSS95, pSS100 in pTrcHis
H1226R/R1230Q-forward	GCA CTC TAT ACA GTC GTG GTC CAA ACC AAT ACA AG	Klonierung von pSS100 (mAOX1-wt)
H1226R/R1230Q-reverse	GAA TCT TGT ATT GGT TTG GAC CAC GAC TGT ATA G	Klonierung von pSS100 (mAOX1-wt)
NdeI-mMCSF-forward	GCC CAT ATG GCC TGC GGG	Klonierung mMCSF in pACYCduett1 (2.MCS)
XhoI-mMCSF-reverse	GCC CTC GAG TCA GGA CAC TC	Klonierung mMCSF in pACYCduett1 (2.MCS)
pTrcHis-forward	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG	zum Sequenzieren der mAOX1 in pTrcHis
mAOX1-Seq #1	GTA TCC CCA GGC CCC TAT G	zum Sequenzieren der mAOX1 in pTrcHis
mAOX1-Seq #2	GAC AAG CAC AGA AAC CT	zum Sequenzieren der mAOX1 in pTrcHis
mAOX1-SeqA-reverse	GCG TGT GCT CTT GAA CTT GTT AC	zum Sequenzieren der mAOX1 in pTrcHis

Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen

Standardlösungen, Puffer und Medien wurden mit Millipore-Wasser hergestellt und sind bei den entsprechenden Kapiteln zu den Proteinreinigungen und analytischen Methoden erwähnt. Soweit nicht anders angegeben, wurde der pH Wert der Lösungen mit HCl oder NaOH eingestellt. Medien, Medienstammlösungen oder –Zusätze wurden durch Autoklavieren (20 min, 1 bar, 121 °C) oder Sterilfiltrieren (0,2 µM) sterilisiert. Die verwendeten Endkonzentrationen der Antibiotika betragen 150 µg/mL Ampicillin und 50 µg/mL Chloramphenicol.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Bakterienanzucht

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde LB- (Luria Bertani-) Medium verwendet (10 g Pepton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt ad 1 L ddH₂O, pH 7,0). Die Vereinzelnung von Kolonien erfolgte auf Festmedium (LB + 1,5 % (w/v) Agar). Für die Vermehrung eines Plasmids wurde eine Einzelkolonie in 5 mL LB-Flüssigmedium (inklusive Selektionsantibiotikum) überführt. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln bei 170 rpm, für 12-16 h (über Nacht) bei 37 °C.

2.2.2 Herstellung kompetenter Zellen

Da *E. coli* kein natürliches Transformationssystem besitzt, müssen die Zellen für die Aufnahme extrachromosomaler DNA kompetent gemacht werden. Durch die Behandlung der Bakterien mit verschiedenen Salzlösungen kann eine Permeabilisierung der Bakterienzellwand erreicht werden.

- 100 mL LB-Flüssigmedium und 20 mM MgSO₄ mit einer Einzelkolonie animpfen und bei 250 rpm und 37 °C bis zu einer o.D.₆₀₀ = 0,9 inkubieren
- Zellen für 2 min in Eiswasser schütteln, anschließend für 30 min auf Eis inkubieren
- 10 min bei 4 °C und 2500 rpm zentrifugieren, anschließend das Pellet in insgesamt 30 mL MES-Puffer (500 mM MES (N-Morpholino)-ethansulfonsäure), 30 mM CaCl₂·2 H₂O und 22 mM MnCl₂·4 H₂O, 10 % Glycerol, pH 6,3 (mit KOH)) resuspendieren und für weitere 10 min auf Eis inkubieren
- Zellen für 10 min bei 4 °C und 2500 rpm pelletieren und mit 8 mL MES-Puffer resuspendieren
- Zellsuspension aliquotieren und bei -70 °C lagern

2.2.3 Transformation von *E. coli*

Bei einer Transformation gelangt Plasmid-DNA durch einen Hitzeschock in kompetente *E. coli* Zellen.

- 100 µL kompetente Zellen auf Eis auftauen und mit 100 ng Plasmid-DNA versetzen, Ansatz für 30 min auf Eis inkubieren
- Nach Hitzeschock bei 42 °C die Zellen für 2 min auf Eis abkühlen
- Zugabe von 500 µL LB-Medium und Zellen für 30-90 min bei 37 °C und 170 rpm inkubieren
- Aliquot bzw. gesamten Ansatz auf LB-Platten (+Selektionsmedium) ausstreichen und ü.N. bei 37 °C inkubieren

2.2.4 Plasmid-DNA-Isolierung

Um hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierungen, Restriktionsverdauung oder als Vorlage für PCR zu erhalten, wurde eine alkalische Lyse der zuvor zentrifugierten und resuspendierten transformierten Zellen vorgenommen. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe einer Silicagelmatrix isoliert, mit Ethanol gewaschen und mit Wasser eluiert. Dafür wurde das Plasmidpräparationskit Nucleo Spin[®] Plasmid (Macherey-Nagel) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Für DNA-Fragmente, die nach einer präparativen Gelelektrophorese aus dem Agarosegel isoliert werden sollten, wurde das Nucleo Spin[®] Extract Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Das Elutionsvolumen betrug 20-50 µL.

2.2.5 Isolierung von mRNA und Generierung von cDNA

Messenger-RNA (mRNA) wurde für die Generierung von cDNA isoliert, dabei war auf eine RNase-freie Umgebung zu achten. Für die mRNA-Isolierung wurde unter flüssigem Stickstoff das entsprechende Gewebe (hier Mausleber) fein zermörsert und anschließend nach Anleitung des mRNA-Isolierungskits (Macherey-Nagel) weiterverarbeitet. Die so erhaltene mRNA wurde mit einem First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, K1611) in cDNA umgeschrieben, die anschließend für eine Polymerasekettenreaktion zur Verfügung stand.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und PCR-Mutagenese

Die PCR ist eine *in vitro*-Methode der DNA Amplifikation, die auf einer enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen basiert. Die für die Hybridisierung benötigten spezifischen Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH synthetisiert. Für die PCR-Reaktion wurde die *Pfu*-Polymerase (Fermentas) bzw. für GC-reiche Templates die KOD Hot Start (Novagen) verwendet.

Zusätzliche Mutationen können in die DNA-Sequenz mit Hilfe von Primern, die neben Homologien zur Ausgangssequenz auch eine oder mehrere veränderte Basenabfolge aufweisen, erzielt werden. Um eine Mutation an Codons vorzunehmen, wurde eine Fusions-PCR durchgeführt. Hierfür wurden zwei Fragmente hergestellt, die vom Ende des Gens bis zur gewünschten Mutation bzw. von der Mutation bis zum 3'-Ende des Gens reichen. Die beiden erzeugten Fragmente wurden daraufhin in einem ersten Schritt fusioniert und anschließend in einem zweiten Schritt der fusionierte DNA-Bereich durch Zugabe der flankierenden Primer amplifiziert.

2.2.7 Klonierungstechniken

Um definierte DNA-Fragmente zu isolieren und mit anderen DNA-Abschnitten neu zu kombinieren, nutzt man verschiedene Enzyme, die DNA schneiden und wieder zusammenführen. Mit Hilfe der hydrolytischen Aktivität spezifischer Typ II Restriktionsendonukleasen erfolgte die Restriktion von DNA gemäß den Angaben des Herstellers (Fermentas). Die Ligation der komplementären Enden von Insert und Zielvektor wurde durch die T4-Ligase (Fermentas) unter ATP-Verbrauch bei RT für mind. 45 min. katalysiert.

Für eine Klonierung direkt nach einer PCR-Reaktion wurde eine Ligation in den pJET1.2-blunt-Vektor (Fermentas) vorgenommen, der eine einfache Sequenzierung des gewünschten Genabschnittes ermöglichte.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Herstellung zellfreier Rohextrakte - Zellaufschluss durch French-Press

Um eine effiziente Reinigung eines rekombinanten Proteins zu erhalten, ist ein nahezu vollständiger Zellaufschluss nötig. Dies kann durch biologische, chemische oder mechanische Methoden bzw. durch eine Kombination dieser erreicht werden. Zum Schutz von Proteasen wurde möglichst bei 4 °C gearbeitet bzw. zusätzlich der Protease-Inhibitor PMSF (0,1 – 1 µM) zugesetzt.

Nach der Zellernte wurde das Zellpellet im entsprechenden Puffer resuspendiert. Der mechanische Aufschluss erfolgte durch 3 maliges Passagieren der Zellsuspension durch eine vorgekühlte French-Press-Zelle bei 1150 psi (American Instruments Company, Maryland/USA). Anschließend wurden die Zellbruchstücke durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 13500xg pelletiert und der Überstand für die weitere Behandlung in ein neues Gefäß überführt.

2.3.2 Expression und Reinigung des XDH-Wildtyps und der chimären Variante über das IMPACT™ CN Intein-System

Die *R. capsulatus* XDH konnte durch die Intein-Tag-Fusionierung an der XdhB-Untereinheit durch das Intein Mediated Purification with Affinity Chitin-binding Tag (IMPACT™) System gereinigt werden. In Gegenwart von Dithiothreitol (DTT) erfolgte die Freisetzung des nativen Zielproteins (Abb. 2.1).

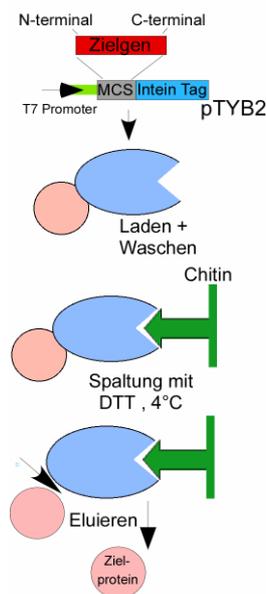


Abb. 2.1 Schematische Darstellung einer Intein-Tag Reinigung mittels Chitin-Matrix: Das Zielgen ist in den pTYB2 Vektor als C-terminales Fusionsprotein kloniert worden. Der Intein-Tag wird nach Bindung an der Chitin-Matrix über Nacht mit DTT vom Zielgen gespalten.

- Für die Vorkultur des XDH-Wildtyps sowie der chimären Variante wurden 100 mL LB-Flüssigmedium zusammen mit 150 µg/mL Ampicilin, 50 µg/mL Chloramphenicol, 1 M NaMoO₄ und einer vereinzelt Kolonie anaerob bei 37°C für 48 h inkubiert.
- Diese Vorkultur wurde 1:100 auf die Hauptkultur übertragen (welche die gleichen Antibiotika und NaMoO₄ enthält) übertragen und für ca. 6 h bei 30 °C

und 130 rpm bis zu einer o.D.₆₀₀ = 0,6 inkubiert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 100 mM IPTG. Für weitere 24 h wurde bei 16 °C und 130 rpm inkubiert.

- Die Zellen wurden durch 5-minütiges Zentrifugieren geerntet und mittels French Press aufgeschlossen.
- Der Überstand nach dem Zellaufschluss und Zentrifugation der Zelltrümmer wurde analog der Ni-NTA Reinigung weiterbehandelt (siehe Abschnitt 2.2.3).
- Das Eluat der Ni-NTA Reinigung wurde in 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl pH 8,0 über Nacht dialysiert.
- Das Dialysat wurde mit selbigem Puffer auf 100 mL aufgefüllt und mit 7 mL Chitin-Matrix versetzt.
- Für eine optimale Bindung des Fusionsproteins an die Matrix wurde die Mischung für mind. 1 h bei 4 °C gerührt und anschließend in eine Tropfsäule überführt.
- Nach einem Waschschrift mit 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl pH 8,0 (10x Säulenvolumen) werden drei Säulenvolumen Spaltungspuffer (250 mM Tris, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl, pH 8,5 + 50 mM DTT) auf die Matrix gegeben und zur Hälfte durch die Matrix laufen gelassen.
- Die XdhB Untereinheit wurde in den pTYB2 als C-terminales Fusionsprotein kloniert, welches eine Spaltungsstelle für DTT besitzt.
- Für eine nahezu vollständige Spaltung wurde die Matrix für 16-20 h bei 4 °C inkubiert und anschließend das Protein eluiert.
- Eine Dialyse in 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 2,5 mM DTT pH 7,5 folgte. Nach Ankonzentrieren der Proteinlösung wurde die Konzentration am Photometer bestimmt und für weitere Messungen bei -70 °C gelagert.

2.3.3 Expression und Reinigung der mAOX1, hAOX1 sowie aller erzeugten mAOX1-Varianten über die Ni-NTA Matrix

Das vollständige Gen der XDH ist im pACYCduet-1 Vektor kloniert, XdhA und XdhB in der ersten MCS und dadurch als N-terminales His₆-Fusionsprotein. Die AOX1 Gene als auch alle Mutanten der mAOX1 sind in den pTrcHis-Vektor ebenfalls als His₆-Fusionsprotein kloniert und können damit mit Hilfe der Ni-NTA (Ni-Nitrilotriessigsäure)-Matrix von nicht erwünschten Proteinen gereinigt werden. In Abb. 2.2 ist eine schematische Darstellung der Ni-NTA zu erkennen, die vier der sechs Bindungsstellen des Ni²⁺-Ions besetzt, so dass noch zwei Bindungsstellen für die Proteinbindung frei bleiben.

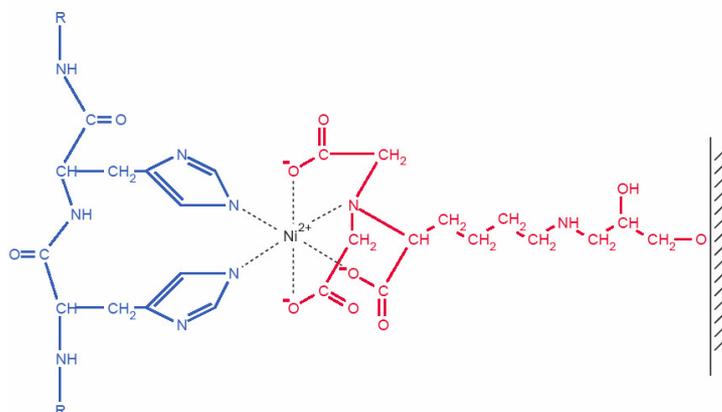


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Interaktion zwischen einem 6xHis-Tag-Fusionsprotein und einer Ni-NTA Matrix: Ni-NTA ist dabei an eine Sepharose CL-6B gekoppelt (rot), die zwei freien Bindungsstellen am Ni²⁺ Ion werden von den Histidinresten des Fusionsproteins besetzt.

- Zur Minimierung der Proteaseaktivität wurden alle Reinigungsschritte bei 4 °C durchgeführt.
- Für eine Vorkultur der AOX1 wurden 50 mL LB-Flüssigmedium mit 150 µg/mL Ampicilin, 50 µg/mL Chloramphenicol, 1 M NaMoO₄, und 20 µM IPTG und einer zuvor vereinzelt Kolonie anaerob bei 37 °C für 48 h inkubiert.
- Diese Vorkultur wurde 1:500 auf die Hauptkultur (die die gleichen Antibiotika und NaMoO₄ und IPTG enthielt) übertragen und für 24 h bei 30 °C und 130 rpm inkubiert.
- Anschließend wurden die Zellen durch 5-minütiges Zentrifugieren geerntet, das Zellpellet wurde in 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8 resuspendiert und mit Hilfe der French Press aufgeschlossen.
- Der Überstand nach Zellaufschluss und Zentrifugation der Zelltrümmer wurde mit 3,5 mL Ni-NTA-Matrix vermengt und in eine Tropfsäule überführt. Dies wurde mit 10 Säulenvolumen 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8 gewaschen.
- Anschließend erfolgte mit 5 Säulenvolumen 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8 eine weitere Waschung der Matrix.
- Das rekombinante Protein wurde mit 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8 eluiert und die Fraktionen mit einem 12 %igen SDS Gel analysiert.
- Die Fraktionen, mit gewünschtem Protein, wurden vereinigt und über Nacht gegen 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 (alle AOX1 Varianten für die folgende Gelfiltration) bzw. gegen 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8 (für XDH-Wildtyp bzw. die chimäre Variante) dialysiert.

2.3.4 Gelfiltration der AOX1 Varianten mittels Superose12-Säule an einem ÄKTA Basic-System

Einen weiteren Reinigungsschritt stellte eine Gelfiltration mittels Superose12 (120 mL quervernetzte Agarose, 20-40 µm Porengröße) an einem Äkta-Basic-System (GE Healthcare) dar. Hierfür wurde die Säule mit 1,5-fachen Säulenvolumen eines 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl pH 7,5 (für alle AOX1-Varianten) voräquiliert. Alle Proteinlösungen wurden auf ein Volumen von 1,2 mL ankonzentriert und dann manuell auf die Säule geladen. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Die Trennung der Proteine erfolgte auf Grund ihrer unterschiedlichen Größe und wurde bei 280 nm und 450/465 nm erfasst. Potente Fraktionen wurden ebenfalls wieder mit einem 12 %-igem SDS Polyacrylamid-Gel überprüft und die gewünschten Fraktionen vereinigt und gegen 100 mM Glycin, 200 mM NaCl, pH 9 über Nacht dialysiert.

2.3.5 Reinigung der mAOX1-Varianten mittels Benzamidin-Sepharose-6B Matrix

Um inaktive mAOX1 von aktiver mAOX1 zu trennen, wurde als letzter Reinigungsschritt eine Benzamidin-Sepharose-6B Matrix verwendet. Die dialysierten Proteine wurden je 12 L *E. coli* Kultur mit 3 mL dieser Matrix vermengt und für mindestens 4 h inkubiert. Um nicht gebundene Proteine zu entfernen, folgte ein 3-maliges Waschen mit 100 mM Glycin, 200 mM NaCl, pH 9. Für die Elution wurde die Matrix für mindestens weitere 4 h mit 100 mM Glycin, 200 mM NaCl, 30 mM Benzamidin, pH 9 inkubiert. Anschließend wurde die Matrix-Protein-Mischung in eine Tropfsäule überführt, das eluierende Protein aufgefangen und gegen 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 über Nacht dialysiert. Die in der Tropfsäule verbleibende Matrix wurde erneut mit Elutionspuffer versetzt, nochmals über Nacht inkubiert und am folgenden Tag die noch nicht eluierten Proteine aufgefangen und ebenfalls gegen den 50 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,5 dialysiert.

2.3.6 Ankonzentrieren von Proteinen

Die Ankonzentrierung von Proteinlösungen kleiner Volumina bis 30 mL erfolgte mit Hilfe von Zentrifugations-Konzentratoren (Centriprep 50, Milipore) mit einem Ausschlußvolumen von 50 kDa entsprechend den Angaben des Herstellers bei 4 °C.

2.3.7 Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration eines gereinigten Proteins in Lösung läßt sich über den Extinktionswert und den spezifischen Extinktionskoeffizienten bestimmen. Das Lambert-Beersche Gesetz berücksichtigt dabei neben der Schichtdicke der Küvette, den Extinktionswert sowie den spezifischen Extinktionskoeffizienten. Dieser wurde mit Hilfe einer Kalibrierungsreihe von verschiedenen FAD Konzentrationen sowie FAD-haltigem und FAD-freiem Protein für die XDH bestimmt.

Lambert-Beersches Gesetz: $E = \epsilon \times c \times d$
 ϵ = Extinktionskoeffizient
 c = Proteinkonzentration in mol/L
 d = Schichtdicke der Küvette in cm

Extinktionkoeffizient XDH = $31600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

2.3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gebräuchlichste und einfachste Methode zur Reinheitskontrolle von Proteinen ist die SDS-PAGE. Hierbei werden die Proteine unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen entsprechend ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt. Natriumdodecylsulfat (SDS), welches über eine negative Eigenladung verfügt, bindet an die hydrophoben Bereiche der Proteine und überdeckt damit deren Eigenladung. So erfolgt die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld nur noch über deren Masse. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine werden zusätzlich Disulfid-Brücken spaltende Reagenzien wie β -Mercaptoethanol oder DTT zugesetzt. Die Proteintrennung erfolgt in einem polymeren Acrylamidgel (Trenngel) welches mit einem großporigen Sammelgel verbunden ist, das einen um zwei Einheiten niedrigeren pH aufweist. Dies ermöglicht eine Konzentrierung der Proteinproben. Als Ampholyt dient Glycin.

Ansatz für ein 12 %-iges Glycin-Trenngel (Minigel)

2,1 mL	ddH ₂ O
+ 1,65 mL	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30% (w/v) 0,8% (w/v))
+ 1,25 mL	4x Lower Tris
+ 25 μ L	10 % (w/v) APS
+ 10 μ L	TEMED

Ansatz für ein Sammelgel:

1140 μ L	ddH ₂ O
+ 500 μ L	4x Upper Tris
+ 340 μ L	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30% (w/v) 0,8% (w/v))
+ 10 μ L	10 % (w/v) APS
+ 2 μ L	TEMED

2.3.9 Coomassie-Blau-Färbung

Für die Proteindetektion wurde der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-R250 verwendet, der sich im sauren Milieu an die basischen und aromatischen Seitenketten von Aminosäuren (wie Arginin, Histidin, Lysin, Phenylalanin) anlagert und Proteine damit unspezifisch anfärbt. Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese für ca. 30 min in der Färbelösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure und 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R250) geschwenkt. Die Proteine werden dabei gleichzeitig fixiert und angefärbt. Da auch das Gel unspezifisch angefärbt wird, erfolgt anschließend eine Entfärbung (in 40 % Methanol, 10 % Essigsäure) bis zur deutlichen Erkennbarkeit der Proteinbanden. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0,1 µg Protein je Bande.

2.3.10 Immunoblot-Analyse

Im Anschluss an eine SDS-PAGE wurde das Gel für 10 min in Transferpuffer (50 mM Tris, 200 mM Glycin, 5 % Methanol) äquilibriert. Der Transfer der Proteine auf die Trägermembran (Hybond™-P, GE Healthcare) erfolgte für 1 h bei konstant 80 mA/2 Gele (0,8 mM/1cm²).

- Die Membran wurde mehrmals mit 1x TBS Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) gewaschen.
- Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C in einer Blockierungslösung (5 % fettfreies Milchpulver in 1x TBS).
- Die Blockierungslösung wurde durch Waschen mit 1x TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % TWEEN, pH 7,5) kurz entfernt.
- Danach wurde der 1. Antikörper – ein polyklonaler Peptidantikörper αMAOX1-1:1000 mit 15 mL 1x TBS, 2 % Milchpulver versetzt und die Membran darin für mind. 2 h belassen.
- Nach Inkubation mit dem primären AK, wurde die Membran mehrmals mit TBST und TBS gewaschen, um nichtgebundenen AK zu entfernen.
- Im Anschluss wurde die Membran wie oben beschrieben mit dem sekundären AK (1:5000), (Meerrettich-Peroxidase konjugierter anti-rabbit IgG AK) für ca. 2 h inkubiert.
- Nichtgebundener sekundärer AK wurde ebenfalls durch mehrmaliges Waschen mit 1x TBST und 1x TBS wieder entfernt.
- Die Detektion des gebundenen sekundären Antikörpers erfolgte durch Inkubation mit ECL-Lösung (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 225 µM p-Cumarsäure; 1,25 mM 3-Aminophthalhydrazid; 0,3 % H₂O₂) für 1 min.
- Durch die während der Peroxidase-Reaktion emittierten Photonen erfolgte die Belichtung eines Röntgenfilms (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) für verschiedene Zeiten (1, 2, 5 min).

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Dünnschichtchromatographie auf einer Zellulose-Acetat-Membran

Für diese Methode wurde eine Titan III (Helena Bioscience) Membran verwendet, die mit definierten Konzentrationen mAOX1 Protein betupft wurde. Nach einer kurzen Trocknungsphase der Membran wurden die aufgetragenen Proteine elektrophoretisch in Tris-Glycin Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,5) bei 200 V für 30 min getrennt. Anschließend wurden die AOX1 bzw. AOH1 Proteine durch einen Agarose-Overlay gefärbt. Hierfür wurden 2 % Agarose in 0,1 M Tris, pH 8,0 gelöst und 0,9 mM MTT (Methyl-Thiazolyl

Blue), 0,3 mM PMS (Phenazine Methosulfat) und das entsprechende Aldehyds substrat (z.B. Phthalazin, Retinaldehyd, Benzaldehyd) zugegeben und vermengt. Diese Mischung wurde auf die Zellulosemembran gegossen und im Dunkeln für 10 – 30 min entwickelt. Die entstandenen farbigen Spots auf der Membran sind auf die Reduktion des MTT zurückzuführen, welches als Elektronenakzeptor für die AOX1/AOH1 im reduzierten Zustand einen violetten Azofarbstoff bildet.

2.4.2 Bestimmung der AOX1-Aktivität mittels Retinaldehyd-Assay nach Vila *et al.* (2004)

Gereinigter mAOX1-Wildtyp (und alle erzeugten Varianten) (2 µg) wurde im Dunkeln für 2 min bei 37 °C in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 inkubiert. Anschließend wurden je 5 µL all-*trans*-Retinaldehyd verschiedener Konzentrationen zugegeben und für weitere 10 min inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 100 µL eines Butanol/Methanol-Gemischs (95:5 v/v), welches 0,005 % w/v BHT (butyliertes Hydroxytoluol) enthält, gestoppt. Molekularer Sauerstoff, der im Puffer gelöst ist, dient hier als finaler Elektronenakzeptor. Anschließend wurde die organische Phase durch Zentrifugation abgetrennt und 20 µL wurden auf eine C18 Reverse Phase Column (4,6 x 250 mm ODS Hypersil, 5 µm) an einer HPLC aufgetragen. Die Bildung des Reaktionsproduktes all-*trans*-Retinalsäure konnte bei 340 nm detektiert und die gebildete Menge über eine Kalibrierungsgerade quantifiziert werden.

2.4.3 Bestimmung der AOX1-Aktivität verschiedener Aldehyde und Purine am Photometer

Um die enzymatische Aktivität der AOX1 auf verschiedene Substrate zu untersuchen, wurden kinetische Parameter, wie die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} und die Michaelis-Menten Konstante K_M bestimmt. Hierfür wurden die Versuchsparameter, wie Reaktionstemperatur, Reaktionszeit und Substratkonzentration, variiert. Einen ersten Anhaltspunkt der katalysierten Substrate hat bereits die Dünnschichtchromatographie ergeben. Durch variierende Substratkonzentrationen $[S]$ konnte eine Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit V_0 erzielt werden und schließlich bei ausreichender $[S]$ die Maximalgeschwindigkeit V_{max} erreicht werden. Um eine bessere Vergleichbarkeit der kinetischen Konstanten zwischen den Substraten zu erhalten, wurde für jede Messung 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP) als Elektronenakzeptor verwendet (Abb. 2.3). Dieser blaue Farbstoff wird farblos, wenn er Elektronen aufnimmt und reduziert wird. Er bindet direkt am Moco und nimmt vom Molybdän die Elektronen auf, ohne dass diese über die FeS-Zentren zum FAD transportiert werden müssen. DCPIP absorbiert im oxidierten Zustand bei 600 nm. Bei dieser Wellenlänge wird durch die Elektronenaufnahme die Abnahme von DCPIP bzw. die Abnahme dessen Absorptionssignals pro Zeit gemessen.

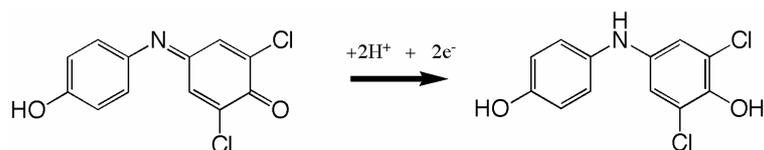


Abb. 2.3 Darstellung der Reaktion von DCPIP während der Aufnahme von Elektronen: 2,6-Dichlorphenolindophenol nimmt im oxidierten Zustand (blau) zwei Elektronen und zwei Wasserstoffionen auf und wird im reduzierten Zustand farblos

Gereinigte mAOX1-Wildtyp sowie die erzeugten Varianten wurden in 500 μL Quarzküvetten in 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 bei 30 $^{\circ}\text{C}$, 100 μM DCPIP und variierender Substratkonzentration vermessen. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10 μL	3 μM Enzym (\equiv 60 nM/Ansatz)
10 μL	5 mM DCPIP (\equiv 100 μM /Ansatz)
10 μL	x mM Substrat
470 μL	50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5

500 μL	Gesamtvolumen gemessen bei 30 $^{\circ}\text{C}$, für 1 min

Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von DCPIP ($=16.1 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) und der molaren Masse der AOX1 und der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk konnten die kinetischen Konstanten bestimmt werden.

Für einige Varianten (wie z.B. mAOX1 V806E/M884R; aber auch für *R. capsulatus* XDH und hAOX1), bei denen mit 3 μM Enzymkonzentration keine zeitliche Absorptionsänderung von DCPIP gemessen werden konnte, wurde die Enzymkonzentration deutlich erhöht, wenn dies auch nicht immer für eine deutliche enzymatische Aktivität genügte. In diesen Fällen galten die Varianten als inaktiv.

Alle Messungen mit der *R. capsulatus* XDH wurden bei 22 $^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

2.4.4 Bestimmung des MPT-Gehaltes mittels High-Pressure-Liquid-Chromatography (HPLC)

Der Molybdänkofaktor wurde durch Zugabe von 50 μL saurer I_2/KJ Lösung aus dem Protein gelöst. Dafür wurden 400 μL Proteinproben (1 μM Endkonzentration) in 100 mM Tris ü.N. mit 1% $\text{I}_2/2\%$ KJ in 1M HCL-Lösung inkubiert. Das dadurch denaturierte Protein wurde bei 11.000 x g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand mit 55 μL einer 1 %-igen Ascorbinsäurelösung versetzt, um überschüssiges Jod zu reduzieren. Durch Zugabe von 200 μL 1 M ungepuffertem Tris wurde der pH auf 8,3 eingestellt. Für die Abspaltung der endständigen Phosphatgruppe wurden 20 μL 1 M MgCl_2 Lösung und 1 U Alkalische Phosphatase (CIAP, Fermentas) zugegeben und für mind. 45 min bei RT inkubiert, Zur Quantifizierung der Form A wurden 100 μL der Proben nach Zugabe von 20 μL 50 %-iger Essigsäure auf eine HPLC C18 Reverse Phase Column (4,6 x 250 mm ODS Hypersil, 5 μm) aufgetragen, die zuvor mit 5 mM Ammoniumacetat und 15 % Methanol äquilibriert wurde. Die Fluoreszenz wurde mit einem Agilent 1100 series Detektor bei einer Extinktion von 383 nm und einer Emission von 450 nm gemessen (siehe Abb. 2.4).

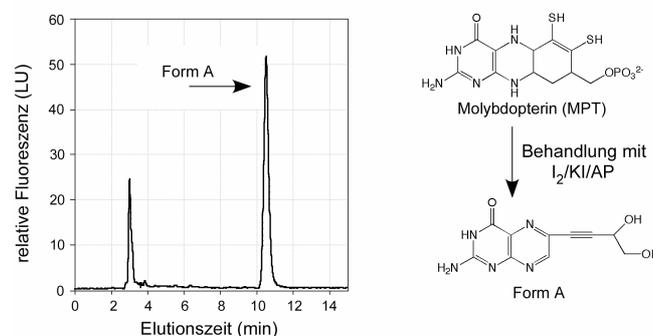


Abb. 2.4 Elutionsprofil der Form A nach der MPT-Analyse des XDH-Wildtyps sowie die schematische Darstellung der Umwandlung des MPT zu FormA

2.4.5 Elementanalyse mittels ICP-OES

Der Molybdän- und Eisengehalt der gereinigten Proteine wurde durch eine ICP-OES Analyse an einem Perkin-Elmer Optima 2100 DV quantifiziert. Dafür wurden 2 bzw. 4 μM der Proteinproben in einem Gesamtvolumen von 500 μL mit 500 μL 65 %-iger Salpetersäure versetzt. Die Prolyse (Nass-Veraschen) wurde ü.N. bei 100 °C durchgeführt. Die Proben wurden weiter durch Zugabe von 4 mL ddH₂O verdünnt und zur Analyse in das ICP-OES (engl. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry)-Gerät (Perkin Elmer) automatisch injiziert. Um den Hintergrundwert zu bestimmen, wurden analog 500 μL 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 behandelt und als Referenz für die Analyse verwendet. Das charakteristische Spektrum der Molybdän- und Eisen-Ionen wurde bei drei Wellenlängen aufgenommen (Mo: 203,845, 202,031, 204,597; Fe: 238,204, 239,562, 259,939) und die ermittelten Konzentrationswerte entsprechend gemittelt und mit einer Standardlösung bekannter Elementarzusammensetzung (Standard Solution XVI, Merck) verglichen. Von jeder Proteinprobe wurden Mehrfachbestimmungen durchgeführt, die gemittelt wurden und der gemessene Mo/Fe-Gehalt in mg/mL wurde in X %-Sättigung angegeben.

2.4.6 Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR)

Die Elektronenspinresonanz (ESR oder electron paramagnetic resonance – EPR) misst die resonante Mikrowellenabsorption einer Probe in einem äußeren Magnetfeld. Damit können Proben untersucht werden, die ein dauerhaftes magnetisches Moment, d.h. ungepaarte Elektronen, besitzen. Wird diese Probe nun in ein Magnetfeld gebracht, spalten sich die entarteten Energiezustände auf, dies wird als Zeeman-Effekt bezeichnet. Häufig wird dieser anhand von Übergängen zwischen Niveaus unterschiedlicher Hauptquantenzahl untersucht. Durch eine Bestrahlung der Probe mit einer Mikrowelle, deren Energie gleich der Aufspaltung der Niveaus ist, kommt es zur Absorption. Meist wird die Probe in einem veränderlichen Magnetfeld mit einer Mikrowelle fester Frequenz bestrahlt und das dabei entstehende Absorptionsspektrum erlaubt Rückschlüsse auf die magnetische Umgebung der magnetischen Momente.

Die 9,5 GHz X-band EPR Spektren wurden mit einem Bruker ESP300E aufgenommen, welches mit einer TE₁₀₂ Mikrowelle versehen war. Um die Messtemperatur zwischen 5 und 300 K zu einzustellen, wurde ein Oxford ESR 900 Helium Flußkryostat mit einem Oxford ITC4 Temperaturregler verwendet. Die Frequenz der Mikrowelle wurde mit einem EIP Frequenzzähler detektiert. Das Magnetfeld wurde mit Hilfe eines LiLiF Standards mit einem bekannten g-value von $2,002293 \pm 0,000002$ kalibriert. Die Proteinproben (meist 100 μM) wurden in einer Quatzküvette mit einem Außendurchmesser von 4 mm vermessen. Eine Reduktion der Enzyme, um die reduzierte Form Fe(II)/Fe(III) der FeS-Zentren zu erhalten, konnte durch Zugabe von entgastem Natriumdithionit (20-facher Überschuss gegenüber dem Protein) unter Argonbegasung erreicht werden. Unmittelbar nachdem die Proben ihre Farbe änderten, wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Eine Nullwertkorrektur konnte durch Abzug des Pufferspektrums erreicht werden. Alle weiteren Simulationen der gemessenen Spektren wurden mit dem Programm „EasySpin“ ermöglicht. Um den relativen Anteil der beiden FeS Zentren in den jeweiligen Proteinproben zu bestimmen, wurden die zweiten Integrale der simulierten Spektren der reduzierten FeSI- und FeSII-Zentren gebildet.

2.4.7 Zirkularer Dichroismus

Proteine sind optisch aktive Chromophore, die rechts und links polarisiertes Licht unterschiedlich absorbieren. Dies führt dazu, dass zirkular polarisiertes Licht elliptisch polarisiert wird (Abb. 2.6A + B).

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie kann nicht nur die Sekundärstruktur (α -Helix, β -Faltblatt) und die Temperaturstabilität von Proteinen überprüft werden, es sind auch Aussagen über

prothetische Gruppen, wie FeS-Zentren, möglich. Dafür wird ein CD-Spektrum in einem Wellenlängenbereich zwischen 350 und 600 nm bei konstanter Temperatur aufgenommen. Für die Messungen wurden ca. 2 mg/mL Proteinlösung in einem Volumen von 200 μ L (in 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5) an einem JASCO J715 CD-Spektrometer in einem Wellenlängenbereich zwischen 350 – 600 nm aufgenommen. Folgende Parameter wurden dabei festgesetzt: Data Pitch: 1 nm, Scan Speed: 10 nm/sec, Response time: 2 sec., Scanning mode: Stepp-wise, Accumulation: 4 times. N₂-flow: 6 L/min
Zu Beginn wurde eine Hintergrundmessung des Puffers vorgenommen, welche dann von den Probenspektren abgezogen wurde. Die Proteinlösungen wurden im oxidierten Zustand und nach Zugabe von 2-5 mM Natriumdithionit ebenfalls im reduzierten Zustand aufgenommen.

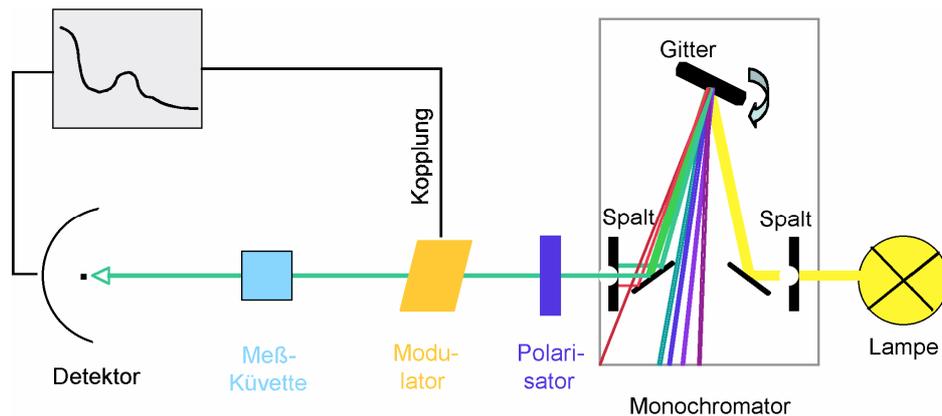


Abb. 2.5 Schematische Darstellung des Aufbaus eines CD-Spektrometers: Das Licht einer Heliumlampe wird über einen Polarisator linear polarisiert, welches sich aus rechts und links gerichteten zirkular polarisierten Komponenten zusammensetzt.

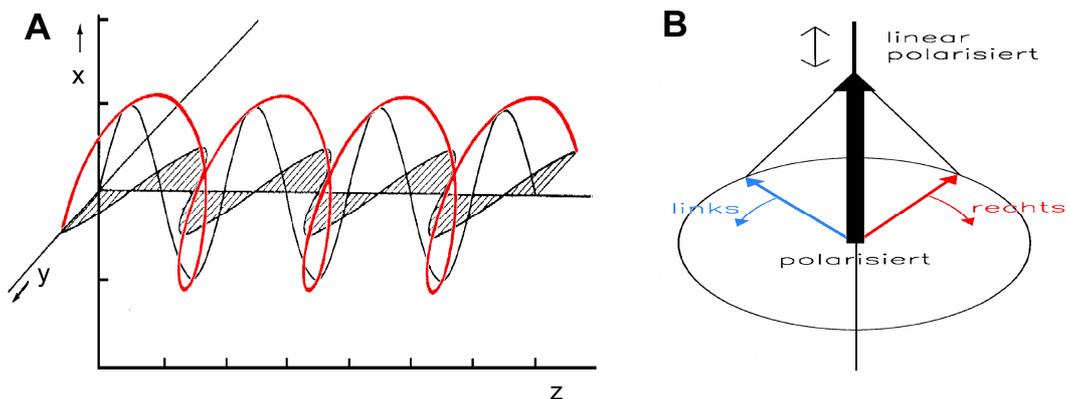


Abb. 2.6 **A:** Circular polarisierte Lichtwelle als Vektorsumme zweier Teilwellen mit gleicher Amplitude und Länge, die um 90° phasenverschoben sind. Hier ist $\varphi < 0$, so dass die resultierende Welle vom Betrachter aus gesehen rechtsdrehend ist. **B:** Linear polarisiertes Licht ist mathematisch gesehen eine Überlagerung zweier circular polarisierter Lichtstrahlen mit gegenläufigen E-Vektoren. Zu jedem Zeitpunkt führt die Vektoraddition der beiden sich nach vorne bewegendenden Licht-Spiralen (links- und rechtsgewundenen) zu einem räumlich fixierten E-Vektor: linear polarisiertes Licht.

2.4.8 Analytische Gelfiltration

Alle analytischen Gelfiltrationsläufe wurden bei 10 °C mit einer Superdex200-Gelfiltrationssäule an einem Äkta-Basic-System (GE Healthcare) mit einer Flußrate von 0,5 mL/min. Die Proteinkonzentration betrug 7 – 12 µM in einem Gesamtvolumen von 400 µL. Diese Art der Gelfiltration diente hierbei für eine Größenabschätzung der gereinigten Proteine (mAOX1, hAOX1). Die bereits kristallisierte *R. capsulatus* XDH diente mit ihrer bekannten Größe von 275 kDa als Heterotetramer als Vergleichsprobe. Das Molekulargewicht der Proteinlösungen wurde mit Hilfe eines Proteinstandards von Biorad (1:10 verdünnt eingesetzt), der sich aus einer Mischung von Standardproteinen (670 kDa – Thyroglobulin (Rind), 158 kDa – γ Globulin (Rind), 44 kDa – Ovalbumin (Huhn), 17 kDa – Myoglobin (Pferd), 1,3 kDa – Vitamin B₁₂) zusammensetzte, bestimmt. Die Gelfiltrationssäule wurde mit 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 voräquiliert. Das Elutionsverhalten der Proteine wurde bei 280 nm verfolgt.

2.4.9 Elektrospray-Ionisations (ESI) - Massenspektrometrie und MS/MS

Alle massenspektrometrischen Analysen wurden am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig) von Dr. Manfred Nimtz durchgeführt.

Für die massenspektrometrische Identifizierung von Proteinbanden in einem Acrylamidgel wurde ein „im-Gel-Verdau“ durchgeführt. Dafür sind vier Stufen notwendig. Nach der Trocknung der ausgeschnittenen potentiellen Proteinbanden erfolgte eine Reduktion und eine Alkylierung der Cysteinreste im Protein, anschließend eine proteolytische Spaltung und schließlich eine Extraktion der so erzeugten Peptide. Die nach der Gelelektrophorese mit Coomassie brilliant blue (CBB) angefärbten Proteine werden anschließend mit einem Puffer, der aus Ammoniumbicarbonat (NH₄HCO₃) und 30 – 50 % organischen Lösungsmittels (meist Acetonitril) besteht, wieder entfärbt. Das organische Lösungsmittel reduziert so die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem CBB und dem Protein. Die sich nun anschließende Reduktion von Disulfidbrücken erlaubt eine optimale Entfaltung der Tertiärstruktur und die irreversible Alkylierung der SH, meist mit Iodoacetamid, ergibt eine stabile Aminoacid-Cystein Verbindung. Der letzte Schritt umfasst den enzymatischen Verdau des Proteins mit Trypsin (Promega, 2 µg/mL) in kürzere Fragmente, in Peptide.

Der letzte Schritt ist die Extraktion der erzeugten Peptide aus dem Acrylamidgel. Die Gelstückchen werden dazu mit einer Extraktionslösung aus Ameisensäure/Methanol inkubiert.

Für die Erzeugung der Ionen für die Massenspektrometrie wurde eine Elektrospray-ionisation, die sehr schonend für den Analyten ist, verwendet. Hierbei erfolgt die Desolvatisierung der Ionen durch kontinuierliche Zuführung des gelösten Analyten an der Spitze einer leitfähigen Kapillare. Das an der Kapillarspitze angelegte elektrische Feld durchdringt die Analytlösung und erzeugt durch Entfernen von Elektronen positiv geladene Ionen (M⁺). Die so entstandenen Ionen bewegen sich elektrophoretisch auf die Gegenelektrode zu, wobei sich an der Kapillarspitze ein Überschuss an gleichartig geladenen Ionen bildet, die sich gegenseitig abstoßen und in Form eines Taylor-Kegels als feines Aerosol aus der Kapillare treten. Durch Verdunstung werden diese Tröpfchen immer kleiner, die Ionen werden damit zusammengedrängt und es kommt schließlich zur Coulomb-Explosion, bei der das Tröpfchen in kleinste Tröpfchen explodiert. Der Ionenstrahl wird beschleunigt und über eine ‚Feld-freie-Zone‘ zum eigentlichen Massenspektrometer transferiert. Ein Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) wird dann für die Analyse der Peptidfragmente genutzt (Abb. 2.7).

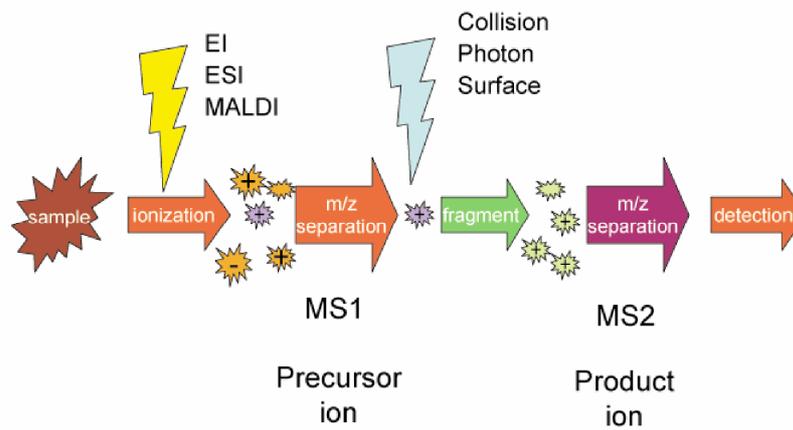


Abb. 2.7 Schema einer tandem Massenspektrometrie (MS/MS): Durch Elektrospray-Ionisation (ESI) werden aus den Probenmolekülen Ionen erzeugt, diese werden als ‚Precursor Ionen‘ im MS1 entsprechend ihres Masse/Ladungsverhältnisses getrennt. Eine zweite Fragmentierung trennt und detektiert alle erhaltenen Massen. Spezielle Programme bearbeiten die resultierenden Spektren. Mit einer geeigneten Software werden die Peptid-Sequenzen mit bekannten Sequenzen verglichen und analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Elektronentransfermechanismus der *R. capsulatus* XDH

Die *R. capsulatus* XDH ist ein heterotetrameres Enzym, welches aus den Untereinheiten XdhA und XdhB zusammengesetzt ist. Die Röntgenkristallstruktur von Truglio *et al.* (2002) zeigt die Bindungsorte der Kofaktoren, so sind die Eisen-Schwefel-Zentren sowie das FAD in der XdhA- und der Molybdänkofaktor in der XdhB-Untereinheit gebunden.

Mit Hilfe der chimären Variante $[(\alpha)_2(\beta_{1wt}/\beta_2E730A)]$, welche je eine aktive und inaktive XdhB-Untereinheit gebunden trägt, sollte die Frage geklärt werden, wieso die XDH als Dimer vorliegt. Hierzu sollte untersucht werden, ob die beiden $(\alpha\beta)$ -Untereinheiten von *R. capsulatus* XDH unabhängig voneinander agieren oder ob zwischen den beiden β -Untereinheiten ein intramolekularer Elektronentransfer stattfindet.

3.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung einer XDH Variante, die nur eine aktive Untereinheit pro $(\alpha\beta)_2$ Tetramer besitzt

Für die Untersuchung des intramolekularen Elektronentransfers zwischen den beiden XdhB-Untereinheiten soll die chimäre Variante $[(\alpha)_2(\beta_{1wt}/\beta_2E730A)]$ hergestellt werden. Diese enthält zwei unterschiedlich aktive Seiten, eine Hälfte entspricht dem Wildtyp und die andere enthält den Aminosäureaustausch Glutamin zu Alanin an der Position 730 in der XdhB-Untereinheit. Der Aminosäureaustausch wurde gewählt, da dieser zu einer vollständigen Inaktivierung des Proteins führte (Leimkühler *et al.*, 2004). Dazu wurde mit Hilfe von PCR Mutagenese die Aminosäure Glutamin gegen Alanin in der XdhB-Untereinheit ausgetauscht. Dieses modifizierte *xdhB*-Gen wurde in die *NdeI/KpnI* Schnittstelle des pTYB2-Vektors (New England Biolabs) integriert, so dass das XdhB-Protein als Fusionsprotein mit dem Intein-Protein am C-Terminus synthetisiert wird. Der Vektor wurde pSS2 genannt. Für eine Coexpression des Wildtyp *xdhB* Gens zusammen mit *xdhA* und *xdhC* wurde das Plasmid pACYCduett-1 (Novagen) verwendet. Für das *xdhAB* Gen wurden Primer verwendet, welche die beiden Gene in die *NcoI* und *HindIII* Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle 1 integrierten. Zusätzlich enthielt der 3'-*HindIII*-Primer eine Kodierungssequenz für sechs Histidine, so dass am C-Terminus von XdhB ein His₆tag angehängt wurde. Das *xdhC*-Gen wurde in die *NdeI/KpnI* Schnittstelle der zweiten multiplen Klonierungsstelle des pACYCduett-1 Vektors inseriert wurde. Dieser Vektor wurde als pSL239 bezeichnet und lag bereits kloniert vor.

Für die Expression der chimären Variante $[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$ wurden die Plasmide pSS2 und pSL239 in den *E. coli* Stamm RK4353(DE3)*mobAB* transformiert und bei 16 °C für 20 h exprimiert. Das konservierte Glutamat 730 wurde bereits von Leimkühler *et al.* (2004) als essentielle Aminosäure mit basischer Funktion beschrieben. Sie nimmt ein Proton der MOH Gruppe auf und ermöglicht somit den nukleophilen Angriff auf das Substrat. Der basenkatalysierte Reaktionsmechanismus wird damit von diesem Glutamatrest initialisiert. Durch die Expression von XdhB von zwei unterschiedlichen Plasmiden sollte ein chimäres Fusionsprotein entstehen, das durch die zwei unterschiedlichen Tags (His-tag, Intein-tag) von dem homologen assemblierten Protein getrennt werden kann (Abb. 3.1). Eine zweistufige affinitätschromatografische Reinigung mit Ni-NTA und Chitin-Matrix sollte die Abtrennung der anderen Proteine gewährleisten.

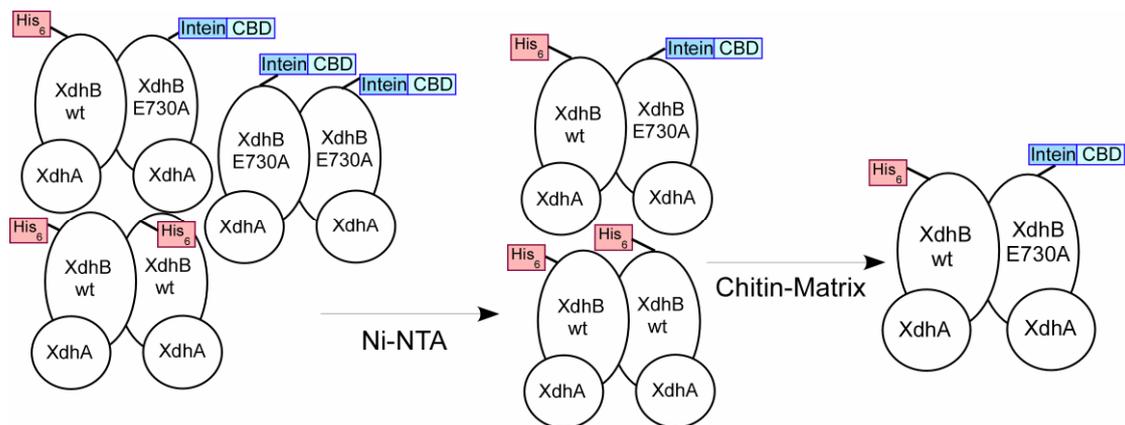


Abb. 3.1 Reinigungsschema der XDH-Chimäre $[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$:

Um eine chimäre XDH-Variante zu isolieren, wurde das *xdhB* Wildtyp-Gen als C-terminales His₆-Fusionsprotein und das *xdhB* E730A-Gen als C-terminales Intein-Fusionsprotein kloniert. Eine zweistufige Reinigung der chimären Variante $[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$ wurde durch Ni-NTA-Chromatografie sowie durch Inkubation mit Chitin-Matrix erreicht. Das Ziel der zweistufigen Reinigung war die Abtrennung der chimären Variante vom assemblierten XDH-Wildtyp sowie der XDH-E730A Variante.

His₆: His₆-Tag

Intein-CBD: Intein-Chitin-Bindungs-Domäne

Abbildung 3.2 zeigt das Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel der gereinigten chimären XDH-Variante $[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$ und des Wildtyps nach der Ni-NTA-Affinitätschromatografie. Die beiden stärker hervorgehobenen Proteinbanden entsprechen den Untereinheiten XdhB (85 kDa) und XdhA (50 kDa). Die zusätzlichen unspezifischen Proteinbanden sowie die unerwünscht gebildeten Dimere (nur His₆-getaggt) konnten in einem zweiten Reinigungsschritt, unter Verwendung einer Chitin-Matrix abgetrennt werden (Abb.3.3). Die

Ausbeute aus 12 L LB betrug für XDH-[(α)₂(β ₁wt/ β ₂E730A)] 0,39 mg/mL und für den XDH-Wildtyp 0,43 mg/mL.

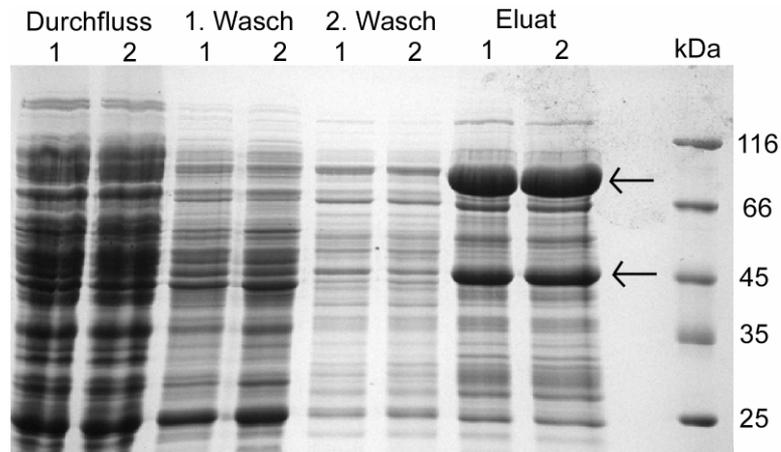


Abb. 3.2 Ni-NTA-affinitätschromatografische Reinigung des XDH-Wildtyps und der chimären Variante [(α)₂(β ₁wt/ β ₂E730A)]: 10 % SDS-PAGE gefärbt mit Coomassie Brilliant Blau. Der Durchfluss repräsentiert die nicht an der Ni-NTA Matrix gebundenen Proteine. Zwei Waschschrte mit 10 mM (1. Wasch) bzw. 20 mM (2. Wasch) Imidazolpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8) durchgeführt. Die Proteine wurden dann mit 250 mM Imidazolpuffer von der Matrix eluiert. Die mit der Nummer 1 bezeichneten Spuren zeigen den Reinigungsverlauf des XDH-Wildtyps und die mit Nummer 2 die chimäre Variante. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Proteinbanden markieren die XdhB-Untereinheiten mit 85 kDa und die XdhA-Untereinheiten mit 45 kDa.

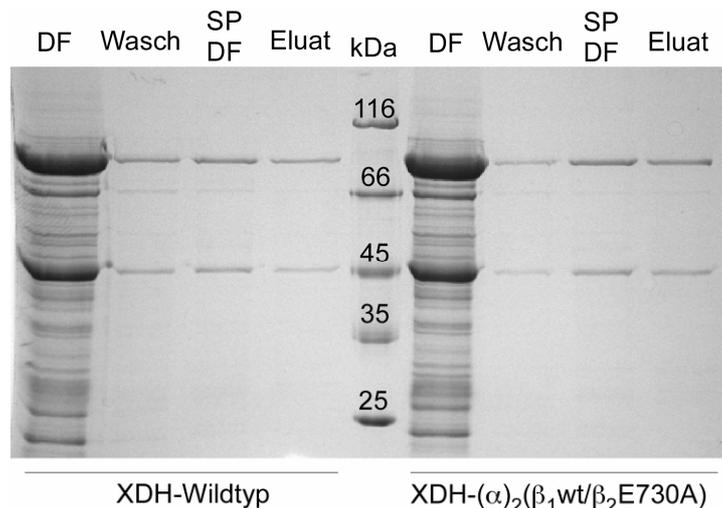


Abb. 3.3 Chitin-affinitätschromatografische Reinigung des XDH-Wildtyps sowie der chimären Variante [(α)₂(β ₁wt/ β ₂E730A)]: 10 % SDS-PAGE gefärbt mit Coomassie Brilliant Blau. Der in Spur 1 und 6 gezeigte Durchfluss (DF) zeigt die Proteine, die nicht an die Intein-Matrix gebunden haben. Der Spaltungspuffer (250 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM DTT) wurde über Nacht mit der Matrix und dem gebundenen Protein inkubiert. Das Eluat (Spur 4 und 9) zeigt die Banden der beiden XDH-Untereinheiten.

3.1.2 Bestimmung des MPT-Gehaltes sowie der Reduktionsfähigkeit der XDH mit Xanthin und NADH

Der Gehalt des MPT wurde indirekt über die Quantifizierung nach Umwandlung in dessen stabiles Oxidationsprodukt FormA (Abb. 3.4) mittels HPLC ermittelt. Dabei wird unter Salzsäurezugabe das Protein denaturiert und der Moco durch I_2/KJ in das fluoreszierende Produkt FormA oxidiert. Die Zugabe von alkalischer Phosphatase spaltet den endständigen Phosphatrest ab und bildet die so genannte FormA. Aus den Werten ist ersichtlich, dass beide Proteine mit ähnlichen MPT-Gehalten gereinigt wurden.

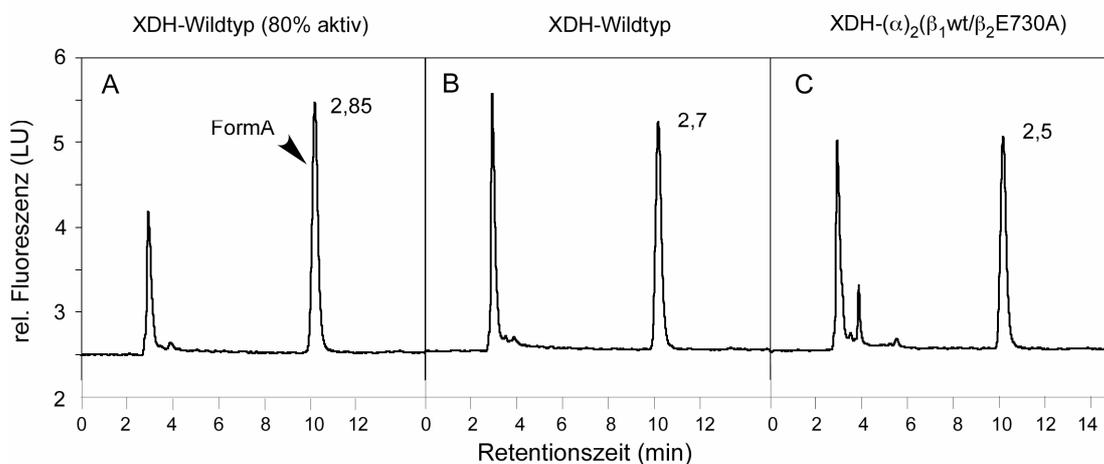


Abb. 3.4 Elutionsprofil von FormA des XDH-Wildtyps mit bekannter Aktivität von 80% (A), des XDH-Wildtyps über Ni-NTA und Chitin-Affinitätschromatografie gereinigt (B) sowie der chimären Variante $[(\alpha)_2(\beta_1wt/\beta_2E730A)]$: Für die MPT-Analyse wurden die drei XDH Proteine in gleicher Konzentration ($0,2 \mu M$) über Nacht mit salzsäurehaltiger 2 %-iger I_2/KI Lösung inkubiert, anschließend das denaturierte Protein durch Zentrifugation entfernt und das überschüssige Jod mit Ascorbinsäure vollständig reduziert. Durch die Zugabe von Alkalischer Phosphatase (AP) wird der endständige Phosphatrest abgespalten. Anschließend werden die Proben mit einer reversed phase C18 Säule an der HPLC analysiert. Die FormA eluiert bei circa 10 min.

Die Ergebnisse der FormA-Analyse zeigen, dass der XDH-Wildtyp besaß 76 % und die chimäre Variante 70 % MPT-Sättigung (Tabelle 3.1). Für eine weitere Charakterisierung der Proteine hinsichtlich ihrer Aktivität, wurden Reduktionsspektren mit Xanthin und Natriumdithionit aufgenommen (Abb. 3.5). Um eine Reoxidation während der Reduktion zu vermeiden, wurden alle Proteinlösungen, Puffer sowie Substrate für drei Stunden in einer Anaerobkammer unter Formiergasatmosphäre entgast. Unmittelbar nach der Xanthinzugabe konnte der Wildtyp zu 46 % und das Chimär $[(\alpha)_2(\beta_1wt/\beta_2E730A)]$ zu 26 % reduziert werden.

Tabelle 3.1 Bestimmung des MPT Gehaltes und des Anteils des reduzierbaren Proteins mit Xanthin und NADH von *R. capsulatus* XDH-Wildtyp und $[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$

	Reduktion mit Xanthin ^a	Reduktion mit NADH ^a	MPT ^b
		%	
Wildtyp XDH	46	66	76
$(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})$	26	74	70

^a XDH in 0,5 mL 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5, wurde mit je 100 μM Xanthin bzw. NADH reduziert. Die vollständige Reduktion wurde durch Zugabe von Natriumdithionit bei einer Endkonzentration von 20 mM erreicht. 100 % Reduktion mit Xanthin bzw. NADH entspricht einer vollständigen Reduktion beider Enzyme mit dem jeweiligen Substrat.

^b Der Gehalt an MPT wurde nach Umwandlung in das stabile fluoreszierende Produkt FormA ermittelt. 100 % MPT Gehalt entsprach hierbei einer XDH Positivkontrolle, die vollständig mit Moco gesättigt war.

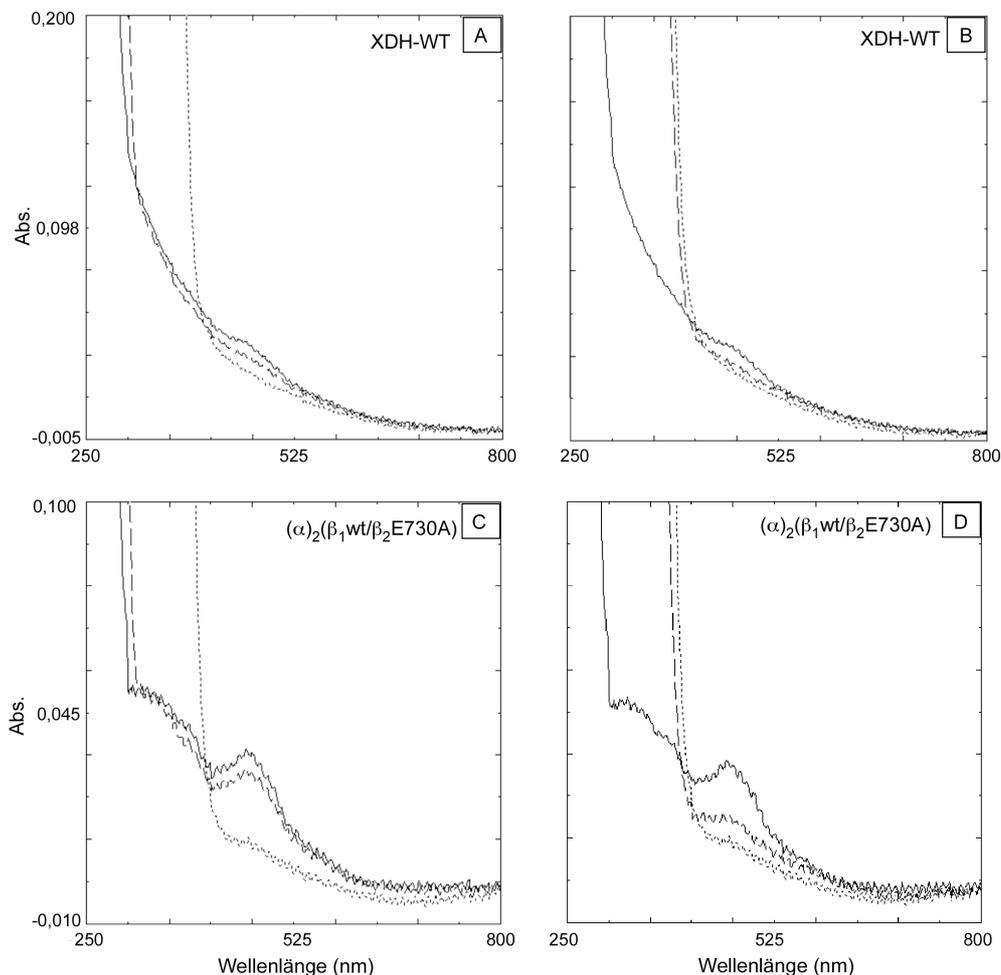


Abb. 3.5 Reduktionsspektren des *R. capsulatus* XDH-Wildtyps und der chimären Variante $[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$ mit Xanthin und NADH: Das Spektrum der oxidierten Enzyme wurde in 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 von je 1 μM Enzym aufgenommen, anschließend wurden diese mit je 100 μM Xanthin (A+C) bzw. NADH (B+D) reduziert. Eine vollständige Reduktion (gepunktete Linien) wurde durch Zugabe von Natriumdithionit mit einer Endkonzentration von 20 mM erreicht.

Die Reduktion des Wildtyps von 46 % zeigt, dass nur circa die Hälfte der XDH-Moleküle den terminalen Mo=S Liganden tragen. Die chimäre Variante verdeutlicht mit 26 % reduziertem Anteil, dass sie nur circa halb so aktiv ist wie die Wildtyp XDH, die unter den gleichen Bedingungen exprimiert wurde. Durch die Zugabe des Elektronenlieferanten NADH, welches am FAD bindet, erfolgt eine schnelle Reduktion des FAD und der Fe/S analog ihrer Reduktionspotentiale. Aufgrund der hohen Potentialdifferenzen zwischen Fe/SII, Fe/SI und Mo^{VI}/Mo^{IV} findet keine Reduktion des Molybdäns statt. Mit NADH wird damit der vier-Elektronenstatus erreicht, die Reduktion ist somit nicht vollständig. Die Reduktion mit NADH ergab wiederum für den Wildtyp 66 % und für das Chimär 74 %. Bei der Zugabe von NADH wird direkt die Reduktion des FAD überprüft, beide Varianten besitzen damit ein funktionales FAD und FeS-Zentren.

3.1.3 CD-Spektroskopie

Um weitere Informationen über die integrierten Eisen-Schwefel-Zentren zu erhalten, wurden vom Wildtyp und der chimären XDH-Variante CD Spektren im sichtbaren Wellenlängenbereich (350 – 600 nm) für die oxidierte und reduzierte Form aufgenommen. Das Spektrum (Abb. 3.6A) vom Wildtyp-Enzym zeigt starke dichromatische Banden im Bereich 350 – 400 nm und 520 – 580 nm sowie stark positive Banden zwischen 400 – 500 nm. Im Bereich der negativen und positiven Maxima können an folgenden Punkten Übergänge ausgemacht werden: 374 (-), 434 (+), 470 (+) und 552 (-). Der positive Maximumpeak bei 434 nm entspricht dem FeSI und der zweite positive Maximumpeak bei 470 nm kann dem FeSII zugeordnet werden. Wird das Enzym mit Natriumdithionit reduziert, verändert sich das Spektrum mit weniger stark ausgeprägten Übergängen in 371 (-), 409 (+), 461 (-) und 573 (-). Das sichtbare CD Spektrum der reduzierten und oxidierten Form der Wildtyp *R. capsulatus* XDH ist in Form und Intensität dem von *Comamonas acidovorans* ähneln (Xiang *et al.* 1996).

Das Spektrum der chimären Variante (Abb. 3.6B) zeigt ebenfalls im Bereich 350 – 400 nm und 520 – 580 nm starke dichromatische Banden sowie stark positive Banden zwischen 400 – 500 nm. Im Bereich der negativen Maxima können an folgenden Punkten ähnliche Übergänge wie beim Wildtyp ausgemacht werden: 375 (-), 435 (+), 470 (+) und 557 (-). Bei einer Reduktion mit 4 mM Natriumdithionit im Reaktionsansatz veränderte sich auch hier das Spektrum mit weniger stark ausgeprägten Übergängen in 369 (-), 399 (+) und 465 (-). Wie in den Abbildungen 3.6A+B zu erkennen, resultieren die Peaks vorrangig von den FeS Zentren und bieten damit zusätzliche Informationen korrekt im Enzym assemblierter FeSI (470 nm) und FeSII (430 nm). Die Spektren der beiden Varianten zeigen große Ähnlichkeit zur Wildtyp

XDH. Im oxidierten Zustand zeigten die Glutamtvarianten E_B730A der XDH (Abb. 3.6B+C durchgezogene Linie) auch hier dichromatische Banden in den Bereichen 350 – 400 nm und 520 – 580 nm. Die beiden Peakmaxima bei 430 und 470 nm, die die beiden Eisen-Schwefel-Zentren (FeSII bzw. FeSI) verdeutlichen, sind bei beiden Varianten vorhanden. Die Reduktion dieser mit Natriumdithionit (gestrichelte Linie) ist vollständig erfolgt, Peakmaxima sind verschoben bzw. gänzlich verschwunden. Da die Reduktionsspektren identisch dem des Wildtyps sind, ist davon auszugehen, dass der Glutamataustausch keinen Einfluss auf die Insertion der FeS-Zentren hat. Das Absorptionsverhältnis A_{465}/A_{550} von 3,6 für den Wildtyp und 3,7 für die chimäre Variante bestätigt damit ebenfalls den Einbau von FAD und FeS in einem Verhältnis von 1:4 (Leimkühler *et al.*, 2004).

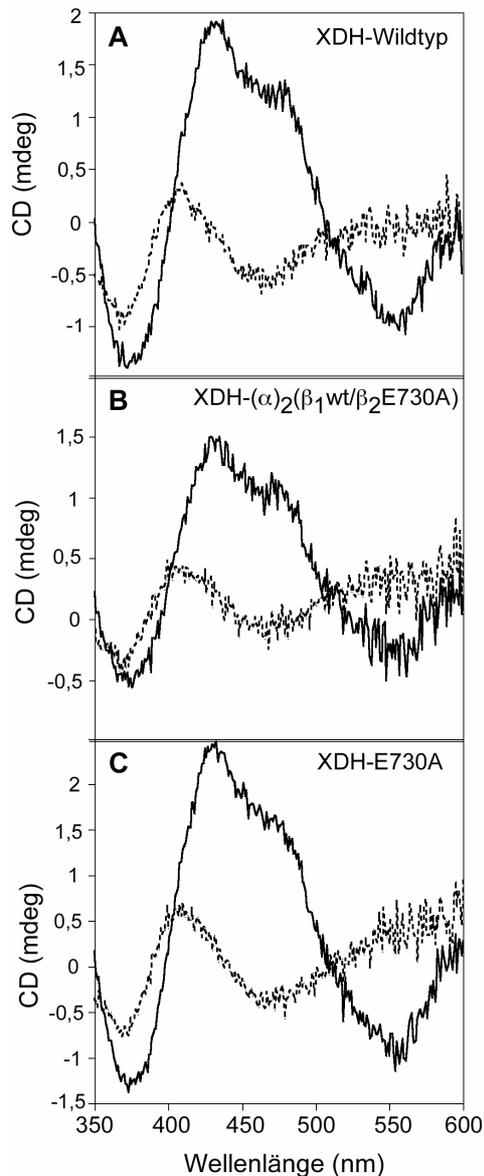


Abb. 3.6 CD-Spektroskopie des *R. capsulatus* XDH-Wildtyps (A), der chimären Variante $[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$ (B) sowie der Variante XDH-E730A (C)

Das Spektrum wurde in 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 bei 20 °C mit einem JASCO J-715 CD-Spektrometer aufgenommen. Spektren wurden von 2,1 mg/mL des Wildtyps, 1,6 mg/L der Chimäre und 2,7 mg/L der XDH-E730A Variante im oxidierten und reduzierten Zustand (durch Zugabe von 4 mM Natriumdithionit) aufgenommen.

3.1.4 Steady-state Kinetiken der Wildtyp-XDH und der chimären XDH-Variante $[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$

Die steady-state Kinetiken der Wildtyp XDH im Vergleich mit der chimären Variante $[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$ wurden bei variierenden Substratkonzentrationen von Xanthin und NAD^+ durchgeführt (Tabelle 3.2). Die Werte für die Wildtyp XDH für $k_{\text{cat}}^{\text{Xanthin}}$, K_m^{Xanthin} und $K_m^{\text{NAD}^+}$ waren $38,8 \pm 3,4\text{s}^{-1}$, $36,2 \pm 7,3 \mu\text{M}$ bzw. $36,2 \pm 4,5 \mu\text{M}$. Aus den Reduktionsspektren ging hervor, dass nur 46 % der Wildtyp XDH aktiv waren, der korrigierte Wert für die Turnovernumber für ein vollständig aktives Enzym beträgt somit $84,3 \text{s}^{-1}$,

welcher dem publizierten Wert der XDH (die als His₆-Tag Fusionsprotein gereinigt wurde, Leimkühler *et al.*, 2004) von 108 s⁻¹ sehr ähnelt. Die Daten der chimären Variante ergaben für $k_{cat}^{Xanthin}$, $K_m^{Xanthin}$ und $K_m^{NAD^+}$ folgende Werte: 19,7 ± 0,4 s⁻¹, 27,0 ± 1,4 μM bzw. 31,3 ± 1,0 μM. Während der K_m für Xanthin und NAD⁺ sich für beide Varianten im gleichen Bereich liegt, beträgt der $k_{cat}^{Xanthin}$ der chimären Variante nur die Hälfte im Vergleich zum Wildtyp. Dieses Ergebnis zeigt, dass bei einem verminderten k_{cat} von 50 % die chimäre Variante (α)₂(β₁wt/β₂E730A) in der Lage ist, das Substrat Xanthin mit der noch intakten Dimerhälfte zu reduzieren. Somit findet kein intramolekularer Elektronentransfer zwischen beiden XdhB-Untereinheiten statt.

Tabelle 3. 2 Kinetische Parameter für *R. capsulatus* XDH-Wildtyp und der chimären [(α)₂(β₁wt/β₂E730A)] XDH-Variante

	Steady-state ^a für Xanthin			Steady-state ^a für NAD ⁺		
	k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m	k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m
	s ⁻¹	μM	s ⁻¹ μM ⁻¹	s ⁻¹	μM	s ⁻¹ μM ⁻¹
Wildtyp XDH	38,8 ± 3,4	36,2 ± 7,3	1,07	38,6 ± 6,5	36,2 ± 4,5	1,07
(α) ₂ (β ₁ wt/β ₂ E730A)	19,7 ± 0,4	27,0 ± 1,4	0,73	21,5 ± 0,4	31,3 ± 1,0	0,7

^a Kinetiken wurden in 50mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.5 durchgeführt

3.2 Reinigung und Charakterisierung der Aldehyd-Oxidase aus *Mus musculus* (mAOX1) und der humanen (hAOX1)

Die AOX1 aus Maus und Mensch sind bisher noch nicht vollständig biochemisch charakterisiert worden. Aminosäuresequenzvergleiche beider AOX1s mit XORs gleicher Organismen, vor allem jedoch mit der XO aus Kuhmilch, zeigen untereinander eine Aminosäurehomologie von 50 % (bestimmt mit Hilfe des ClustalW-Algorithmus). Beide AOX1 Proteine besitzen zwei Eisen-Schwefel-Zentren, ein FAD und einen Moco je katalytisch aktiver Untereinheit. Beide Proteine werden vorrangig in der Leber exprimiert, was für eine Rolle in der Entgiftung von Xenobiotika spricht. Verschiedene Aldehyde, aromatische wie auch kettenförmige, aber auch N-heterozyklische Stoffe sind bereits getestet worden und werden von beiden Proteinen als Substrat verwendet (Vila et al., 2003). Für die mAOX1 und die hAOX1 sollte ein heterologes *E. coli* Expressionssystem etabliert werden. Dafür sollten die Gensequenzen beider AOs in den Vektor pTrcHis als His₆-Tag-Fusionsprotein exprimiert werden. Um ein stabiles und aktives Protein nach der Reinigung zu bekommen, sollte die Mocosulfurase aus beiden Organismen kloniert und koexprimiert werden. Mit Hilfe des *E. coli* Stammes TP1000, der eine *mobAB* Deletion trägt, sollte die eukaryotische Form des Molybdänkofaktors für die Insertion in die AO-Proteine ausreichend zur Verfügung gestellt werden.

Um die Substratspezifitäten der AOX1 zu charakterisieren, sollten zusätzliche Mutagenesestudien an substratbindungsrelevanten Aminosäuren der mAOX1 durchgeführt werden und die Aktivitäten der Varianten mit dem mAOX1 Wildtyp verglichen werden.

3.2.1 Aminosäuresequenzvergleich von mAOX1 und hAOX1

Abb. 3.7 zeigt einen Aminosäuresequenzvergleich der beiden AOs. Die in der Abbildung grau unterlegten Aminosäuren repräsentieren identische Aminosäuren in beiden Proteinen und zeigen eine 83 %-ige Übereinstimmung. Die hAOX1 besitzt eine zusätzliche Sequenz im Verbindungsbereich zwischen der FAD (blau unterlegt) und der Moco Domäne (grün unterlegt) und ist damit um fünf Aminosäuren länger als die mAOX1. In den farblich unterzeichneten Bindungsdomänen für die einzelnen Kofaktoren (Kurosaki, *et al.*, 2004) ist eine höhere Aminosäurehomologie zu erkennen als in den unspezifischeren Verbindungsbereichen, die die einzelnen Kofaktorbindungsdomänen miteinander verbinden. Mit Hilfe des *ExPASy Motif-Scans* konnte jede Kofaktorbinderegion für die mAOX1 identifiziert werden: Für das FeSI wurde eine Aminosäureregion von der Position 8-79 ermittelt, für FeSII von 87-162, für die FAD-Bindedomäne von 235-420 und für die Molybdopterin-Bindungsdomäne von 705-1240.

hAOX1	MDRASELLFYVNGRKVIEKNVDPETMLLPYLRRKLRLLTGTKYCGGGGGCGACTVMISRYNPITKRIRHHPANA CLIPICSLYGA AVTTVE	90
mAOX1	MD-PIQLLFYVNGQKVVEKNVDPPEMMLLPYLRRKLRLLTGTKYCGGGGGCGACTVMISRYNPSTKAI RHHHPVNA CLTPICSLHGTAVTTVE	89
hAOX1	GIGSTHTRIHPVQERIAKCHGTQCGFCTPGMVMSIYTLNRNHPEPTLDQLTDALGGLNLCRCTGYRPIIDACKTFCKTSGCCQSKENGVCC	180
mAOX1	GLGNTRTRLHPIQERIAKCHGTQCGFCTPGMVMSYALLRNHPEPTLDQLTDALGGLNLCRCTGYRPIIDACKTFCKASGCCQSKENGVCC	179
hAOX1	LDQGINGLPEFEEGSKTSPKLF AEEEFPLDPTQELIFPPELMI AAEKQSRTRVFGSERMMWFSPVTLKELLEFFKFKYPQAPVIMGNTS	270
mAOX1	LDQEINGLAESQEDKTSPELFS EEEFPLDPTQELIFPPELMRI AAEKQPPKTRVFGYERVTWISPVTLKELVEAKFKYPQAPIVMGYTS	269
hAOX1	VGPEVKFKGVFHPV IISPDRIEELS VVNHA YNGLTLGAGLSLAQVKDILADV VQKLPEEKTQMYHALLKHLGTLAGSQIRNMA SLGGHI I	359
mAOX1	VGPEVKFKGVFHP I IISPDRIEELGVISQARDGLTLGAGLSLDQVKDILADIVQKLPEEKTQTYRALLKHLRRTLAGSQIRNMA SLGGHI V	359
hAOX1	SRHPDSDLNPI LAVGNCTLNLLSKEGKRQ IPLNEQFLSKCPNADLKQEVILVSVNIPYSRKWEFVSAFRQAQRQENALAI VNSGMRVFFG	450
mAOX1	SRHLDSDLNPI LAVGNCTLNLLSKDGERRIPLSEEF LRKCEPADLKQEVILVSVNIPWSRKWEFVSAFRQAQRQENALAI VNSGMRVLF R	449
hAOX1	EGDGI IRELCISYGGVGPAT ICAKNSCQKLI GRHWNEQMLDIACRL IILNEVSLGSA PGGKVEFKRTL IISFLFKFYLEVSQ I LKMDPV	540
mAOX1	EGGVIEELSLYGGVGSTI I SAKNSCQRL IGRPWNEGMLDTACRLVLDVETLAASAPGGKVEFKRTL IISFLFKFYLEVSQGLKREDPG	539
hAOX1	HYP SLADKYESALEDLHSHKHCSTLKYQNI GPKQHPEDPIGHPIMHLSGVKHATGEA IYCDMP LVDQELFTVFTSSRAHAKIVSIDLS	630
mAOX1	HSPSLAGNHESALDDLHSHKHPWR TLTHQNVDP AQLPQDP IGRPIMHLSQIKHATGEA IYCDMP AVDRELFTVFTSSRAHAKIVSIDLS	529
hAOX1	EALSPGVVDIMTA EHLSDVNSFCFFTEAEKFLATDKVFCVGLVCAVLADSEVQAKRAAKRVKIVYQDLEPILITIEESTIQHNSSF KPE	720
mAOX1	EALS LPGVVDIITADHLQEANTFG----TETFLATDEVHCVGHVCAVIADSETRAKQA AKQVKVYQDLAPLILITIEEATIQHSFFKPE	715
hAOX1	RKLEYGNVDEAFKVVVDQILEGEIHMGGQEHFYMETQSMLVVPKGEDQEMDVVSTQFPKYIQDIVASTLKL PANKVMCHVRRVGGAFGGK	810
mAOX1	RKLECGNVDEAFKIVDQILEGEI HIGQEHFYMETQSMLVVPKGEDGEIDI VVSTQFPKYIQDIVAATLKL SANKVMCHVRRVGGAFGGK	805
hAOX1	VLKGTGIIAAV TAF AANKHGRAVRCV LERGEDMLITGGRHPYLGKYKAGFMNDGRILALDMEHYSNAGASLDES L FVIEMGLLKM DNAYKF	900
mAOX1	VGKTSILAAITAF AASKHGRAVRC ILERGEDMLITGGRHPYLGKYKAGFMNDGRILALDVEHYCNGC SLDES L VVIEMGLLKL DNAYKF	895
hAOX1	PNLRCRGWACRTNLP SNTAFRGFGFPQAAL I TESCITEVA AKCGLSPEKVRI INMYKEIDQTPYKQEI NAKNLIQCWRECMA M S YSLRK	990
mAOX1	PNLRCRGWACRTNLP SNTALRGFGFPQAAGLVTEACITEVA I KGLSPEQVRT INMYKHVD TTHYKQEFSAKALSECWRECMAKCSYFERK	985
hAOX1	VAVEKFNAENYWKKGLAMVPLKFPVGLGSRAAQQAALVHI YLDGSVLVTHGGIEMGGVHTKMIQVVSREL RMPMSNVHLRGTSTETV	1080
mAOX1	AAIGKFNAENSWKKRGM A V I PLKFPVGI SVAMQQAALVHI YLDGSALVSHGGIEMGGVHTKMIQVVSREL RMPMSVHLRGTSTETV	1075
hAOX1	PNANI SGGSVVADL NGLAVKDACQTL LKRLPEI I SKNP KGTWKDWAQTAFDES I NLSAVGYFRGYESDMNWEKGE GQPF EYFVYGAACSE	1170
mAOX1	PNTNASGGSVVADL NGLAVKDACQTL LKRLPEI I SKNP QGTWKDWAQTAFDQSI SLSAVGYFRGYESNIDWEKGE GHPFEYFVYGAACSE	1165
hAOX1	VEIDCLTGDHKNIRTDI VMDVGC SINPAI DIGQIEGAFIQGMGLYTIEELNYS PQGILHTRGPDQYKIPAI CDMPTELHIAL LPPSQNSN	1260
mAOX1	VEIDCLTGDHKNIRTNIVMDVGH SINPALDIGQVEGAFIQGMGLYTIEELSY PQGTLYSRGPNQYKIPAI CDIPTEMHISFLPPSEHSN	1255
hAOX1	TLYSSKGLGESGVFLGCSVFFAIHDAV SAARQERGLHGPLTLNSPLTPEKIRMACEDKFTKMI PRDEPGSVYPWNVPI	1338
mAOX1	TLYSSKGLGESGVFLGCSVFFAIHDAV KAARQERGISGPWKLNSPLTPEKIRMACEDKFTKMI PRDEPGSVYPWNIVP	1333

Abb. 3.7 Aminosäuresequenzvergleich von mAOX1 und hAOX1

Für den Aminosäure-Sequenzvergleich wurde das ClustalW Programm verwendet. Aminosäuren die grau unterlegt sind, sind identisch in beiden Sequenzen. Die farblich untermalten Bereiche entsprechen den unterschiedlichen Domänen in Molybdoflavoenzymen (*Expassy Motif-Scan*): schwarz entspricht der 25 kDa N-terminalen FeSI und FeSII Bindungsmotive, hellblau ist die FAD-bindende Domäne und hellgrün zeigt die circa 85 kDa große Moco- und Substrat-Bindedomäne. Die schwarzen Punkte repräsentieren die konservierten Cysteine, die an der Bindung der Eisen-Schwefel-Zentren beteiligt sind. Die dargestellten Proteinsequenzen stammen aus der Datenbank von NCBI und sind unter den Zugangsnummern NP_001150 für die humane AOX1 und NP_033806 für die Maus AOX1 hinterlegt.

Aufgrund der hohen Aminosäureidentität (83 %) der beiden Proteine sollte zunächst ein Expressionssystem für die mAOX1 etabliert werden, das später auf die hAOX1 übertragen werden soll.

3.2.2 Reinigung und Charakterisierung der Substratspezifität der nativen Maus AOX1

Mit der Reinigung der nativen mAOX1 aus der Leber von Mäusen sowie erste Substratuntersuchungen (Kurosaki *et al.*, 1999; Vila *et al.*, 2004) wurden Daten über die molekulare Masse des Proteins sowie der Spezifität gegenüber potentiellen Substraten gezeigt. Der dafür verwendete Mausstamm DBA/2 besitzt einen reduzierten Expressionslevel für das Homolog 1 (AOH1), welches ebenfalls in großen Mengen neben der mAOX1 in der Leber exprimiert wird.

Um die heterologe mAOX1 mit der nativen zu vergleichen, wurde zunächst die native mAOX1 nach der Methode von Terao & Kurosaki *et al.* (1999) gereinigt. Dafür wurde die Leber von 28 männlichen Mäusen des Stammes DBA/2 entfernt und vereinigt, homogenisiert und anschließend ultrazentrifugiert. Ein Hitzeschritt bei 55 °C für 10 min entfernte hitzeinstabile Proteine, eine Ammoniumsulfatfällung (40 %) und eine Benzamidin-Sepharose Affinitätschromatographie entfernte weitere Verunreinigungen sowie inaktive AOX1/AOH1. Abschließend wurde eine Anionenaustauscher Säule (Mono-Q) verwendet, die mittels eines Natriumchloridgradienten die Proteine AOX1 und AOH1 voneinander trennen sollte. Die Überprüfung der einzelnen Reinigungsschritte ist in Abb. 3.8A dargestellt. Die Elutionsfraktion nach der Benzamidin-Sepharose (Spur 4) zeigt bereits einen hohen Reinigungsgrad. Da die zusätzlichen Proteinbandengrößen nicht den proteolytischen Spaltungsprodukten von 20, 40 und 85 kDa der AOX1 entsprechen (Garattini *et al.*, 2007), ist von unspezifischen Lebergewebsproteinen auszugehen. Für eine Immunoblotanalyse wurden Peptidantikörper verwendet, die spezifisch die AOX1 und die AOH1 erkennen. Die C-terminale Erkennungssequenz für das AOX1-Peptid war Thr1241 – Tyr1258 bzw. für das AOH1-Peptid Phe1315 – Lys1326 (Terao *et al.*, 2000). Die Immunoblotanalyse in Abb. 3.8B zeigt deutlich, dass die Elutionsfraktion der Benzamidin-Sepharose-Inkubation eine Mischung aus AOX1 und AOH1 enthält (Spuren 4 in Abb. 3.8B). Eine Trennung sollte mit Hilfe der Mono-Q Säule erfolgen, da beide Proteine eine unterschiedliche Proteinladung aufweisen. Der isoelektrische Punkt (pI) für mAOX1 beträgt pI = 6,49 und für mAOH1 pI = 6,06. Als Säulenequilibrierungspuffer wurde 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 und als Elutionspuffer 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,4 verwendet. Mit einer Flussrate von 0,5 mL/min wurde ein Natriumchlorid-Gradient von 0 – 50 % über anderthalb Stunden erreicht. Diese Trennung des AOH1 von der AOX1 ist in Abb. 3.9 gezeigt. Wie zu erkennen, sind in nur drei Fraktionen (F23-25) mAOX1 enthalten, die Proteinausbeute von 250 µg ist damit sehr gering. Anschließende Experimente konnten daher nur als Vorversuche genutzt werden. Aus diesem Grund sollte ein heterologes Expressionssystem entwickelt werden, welches die Expression des gewünschten AOX1 Proteins gewebsunabhängig und mit höherer Proteinausbeute ermöglicht.

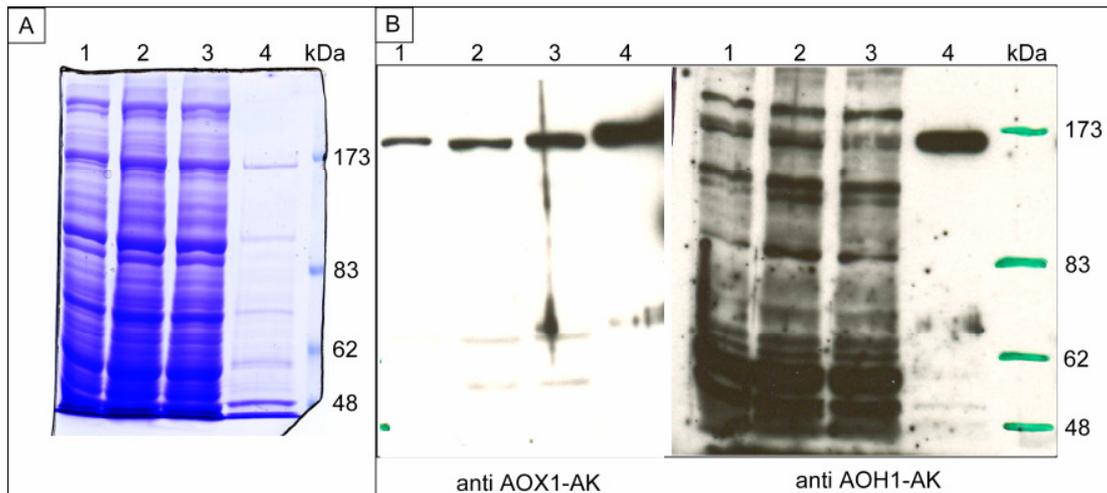


Abb. 3.8 **Reinigung der nativen mAOX1, Coomassiefärbung eines 6 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gels (A) und Immunoblot-Analyse mit α AOH1-AK und α AOX1-AK (B)**

Die Proben (jeweils 100 μ g Gesamtprotein in Spur 1-3) nach den einzelnen Reinigungsschritten wurden unter denaturierenden Bedingungen auf ein 6 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Proteinbanden sind dann mit den entsprechenden Antikörpern detektiert wurden.

Spur 1: Ultrazentrifugation des Leber-Homogenates

Spur 2: hitzeinstabile Proteine nach 55 °C Hitzeschritt

Spur 3: ungebundene Fraktion an BAS

Spur 4: Elution von BAS

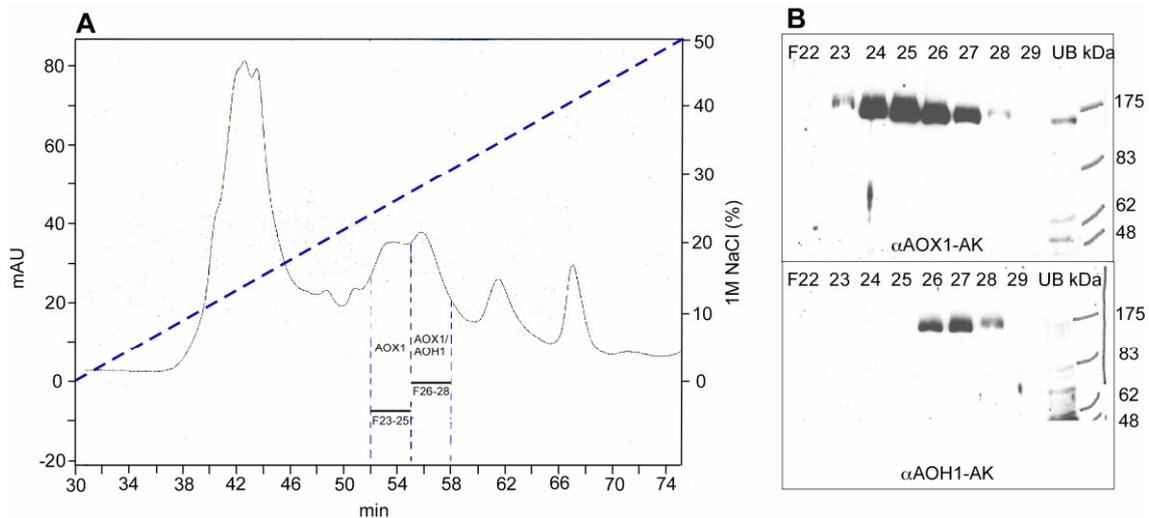


Abb. 3.9 **Reinigung und Trennung der nativen mAOX1 von mAOH1 mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule Mono-Q:** Gezeigt ist der Ausschnitt des Elutionsprofils mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, mit einem linearen 0-1 M NaCl-Gradienten und einer Flußrate von 0,5 mL/min. Die blau gestrichelte Linie stellt den NaCl-Gradienten dar. Potentielle Proteinfraktionen (je 30 μ L) wurden auf ein 6 %-iges SDS-PAGE Gel aufgetragen, anschließend auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit den Antikörpern α AOX1 und α AOH1 inkubiert und mittels ECL-Lösung entwickelt.

Um eine erste qualitative Einschätzung der Substratumsetzung der nativen mAOX1 zu erlangen, wurde eine Dünnschichtchromatographie nach Holmes (1978) durchgeführt. Der Vorteil in dieser Methode liegt in der geringen Probenmengenauftragung. So genügen bereits ein bzw. zwei Mikrogramm der gereinigten Proteine, um eine Detektionsbande bei vorliegender Aktivität der mAOX1 zu erkennen. In Abb. 3.10 sind vier dieser Dünnschichtchromatogramme nach der Substratumsetzung und Farbentwicklung dargestellt. Mit Hilfe der Zugabe des Elektronenakzeptors Methyl-Thiazolyl-Blau (MTT), der im reduzierten Zustand als blauer Azofarbstoff sichtbar wird, kann die AO-Aktivität nachgewiesen werden. Als Substrate wurden 2-OH-Pyrimidin, Phthalazin und Retinaldehyd mit einer Konzentration von 1 mM verwendet, sowie Benzaldehyd mit einer Konzentration von 25 mM. Bis auf Benzaldehyd konnte eine Substratumsetzung zur Reduktion von MTT für die native mAOX1/mAOH1 Mischung nachgewiesen werden. Für Benzaldehyd mit einem 25-fachen Substratüberschuss im Vergleich zu den anderen Substratkonzentrationen konnte keine Reduktion von MTT nachgewiesen werden.

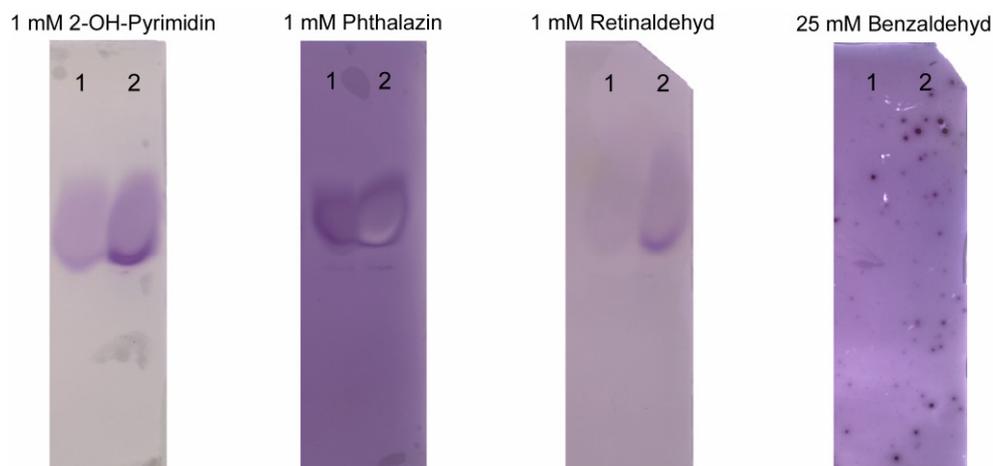


Abb. 3. 10 Dünnschichtchromatografie mit anschließender Agarose-Überschichtung auf Titan III Zellulose-Acetat-Membran

Die zu untersuchenden Proteine wurden in je zwei Konzentrationen mit gleichem Volumen von 10 μ L auf die Membran aufgetragen und die Trennung der Proteine wurde mit Tris-Glycin Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,5) bei einer angelegten Spannung von 200 V für 30 min gestartet. Eine anschließende Färbung mit 0,9 mM Methyl-Thiazolyl-Blue (MTT), 0,3 mM Phenazine-Methosulfat (PMS) und entsprechender mAOX1-Substratkonzentration im 2 %-igen Agaroseoverlay wurde benutzt, um die AO-Oxidase-Aktivität zu detektieren.

Spur 1 und 2 entsprechen 1 bzw. 2 μ g native mAOX1/mAOH1 Mischung

3.2.3 Klonierung der mAOX1 in den pTrcHis-Vektor und der Maus Mocosulfurase (mMCSF) in den pACYCduet-Vektor

Die cDNA der mAOX1 wurde von Kurosaki *et al.* aus der Leber von CD1 Mäusen kloniert und in die *NdeI-SalI*-Schnittstelle des pTrcHis-Vektors (Temple, C.A.) kloniert und lag bereits als Plasmid pSL205 vor. Dieses exprimiert die mAOX1 als N-terminales Fusionsprotein mit sechs Histidinen. Die Maus MCSF wurde für diese Arbeit aus Mausleber mittels RT-PCR und anschließender spezifischer PCR erhalten. Dafür wurde die Leber einer Balb-C Maus (Arbeitsgruppe Micheel, Universität Potsdam) entfernt und 5 mg unter flüssigem Stickstoff fein zerrieben und mit Hilfe des mRNA-Isolierungs-Kits (Macherey & Nagel) die mRNA isoliert und anschließend mittels RT-PCR cDNA erzeugt. Die cDNA diente als Amplifikationsvorlage für die sich anschließende PCR mit den spezifischen Primern (5'-gcccatatggcctgcggg-3' und 5'-gccctcgagtccaggacactc-3'). Der erzeugte DNA-Abschnitt wurde anschließend in die *NdeI-XhoI*-Schnittstelle im zweiten multiplen Klonierungsbereich (MCS2) des pACYCduet-Vektors mit Stopcodon kloniert. Der Vektor wurde pSS110 genannt.

3.2.4 Heterologe Expression und Reinigung der Maus Aldehyd-Oxidase

Für Aldehyd-Oxidasen in Säugetieren wurden bereits zahlreiche heterologe Expressionssysteme beschrieben. Der Nachteil dieser Art der Expression lag in der niedrigen katalytischen Aktivität der gereinigten Enzyme, da der Molybdänkofaktor ohne den terminalen Schwefel vorrangig in der dioxo-Moco Form vorlag (Huang *et al.*, 1999, Adachi *et al.*, 2007). Um dieses Problem zu lösen, sollte ein Expressionssystem etabliert werden, welches die gleichzeitige Expression der Proteine AOX1 und MCSF im *E. coli* Stamm TP1000 ermöglicht und den Einbau des modifizierten Molybdänkofaktors mit dem terminalen Schwefel (Leimkühler *et al.*, 2003) garantiert.

Rekombinante mAOX1 wurde zunächst aus 12 L *E. coli* Kultur und stufenweise beginnend mit Ni-NTA Chromatographie, Anionenaustauscherchromatographie sowie abschließend mittels Gelfiltration gereinigt. Nach der Zentrifugation der 12 L *E. coli* Kultur wurde das resuspendierte Pellet zum Zellaufschluss in drei Passagen in eine French Press Zelle gegeben. Der Überstand wurde mit 3,5 mL Ni-NTA-Agarose inkubiert und nach mehrmaligem Waschen unterschiedlicher Imidazolkonzentrationen konnte das His₆-getaggte mAOX1 Fusionsprotein mit einem 250 mM Imidazolpuffer eluiert werden. Die Fraktionen wurden mit einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert und anschließend für die Anionenaustauscherchromatographie gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 dialysiert. Mit der Q-Sepharose konnten durch einen Salzgradienten Proteine mit unterschiedlichem pI-Wert getrennt werden (Abb. 3.11).

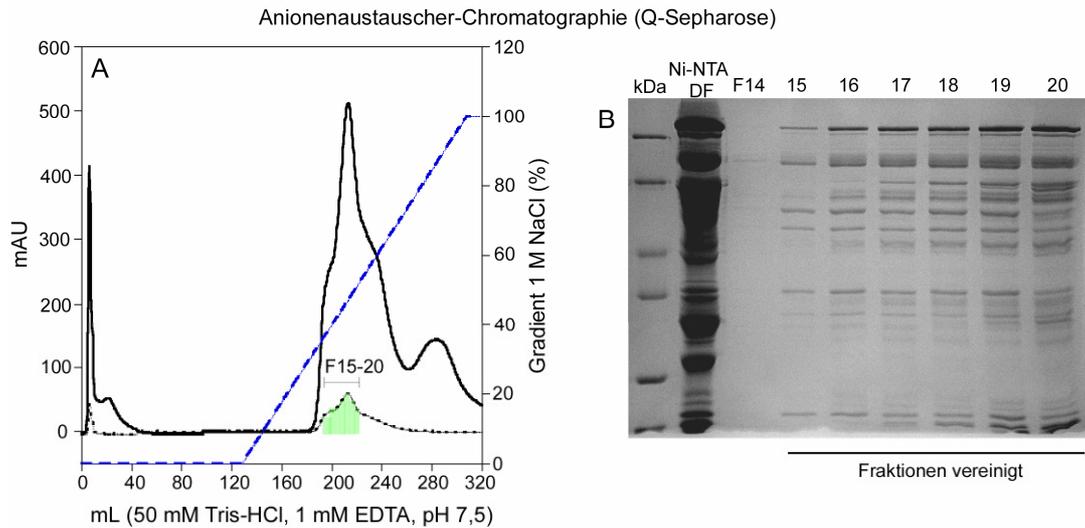


Abb. 3. 11 Elutionsprofil der Anionenaustauscherchromatographie der rekombinanten mAOX1: Die Q-Sepharose stellt die zweite Reinigungsstufe der rekombinanten mAOX1 dar (A). Die nach der Ni-NTA dialysierte und ankonzentrierte Elutionsfraktion wird auf die vorequilibrierte Anionenaustauschersäule gegeben. Mittels eines 0-1 M NaCl-Gradienten werden bei einer Flussrate von 3 mL/min Fraktionen zu je 3 mL gesammelt und mittels SDS-PAGE (B) analysiert. Um einen ersten Reinigungseffekt zu beobachten, wurde ebenfalls eine Probe nach der Ni-NTA Elution (Ni-NTA DF) mit aufgetragen. Die Fraktionen F15-20 wurden vereint, dialysiert und auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die durchgezogene schwarze Linie in Bild A zeigt das Elutionsprofil bei 280 nm und die gestrichelte bei 450 nm. Die blaue Linie repräsentiert den Salzgradienten.

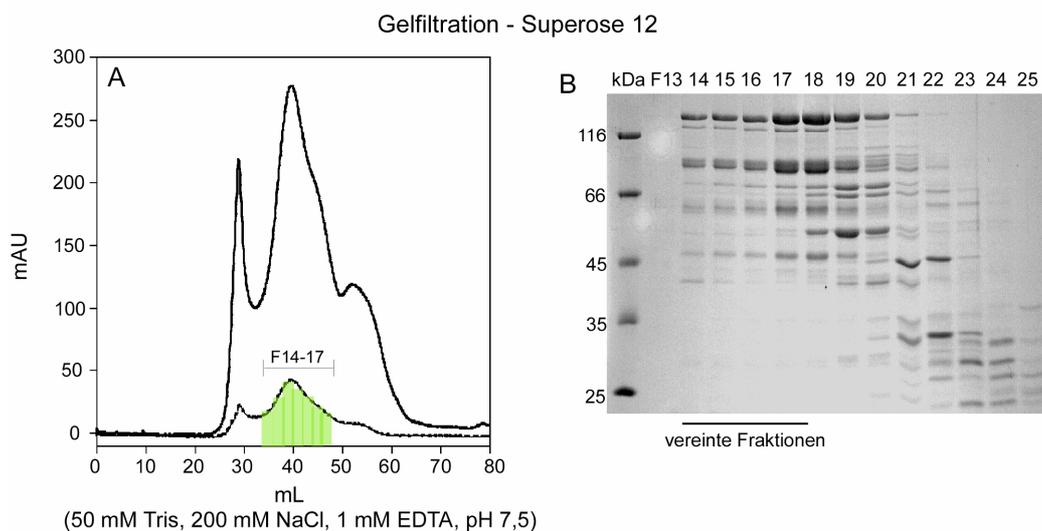


Abb. 3. 12 Elutionsprofil der rekombinanten mAOX1 nach Gelfiltration

Eine Gelfiltration mit der Superose 12 (A) stellt bei der Reinigung der rekombinanten mAOX1 die dritte Reinigungsstufe dar. Mit einer Flußrate von 1 mL/min wurden Fraktionen je 3 mL gesammelt und mit Hilfe einer 12 %-igen SDS-PAGE (B) analysiert. Die Fraktionen F14-17 wurden vereint, dialysiert und für den letzten Reinigungsschritt auf die Benzamidin-Sepharose 6B gegeben. Die schwarze durchgezogene Linie zeigt das Elutionsprofil bei 280 nm und die gestrichelte bei 450 nm.

Die Gelfiltration (Abb. 3.12) trennte Proteine unterschiedlicher Größe, kleinere Proteinfractionen (in F21-25 zu sehen) eluierten später von der Säule und konnten somit von der mAOX1 getrennt werden.

Da die Q-Sepharose keinen wesentlichen Reinigungseffekt erbrachte, wurde auf diese Methode später verzichtet und unmittelbar nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie eine Gelfiltration verwendet. Der letzte Reinigungsschritt stellte die Trennung der inaktiven von der aktiven mAOX1 durch Inkubation mit Benzamidin-Sepharose 6B dar. Alle Reinigungsschritte sind zusammen in Abb. 3.13 auf einem 12 %-igem SDS-PAGE Gel aufgetragen. Das SDS-PAGE Gel zeigt unter reduzierenden Bedingungen für das gereinigte Protein eine Hauptbande mit einer Größe von 150 kDa.

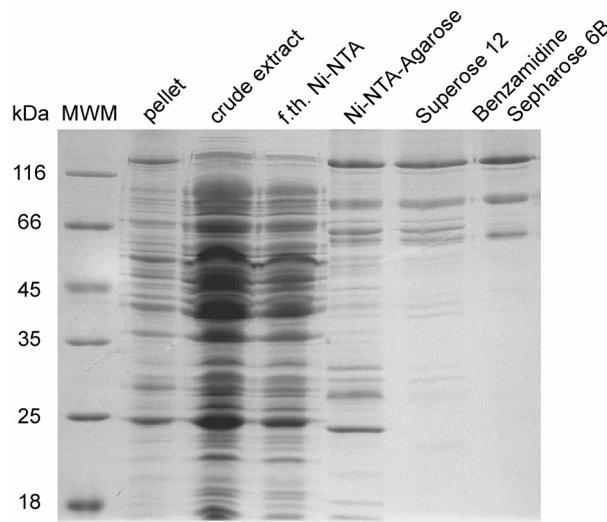


Abb. 3. 13 12%-iges SDS-Polyacrylamidgel der Reinigungsschritte der mAOX1 nach heterologer Expression in *E. coli*: 12 % SDS-PAGE Analyse der verschiedenen Reinigungsstufen der mAOX1. Das Protein wurde mittels Ni-NTA, Supersoe 12 und abschließend mit Benzamidin-Sepharose 6B affinitätschromatografisch gereinigt. Im SDS-PAGE zeigt die mAOX1 eine Hauptbande bei 150 kDa auf, drei weitere Banden von der Größe 120 kDa, 80 kDa und 60 kDa korrespondieren zu Abbauprodukten der mAOX1. (crude extract = Rohextrakt nach der Zentrifugation nach dem Zellaufschluss; f.th. = Durchfluss bei Ni-NTA; in den letzten drei Spuren wurden jeweils 5 µg Protein aufgetragen).

Unter diesen experimentellen Bedingungen sind drei zusätzliche Proteinbanden zu erkennen, die Größen von 120 kDa, 80 kDa und 60 kDa aufweisen. Ein Peptidantikörper, dessen Erkennungssequenz am C-Terminus des Proteins liegt (Thr 1241 bis Tyr 1258), erkennt jedes dieser Degradationsprodukte (Abb. 3.14). Daraus kann man schließen, dass der Proteinabbau N-terminal stattfindet. Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie Analysen zeigten mittels tryptischen Verdau, dass die Banden mit einer Größe von 120kDa, 80 kDa sowie 50 kDa Degradationsprodukte der mAOX1 sind, die allerdings nicht

den postulierten proteolytischen Spaltungsprodukten von 20 kDa, 40 kDa und 85 kDa entsprechen, welche charakteristisch für Säugetier MFEs sind (Garattini, 2003, Waud, 1975). Die Ergebnisse der Massenspektrometrie (im Detail hier nicht gezeigt) für alle drei zusätzlichen Degradationsprodukte weisen für alle mittels tryptischen Verdaus erhaltenen Peptidbruchstücke eine eindeutige Übereinstimmung mit Teilen der mAOX1-Gensequenz auf. Mit Hilfe des *Matrix Science-Mascot-Search*-Programms konnten für die 120 kDa sowie für die 80 kDa Bande ein N-terminaler Abbau und für die 60 kDa Bande ein C-terminaler Abbau identifiziert werden.

Der Erfolg der Reinigungsschritte ist in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Um Aussagen über Ausbeute und Reinigungseffekt treffen zu können, wurde für die Bestimmung der AO-Oxidase-Aktivität das Substrat Benzaldehyd in einer Konzentration von 500 μ M verwendet. Für eine mAOX1-Expression in 12 L *E. coli* Kultur konnte der Reinigungseffekt des Proteins während der drei Reinigungsstufen um das 23-fache gesteigert werden. Die Ausbeute betrug 0,17 %. Durch Inkubation des Superose-Eluates mit Benzamidin-Sepharose 6B konnte die spezifische Aktivität zusätzlich um das Fünffache, auf 2,3 U/mg, gesteigert werden.

Tabelle 3.3 Reinigungstabelle der mAOX1 exprimiert in *E. coli* TP1000 Zellen

Gemessen wurde die Aktivität mit dem Substrat Benzaldehyd (500 μ M)

Reinigungs-schritt	Volumen	Protein ^a	Gesamt-aktivität ^b	Spezifische Aktivität ^c	Ausbeute	Reinigungseffekt
	<i>ml</i>	<i>mg</i>	<i>U</i>	<i>U/mg</i>	<i>%</i>	<i>Steigerung</i>
Cytosol	150	1611	134	0.1	100	1
Ni-NTA Eluat	14	6.6	0.76	0.12	0.57	1.2
Superose	15	0.84	0.35	0.42	0.27	4.2
Benz. Seph.	20	0.1	0.23	2.3	0.17	23

^a Die Proteinkonzentrationen wurden mit Bradfordreagenz bestimmt.

^b Die Aktivität wurde über die Abnahme des Elektronenakzeptors DCPIP (100 μ M) bei 600 nm unter Verwendung von 500 μ M Benzaldehyd als Substrat gemessen.

^c Die spezifische Enzymaktivität (Units/mg) ist definiert als die Oxidation von 1 μ M Benzaldehyd pro min und mg Enzym unter den angegebenden Bedingungen.

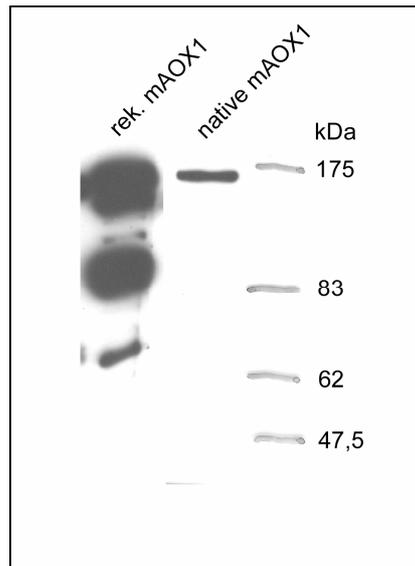


Abb. 3.14 Immunoblot Analyse mit dem anti-mAOX1 Antikörper des nativ gereinigten sowie der rekombinant exprimierten mAOX1: Die gereinigten Proteinfraktionen (1,25 µg rekombinante und 0,8 µg native mAOX1) wurden auf ein 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Peptid-anti-mAOX1 Antikörper sowie einem sekundären α -Kaninchen-Antikörper inkubiert. Die Detektion mit Chemilumineszenz-Reagenzien auf Röntgenfilm. Das native mAOX1 Protein zeigt eine Bande von 150 kDa, im Gegensatz dazu sind für das rekombinant exprimierte mAOX1 Protein drei zusätzliche Banden zu erkennen, bei 120 kDa, 80 kDa und bei 65 kDa.

3.2.5 Untersuchung der Substratspezifität der rekombinanten mAOX1

Für eine qualitative Einschätzung der Substratumsetzung der rekombinanten mAOX1 wurde wie bereits für die native mAOX1 eine Dünnschichtchromatographie nach Holmes (1978) durchgeführt. Hierfür genügt eine geringe Probenmengenauftragung des gereinigten Proteins. In Abb. 3.15 sind vier dieser Dünnschichtchromatogramme nach der Substratumsetzung und Farbentwicklung dargestellt. Als Substrate wurden ebenfalls 2-OH-Pyrimidin, Phthalazin und Retinaldehyd mit einer Konzentration von 1 mM verwendet, sowie Benzaldehyd mit einer Konzentration von 25 mM. Bis auf Retinaldehyd konnte eine Substratumsetzung zur Reduktion von MTT für die rekombinante mAOX1 nachgewiesen werden. Für die Untersuchung dieses sehr lichtsensitiven Substrates wurde später die Methode an der HPLC nach Vila *et al.* verwendet. Für Benzaldehyd mit einem 25-fachen Substratüberschuss im Vergleich zu den anderen Substratkonzentrationen konnte nur für 1 µg Protein die Reduktion von MTT nachgewiesen werden. Eventuell zeigt Benzaldehyd bei dieser Konzentration bereits Substratinhibierung.

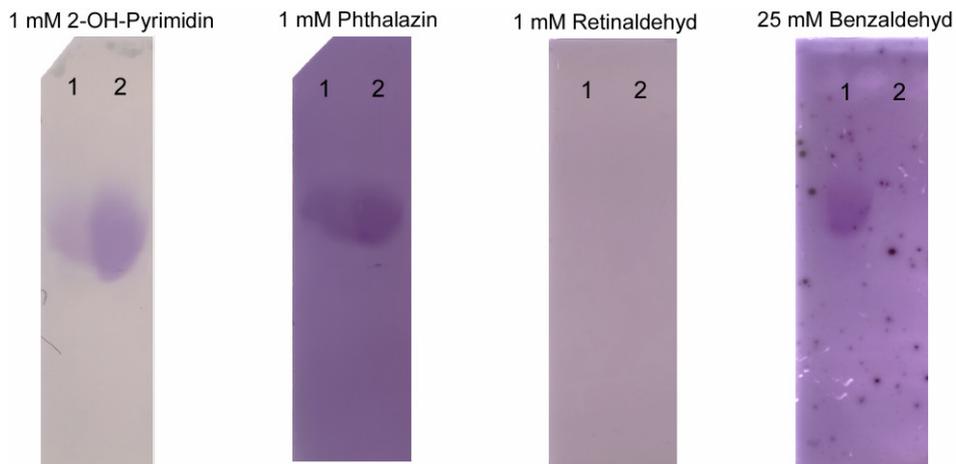


Abb. 3.15 Dünnschichtchromatografie mit anschließender Agarose-Überschichtung auf Titan III Zellulose-Acetat-Membran

Die zu untersuchenden Proteine wurden in je zwei Konzentrationen mit gleichem Volumen von 10 μ L auf die Membran aufgetragen, die Trennung der Proteine wurde mit Tris-Glycin Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,5) bei einer angelegten Spannung von 200 V für 30 min gestartet. Eine anschließende Färbung mit 0,9 mM Methyl-Thiazolyl-Blau (MTT), 0,3 mM Phenazine-Methosulfat (PMS) und entsprechender mAOX1-Substratkonzentration im 2 %-igen Agaroseoverlay wurde benutzt, um die AO-Oxidase-Aktivität zu prüfen.

Spur 1 und 2 entsprechen 1 bzw. 2 μ g rekombinanter mAOX1

3.2.6 Charakterisierung der mAOX1 mittels UV-VIS Absorptionsspektroskopie

Das UV-VIS Absorptionsspektrum der rekombinanten mAOX1 in Abb. 3.16A (durchgezogene Linie) zeigt große Gemeinsamkeiten zu anderen Säugetier-XORs und lässt die Eisen-Schwefelzentren und das FAD als prosthetische Gruppen bei 550 nm bzw. 450 nm (Garattini, 2003) erkennen. Um den Anteil des terminalen Schwefelliganden am Moco, der für die Enzymaktivität essentiell ist, zu bestimmen, wurden neben dem Spektrum der oxidierten mAOX1 Absorptionsspektren der mit Benzaldehyd und Natriumdithionit reduzierten mAOX1 unter anaeroben Bedingungen aufgenommen. Von diesen Reduktionsspektren wurde der Anteil an aktiver mAOX1 von 20 % ermittelt. Die Sättigung mit Molybdänkofaktor (70 %) wurde nach dessen Umwandlung zu Form A quantifiziert und steht in Verbindung zum Molybdängehalt der gereinigten mAOX1. Dies weist darauf hin, dass keine demolybdo-mAOX1 in der gereinigten Fraktion vorlag.

Bevor die Mocosulfurase aus der Maus vollständig kloniert war, erfolgte die Koexpression mit dem Chaperon XdhC aus *Rhodobacter capsulatus*. XdhC bindet den dioxo-Moco, sulfuriert mit Hilfe der L-Cystein-Desulfurase NifS4 den Moco und inseriert ihn anschließend in die *R. capsulatus* XDH. In Abb. 3.16B ist das Spektrum der oxidierten mAOX1 koexprimiert mit XdhC dargestellt, deren Reduktion mit 10 mM Benzaldehyd sowie die vollständige Reduktion mit einem Überschuss an Natriumdithionit (20 mM). Der Anteil des terminalen

Schwefelliganden beträgt hier nur 12 %, was auf eine niedrigere Proteinaktivität im Vergleich zur mAOX1 hinweist, die mit der mMCSF koexprimiert wurde. Eine deutliche Aktivitätssteigerung konnte ebenfalls durch kinetische Messungen am Photometer unter Verwendung verschiedener Aldehyde belegt werden.

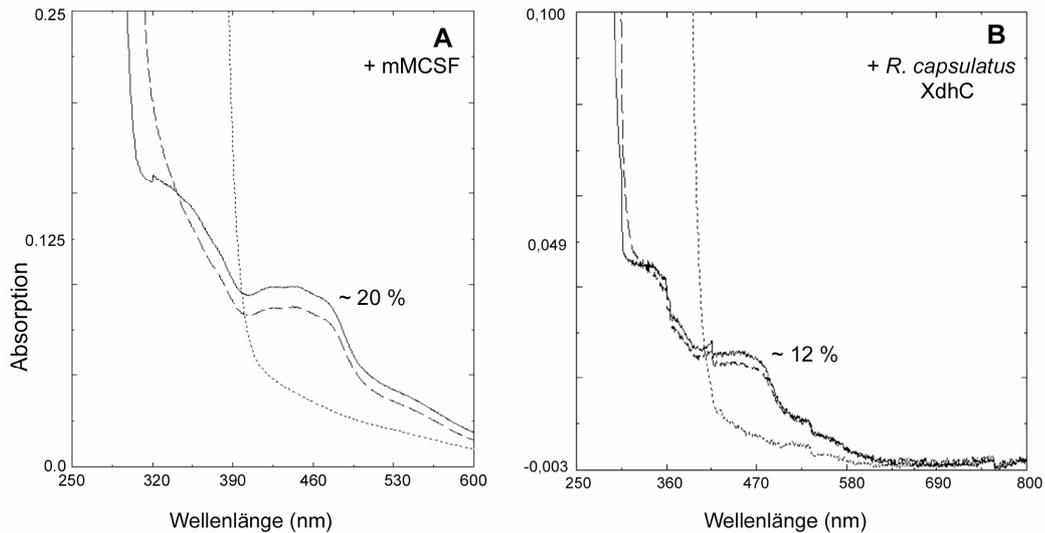


Abb. 3.16 Charakterisierung der rekombinanten Wildtyp mAOX1 mittels UV-VIS Absorptionsspektrometrie: Gegenübergestellt ist die Reduktion mit Benzaldehyd der mAOX1 coexprimiert mit mMCSF (A) bzw. mit *R. capsulatus* XdhC. Spektren wurden von 3 μ M (A) bzw. 0,9 μ M (B) oxidiertes mAOX1 (durchgezogene Linie), von 3 μ M bzw. 0,9 μ M mAOX1 inkubiert mit 10 mM Benzaldehyd (gestrichelte Linie) und 3 μ M bzw. 0,9 μ M mAOX1 reduziert mit 20 mM Natriumdithionit (gepunktete Linie) aufgenommen. Spektren wurden in 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 unter anaeroben Bedingungen aufgenommen.

3.2.7 Klonierung der hAOX1 und der hMCSF sowie die heterologe Expression und Reinigung der hAOX1

Das *E. coli* Expressionssystem der mAOX1 sollte auf die hAOX1 übertragen werden. Um die katalytische Aktivität des Enzyms zu gewährleisten, sollte die humane Mocosulfurase (Nishino *et al.*) kloniert und mit der hAOX1 coexprimiert werden.

Das humane Aldehyd-Oxidasegen wurde aus einer Vielzahl überlappender lambda Phagenklone sowie verschiedener PCR-DNA-Fragmente von Garattini *et al.* im pBluescript Vektor bereitgestellt. Dieser Genabschnitt wurde in dieser Arbeit in die *Nde*I-*Sal*I-Schnittstelle des pTrcHis-Vektors kloniert und mit pSS130 bezeichnet.

Die humane Mocosulfurase konnte erfolgreich aus dem pUC118 (Nishino *et al.*) in die *Nde*I-*Aat*II-Schnittstelle des pACYCduet-Vektors mit Stopcodon kloniert werden und wurde als pSS120 bezeichnet. Ein ClustalW Sequenzvergleich der Mocosulfurasen aus Maus und Mensch ergab eine Aminosäurehomologie von 76 %.

Rekombinante hAOX1 wurde aus 12 L *E. coli* Kultur (nach 24 stündigem Wachstum bei 30°C, 130 rpm, 150 µg/mL Ampicilin, 50 µg/mL Chloramphenicol, 1 mM NaMoO₄, 20 µg IPTG) und stufenweise beginnend mit Ni-NTA Chromatographie, Gelfiltration und abschließend mittels Ni-NTA-Superflow gereinigt.

Das SDS-PAGE Gel in Abb. 3.17 zeigt unter reduzierenden Bedingungen die Reinigung mittels Ni-NTA Matrix. Eine Hauptbande mit einer Größe von 150 kDa entspricht dem Monomer der hAOX1. Die erkennbaren Proteinbanden geringerer Größe sind *E. coli* Proteine, die in den folgenden Reinigungsschritten entfernt werden konnten.

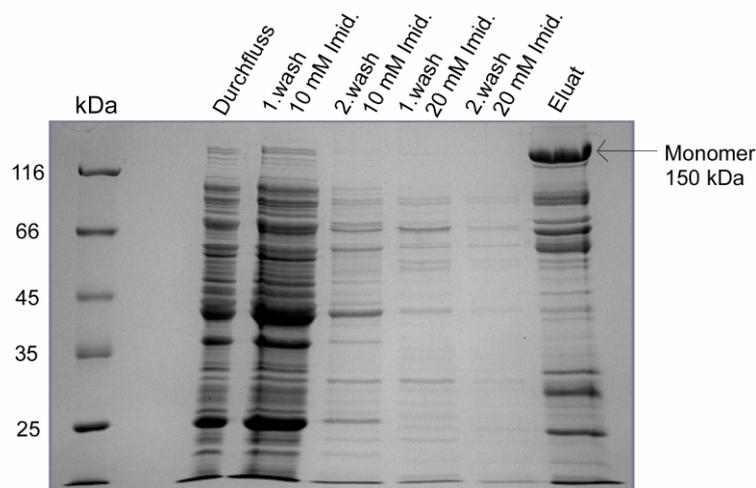


Abb. 3.17 Ni-NTA Reinigung der hAOX1 nach heterologer Expression in *E. coli*: 12 % SDS-PAGE Analyse der verschiedenen Waschschrte bei einer Ni-NTA Reinigung der hAOX1. Eluiert wurde mit 250 mM Imidazol, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM, pH 8,0. Die letzte Spur zeigt das Monomer der hAOX1 (150 kDa) und weitere *E. coli* Proteine, die in folgenden Reinigungsschritten entfernt werden konnten.

In Abb. 3.18A ist das Elutionsprofil nach Gelfiltration mit einer Superose 12 gezeigt. Die Elutionsfraktion aus dem ersten Ni-NTA affinitätschromatografischen Reinigungsschritt wurde auf die Superose 12 Säule geladen und mit einer Flussrate von 1 mL/min eluiert. Die 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgele sind in Abb. 3.18B gezeigt. Mit dieser Methode konnten unspezifische Proteine, mit einer Größe von 10 – 35 kDa (Fraktionen 20 – 25) abgetrennt werden.

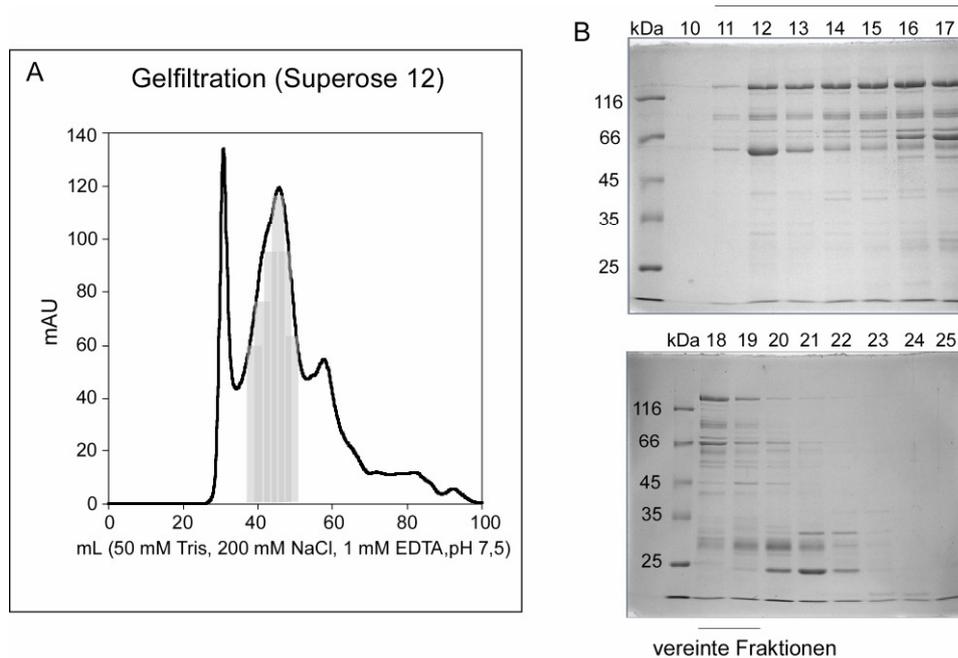


Abb. 3. 18 Elutionsprofil nach Gelfiltration der hAOX1

Im Bild A ist das Elutionsprofil der Superose 12 an einem Äkta-Basic-System gezeigt. Die Säule wurde mit 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 vorequibriert, die auf 1,2 mL ankonzentrierte hAOX1 Probe aufgetragen und mit einer Flußrate von 1 mL/min in 3 mL Fraktionen eluiert. Die dazugehörige 12 %-ige SDS-PAGE-Analyse ist in Bild B gezeigt. Jeweils 15 µL jeder Fraktion wurde aufgetragen, die Fraktionen 11 – 19 (grau unterlegt) wurden vereint und gegen 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0 über Nacht dialysiert.

Der letzte Schritt in der Reinigung der hAOX1 stellte die Verwendung einer Ni-NTA-Superflow Säule an einem Äkta-Basic-System dar. Die eluierten Fraktionen der Gelfiltration wurden auf die 1 mL vorgepackte Ni-NTA Matrix geladen und mit einem kontinuierlichen Imidazolgradienten von 10 – 250 mM Imidazol und einer Flussrate von 0,5 mL/min eluiert. (Abb. 3.19A). Auf einem 12 %-igem SDS-PAGE Gel wurde jede zweite Fraktion (0,6 mL) aufgetragen, die Fraktionen 32 – 48 wurden vereint und über Nacht gegen 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 dialysiert und ankonzentriert.

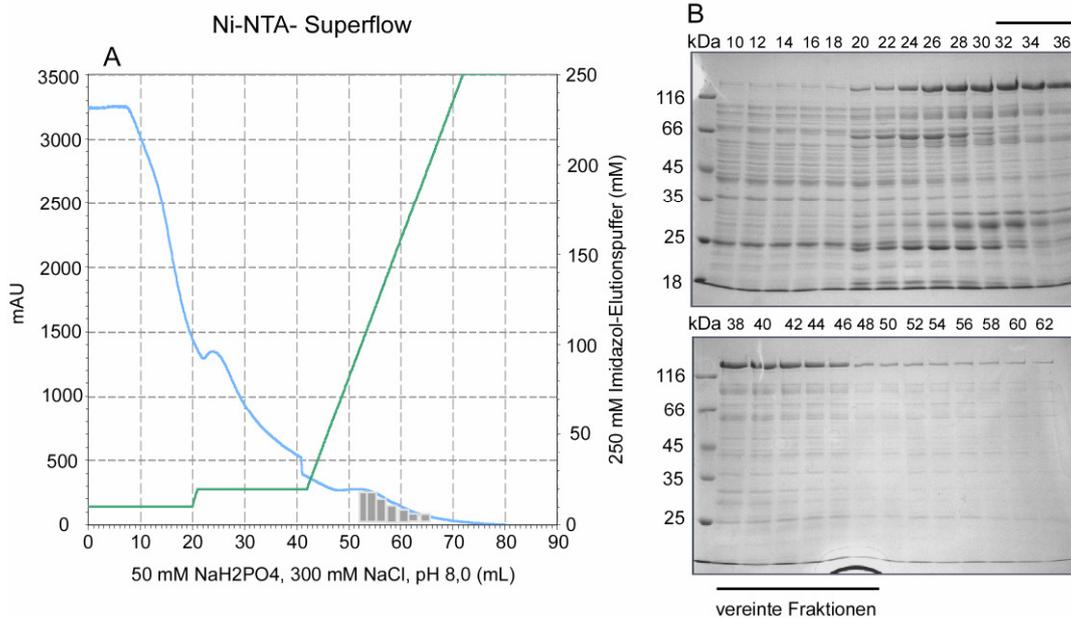


Abb. 3.19 Elutionsprofil nach Ni-NTA-Superflow-Matrix der hAOX1

Im Bild A ist das Elutionsprofil der Ni-NTA-Superflow gezeigt, die vorgepackte Ni-NTA Säule (1 mL) wird mit 10 mM Imidazolpuffer vorequibriert, die Proteinprobe geladen, mit je 20 mL 10 mM bzw. 20 mM Imidazolpuffer gewaschen und anschließend mit einem Imidazolgradienten (20 – 250 mM) eluiert. Grau sind die vereinigten hAOX1 Fraktionen gekennzeichnet, welche anschließend gegen 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 über Nacht dialysiert und anschließend ankonzentriert wurden.

Das UV-VIS Absorptionsspektrum der rekombinanten hAOX1 in Abb. 3.20B zeigt wie schon das der mAOX1 große Gemeinsamkeiten zu anderen Säugetier-XORs und lässt die Eisen-Schwefelzentren und das FAD als prosthetische Gruppen bei 550 nm bzw. 450 nm (Garattini, 2003) erkennen. Das Absorptionsverhältnis A_{450}/A_{550} von 3,0 verdeutlicht einen FAD:Fe/S Gehalt je Untereinheit im Verhältnis 1:4. Unter reduzierenden Bedingungen zeigt das SDS Polyacrylamid Gel für das gereinigte Protein ein Hauptbande von 150 kDa (Abb. 3.20A). Im Gegensatz zur mAOX1 sind unter diesen gewählten Bedingungen die zusätzlichen Degradationsbanden in geringerer Intensität als die Monomerbande vorhanden. Der Anteil des terminalen Schwefelliganden am Moco konnte für die hAOX1 aufgrund von sehr geringer katalytischer Aktivität gegenüber verschieden getesteter Aldehyde im Reduktionsspektrum nicht bestimmt werden. Die sehr niedrige katalytische Aktivität kann einerseits aufgrund der hohen Aggregation der hAOX1 in Lösung liegen (siehe Abb. 3.21D), am fehlenden Schwefelliganden oder mit dem Austausch von vier Aminosäuren in der Gensequenz erklärt werden. Der erste Austausch an Position 224 (Ile/Thr) liegt in der weniger stark konservierten Verbindungsregion zwischen den FeS-Zentren und dem FAD. Der zweite Austausch an Position 410 (Ile/Phe) liegt am Ende der FAD Bindedomäne. Die beiden letzten Aminosäureaustausche an den Positionen 796 (Val/Ile) und 802 (Arg/Cys) befinden sich am Beginn der Moco- und Substratbindungsdomäne.

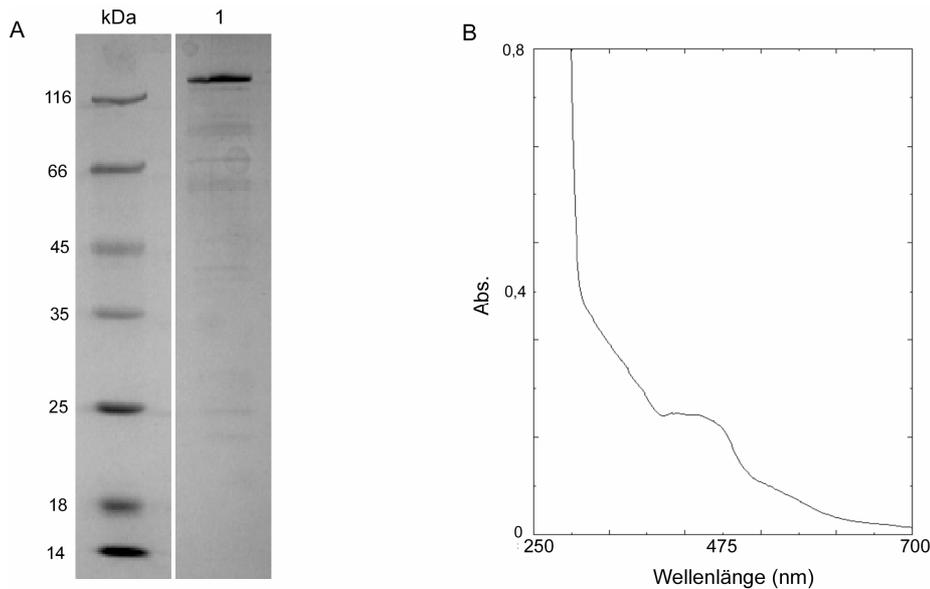


Abb. 3. 20 Gereinigte hAOX1 nach heterologer Expression in *E. coli* (A) und die Charakterisierung durch UV-VIS Absorptionsspektroskopie (B)

A: 12 % SDS-PAGE Analyse der gereinigten hAOX1 in Spur 1. Das Protein wurde mittels Ni-NTA, Superose 12 und Ni-NTA-Superflow gereinigt. Die hAOX1 weist als Monomer eine molekulare Masse von 150 kDa auf. Aufgetragen wurde 3 μ g Protein.
 B: Das UV-VIS Spektrum wurde mit 6 μ M Protein aufgenommen.

3.2.8 Charakterisierung der Oligomerisationszustände der mAOX1 und hAOX1 mit Größen-Ausschluss-Chromatografie

Die Bestimmung der Oligomerisationszustände beider Aldehyd-Oxidasen erfolgte mittels Größenausschlusschromatografie mit einer Superdex 200 Säule. Für einen direkten Vergleich diente die bereits charakterisierte und kristallisierte (Truglio *et al.*) XDH (Abb. 3.21B) aus *R. capsulatus*. Dieses Enzym ist ein Heterodimer mit einer molekularen Masse von 275 kDa. Für beide Aldehyd-Oxidasen (Abb. 3.21C+D) ist ein Elutionspeak nach ca. 10,5 mL zu erkennen, der einer molekularen Masse von ungefähr 300 kDa entspricht und damit bestätigt, dass die Proteine in Lösung als Homodimer vorliegen. Unter den gegebenen Bedingungen beträgt der Anteil des Homodimers in Lösung für die hAOX1 (Abb. 3.21D) jedoch nur 20 %, da der überwiegende Teil als Aggregat bzw. Multimer vorliegt. Diese Aggregation kann ebenfalls ein Hinweis auf die geringe katalytische Aktivität sein.

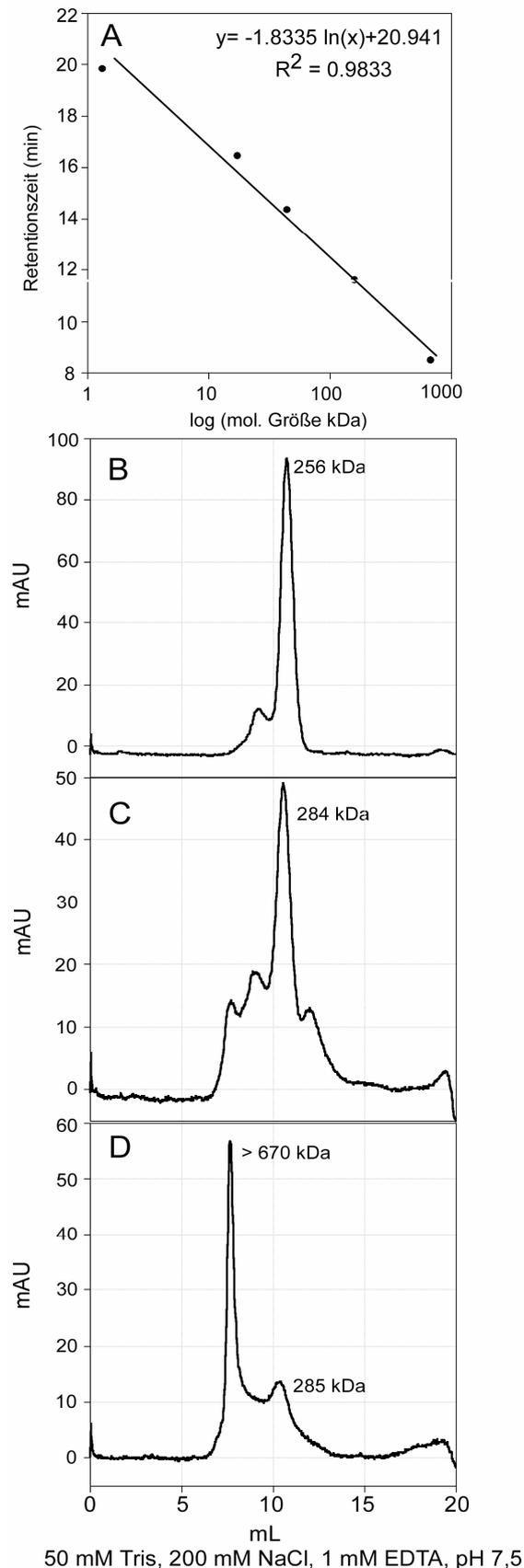


Abb. 3. 21 Größenausschluss-Chromatografie von gereinigtem XDH-Wildtyp, mAOX1 und hAOX1 im Vergleich zu einem BioRAD Protein-Standard

Die Gelfiltration wurde mit einer Superdex 200 unter Verwendung von 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 durchgeführt.

A: Der Proteinstandard von BIORAD enthält fünf Standardproteine: 670 kDa – Thyroglobulin (Rind), 158 kDa – γ Globulin (Rind), 44 kDa – Ovalbumin (Huhn), 17 kDa – Myoglobin (Pferd), 1,3 kDa – Vitamin B₁₂. Die molekularen Massen sind logarithmisch gegen die Retentionszeit aufgetragen. Mit Hilfe der angegebenen Formel können die molekularen Massen der untersuchten Proteinproben anhand der gegebenen Elutionszeiten berechnet werden.

B: 12 μ M gereinigter XDH-Wildtyp

C: 7 μ M gereinigte mAOX1

D: 10 μ M gereinigte hAOX1

3.2.9 Vergleich der FeS-Zentren der mAOX1 und hAOX1 durch CD-Spektroskopie

Die Aufnahme von Circular Dichroismus (CD) Spektren im sichtbaren Nanometer-Bereich sollte weitere Informationen über die FeS-Zentren liefern. Dazu wurde je ein Spektrum im oxidierten und reduzierten Zustand aufgenommen. Die Spektren der mAOX1 und der hAOX1 (Abb. 3.22) in der oxidierten Form zeigen in zwei Bereichen starke negative dichromatische Banden, zwischen 350-400 nm und 520-580 nm sowie stark positive Banden zwischen 400-500 nm. Im Bereich der negativen und positiven Maxima können an folgenden Punkten Übergänge für mAOX1 ausgemacht werden: 378 (-), 434 (+), 474 (+) und 556 (-). Wird das Enzym mit Natriumdithionit reduziert, verändert sich das Spektrum mit weniger stark ausgeprägten Übergangsbereichen bei 370 (-), 408 (+), 478 (-). In der oxidierten Form können für die hAOX1 folgende Übergänge ausgemacht werden: 383 (-), 435 (+), 475 (+) und 553 (-). Die Reduktion des Enzyms mit Natriumdithionit veränderte das Spektrum ebenfalls mit weniger stark ausgeprägten Übergangsbereichen bei 365 (-), 399 (+) und 474 (-). Die CD-Spektren der oxidierten und der reduzierten mAOX1 und hAOX1, welche große Ähnlichkeiten in Form und Intensität zu *Comamonas acidovorans* XDH sowie zu humaner XOR und XOR vom Rind zeigen (Xiang *et al.*, 1996; Godber *et al.*, 2005), bestätigen den Einbau beider FeS-Cluster in die rekombinanten Enzyme. Zwei Peakmaxima können den FeS zugeordnet werden, bei 430 nm wird das FeSII detektiert und bei 470 nm das FeSI. Die Sättigung bzw. Bindung der FeS im Enzym konnte ebenfalls durch die Eisen-Elementanalyse am ICP für die mAOX1 bestätigt werden, welche einen Wert von 90 % Eisensättigung zeigte.

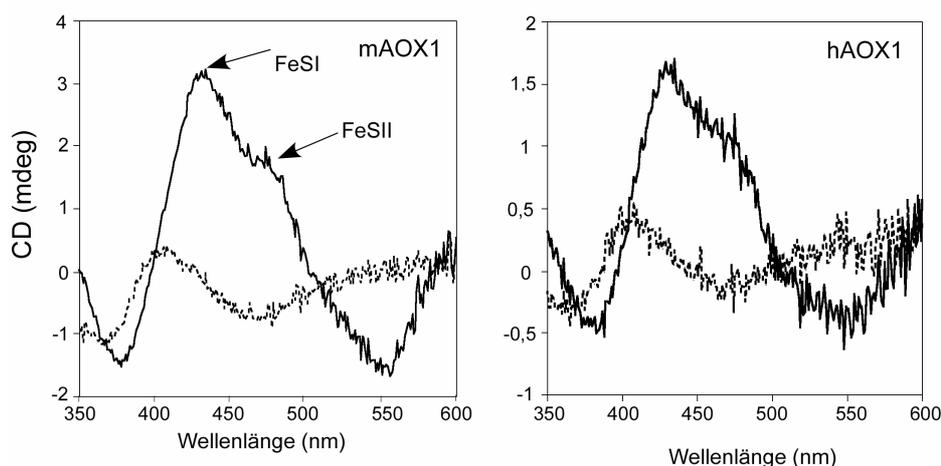


Abb. 3.22 Vergleich der FeS-Zentren durch CD-Spektroskopie

Die Spektren wurden in 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 bei 20 °C mit einem JASCO J715 CD-Spektrometer aufgenommen. Für eine ausreichende Signalintensität wurde eine Proteinkonzentration von 20 µM für mAOX1 und 18 µM für hAOX1 verwendet. Gegenübergestellt sind der oxidierte Zustand (durchgezogene Linie) und der mit Natriumdithionit (final 2,8 mM) erreichte reduzierte Zustand (gestrichelte Linie).

3.2.10 Vergleich von zwei mAOX1 - Varianten

Die vollständige Sequenzierung der Gensequenz der mAOX1 im Vektor pSL205 zeigte eine Abweichung zu der veröffentlichten Aminosäuresequenz NP_033806. Wie in Abb. 3.23 zu erkennen ist, betrifft es die beiden Aminosäuren His1226 und Arg1230.

bXO :	HTRGPST	- 1226
mAOX1* :	YSRGPNQ	- 1230
mAOX1 :	YSHGPNR	- 1230

Abb. 3.23 Sequenzvergleich der XO aus dem Rind und der AOX1 aus der Maus: mAOX1* entspricht der veröffentlichten Sequenz NP_033806, die Sequenz mAOX1 mit den Austausch R1226H und Q1230R scheint ein PCR Artefakt zu sein. Dieses Plasmid pSL205 wurde für die erzeugten Varianten (V806E, M884R, V806E/M884R, E1265Q) verwendet.

In der veröffentlichten Sequenz ist das Histidin an Position 1226 gegen ein Arginin und das Arginin an Position 1230 gegen ein Glutamin ausgetauscht (Abb. 3.23: mAOX1*). Da bisher die Kristallstruktur der mAOX1 nicht gelöst werden konnte, wurde für die Lagebestimmung dieser beiden Aminosäuren im Protein die bereits von Enroth *et al.* publizierte Kristallstruktur der bXO heran gezogen. Die in der bXO betroffenen analogen Aminosäuren sind ebenfalls aus Abb. 3.23 zu entnehmen. Die genaue Position dieser beiden Aminosäuren (R1222 und T1226) konnte mit Hilfe des *PyMOL-Programms* lokalisiert werden und ist in der Monomerstruktur der bXO in Abb. 3.24 als rotes Skelettmodell mit den Positionen 1 und 2 hervorgehoben. Wie in dieser Darstellung zu erkennen, liegen beide Aminosäuren offensichtlich nicht im Elektronenfluss der gebundenen Kofaktoren und könnten ihn daher auch nicht unterbrechen.

Weiterhin sollte geklärt werden, ob und wie sich diese beiden Aminosäuren auf die Substrataktivität auswirken. Dazu wurden die Aminosäureaustausche H1226R und R1230Q in die bisher verwendete mAOX1 eingeführt und der mAOX1 Wildtyp generiert, der in der Gendatenbank von Pubmed unter der Nummer NP_033806 veröffentlicht ist. Es wurde die Variante mAOX1 H1226R/R1230Q mittels Fusions-PCR hergestellt (Vektorbezeichnung: pSS100), in *E. coli* exprimiert und anschließend analog der bereits beschriebenen Reinigungsmethoden gereinigt.

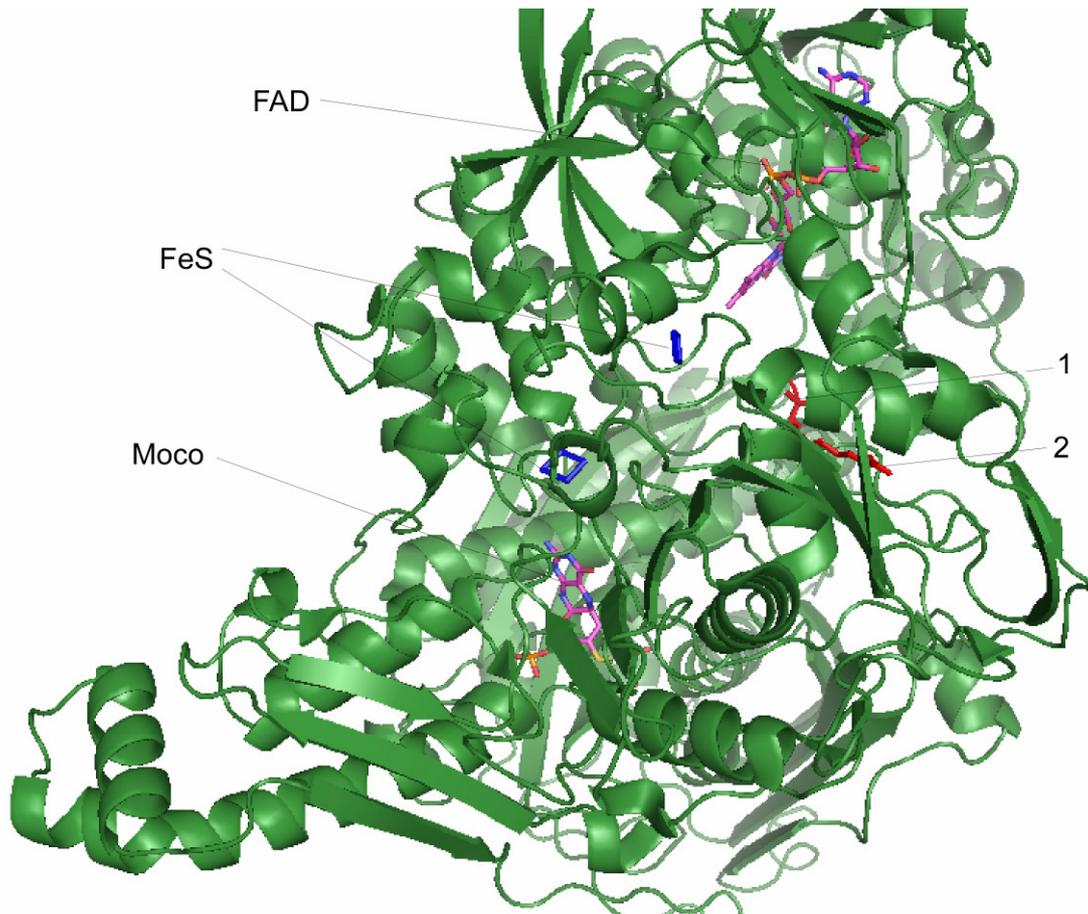


Abb. 3. 24 Ausschnitt des bXO Monomers mit eingezeichneten Kofaktoren: FAD, FeS-Zentren und Moco. In rot sind die Positionen der beiden analogen Aminosäuren R1222 (2) und T1226 (1) markiert, die den Aminosäuren R1226 und T1230 in der mAOX1 entsprechen.

3.2.11 Steady-state Kinetiken der mAOX1-Wildtyp Variante H1226R/R1230Q (mAOX1*)

Um die Auswirkungen der beiden Aminosäureaustausche His1226 und Arg1230 auf die Enzymaktivität näher zu charakterisieren, wurden alle Aldehyd- und Purinsubstrate mit der neu generierten mAOX1*-Variante (pSS100) getestet und mit der bereits vorhandenen mAOX1 (pSL205) verglichen. Dabei wurden alle Reaktionsbedingungen konstant gelassen. Für beide Varianten wurden ebenfalls der Molybdän- sowie der Eisengehalt mittels Elementanalyse (ICP-OES) bestimmt. Für mAOX1* (pSS100) ergab sich eine Mo- und Fe-Sättigung von 70 % bzw. 90 %. Für mAOX1 (pSL205) wurden sehr ähnliche Werte gemessen, für Molybdän 68,5 % und für Eisen 96 %. Man kann daher davon ausgehen, dass der Moco und die FeS-Zentren in beiden Varianten zu gleichen Anteilen eingebaut sind.

In Tabelle 3.4 sind alle kinetischen Parameter zusammengefasst. Für alle getesteten Aldehyde sind gleiche oder sehr ähnliche Reaktionsgeschwindigkeiten ermittelt worden. Dies trifft ebenfalls auf die K_m -Werte zu. Phthalazin, als dicyklisches spiegelsymmetrisches Substrat ist von mAOX1* weniger gut oxidierbar, da es einen doppelt so großen K_m -Wert (21,3 μM) im Vergleich zu mAOX1 (11,4 μM) aufweist. Die beiden untersuchten Purine Xanthin und Hypoxanthin sind von beiden Varianten nicht metabolisierbar.

Zusätzlich wurden die kinetischen Parameter für die Aldehyde Benzaldehyd, Retinaldehyd sowie Acetaldehyd (vermessen von Vila *et al.*, 2004) für die nativ gereinigte mAOX1 aus Mausleber vergleichend dargestellt (Tabelle 3.4). Der Anteil des sulfurierten Moco betrug für die rekombinante mAOX1 20 % (ermittelt durch Reduktionsspektren mit Benzaldehyd und Natriumdithionit). Berücksichtigt man diesen Sulfurierungsanteil auf die Reaktionsgeschwindigkeit von Benzaldehyd, würde sich für ein vollständig aktives Enzym die gleiche Reaktionsgeschwindigkeit wie für das native Enzym ergeben ($k_{\text{cat}} = 1221 \pm 50 \text{ min}^{-1}$). Allerdings ist das native mAOX1 Protein 10 – 20 mal sensitiver gegenüber Benzaldehyd ($K_m = 4 \pm 1 \mu\text{M}$). Diese Werte sind nur dann korrekt, wenn davon auszugehen ist, dass das native Enzym vollständig sulfuriert vorlag. Dies ist aufgrund der sehr geringen Ausbeute jedoch nicht beschrieben. Für Retinaldehyd und Acetaldehyd sind sehr ähnliche K_m und k_{cat} -Werte für beide rekombinante Varianten erreicht worden. Acetaldehyd stellt allerdings mit einer geringen Substratspezifität von $K_m = 17,5 \text{ mM}$ bzw. $K_m = 13,1 \text{ mM}$ ein sehr schlecht metabolisiertes Substrat dar. Dies konnte ebenfalls für die native mAOX1 bestätigt werden. Für Retinaldehyd wurde für beide rekombinanten Varianten wie für das native mAOX1 ein ähnlicher K_m - und k_{cat} -Wert bestimmt.

Die Substrate Phthalazin, Hypoxanthin und Xanthin sind für die native mAOX1 bisher noch nicht beschrieben worden.

Da sich die beiden rekombinanten mAOX1-Varianten in der Substratspezifität sowie der Substratumsetzung nicht wesentlich unterscheiden, wurde für die Erzeugung der vier Varianten V806E, M884R, V806E/M884R sowie E1265Q die Gensequenz aus dem Vektor pSL205 verwendet.

Tabelle 3.4 Zusammenfassung der kinetischen Parameter der rekombinant exprimierten mAOX1-Varianten (pSL205 und pSS100) und der nativ aus Mausleber gereinigten mAOX1

Substrat	Kinetik	mAOX1 (pSL205)	mAOX1* (pSS100)	mAOX1 nativ ¹
Benzaldehyd	k_m	97,7 ± 21,5 µM	56,0 ± 8,6 µM	4 ± 1 µM
	K_{cat}	317,6 ± 28,5 min ⁻¹	252,2 ± 15,7 min ⁻¹	1221 ± 49,5 min ⁻¹
Retinaldehyd	k_m	54,8 ± 8,8 µM	54,5 ± 14,1 µM	31 ± 4 µM
	K_{cat}	44,3 ± 0,8 min ⁻¹	52,3 ± 11,6 min ⁻¹	27 ± 1,5 min ⁻¹
Acetaldehyd	k_m	17,5 ± 4,9 mM	13,1 ± 1,1 mM	0,81 ± 0,31 mM
	K_{cat}	519,9 ± 112,3 min ⁻¹	572,4 ± 12,9 min ⁻¹	58,5 ± 7,5 min ⁻¹
Phthalazin	k_m	11,4 ± 4,0 µM	21,3 ± 5,6 µM	--
	K_{cat}	128,1 ± 13,0 min ⁻¹	157,6 ± 16,1 min ⁻¹	--
Hypoxanthin	k_m	n.d.	n.d.	--
	K_{cat}	n.d.	n.d.	--
Xanthin	k_m	n.d.	n.d.	--
	K_{cat}	n.d.	n.d.	--

¹ Vila *et al.*, 2003
n.d. nicht detektiert

3.2.12 EPR Spektroskopie von mAOX1

Die EPR Spektroskopie diente der Untersuchung der Eisen-Schwefel-Zentren. Bereits publizierte EPR-Studien zeigten, dass eukaryotische Molybdoenzyme zwei nichtidentische FeS-Zentren [2Fe-2S] besitzen, bei denen das FeSI bei Temperaturen um 77 K und das zweite Cluster FeSII nur bei Temperaturen niedriger als 40 K zu beobachten ist (Palmer & Massey, 1969).

Die in dieser Arbeit durchgeführten EPR-Messungen an der rekombinanten mAOX1 bei verschiedenen Temperaturen sollten zeigen, ob die [2Fe-2S] Zentren, die bereits mit CD-Spektroskopie identifiziert wurden, den bereits veröffentlichten EPR-Signalen eukaryotischer XDH und XO ähneln (Edmondson *et al.*, 1972; Hille *et al.*, 1985).

Abb. 3.25 zeigt das EPR Spektrum der FeS Cluster des mit 20-fachem Überschuss an Dithionit reduzierten Wildtyps mAOX1 (Spur a) zusammen mit den entsprechenden Simulationen (Spur b-e). Das Spektrum zeigt Signale vom reduzierten FAD Cofaktor bis zum Flavin Semiquinon und ein schwaches Mo(V) Signal. Es konnten starke Signale von zwei reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren (FeSI und FeSII) beobachtet werden, die charakteristisch für alle Vertreter der Xanthin Oxidase Familie sind, die bisher beschrieben wurden (Hille, 1996; Parschat *et al.*, 2001). Die Signale des FeSI-Clusters weisen einen

axialen g-Tensor mit $g_x = 2,019$, $g_y = 1,927$ und $g_z = 1,912$ auf, die eine starke Ähnlichkeit mit den Signalen anderer [2Fe2S]-Cluster enthaltenden Proteine (Aldehyd-Oxidoreduktase und Aldehyd-Dehydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* und *Desulfovibrio desulfuricans*; Boer *et al.*, 2004; Thapper *et al.*, 2006; Brondino *et al.*, 2006) haben und sind auch bei hohen Temperaturen sichtbar (60K). Die Spur d zeigt ein rhombisches Signal des reduzierten FeSII-Clusters mit einem g-Tensor $g_x = 2,085$, $g_y = 1,971$ und $g_z = 1,90$. Die sehr große Linienbreite von 4,0 mT der FeSII Signale ist nur bei niedrigen Temperaturen unterhalb von 20 K sichtbar. Die doppelt integrierten Spektren der FeSI und FeSII Signale (Spuren c und d) zeigten ein Verhältnis von 1:1, welches den Schluss zulässt, dass beide Cluster im gleichen Verhältnis im gesamten Protein vorliegen, wie auch im CD bereits gezeigt wurde. Die ermittelten Ergebnisse aus der Simulation ähnelten bekannten Literaturdaten (More *et al.*, 2005), zudem lagen beide Cluster im selben Verhältnis vor.

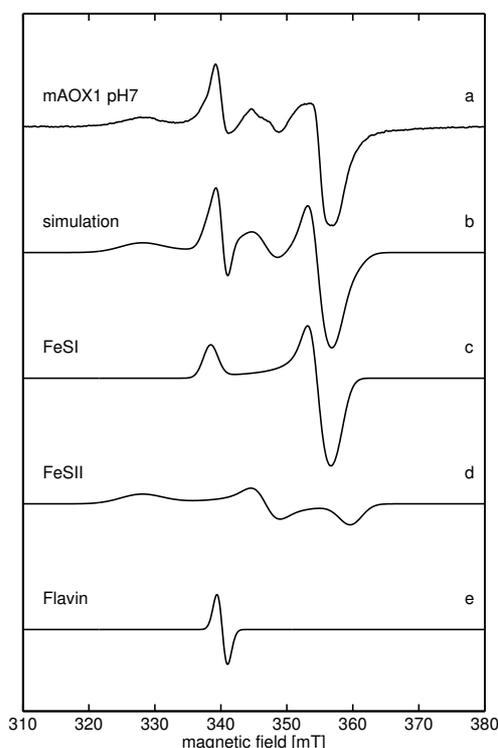


Abb. 3. 25 EPR Spektrum der rekombinanten Wildtyp mAOX1

Dargestellt sind in Teilbild a das EPR Spektrum der Dithionit reduzierten Wildtyp mAOX1 bei pH 7,0 und die dazugehörige Simulation (b). Alle Simulationsparameter sind in Tabelle 3.5 zusammengestellt. Das Flavin Semiquinon wurde mit einem isotropen g-Wert von $g_{iso} = 2,0$ und 1,9 mT (Teilbild e) simuliert. Das Signal des Oxidationsstatus Mo^V wurde bei allen Simulationen vernachlässigt.

(a) Wildtyp mAOX1, (b) Simulation des vollständigen Spektrums, (c) Simulation des FeSI, (d) Simulation des FeSII, (e) Simulation des FAD

Meßparameter: T = 20 K, 1 mW Mikrowellenstärke, 1 mT Modulationsamplitude, 12,5 kHz Modulationsfrequenz

Die g-Werte und Linienbreiten der Simulationen wurden mit Hilfe des Programms *Easy Spin* (Stoll, 2006) ermittelt und sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 3.5 EPR Simulationsparameter der rekombinten mAOX1

	Cluster	g-Werte			Linienbreite [mT]
		g_x	g_y	g_z	
AO aus Kaninchenleber ^a	FeSI ^a	2,018	1,930	1,918	1,6
	FeSII ^a	2,106	2,003	1,915	-
mAOX1	FeSI ^b	2,019	1,927	1,912	2,6
	FeSII ^c	2,085	1,971	1,900	4

^a AOX1 Wildtyp von Kaninchenleber, Daten aus (Barber, 1982)

^b g-strain wurde bestimmt in der Simulation mit $g_z = 0,01$

^c g-strain wurde bestimmt in der Simulation mit $g_x = 0,04$, die Fehlerabschätzung der g-Wert: $\pm 0,004$ für FeSI und \pm für FeSII

3.2.13 Zielgerichtete Mutagenese in der Substratbindungstasche der mAOX1

Der Reaktionsmechanismus der Substratoxidation wurde im Detail für die *R. capsulatus* XDH von Leimkühler *et al.* (2004) beschrieben. Dieses bakterielle Enzym zeigt zu eukaryotischen XORs hohe Homologien in der Gesamtstruktur, in der Aminosäuresequenz sowie in der Substratspezifität (Truglio *et al.*, 2002, Leimkühler *et al.*, 1998). Nachdem die Funktion der an der Substratreaktion beteiligten Aminosäuren für *R. capsulatus* XDH aufgeklärt werden konnte, soll der Mechanismus auf die mAOX1 übertragen werden. Neben der konservierten Glutamataminosäure (E730 in *R. capsulatus* XDH, E1261 in rXOR, E1262 in hXO) wurde im aktiven Zentrum ein zweiter Glutamatrest (E232 bei *R. capsulatus* XDH, E802 in bXO und rXO, E803 in hXO) identifiziert, der für die Bindung sowie die Umwandlung von Purinsubstraten verantwortlich ist. Diese Aminosäure ist bei allen Aldehyd-Oxidoreduktasen gegen nichtpolare Aminosäuren ausgetauscht (Phe in *Desulfuvibrio gigas* - Romao *et al.*, 1995; Val in AOs bei Säugetieren – Garattini *et al.*, 2007). Für AOs wurden nur sehr geringe Aktivitäten gegenüber Purinsubstraten gemessen (Garattini *et al.*, 2007). Die dritte konservierte Aminosäure im aktiven Zentrum der XORs ist ein Arginin (R310 in *R. capsulatus* XDH, R881 in hXO, R880 in rXO), welche neben der Substratbindung für eine Beschleunigung der Katalyse durch Stabilisierung des Übergangszustandes verantwortlich ist. Bei Aldehyd-Oxidoreduktasen ist das Arginin gegen ein Methionin ausgetauscht (M884 in mAOX1, M890 bei bAOX1, M889 in hAOX1). Werden das Glutamat sowie das Arginin bei den XORs gegen Valin bzw. gegen Methionin ausgetauscht (Yamaguchi *et al.*, 2007), können nur noch geringe Aktivitäten gegenüber Xanthin und Hypoxanthin gemessen werden, da der Verlust durch diesen Aminosäureaustausch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken

zum Substrat verhindert und somit der Elektronentransfer von den Purinsubstraten zum Molybdänzentrum blockiert wird.

Die Rolle der drei konservierten Aminosäuren Val806, Met884 und Glu1265 (Tabelle 3.6) der mAOX1, die für die Oxidation von Aldehyden zuständig sind, sollten mit den komplementären Aminosäuren in der *R. capsulatus* XDH verglichen werden. Hierfür wurden die Varianten V806E, M884R, V806E/M884R und E1265Q durch gerichtete Mutation generiert. Mit Hilfe von Fusions-PCR wurden alle mAOX1-Varianten erzeugt.

Tabelle 3.6 Vergleichende Darstellung der an Substraterkennung und –bindung beteiligten Aminosäuren in verschiedenen Organismen

Die eingerahmten Aminosäuren der mAOX1 wurden gegen die entsprechenden Aminosäuren im aktiven Zentrum der *R. capsulatus* XDH ausgetauscht (grau umrahmt) und die entstandenen Varianten V806E, M884R, V806E/M884R und E1265Q wurden für Kinetikstudien verwendet. Gleichzeitig wurden die Aminosäuren im aktiven Zentrum der *R. capsulatus* XDH gegen die konservierten Aminosäuren im aktiven Zentrum der mAOX1 ausgetauscht und die erzeugten Varianten E232V, R310M und E232V/R310M für Kinetikstudien verwendet.

<i>R. capsulatus</i> XDH	bXO/XDH	mXOR	bAOX1	mAOX1
Glu ²³² Arg ³¹⁰ Glu ⁷³⁰	Glu ⁸⁰² Arg ⁸⁸⁰ Glu ¹²⁶¹	Glu ⁸⁰⁵ Arg ⁸⁸³ Glu ¹²⁶⁴	Val ⁸¹² Met ⁸⁹⁰ Glu ¹²⁷¹	Val ⁸⁰⁶ Met ⁸⁸⁴ Glu ¹²⁶⁵

Die heterologe Expression in *E. coli* der vier Varianten erfolgte analog der Expression des mAOX1-Wildtyps. Alle Varianten wurden mittels Ni-NTA-Affinitätschromatografie sowie über Größenausschluss-Chromatografie gereinigt. Die Variante V806E wurde zusätzlich wie der Wildtyp mit Benzamidin-Sepharose-6B inkubiert, um den Anteil an aktivem Protein zu erhöhen. Die übrigen drei Varianten haben keine Bindung an die Benzamidin-Sepharose-6B Matrix gezeigt. Abb. 3.26 zeigt das 12 %-ige SDS-Polyacrylamidgel aller erzeugten Varianten im Vergleich zum mAOX1-Wildtyp. Die leicht unterschiedliche Reinheit der Proteine kann durch die unterschiedlichen Reinigungsschritte erklärt werden. Die Varianten M884R, V806E/M884R sowie E1265Q wurden nicht über Benzamidin-Sepharose-6B gereinigt.

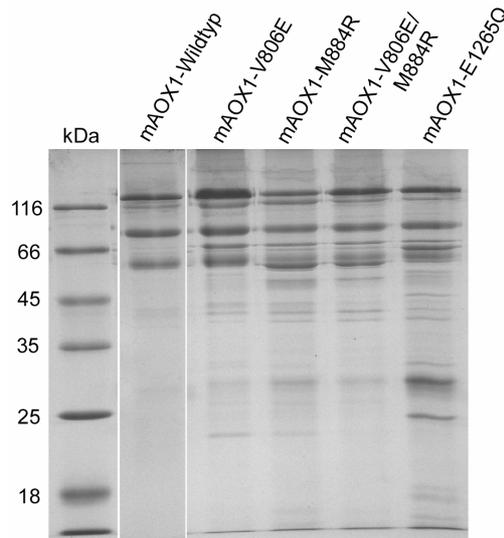


Abb. 3. 26 Reinigung der mAOX1-Wildtyp und der vier Varianten nach heterologer Expression in *E. coli*: 12 % SDS-PAGE Analyse der verschiedenen mAOX1 Varianten im Vergleich zum Wildtyp nach dem jeweils letzten Reinigungsschritt. Aufgetragen wurden jeweils 5 μ g Protein. Wie auch bereits im Wildtyp sind ebenfalls für alle Varianten drei zusätzliche Degradationsbanden von der Größe 120 kDa, 80 kDa und 60 kDa zu erkennen.

Abb. 3.27 zeigt alle gereinigten Varianten im Vergleich zum mAOX1-Wildtyp in einem nativen Polyacrylamidgel. Das 7 %-ige native Polyacrylamidgel verdeutlicht, dass alle Varianten vorrangig als Dimer vorliegen und keine Degradationsbanden entstanden sind. Die unterschiedliche Reinheit der Proteine resultiert durch die unterschiedlichen Reinigungsschritte.

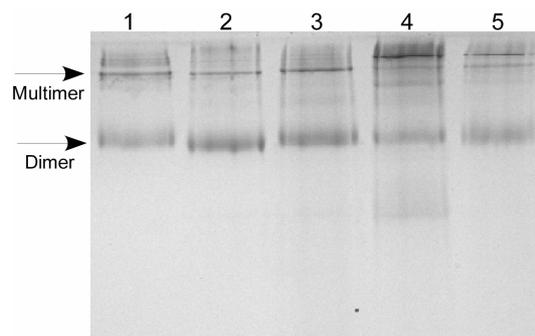


Abb. 3. 27 Natives PAGE des mAOX1-Wildtyp und der vier Varianten: Die gereinigten Proteine wurden mit Hilfe einer 7%-igen nativen PAGE analysiert. Jede Spur enthält 6 μ g gereinigtes Protein. Spur 1: mAOX1-Wildtyp, Spur 2: mAOX1-V806E, Spur 3: mAOX1-M884R, Spur 4: mAOX1-V806E/M884R, Spur 5: mAOX1-E1265Q

Während einige mAOX1-Varianten das Substrat Benzaldehyd nicht oxidieren konnten, wurde der Moco Gehalt über die indirekte Messung des fluoreszierenden Produktes FormA im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Für die Varianten ergab sich folgende Moco-Sättigungen: V806E 46 %, M884R 66 %, V806E/M884R 44 % und E1265Q 60 % (Tabelle 3.7). Die unterschiedlichen Werte sind auf abweichende Reinigungsstrategien für die Varianten zurückzuführen, da aufgrund der eingeführten Mutationen eine Bindung an die Benzamidin-Sepharose-Matrix nicht mehr stattfand. Die Bestimmung der Eisensättigung aller Varianten erfolgte mit ICP-OES Messung. Da für alle Varianten und dem mAOX1-Wildtyp Eisengehalte zwischen 83 % und 108 % ermittelt wurden, kann von einer vollständigen Sättigung mit dem Element Eisen ausgegangen werden.

Tabelle 3.7 Zusammenfassung der Moco- und Eisengehalte der mAOX1-Varianten

	Moco Gehalt ^a	Fe-Gehalt ^b
	%	%
mAOX1:		
WT	70	90
V806E	46	101
M884R	66	97
V806E/M884R	44	108
E1265Q	60	83

^aDer Moco-Gehalt wurde analog wie unter Material und Methoden beschrieben quantifiziert. Der Moco-Gehalt des mAOX1-Wildtyps wurde aus den Molybdängehalten der ICP-OES-Messung berechnet. Der MPT-Gehalt aus der FormA-Bestimmung wurde für alle Varianten im Verhältnis zum Wildtyp berechnet.

^bDer Eisengehalt wurde mittels ICP-OES gemessen.

3.2.14 Charakterisierung der FeS-Cluster der mAOX1-Varianten durch CD- Spektroskopie

Für die vier erzeugten Varianten (V806E – A, M884R – B, V806E/M884R – C, E1265Q – D in Abb. 3.28) konnten im oxidierten Zustand sehr ähnliche Spektren, wie für den Wildtyp, gezeigt werden. Zwei Peakmaxima, die charakteristisch für die beiden Eisen-Schwefel-Zentren sind, sind ebenfalls bei 430 und 470 nm zu erkennen. Das FeSI ist dabei als Schulter sichtbar. Die Reduzierung mit Natriumdithionit weist jedoch einen Unterschied zwischen der Glutamatvariante E1265Q und den drei anderen Varianten auf. Während hingegen die Valin- und Methioninvarianten eine dem des Wildtyps entsprechende Reduktion (Abb. 3.28A-C) aufweisen, zeigt die Glutamatvariante keine vollständige Reduktion der FeS-Zentren, was vermutlich auf eine Inaktivierung des Proteins während der

Reduktion zurück zuführen ist, da das Protein präzipitierte (Abb. 3.28D). Diese Variante ist im Vergleich zu den anderen Varianten vermutlich instabiler.

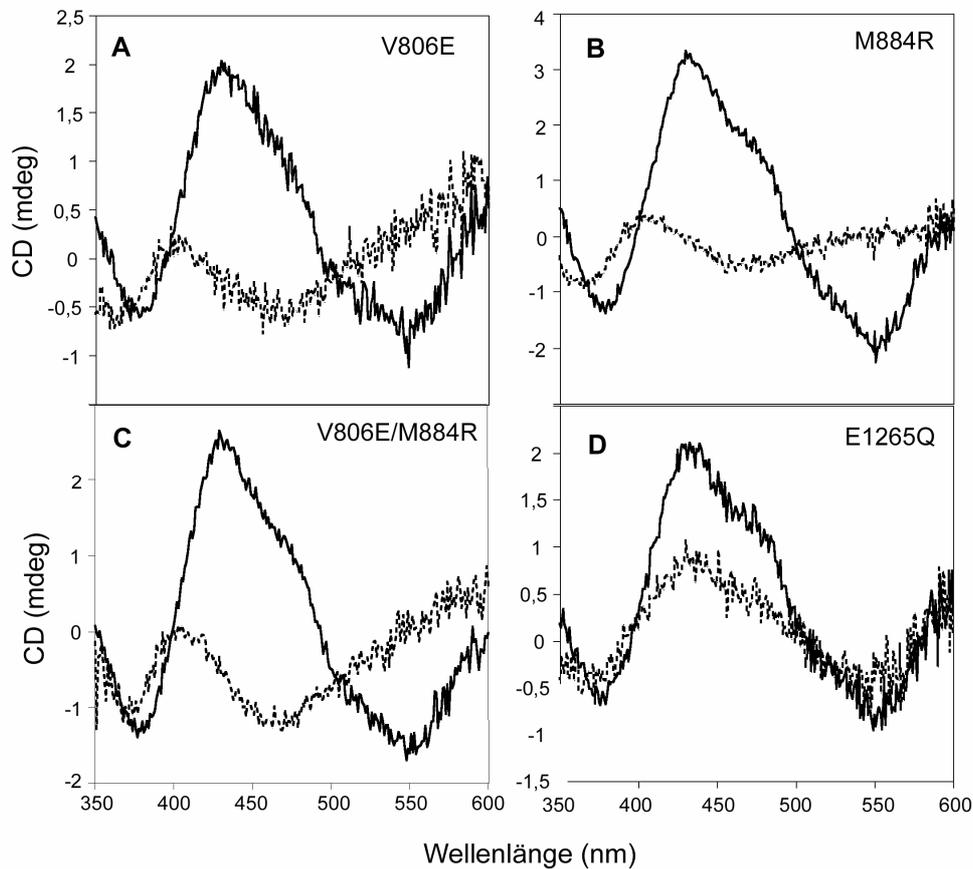


Abb. 3. 28 CD-Spektroskopie der vier mAOX1 Varianten

Die CD-Spektren wurden in 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 bei 20 °C an einem Jasco J715 CD-Spektrometer aufgenommen. Für gute Signalintensität wurde eine Proteinkonzentration von circa 2 mg/L der mAOX1 verwendet. Der oxidierte Zustand (durchgezogene Linie) im Vergleich zur mit 5 – 17 mM Natriumdithionit reduzierten mAOX1 (gepunktete Linie) ist gegenübergestellt.

3.2.15 Steady-state Kinetiken des mAOX1-Wildtyp und der Varianten V806E, M884R, V806E/M884R und E1265Q

Für die Bestimmung der kinetischen Konstanten des mAOX1-Wildtyps wurden die Substrate Benzaldehyd, Phthalazin, Acetaldehyd, Retinaldehyd, Xanthin und Hypoxanthin mit variierenden Konzentrationen verwendet. Als Elektronenakzeptor fungierte DCPIP, ein redoxaktiver Indophenolfarbstoff, der die Elektronen direkt vom Molybdän aufnimmt. Die Oxidation von Retinaldehyd, welches ein sehr lichtempfindliches Substrat ist, wurde über die Umwandlung in Retinolsäure und mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor an der HPLC detektiert.

Die Aktivität der mAOX1, berechnet über die Reduktionsspektren mit Benzaldehyd und Natriumdithionit, betrug 20 %.

Die Substrate mit der höchsten katalytischen Effizienz sind die aromatischen Aldehyde Phthalazin, Benzaldehyd und Retinaldehyd. Acetaldehyd zeigte mit $k_{\text{cat}}/K_m = 0,030 \pm 0,002 \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ die geringste katalytische Effizienz. Xanthin und Hypoxanthin wurden unter den gewählten Reaktionsbedingungen von der rekombinanten mAOX1 nicht umgesetzt. Die katalytischen Parameter für die Varianten V806E, M884R, V806E/M884R und E1265Q wurden ebenfalls unter Verwendung der oben genannten Substrate bestimmt. Wie aus Tabelle 3.8 zu entnehmen ist, zeigen die Varianten V806E/M884R und E1265Q keinerlei Substratumsetzung, weder für die getesteten Aldehyde noch für die Purinsubstrate.

Für den ersten Aminosäureaustausch Valin gegen Glutamat hat bei allen getesteten Substraten die Substratumsatzgeschwindigkeit k_{cat} abgenommen, die Affinität der Substrate Benzaldehyd, Phthalazin und Acetaldehyd ist deutlich kleiner geworden, was sich in den ansteigenden K_m -Werten widerspiegelt. Für die erwähnte Variante sank die katalytische Effizienz für die beiden Substrate Benzaldehyd und Acetaldehyd um einen Faktor von 10, für Phthalazin erniedrigte sich die Effizienz um 3 und bei Retinaldehyd blieb sie aufgrund von parallel abnehmenden k_{cat} und K_m -Werten nahezu konstant. Die Affinität für kleine und symmetrisch aromatische Aldehyde, während die Affinität für stärker hydrophobe Aldehyde, wie z. B. Retinaldehyd, erhöht war.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die Variante M884R für Benzaldehyd einen um das 70-fach erhöhten K_m -Wert sowie eine um das 4-fache gesunkene Wechselzahl. Für Retinaldehyd wurde eine 40-fach verringerte Reaktionsgeschwindigkeit vermessen, die sich ebenfalls in der gesunkenen katalytischen Effizienz widerspiegelt. Für alle anderen verwendeten Substrate konnten keine Parameter bestimmt werden. Damit scheint die Aminosäure Met884 für die Erkennung von Aldehyden verantwortlich zu sein.

Tabelle 3.8 Kinetische Parameter im Fließgleichgewicht der rekombinanten mAOX1 sowie der Varianten mit verschiedenen Aldehyden und Purin Substraten

		WT	V806E	M884R	V806E/M884R	E1265Q
benzaldehyde	K_m [μM]	97.7 ± 21.5	634.5 ± 76.4	7130 ± 2580	n.d.	n.d.
	k_{cat} [min^{-1}]	317.6 ± 28.5	151.0 ± 20.8	76.4 ± 17.8	n.d.	n.d.
	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$]	3.34 ± 0.56	0.24 ± 0.02	0.011 ± 0.002	-	-
phthalazine	K_m [μM]	11.4 ± 4.0	28.55 ± 0.35	n.d.	n.d.	n.d.
	k_{cat} [min^{-1}]	128.1 ± 13.0	103.0 ± 1.0	n.d.	n.d.	n.d.
	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$]	12.2 ± 4.0	3.6 ± 0.1	-	-	-
retinaldehyde	K_m [μM]	55.8 ± 8.8	22.2 ± 2.8	7.5 ± 2.0	n.d.	n.d.
	k_{cat} [min^{-1}]	49.5 ± 8.7	13.9 ± 2.4	1.3 ± 0.4	n.d.	n.d.
	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$]	0.89 ± 0.02	0.63 ± 0.04	0.17 ± 0.02	-	-
acetaldehyde	K_m [μM]	17500 ± 4900	52900 ± 17800	n.d.	n.d.	n.d.
	k_{cat} [min^{-1}]	519.9 ± 112.3	160.6 ± 38.1	n.d.	n.d.	n.d.
	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$]	0.030 ± 0.002	0.0031 ± 0.0003	-	-	-
xanthine	K_m [μM]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	k_{cat} [min^{-1}]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$]	-	-	-	-	-
hypoxanthine	K_m [μM]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	k_{cat} [min^{-1}]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$]	-	-	-	-	-

n.d. nicht detektiert

Alle kinetischen Konstanten wurden mit einem Shimadzu Photometer in 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 bei variierender Substratkonzentration in Gegenwart von 100 μM DCPIP aufgenommen. Für Retinaldehyd wurde statt DCPIP der im Puffer gelöste Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwendet und das Reaktionsprodukt Retinolsäure über eine reverse phased Säule an einer HPLC detektiert.

3.2.16 Vergleich der Steady-state Parameter der komplementär eingeführten Aminosäureaustausche (E_B232V, R_B310M und E_B232V/R_B310M) in der *R. capsulatus* XDH

Der katalytische Reaktionsmechanismus der *R. capsulatus* XDH involviert drei konservierte Aminosäuren im aktiven Zentrum: Glu_B730, Arg_B310 sowie Glu_B232. Mit Hilfe der in *R. capsulatus* XDH eingeführten komplementären Aminosäuren aus dem aktiven Zentrum der mAOX1 (Tabelle 3.6) sollte die Funktion dieser Aminosäuren weiter charakterisiert werden und die Oxidation von Aldehyden näher spezifiziert werden. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden daher die XDH Varianten E_B232V, R_B310M und die Doppelvariante E_B232V/R_B310M erzeugt.

Um den intramolekularen Elektronentransfer zu gewährleisten, wurden für den Wildtyp sowie der Varianten der Moco-Gehalt mittels der Quantifizierung über FormA sowie die Sättigung mit Eisen mittels ICP-OES bestimmt. In Tabelle 3.9 sind die Werte zusammengefasst. Man

kann hier von einer vollständigen Eisensättigung ausgehen, da die Werte zwischen 88 % und 99 % liegen. Damit sind pro Enzym je 2FeSI und je 2FeSII gebunden. Der Gehalt des Moco variiert entsprechend der gereinigten XDH Proteine und liegt zwischen 43 – 63 %, abhängig von den jeweils eingeführten Aminosäureaustauschen. Im Vergleich zu den einzelnen mAOX1 Varianten sind jedoch die Moco-Gehalte der XDH Varianten sehr ähnlich.

Tabelle 3.9 Darstellung der Moco- und Eisengehalte der *R. capsulatus* XDH Varianten

	Moco Gehalt ^a	Fe-Gehalt ^b
	%	%
<i>R.c. XDH:</i>		
WT	75	99
E232V	43	95
R310M	63	88
E232V/R310M	49	97

^aDer Moco-Gehalt wurde analog wie unter Material und Methoden beschrieben quantifiziert. Der Moco-Gehalt des mAOX1-Wildtyps wurde aus den Molybdängehalten der ICP-OES-Messung berechnet. Der MPT-Gehalt aus der FormA-Bestimmung wurde für alle Varianten im Verhältnis zum Wildtyp berechnet.

^bDer Eisengehalt wurde mittels ICP-OES gemessen.

Die Fließgleichgewicht Kinetiken (Tabelle 3.10) der XDH wurden photometrisch bei variierenden Konzentrationen an Benzaldehyd, Phthalazin, Acetaldehyd, Xanthin und Hypoxanthin ermittelt. Retinaldehyd, als sehr lichtempfindliches Substrat, wurde über das Reaktionsprodukt Retinalsäure an der HPLC vermessen. Für alle Substratuntersuchungen wurde der Elektronenakzeptor DCPIP verwendet. Für die beiden getesteten Purinsubstrate (Xanthin, Hypoxanthin) nahm die Aktivität für alle Varianten im Vergleich zum Wildtyp stark ab. Für die Argininvariante und die Doppelvariante konnte selbst bei erhöhter Enzymkonzentration keinerlei Substratumsetzung mehr gemessen werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit für Hypoxanthin verringerte sich für R_B310M im Vergleich zum Wildtyp um das 300-fache. Für E_B232V und E_B232V/ R_B310M konnte keine Enzymaktivität detektiert werden. Im Vergleich dazu konnte eine Steigerung der Oxidation der Aldehyde für die Varianten gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden. Die Doppelvariante E_B232V/ R_B310M zeigte für beide Purine keine enzymatische Aktivität, im Gegensatz dazu konnte jedoch für alle Aldehyde eine höhere katalytische Effizienz gegenüber des Wildtyps erreicht werden. Es ist zu beobachten, dass für alle Aldehyde die Reaktionsgeschwindigkeit k_{cat} der drei XDH Varianten deutlich zunahm, der K_m -Wert für Benzaldehyd und Phthalazin abnahm und sich für Retinaldehyd und Acetaldehyd erhöhte, die Substratspezifität bei diesen beiden

Substraten also abnahm. Die beiden Aminosäuren E232 und R310 im aktiven Zentrum sind für die Purinspezifität verantwortlich. Der Aminosäureaustausch gegen Valin bzw. Methionin ergibt eine Substratspezifität in Richtung der Aldehyde, was an den veränderten K_m - und k_{cat} -Werten deutlich wird. Im Vergleich zu den mAOX1 Varianten konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Die Doppelvariante V806E/M884R der mAOX1 zeigte keinerlei Aktivität gegenüber Xanthin oder Hypoxanthin, zusätzlich ist die Fähigkeit der Aldehydoxidation vollständig verloren gegangen ist.

Tabelle 3.10 Kinetische Parameter im Fließgleichgewicht der rekombinanten *R. capsulatus* XDH und der Varianten mit verschiedenen Aldehyden und Purinen

		WT	E232V	R310M	E232V/R310M
benzaldehyde	K_m [μM]	925 \pm 190	10.6 \pm 1.2	552 \pm 188	25.9 \pm 15.5
	k_{cat} [min^{-1}]	187 \pm 47	206 \pm 18	211 \pm 53	94.2 \pm 8.4
	k_{cat}/K_m [$\mu M^{-1} min^{-1}$]	0.20 \pm 0.02	10.3 \pm 1.5	0.36 \pm 0.08	4.1 \pm 1.3
phthalazine	K_m [μM]	1240 \pm 210	310 \pm 80	n.d.	420 \pm 73
	k_{cat} [min^{-1}]	2.62 \pm 0.06	142.0 \pm 27.4	n.d.	81.0 \pm 10.5
	k_{cat}/K_m [$\mu M^{-1} min^{-1}$]	0.0022 \pm 0.0004	0.47 \pm 0.04	-	0.20 \pm 0.02
retinaldehyde	K_m [μM]	7.6 \pm 0.3	38.2 \pm 10.5	154.8 \pm 7.1	36.6 \pm 1.1
	k_{cat} [min^{-1}]	0.31 \pm 0.01	3.3 \pm 0.9	10.9 \pm 0.2	3.0 \pm 0.2
	k_{cat}/K_m [$\mu M^{-1} min^{-1}$]	0.041 \pm 0.002	0.087 \pm 0.003	0.071 \pm 0.003	0.082 \pm 0.005
acetaldehyde	K_m [μM]	n.d.	913 \pm 460	6200 \pm 1880	2170 \pm 450
	k_{cat} [min^{-1}]	n.d.	88.5 \pm 20.1	110.6 \pm 10.9	56.8 \pm 7.6
	k_{cat}/K_m [$\mu M^{-1} min^{-1}$]	-	0.11 \pm 0.03	0.019 \pm 0.004	0.027 \pm 0.005
xanthine	K_m [μM]	193.0 \pm 22.5	175 \pm 7	n.d.	n.d.
	k_{cat} [min^{-1}]	1303 \pm 146	85.6 \pm 15.3	n.d.	n.d.
	k_{cat}/K_m [$\mu M^{-1} min^{-1}$]	6.8 \pm 0.2	0.49 \pm 0.07	-	-
hypoxanthine	K_m [μM]	17.3 \pm 3.8	n.d.	63.7 \pm 10.1	n.d.
	k_{cat} [min^{-1}]	507 \pm 35	n.d.	9.0 \pm 0.3	n.d.
	k_{cat}/K_m [$\mu M^{-1} min^{-1}$]	30.3 \pm 6.1	-	0.14 \pm 0.03	-

n.d. nicht detektiert

Alle kinetischen Konstanten wurden mit einem Shimadzu Photometer in 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 bei variierender Substratkonzentration in Gegenwart von 100 μM DCPIP aufgenommen. Für Retinaldehyd wurde ebenfalls DCPIP als Elektronenakzeptor verwendet und das Reaktionsprodukt Retinolsäure über eine reverse phased Säule an einer HPLC detektiert.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die drei Molybdoflavoenzyme *R. capsulatus* XDH, *Mus musculus* AOX1 sowie die humane AOX1 näher charakterisiert. Die Xanthin-Dehydrogenase, ein am Purinkatabolismus beteiligtes Enzym, besitzt eine $(\alpha\beta)_2$ heterotetramere Struktur. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe einer chimären Variante ($[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$) die Frage geklärt, ob zwischen den beiden XdhB-Untereinheiten ein intramolekularer Elektronentransfermechanismus existiert und warum Molybdoflavoenzyme Dimere sind.

Im zweiten Teil sollte das Expressionssystem sowie die Reinigung der eukaryotischen mAOX1- und hAOX1-Proteine beschrieben werden. Mit Hilfe des heterologen Expressionssystems konnten verschiedene mAOX1-Varianten hergestellt werden, mit denen die Funktion der konservierten Aminosäuren im aktiven Zentrum der mAOX1 diskutiert werden konnten. Zusätzlich zur Funktionsanalyse dieser Aminosäuren erfolgte eine biochemische und biophysikalische Charakterisierung der mAOX1. Parallel zu den erzeugten mAOX1-Varianten wurden ebenfalls *R. capsulatus* XDH-Varianten exprimiert und gereinigt um einen Reaktionsmechanismus für die mAOX1 zu postulieren. Die Ergebnisse aller experimentellen Ansätze werden im Folgenden diskutiert.

4.1 *R. capsulatus* XDH

4.1.1 Untersuchungen zum intramolekularen Elektronentransfer der XDH

Für die Untersuchung des intramolekularen Elektronentransfers zwischen den beiden XdhB Untereinheiten wurde die chimäre *R. capsulatus* XDH Variante $[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$ erzeugt. Leimkühler *et al.* publizierten bereits 2004 mehrere *R. capsulatus* XDH Glutamatvarianten, (E730A, E730D, E730Q, E730R) für die gezeigt werden konnte, dass das Glutamat essentiell ist. Deshalb wurde der Aminosäureaustausch E730A gewählt, um eine XDH herzustellen, die eine aktive und eine inaktive Seite enthält.

Gegenstand dieses Teils der Arbeit war es, herauszufinden, wie sich die Aktivität eines dimeren Proteins verändert, dessen Dimerhälfte inaktiv ist.

Für die Expression der beiden XDH-Proteine wurde der *E. coli* Stamm RK4353(DE3)*mobAB* verwendet. Dieser, in den Genen *mobA* und *mobB* deletierte *E. coli* Stamm, gewährleistet den Einbau der nukleotid-freien Moco-Form in *R. capsulatus* XDH, da durch Deletion der Gene *mobA* und *mobB* die Modifizierung des dioxo Moco zu bis-MGD unterbunden wird. Mit Hilfe einer zweistufigen Affinitätschromatografischen Reinigung konnte die chimäre $[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$ - XDH mit einer aktiven und einer inaktiven XdhB-Untereinheit, sowie

der XDH-Wildtyp gereinigt werden. Die Insertion sowie die Funktionalität des Moco, des FAD sowie der Fe/S-Zentren beider in dieser Arbeit erzeugten Proteinvarianten wurden mit Hilfe der Quantifizierung des stabilen Oxidationsproduktes FormA, mit der Aufnahme von Reduktionsspektren bzw. der Aufnahme von CD-Spektren im sichtbaren Wellenlängenbereich untersucht.

Die Bestimmung des MPT-Gehaltes zeigte für den XDH-Wildtyp eine Sättigung von 76 % bzw. für die chimäre Variante eine MPT-Sättigung von 70 %. Damit besitzen beide XDH-Proteine gleiche MPT-Gehalte.

Das aus den Spektren ermittelte Absorptionsverhältnis A_{465}/A_{550} von 3,6 für den Wildtyp und 3,7 für die chimäre Variante bestätigt den Einbau von FAD und FeS-Zentren. Da dieses Verhältnis größer als 3,0 ist, welches den Einbau des FAD zu FeS-Zentren in einem Verhältnis von 1:4 darstellt, scheint hier eine Proteinmischung in beiden Varianten vorzuliegen. Dies kann auf das Vorhandensein von weiteren Proteinen hinweisen, die keine Eisen-Schwefel-Zentren besitzen.

Die Reduktion mit NADH unter anaeroben Bedingungen ergab wiederum für den Wildtyp 66 % und für das Chimär 74 %. Bei der Zugabe von NADH wird die Reduktion des FAD sowie der FeS-Zentren überprüft, beide Varianten besitzen damit ein funktionales FAD und FeS-Zentren.

Die beiden FeS-Zentren (FeSI und FeSII), die UV-VIS-spektroskopisch nicht unterscheidbar sind, wurden zusätzlich mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht. Dafür wurden Spektren beider XDH-Varianten zunächst im oxidierten Zustand aufgenommen. Peakmaxima bei 470 nm und 430 nm repräsentieren die FeSI- bzw. die FeSII-Zentren. Reduziert man beide Varianten mit Natriumdithionit verschieben bzw. verschwinden die dichromatischen Banden. Da die Reduktionsspektren der Chimären identisch dem des XDH-Wildtyps sind, hat der E730A Austausch offensichtlich keinen Einfluss auf die Insertion der FeS-Zentren.

Alle Untersuchungen der drei verschiedenen Kofaktoren in *R. capsulatus* XDH verdeutlichen, dass der Glutamataustausch im aktiven Zentrum die Insertion sowie die Funktion dieser Kofaktoren nicht beeinträchtigt.

Um den Elektronentransfer zu untersuchen, wurden die kinetischen Parameter K_m und k_{cat} für die Substrate Xanthin und NAD^+ bestimmt. Damit sollten die Fragen geklärt werden, warum die *R. capsulatus* XDH ein Dimer bildet und ob die beiden ($\alpha\beta$)-Dimer-Untereinheiten unabhängig voneinander agieren. Im Gegensatz zu den von Tai und Hwang (2004) publizierten Daten der XO aus Kuhmilch, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide ($\alpha\beta$)-Dimer-Untereinheiten der *R. capsulatus* XDH unabhängig ohne Kooperativität oder einem intramolekularen Elektronentransfer zwischen den beiden XdhB-Untereinheiten agieren. Dies bestätigen die Daten aus den Reduktionsspektren mit Xanthin. Die Reduktion des Wildtyps ergab, dass nur 46 % den terminalen Mo=S Liganden tragen, die chimäre

Variante im Vergleich verdeutlicht mit 26 % reduziertem Anteil, dass sie nur circa halb so aktiv ist, wie der Wildtyp. Obwohl die K_m Werte für die Substrate Xanthin und NAD^+ unverändert blieben, kann man, aufgrund der um 50 % erniedrigten k_{cat} Werte für Xanthin und NAD^+ der Chimären $[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$ im Vergleich zum XDH-Wildtyp, einen intramolekularen Elektronentransfer zwischen den beiden aktiven XdhB-Untereinheiten ausschließen. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten aus Veröffentlichungen von Russ Hille (1996) für XO aus Kuhmilch überein, die darauf hinweisen, dass beide XO-Untereinheiten unabhängig voneinander an der Katalyse beteiligt sind. Dies haben bereits Anfang 1980 mit Hilfe von Blitzlichtphotolyse und Pulsradiolyse Bhattacharyya *et al.*, 1983; Walker *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1986; Hille *et al.*, 1991 für die die XO und XDH aus Kuhmilch gezeigt. Die Vermutungen von Hille und die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Gegensatz zu den kürzlich veröffentlichten Daten von Tai und Hwang (2004). Mit Hilfe von *stopped-flow*-Messungen und definierten Äquivalenten von 6FP konnte die Umsatzrate von 6-Formylpterin (6FP) zu 6-Carboxylpterin (6CP) ermittelt werden. Da die XO zwei Substratbindungstaschen besitzt, sollte sich die Absorptionsabnahme bei A_{620} nm des Substrates 6FP entsprechend verdoppeln, wenn beide Bindungstaschen besetzt sind und kein kooperativer Mechanismus zwischen beiden Untereinheiten existiert. Die Umsetzungsgeschwindigkeit von 6FP zu 6CP ist allerdings für die zweite Komplexbildung am zweiten aktiven Zentrum (XO-6FP_2) deutlich höher als am ersten aktiven Zentrum (XO-6FP_1). Dies belegt die unterstützende Substratumsetzung im zweiten aktiven Zentrum, sofern in der ersten Substratbindungstasche der einen Untereinheit bereits ein Äquivalent 6FP gebunden hat. Es scheint einen wesentlichen Unterschied in der Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten der *R. capsulatus* XDH und der XO aus Kuhmilch zu geben, da Tai *et al.* zeigen konnten, dass nach Bindung eines langsam oxidierbaren Substrats, wie 6-Formylpterin an das aktive Zentrum der einen aktiven Untereinheit, die Bindungsaffinität sowie die Katalysegeschwindigkeit für weitere Substratmoleküle an der anderen aktiven Seite beeinflusst werden.

Um eindeutig einen kooperativen Mechanismus zwischen den Dimerhälften in Enzymen von Säugetieren zu bestätigen bzw. auszuschließen, sollte ebenfalls eine chimäre Variante für die XO aus Kuhmilch hergestellt und ähnliche Untersuchungen wie in dieser Arbeit durchgeführt werden.

4.1.2 Modell für die Assemblierung der *R. capsulatus* XDH

Die Assemblierung funktionaler Xanthin-Oxidoreduktasen umfasst mehrere Syntheseschritte. Für die homodimere XOR in Säugetieren müssen dafür in jede Untereinheit je ein FAD, 2x[2Fe2S] Zentren sowie der Moco inseriert werden (Hille, 1996). Die Synthese der *R. capsulatus* XDH ist aufgrund der heterotetrameren Struktur wesentlich umfangreicher. Das FAD und die FeS-Zentren binden in der XdhA- und der Moco in der XdhB-Untereinheit. Untersuchungen von Schumann *et al.* (2008) zeigen, dass die Insertion der drei Kofaktoren in die *R. capsulatus* XDH ein komplizierter Prozess ist, der in geordneter Reihenfolge abläuft. Um dies aufzuklären, wurden verschiedene Varianten erzeugt, die an der Bindung des FeSI beteiligt sind sowie für die Dimerisierung der XdhB-Untereinheiten bzw. für die Moco-Bindung verantwortlich sind.

Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen, dass die XDH-Assemblierung in einer bestimmten Reihenfolge in fünf Schritten abläuft (Abb. 4.1). Beginnend mit der Synthese der Untereinheiten XdhA und XdhB, gefolgt von der Dimerisierung beider Untereinheiten und der Insertion des FeSI, FeSII und des FAD in die XdhA-Untereinheit und der anschließenden Dimerisierung zweier ($\alpha\beta$)-Dimere über die XdhB-Untereinheiten. Um ein aktives Protein herzustellen, übernimmt im letzten Schritt das Chaperon XdhC die Insertion eines sulfurierten Moco in jede XdhB-Untereinheit (Neumann *et al.*, 2007a). Mit Hilfe der L-Cystein-Desulfurase NifS4 (Neumann *et al.*, 2007b) wird die dioxo-Moco-Form sulfuriert und anschließend in die tiefliegende Moco-Bindungstasche integriert. Neben der Funktion als Chaperon kann XdhC ebenfalls an der korrekten Faltung der XDH nach der Moco-Insertion zuständig sein.

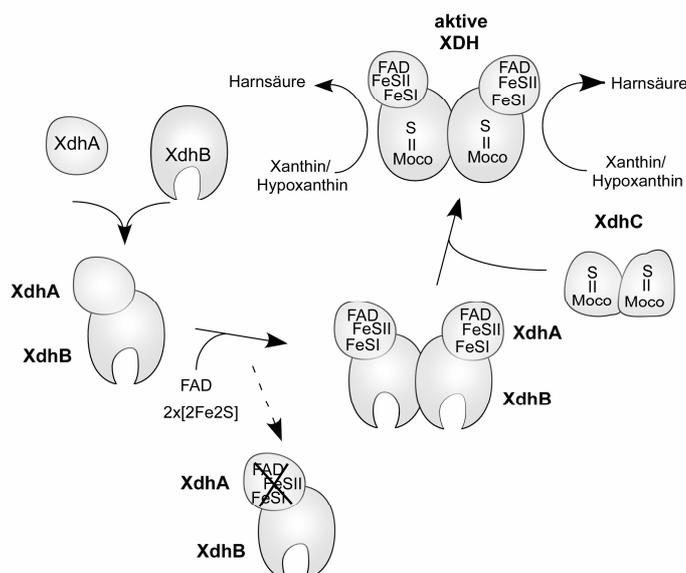


Abb. 4.1 **Model für die Assemblierung von *R. capsulatus* XDH:** Die Assemblierung der *R. capsulatus* XDH umfasst die Synthese der Untereinheiten XdhA und XdhB, die Dimerisierung beider Untereinheiten, die Insertion der FeSI, FeSII und des FAD in die XdhA-Untereinheit, bevor zwei ($\alpha\beta$) Untereinheiten über die XdhB-Untereinheit dimerisieren. Der letzte Schritt stellt die Einführung des sulfurierten Moco dar mit Hilfe der XdhC-Untereinheit. XdhC schützt den sulfurierten Moco vor unerwünschter Oxidation. Wenn eines der FeS-Zentren nicht korrekt in die XdhA-Untereinheit integriert wurde, verbleibt das Protein als ($\alpha\beta$) Heterodimer, welches keinen Moco inserieren kann (Schumann *et al.*, 2008).

Die vollständige Assemblierung der beiden XdhA- und XdhB-Untereinheiten sowie die Bindung der Eisen-Schwefel-Zentren und des FAD in die *R. capsulatus* XDH ist für die Bindung des Moco Voraussetzung. So haben Neumann *et al.* (2007a) mit Rekonstitutionsstudien von apo-XDH aus *R. capsulatus* XDH und Moco gezeigt, dass die Bindung des Moco in die XdhB-Untereinheit abhängig von der XDH-Konformation ist. Da zusätzlich nur 20 % der apo-XDH mit Moco rekonstituiert werden konnte, deutet dies ebenfalls auf eine zeitabhängige Konformationsänderung der XDH hin. Dies konnten bereits Leimkühler und Klipp 1999 zeigen. Native PAGE-Analysen von aktiver und inaktiver *R. capsulatus* XDH zeigten deutlich ein unterschiedliches Laufverhalten beider Proteine. Mit Hilfe eines SDS-Polyacrylamidgels konnte jedoch die gleiche Zusammensetzung der Untereinheiten nachgewiesen werden. Das unterschiedliche Laufverhalten könnte daher mit einer Konformationsänderung der aktiven XDH, die den Moco enthält, zusammenhängen. Die Assemblierung des ($\alpha\beta$)-Heterodimers der XDH (siehe Abb. 4.1) ist Voraussetzung für die Insertion des Moco, da XdhC neben der Mocoinsulfurierung und der Mocoinsertion eine Art Qualitätskontrolle übernimmt, da der Moco nur dann inseriert wird, wenn je zwei ($\alpha\beta$)-Heterodimere assembliert sind.

Xanthin-Oxidoreduktasen (XOR: dazu zählen XDH und XO) wurden aus einer Vielzahl von eukaryotischen sowie bakteriellen Organismen isoliert und biochemisch charakterisiert. Alle nativ bzw. rekombinant gereinigten XDH-Proteine sind bis auf wenige Ausnahmen (XDH aus *Pseudomonas putida* enthält kein FAD; Woolfolk *et al.*, 1985; König und Andreesen, 1990) Molybdän-enthaltende Eisen-Schwefel-Flavo-Enzyme. Eukaryotische XOR sind Homodimere mit einer durchschnittlichen molekularen Masse von 300 kDa. Niedere Organismen weisen häufig einen modifizierten Moco auf und können auch aus mehr als zwei unterschiedlichen Untereinheiten bestehen. So besitzt das anaerobe Bakterium *Veillonella atypica* ein 129 kDa heterotrimeres XDH-Protein (Gremer und Meyer, 1996) mit einem modifizierten Moco (MCD: Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid). Nishino *et al.* (2002) konnten mit Hilfe eines Baculovirus-Insekten-Zellsystems zeigen, dass die heterologe Expression der XOR aus Rattenleber drei verschiedene Formen aufwies: das native Homodimer, ein Demolybdodimer sowie eine monomere Form, die keinen Moco und nur eines der beiden FeS-Zentren besaß. Dies deutet darauf hin, dass die Dimerisierung für den Einbau aller Kofaktoren sowie für eine korrekte Faltung der Untereinheiten erforderlich ist. Weiterhin scheint für die *R. capsulatus* XDH die Dimerisierung nicht nur für die Mocoinsertion sondern auch für die Stabilität des Proteins notwendig zu sein.

Wilson *et al.* (2006) untersuchten mit Hilfe von humanen Sulfit-Oxidase Varianten (G473D, G473W), die auf Grund einer Mutation in der Dimerisierungsdomäne kein Dimer mehr ausbildeten, das biochemische und biophysikalische Verhalten der monomeren Form. Auffällig an dieser monomeren Form war die veränderte Sekundärstruktur (zufällige Faltung) im Vergleich zum Wildtyp (Gemisch aus α -Helices und β -Faltblättern). Beide Varianten besaßen im Gegensatz zu dem XOR-Monomer aus Rattenleber (Nishino *et al.*, 2002) den Molybdänkofaktor. Das Vorhandensein der beiden Kofaktoren (Moco und Häm- b_5) ermöglichte den Varianten die Sulfitoxidation mit Eisencyanid als Elektronenakzeptor. So zeigte die G473W Variante bei einem pH-Wert von 7,0 nahezu Wildtypaktivität und die G473D Variante zeigte eine um das 5-fach verringerte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp auf. Die Bildung eines Monomers scheint bei einer Sulfit-Oxidase-Mutation keine vergleichbaren Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms zu haben, wie es Nishino *et al.* (2002) bei der Ratten XOR beobachten konnten. Dennoch resultierte die Sulfit-Oxidase-G473D Mutation bei einem Patienten in partieller Falschfaltung und Monomerisierung der SO. Obwohl die Substratbindung und die katalytische Effizienz stark beeinträchtigt waren, war dennoch eine Sulfitoxidation messbar.

Es existiert offensichtlich ein Unterschied in den Molybdoflavoenzymklassen hinsichtlich der Enzymstabilität und der damit verbundenen Insertion der Kofaktoren. Für XORs scheint die korrekte Assemblierung der Untereinheiten Voraussetzung für die Kofaktorinsertion zu sein, was bei der SO-Familie nicht beobachtet werden konnte.

4.2 *Mus musculus* AOX1 und humane AOX1

4.2.1 Expressionssystem und Reinigung der mAOX1 und hAOX1

In dieser Arbeit wurde ein heterologes Expressionssystem für die mAOX1 in *E. coli* entwickelt. Bislang stellte die Expression von Säugetier-Molybdoflavoenzymen in Bakterien ein Problem hinsichtlich der überwiegenden Gewinnung inaktiver Demolybdo- und Desulfo-Enzymen dar, was bereits für die humane XOR beschrieben wurde (Yamaguchi *et al.*, 2007). Um eine gesteigerte Sulfurierungsrate für die mAOX1 zu erzielen, wurden in den *E. coli* TP1000 Stamm Plasmide mit den Genen *mMCSF* und *mAOX1* transformiert. Damit wurde die gleichzeitige Synthese der Proteine mMCSF sowie der mAOX1 induziert. Nach der Koexpression mit der mMCSF konnte für das mAOX1-Protein eine 50 %-ige Steigerung des terminalen Schwefelliganden am Moco erreicht werden, obwohl nur 20 % des gereinigten Proteins in der katalytisch aktiven Form vorlagen. Dies kann auf zwei mögliche Ursachen hinweisen: zum einen sind die Expressionsbedingungen für beide Proteine noch nicht optimal und müssen daher weiter modifiziert werden, zum anderen kann die Sulfurierung des Moco in Bakterien und Eukaryonten unterschiedlich sein. Für die *R. capsulatus* XDH konnte für das Genprodukt des *xdhC* Gens eine direkte Beteiligung für die Insertion des sulfurierten Moco in die apo-XDH beschrieben werden (Leimkühler *et al.*, 1999, Neumann *et al.*, 2006). Neumann *et al.* zeigten, dass XdhC stöchiometrische Mengen an Moco bindet und diesen über eine spezifische Bindung mit der XdhB-Untereinheit in Moco-freie apo-XDH integriert. Die Schwefelübertragung auf den Moco wird dabei von der L-Cystein Desulfurase NifS4 übernommen, die mit XdhC interagiert. Das Interaktionspaar NifS4-XdhC kann damit als vergleichbares prokaryotisches Gegenstück zu den in Eukaryonten identifizierten spezifischen Moco-Sulfurasen betrachtet werden (Neumann *et al.*, 2007b). Neumann *et al.* konnten damit für Prokaryonten zeigen, dass die Mocosulfurierung für Proteine der Xanthinoxidase-Familie vor der Insertion des Moco statt findet. Im Gegensatz dazu kann in Eukaryonten der Zeitpunkt der Sulfurierung des Moco vollkommen unterschiedlich sein. Wollers *et al.* (2008) vermuten für die *Arabidopsis thaliana* Moco-Sulfurase ABA3, dass der Moco erst dann sulfuriert wird, wenn er bereits im Protein gebunden ist. Weitere detaillierte Informationen über die Mocosulfurierung bei Eukaryonten sind bislang noch nicht untersucht worden.

Die rekombinante mAOX1 zeigt ähnliche katalytische Eigenschaften wie das nativ gereinigte Enzym aus Mausleber (Vila *et al.*, 2004). Für die drei untersuchten Aldehyde Benzaldehyd, Retinaldehyd und Acetaldehyd zeigt die native mAOX1 im Vergleich zur rekombinanten mAOX1 geringere K_m -Werte, so ist das native Enzym gegenüber Benzaldehyd und Acetaldehyd circa 15-mal sensitiver als das rekombinante und für Retinaldehyd konnte eine doppelt so hohe Substratsensitivität ermittelt werden. Obwohl das nativ gereinigte Enzym

aus Mausleber eine etwas höhere Substratspezifität gegenüber den Aldehyden aufweist, sind alle K_m -Werte in gleichen Größenverhältnissen. Die fehlenden Angaben über den Sulfurierungsgrad der nativen mAOX1 erschwerten eine konkrete Aussage über die Substratumsatzgeschwindigkeit bzw. über die Wechselzahl. Unter Berücksichtigung der Moco-Sulfurierung der rekombinanten mAOX1 (20 %) ist die Reaktionsgeschwindigkeit für Benzaldehyd für das native und rekombinante Enzym mit circa 1200 min^{-1} am ähnlichsten. Sehr auffällig für das Substrat Acetaldehyd waren die sehr hohen K_m -Werte ($1,5 \text{ min}^{-1}$ für das native und 15 min^{-1} für das rekombinante Enzym). Obwohl es ein Aldehyd ist, scheint sich die Substratspezifität der AOs vorrangig auf aromatische Aldehyde sowie N-heterozyklische Verbindungen zu beschränken. Im Ethanolmetabolismus existiert ein weiteres Leberenzym, die Acetaldehyd-Dehydrogenase (ALDH), welche eine sehr hohe Substratspezifität für Acetaldehyd (niedriger K_m ; Gemma *et al.*, 2006) aufweist. Acetaldehyd, als Zwischenprodukt im Ethanolabbau könnte damit bei Ausfall der ALDH von der AOX metabolisiert werden. Für die Purinsubstrate Hypoxanthin und Xanthin konnten für die rekombinante mAOX1 keine Substratumsetzungen gemessen werden. Phthalazin, Hypoxanthin und Xanthin sind für die native mAOX1 bisher noch nicht beschrieben.

Da die kinetischen Parameter allerdings für das rekombinante wie für das native Protein sehr ähnlich sind, verdeutlicht dies, dass das mAOX1 Protein während der Koexpression mit mMCSF in *E. coli* korrekt gefaltet wurde und für weitere Analysen verwendet werden konnte. EPR-Daten der rekombinanten mAOX1 zeigten große Übereinstimmungen mit denen der bakteriellen *R. capsulatus* XDH (Schumann *et al.*, 2008). Für die mAOX1 wurde ein axiales Signal für das FeSI-Zentrum identifiziert. Geringe Unterschiede in den g-Werten und den Linienbreiten, besonders für das FeSII-Zentrum, können auf die geringfügig veränderten Bindungslängen und Bindungswinkeln der Liganden für die entsprechenden FeS-Zentren hindeuten (Schumann *et al.*, 2008). Unberücksichtigt dieser minimalen Unterschiede, weisen die EPR-Parameter auf die gleiche Ligandenstruktur sowie eine gleiche geometrische Anordnung der beiden FeS-Redoxzentren in mAOX1 und *R. capsulatus* XDH hin. Die bereits 1982 von Barber *et al.* publizierten EPR-Daten der AO aus Kaninchenleber sind denen der mAOX1 ebenfalls sehr ähnlich und stimmen mit einem axialen Signal für FeSI überein. Allgemein konnte gezeigt werden, dass die EPR-Spektren der mAOX1, der AO aus Kaninchenleber sowie der bakteriellen *R. capsulatus* XDH sich deutlich von denen eukaryotischer XORs unterscheiden, was auf Unterschiede in der elektrostatischen Umgebung der FeS-Zentren und deren räumliche Beziehung untereinander zurück zu führen ist.

Das Expressionssystem der mAOX1 sollte ebenfalls auf die Expression der hAOX1 übertragen werden. Um die Mocosulfurierung zu gewährleisten, wurde die hMCSF kloniert und gemeinsam mit der hAOX1 im *E. coli* TP1000 Stamm exprimiert. Die Reinigung der

hAOX1 erzielte ein Protein mit einer Ausbeute von 0,5 mg/mL aus 12 L *E. coli* Kultur. SDS-PAGE Analysen zeigten, dass diese AO im Vergleich zur mAOX1 die drei zusätzlichen Degradationsprodukte (120, 80 und 50 kDa) in geringerer Intensität im Vergleich zur Monomerbande aufweist. Dies kann darauf hindeuten, dass das Protein unter reduzierenden Bedingungen stabiler als die mAOX1 ist. Die Aufnahme eines UV-VIS-Absorptionsspektrums und eines CD-Spektrums deutet auf den Einbau der drei Kofaktoren (FAD, FeS und Moco) hin. Das Absorptionsverhältnis A_{450}/A_{550} von 3,0 bestätigt, dass der FAD : FeS Gehalt in einem Verhältnis von 1:4 vorliegt und somit beide Kofaktoren vollständig eingebaut sind.

Der Vergleich der CD-Spektren der oxidierten und reduzierten mAOX1 und hAOX1 zeigte große Ähnlichkeiten in Form und Intensität zu *Comamonas acidovorans* XDH sowie zu humaner XOR und XOR vom Rind (Xiang *et al.*, 1996; Godber *et al.*, 2005). Die beiden Spektren der oxidierten Proteine zeigen zwei Peakmaxima im positiven Bereich, welche den Einbau beider FeS-Redoxzentren bestätigen. Die Reduktion mit Natriumthionit kann zusätzlich die Funktionalität dieser beiden Redoxzentren belegen.

Aktivitätsmessungen zeigten allerdings, dass das Protein nahezu inaktiv ist. Dies kann mehrere Ursachen haben: zum einen kann der terminale Schwefel am Moco fehlen, zum anderen können die vier Aminosäureaustausche (I224T, I410F, 796I, R802C) die Proteinfaltung oder die Substraterkennung bzw. die Substratbindung beeinflussen, außerdem kann der hohe Anteil an aggregiertem Protein von 80 % (siehe Größenausschlusschromatografie) ebenfalls auf die niedrige katalytische Aktivität hinweisen. Nachdem die Reinigung für dieses Protein optimiert wurde, müssen auch hier die Expressionsbedingungen für die beiden Proteine hMCSF und hAOX1 verbessert werden.

4.2.2 Unterschiede in der Aldehyd-Oxidase-Aktivität

Zahlreiche Studien belegen, dass die hepatische Aldehyd-Oxidase-Aktivität zwischen den Tierspezies (Krenitsky *et al.*, 1974), zwischen Tierstämmen innerhalb der gleichen Spezies (Sugihara *et al.*, 1995) und innerhalb der humanen Population (A.S. Rodrigues, 1994; H.S. Al-Salmy, 2001) stark variiert. Eine substratabhängige Variation der AO-Aktivität für Cytosolfractionen aus Leberpräparaten wurde bereits für verschiedene Rattenstämme gezeigt. So konnte Sugihara *et al.* (1995) für Benzaldehyd zwischen den Rattenstämmen Sea:SD und WKA/sea rats einen 63,5-fachen AO-Aktivitätsunterschied bestimmen. Kitamura *et al.* (1999) konnte ebenfalls in Lebercytosolfractionen von Ratten für das Krebsmittel Methotrexat sogar einen bis zu 104-fachen AO-Aktivitätsunterschied messen. Da die pharmakologische Wirkung eines Medikaments in engem Zusammenhang mit der Stoffwechselrate des Wirkstoffes steht, sind die individuellen Unterschiede in der AO-

Aktivität besonders für verschreibungspflichtige Medikamente von großem Interesse. Al-Salmy charakterisierte 2001 in einer Studie mit 13 kaukasischen Probanden (männlichen und weiblichen Geschlechts, im Alter von 41 – 73 Jahren, Raucher sowie Nichtraucher) die cytosolischen AOX-Fractionen mit Hilfe von Benzaldehyd und DACA (N-[(2-Dimethylamino)ethyl]Acridin-4-Carboxamid, ein zytotoxisches Medikament, welches die DNA durch Einlagerung bindet und die DNA-Spaltung stimuliert). Al-Salmy konnte einen individuellen Unterschied in den kinetischen Parametern zeigen, so betrug der K_m -Mittelwert für das Produkt DACA-9(10H)-Acridon $K_m = 8,3 \mu\text{M}$ ($3,5 - 14,2 \mu\text{M}$) und der Mittelwert für $v_{\text{max}} = 1,2 \text{ nmol/min/mg}$ ($0,2 - 3,1 \text{ nmol/min/mg}$). Für das Produkt Benzoessäure ergab sich ein K_m -Mittelwert von $K_m = 8,6 \mu\text{M}$ ($3,6 - 14,6 \mu\text{M}$) sowie für $v_{\text{max}} = 6,1 \text{ nmol/min/mg}$ ($3,6 - 12,6 \text{ nmol/min/mg}$). Zwischen beiden Substraten wurde keine Korrelation erkannt, weder zwischen den Geschlechtern, noch zwischen dem Alter oder dem Gesundheitszustand der Probanden. Diese Studie deutet auf individuelle Unterschiede in der AOX-Aktivität hin, es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die hAOX1-Aktivität sehr schwankend ist, da bereits von Duley *et al.* (1985) eine abnehmende AO-Aktivität während der Homogenisierung und der Lagerung der Cytosolfractionen bemerkt wurde. Daher ist es besonders wichtig, den Unterschied in der Aktivität und der Stabilität der humanen hepatischen Enzyme aufzuklären. Bisher sind für das Substrat Benzaldehyd sehr unterschiedliche kinetische Parameter in Studien mit Probanden unterschiedlichster Nationalität bestimmt worden. So ermittelte Al-Salmy für die Effizienz (V_{max}/K_m) von Benzaldehyd einen 2,75-fachen Unterschied innerhalb der Testgruppe, Rodrigues konnte dies (3,6-facher Unterschied) bereits 1994 zeigen. Sugihara *et al.* (1997) fand allerdings für das gleiche Substrat eine 50-fache Variation für die Effizienz. Dieser Widerspruch in der AO-Aktivität könnte durch genetischen Polymorphismus erklärt werden. Da es keinerlei Zusammenhang zwischen den kinetischen Parametern für die Substrate DACA und Benzaldehyd gab, spekuliert Al-Salmy auf die Beteiligung verschiedener Isoenzyme am Metabolismus dieser beiden Substrate. Ein Mechanismus für die Regulation dieser Isoenzyme wurde allerdings noch nicht aufgeklärt. Bekannt ist allerdings, dass ein einzelnes Gen die hAOX1 kodiert (Terao *et al.*, 1998). Dies impliziert, dass post-translationale Mechanismen für die Erzeugung der Isoenzyme verantwortlich sein können. Beedham C. hat bereits 1985 einen Unterschied in der AO-Aktivität bei männlichen und weiblichen Mäusen beobachtet, somit kann der Einfluss des Geschlechtes auf die Aktivität der hAOX1 noch nicht ausgeschlossen werden, da auch bislang nur unzureichende Probandenstudien durchgeführt worden. Ein weiterer Einfluss auf die AO-Aktivität können Zytokine haben, deren Zellkonzentration bei zahlreichen Erkrankungen leicht erhöht ist (Reiss *et al.*, 1998). Für therapeutische Ansätze sollten daher keine Standarddosierungen mehr verwendet werden, sondern eine individuelle Dosierung auf jeden Patienten angepasst werden.

Die kürzlich von Itoh *et al.* (2007a, 2007b) veröffentlichten Studien über einen genetischen Polymorphismus bei Donryu Ratten (karzinogen-sensitiver Stamm) zeigen, dass ein Aminosäureaustausch Glycin zu Serin an Position 110 sowie der Austausch Alanin zu Valin an Position 852 zu erheblichen AO-Aktivitätsverlusten führt. Itoh *et al.* zeigten ebenfalls, dass bei dem Aminosäureaustausch G110S nur eine monomere AO gebildet wird. Die fehlende Dimerbildung und der gleichzeitige AO-Aktivitätsverlust könnten daher diesem Aminosäureaustausch zugeschrieben werden. Diese Vermutung kann ebenfalls damit bestätigt werden, dass das Gly110 bei Mensch, Affe, Rind, Kaninchen, Ratte und Maus konserviert ist. Für die in der Sequenz der hAOX1 identifizierten vier Aminosäureaustausche (I224T, I410F, 796I, R802C) und deren eventueller Einfluss auf die Substratspezifität erfolgten bislang noch keine Untersuchungen. Die Überprüfung der Oligomerisationszustände zeigte, dass das rekombinante hAOX1-Protein aus einem Gemisch von Dimeren und Multimeren besteht. Demnach scheint keines der vier Aminosäureaustausche eine Monomerbildung zu bewirken. Eines oder mehrere in Kombination der vier Aminosäureaustausche könnten eine Veränderung in der Proteinfaltung bewirken. Diese Konformationsänderung könnte sich negativ auf die Ausrichtung der Kofaktoren auswirken, indem der Elektronentransfer zwischen dem Molybdänzentrum und dem FAD beeinflusst wird (Wilson *et al.*, 2006). Dies muß in weiterführenden Studien genauer untersucht werden.

4.2.3 Vergleich von heterolog exprimierten XOR und AOX1

Bislang wurde die heterologe Expression in *E. coli* von eukaryotischen XORs und AOs nur für die humane XO, die AO aus Ratten sowie für die AO von Langschwanzmakakenäffchen beschrieben (Yamaguchi *et al.*, 2007; Adachi *et al.*, 2007; Hoshino *et al.*, 2007, Asakawa *et al.*, 2008). Allen Expressionssystemen gemein ist der geringe Gehalt an gereinigtem aktivem Protein, da keine Koexpression mit der entsprechenden eukaryotischen Mocosulfurase erfolgte. Des Weiteren sind deutliche Unterschiede im Proteinbandenmuster im SDS-Polyacrylamidgel zu erkennen. So weist keines der drei heterolog exprimierten XOR/AO-Proteine, die bei der mAOX1 mit Massenspektrometrie identifizierten zusätzlichen Degradationsprodukte von 120, 80 und 60 kDa in ähnlicher Intensität auf. Yamaguchi *et al.* (2007) zeigten in einem SDS-Polyacrylamidgel des Wildtyps und der beiden Varianten E803V und R881M der hXO eine deutliche Proteinbande des hXO-Monomers. Zwei weitere Proteinbanden mit den Größen von 83 kDa und circa 55 kDa sind allerdings nur sehr schwach mit Comassie Brilliant Blau im Vergleich zur Monomerbande angefärbt und wurden nicht weiter beschrieben. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, ob diese Proteinbanden *E. coli* Proteine oder Degradationsprodukte der hXO sind. Die Intensität des Protein-

bandenmusters der hXO gleicht damit deutlicher dem SDS-Polyacrylamidgel der rekombinanten hAOX1 (diese Arbeit). Die humane XO sowohl auch die humane AOX1 scheinen damit stabiler gegenüber reduzierenden Bedingungen zu sein, als die mAOX1.

Asakawa *et al.* (2008) haben kürzlich die Eigenschaften einer 130 kDa Untereinheit hinsichtlich ihrer Struktur und der enzymatischen Aktivität untersucht. Sowohl das nativ wie auch das rekombinant gereinigte AO-Protein der Makakenäffchen (MfAOX1) zeigten diese zusätzliche 130 kDa Proteinbande. Mit Hilfe des Edman-Abbaus wurde die Spaltstelle zwischen den Aminosäuren Leu188 und Pro189 der MfAOX1 identifiziert. Diese beiden Aminosäuren liegen in der Bindungsregion zwischen der FeS- und der FAD-Domäne und konnten für die humane und die MfAO, nicht aber für die native AO aus Ratte und Maus identifiziert werden. Den beiden zuletzt genannten AOs fehlt diese Leucin-Prolin-Schnittstelle, die AOX1 aus Rattenleber besitzt stattdessen an dieser Position Ser188 und Ala189 und die Maus AOX1 ein Leu188 und Pro189. Die beiden Aminosäuren an dieser Stelle können einen Unterschied für die Bildung dieser zusätzlichen 130 kDa Untereinheit innerhalb der Säugetierarten repräsentieren, sie sind aber keinesfalls an der unterschiedlichen AO-Aktivität zwischen den Arten beteiligt, da durch Abspaltung der FeS-Domäne ein wichtiges Redoxzentrum für die AO-Aktivität fehlt.

4.2.4 Gegenüberstellung der beiden publizierten Reaktionsmechanismen für XOR

Eukaryotische XOR and AO ähneln sich in der Proteinstruktur und der Zusammensetzung der prosthetischen Gruppen, unterscheiden sich allerdings bei der Substratspezifität am Molybdän- und FAD-Zentrum (Garattini *et al.*, 2003; Krenitsky *et al.*, 1972). Während die AO eine „echte“ Oxidase ist, die molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwendet, existiert die XOR in zwei ineinander überführbaren Formen: NAD⁺ dient als Elektronenakzeptor, wenn die XDH-Form vorliegt, während hingegen nach proteolytischer Spaltung oder intramolekularer Disulfidbrückenbildung die XO-Form gebildet wird, die anstelle von NAD⁺ molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwendet. Die Hydroxylierung von Aldehyden und Purinsubstraten wird bei AO und XOR am Molybdänzentrum katalysiert. Krenitsky *et al.* (1972) zeigten bereits, dass die AOs diese Aldehydhydroxylierung effizienter katalysieren als die XORs. Im Gegensatz dazu werden Purine, wie Xanthin und Hypoxanthin, leichter und effizienter von XORs katalysiert, sind aber schlechte Substrate für AOs.

Wie bereits von Truglio *et al.* (2002), Leimkühler *et al.* (2004) und Pauff *et al.* (2007) konnte über die Funktion der konservierten Aminosäuren im aktiven Zentrum der *R. capsulatus* XDH ein Modell für den Mechanismus der Substratbindung und Substratumsetzung aufgestellt

werden. Abb. 4.2 zeigt die Substratbindungstasche mit gebundenem Xanthin sowie den drei an der Katalyse beteiligten Aminosäuren. Truglio *et al.* (2002) identifizierten in der Kristallstruktur der *R. capsulatus* XDH mit gebundenem Alloxanthin die an der Substratbindung beteiligten drei Aminosäurereste E_B232, R_B310 und E_B730. Untersuchungen zur Funktionsaufklärung der an der Katalyse beteiligten Glutamatreste E_B232 und E_B730 durch Leimkühler *et al.* (2004) verdeutlichen für Glu232 eine wichtige Rolle in der Substratbindung sowie für die Stabilisierung des Übergangszustandes.

Um die Funktion des Arg310 aufzuklären, wurden die Varianten R310K und R310M hergestellt (Pauff *et al.*, 2007). Der Aminosäureaustausch wurde nach Sequenzvergleichen von Xanthin- und Aldehyden-metabolisierenden Enzymen gewählt. Die Röntgenkristallstruktur der *R. capsulatus* XDH mit dem gebundenen Inhibitor Alloxanthin zeigt, dass Arg310 eine Wasserstoffbrückenbindung zum C₆-Carbonylsauerstoff des Alloxanthins eingeht. Für die Variante R310K konnte im Vergleich zum XDH-Wildtyp eine um das 15-fach verlangsamte Xanthinhydroxylierung gemessen werden, wobei die Dissoziationskonstante sich verdoppelte. Der Aminosäureaustausch Lysin hat damit keinen wesentlichen Effekt bei der Xanthinumsetzung. Im Gegensatz dazu wurde für die Variante R310M eine um das 1000-fach verlangsamte Hydroxylierung des Substrates Xanthin gemessen, was auf eine Depositionierung der neu eingeführten Aminosäure Methionin hinweist. Diese Vermutung wurde ebenfalls durch die nicht bestimmbare Dissoziationskonstante K_d bestätigt, was auf eine sehr schlechte Substratbindung hinweist. Die in Aldehyd-Oxidasen im aktiven Zentrum konservierte Aminosäure Methionin besitzt offensichtlich nicht die gleiche Funktion wie Arginin in XORs und scheint damit keine Stabilisierungen von negativen Ladungen in Purinen übernehmen zu können.

Der dazu vorgeschlagene Mechanismus der Xanthinoxidation ist in Abb. 4.2 dargestellt. Arg310 ist weit genug vom Molybdänzentrum sowie vom C-8-Atom des Xanthins entfernt. Durch die heterozyklische Form des Xanthins entsteht eine negative Ladung am C₆-Carbonylsauerstoff die durch elektrostatische Wechselwirkung mit dem Arginin stabilisiert wird. Die damit herabgesetzte Aktivierungsenergie für die Xanthinhydroxylierung steigert die Substratumsetzung. Die Positionierung des Xanthins auf diese Weise (C₆-Carbonylsauerstoff zeigt zum Arg310 und der C₂-Carbonylsauerstoff zeigt in Richtung Glu232) wird daher von Pauff *et al.* bevorzugt. Die Aminosäure Glu730 ist der Initiator der Katalyse. Hierbei greift die Aminosäure nukleophil die Mo-OH Gruppe an und nimmt ein Proton auf (Huber *et al.*, 1996), die so entstandene Mo-O: Gruppe greift ihrerseits ebenfalls als Nukleophil das C-8-Atom des Xanthins an. Indem ein Proton vom Substrat auf die Mo=S Gruppe übertragen wird (Mo-SH), kann das Substrat an das Molybdänatom binden, es entsteht der Übergangszustand, in dem Mo^{IV} entsteht. Das Glu232 bindet dabei das Xanthin über Wasserstoffbrücken am C₂-Carbonylsauerstoff sowie am N₇-Atom und stabilisiert damit gleichzeitig den Übergangs-

zustand. Die für die Hydroxylierung des Xanthins zu Harnsäure notwendige OH-Gruppe stammt vom Wasser des Lösungsmittels. Mit der gleichzeitigen Freigabe des Produktes Harnsäure werden die reduzierenden Äquivalente in Ein-Elektronenschritten über die Eisen-Schwefel-Zentren zum Flavin transportiert. Der terminale Elektronenakzeptor ist NAD^+ .

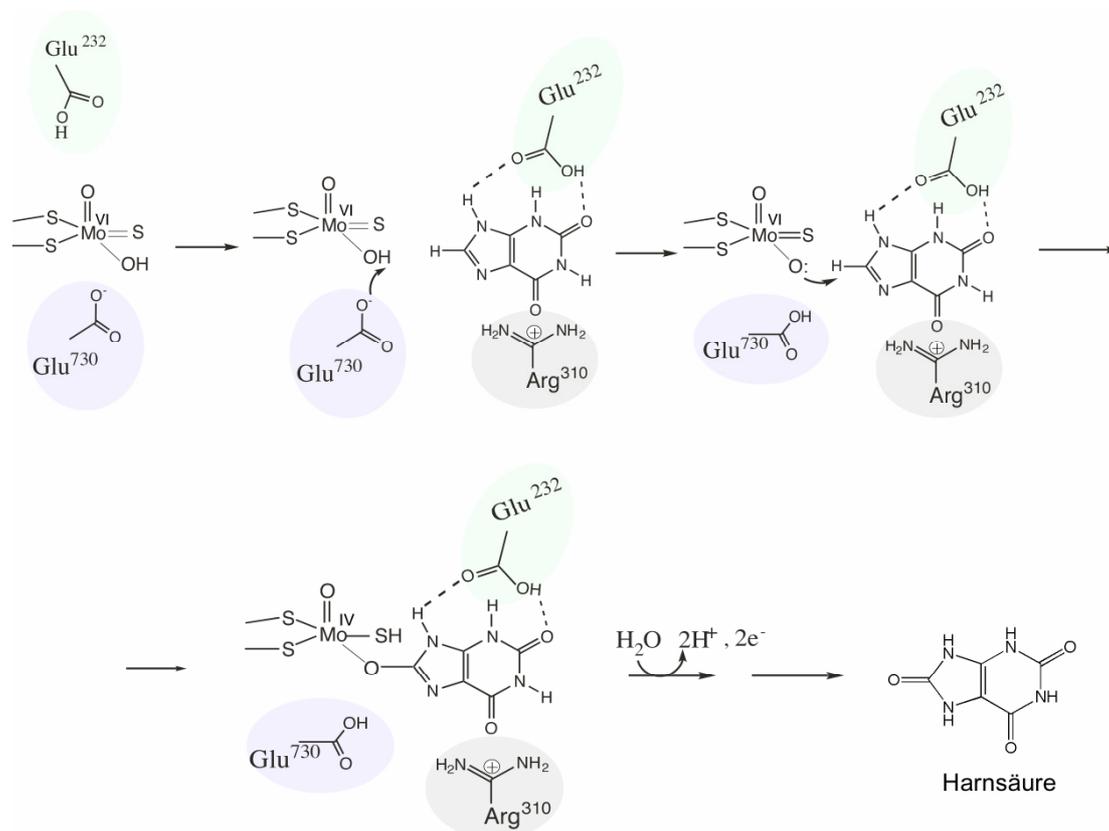


Abb. 4.2 Darstellung der an der Xanthinoxidation beteiligten konservierten Aminosäuren im aktiven Zentrum der *R. capsulatus* XDH (nach Pauff *et al.*, 2007): Das Glu232 ist für die Substratbindung sowie für die Stabilisierung des Übergangszustandes verantwortlich. Die basische Aminosäure Arg310 stabilisiert mit ihrer delokalisierten positiven Ladung negative Ladungen an Atomen von Substratmolekülen. Das Glu730 initiiert durch nukleophilen Angriff auf die Mo-OH Gruppe die Substratkatalyse.

Yamaguchi *et al.* (2007) schlugen einen anderen Reaktionsmechanismus für gebundenes Xanthin im aktiven Zentrum der humanen XO vor, welcher nicht mit dem von Pauff & Hille (2007) publizierten Reaktionsmechanismus der *R. capsulatus* XDH übereinstimmt. So zeigten Yamaguchi *et al.* für Oxypurinol wie auch für Xanthin eine andere Bindungsorientierung, wie in Abb. 4.3 zu erkennen. Aus der hXO-Kristallstruktur von Yamaguchi *et al.* geht hervor, dass Arg881 (Arg880 bei rXOR) den C₂-Carbonylsauerstoff über eine Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert und Glu803 (Glu802 bei rXOR) über den C₆-Carbonylsauerstoff sowie über das N₉-Atom Wasserstoffbrückenbindungen zur Stabilisierung aufbaut. Da der C₂-Carbonylsauerstoff und das N₉-Atom direkte Nachbarn

sind, ist der Abstand der Wasserstoffbrückenbindungen im Modell von Yamaguchi geringer als bei Pauff. Zusätzlich sprechen Yamaguchi *et al.* der Aminosäure Glu1262 (Glu1261 bei rXOR) ebenfalls eine stabilisierende Wirkung zu. Das gebundene Substrat wird zusätzlich über das N₇-Atom über eine Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert (Huber *et al.*, 1996; Nishino *et al.*, 2008).

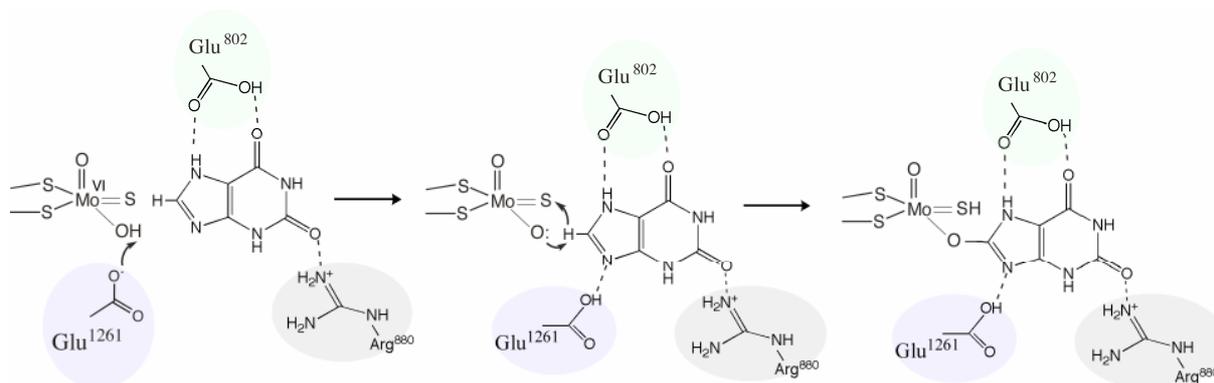


Abb. 4.3 Ausschnitt aus dem Modell der Xanthinoxidation und die beteiligten konservierten Aminosäuren im aktiven Zentrum der rXOR (nach Yamaguchi *et al.*, 2007): Das Glu802 ist für die Substratbindung sowie für die Stabilisierung des Übergangszustandes verantwortlich. Die basische Aminosäure Arg880 stabilisiert negative Ladungen an Atomen von Substratmolekülen. Das Glu1261 initiiert durch nukleophilen Angriff auf die Mo-OH Gruppe die Substratkatalyse und stabilisiert ebenfalls über eine Wasserstoffbrückenausbildung das gebundene Substrat.

4.2.5 Charakterisierung der konservierten Aminosäuren im aktiven Zentrum der mAOX1

Die analogen Aminosäuren in der Substratbindungstasche der *R. capsulatus* XDH sind für die mAOX1 Val806 bzw. Met884. Um die Bedeutung dieser beiden Aminosäuren für die Selektivität gegenüber von Aldehyden zu untersuchen, wurde Val802 gegen ein Glutamat und M884 gegen ein Arginin ausgetauscht und alle erzeugten Varianten erstmalig heterolog, analog dem mAOX1-Wildtyp, in *E. coli* exprimiert. Da die gleichzeitige Einführung eines Valin- und Methioninaustausches in die Substratbindungstasche der *R. capsulatus* XDH ein vollständig inaktives Enzym gegenüber Hypoxanthin und Xanthin lieferte, sollten die Änderungen in der Substratspezifität für die mAOX1-Varianten Aufschluss über die Funktion der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren geben. Für einen besseren Vergleich in der Substratspezifität wurden neben den vier mAOX1-Varianten V806E, M884R, V806E/M884R und E1265Q ebenfalls die drei *R. capsulatus* XDH-Varianten E232V, R310M und E232V/R310M heterolog exprimiert, gereinigt und mit den gleichen Aldehyds substraten sowie Xanthin und Hypoxanthin vermessen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Doppelvariante E232V/R310M ihre Aktivität gegenüber Purinsubstraten vollständig verlor und für Aldehyde eine gesteigerte Aktivität zeigte. Im Gegensatz zu Yamaguchi *et al.* (2007) konnte in dieser Arbeit die Doppel-XDH-Variante E232V/R310M gereinigt werden.

Für die analog ausgetauschten Aminosäuren im aktiven Zentrum der mAOX1 konnte jedoch nicht wie bei Yamaguchi *et al.* die gleiche Tendenz für die Aldehyd- und Purinsubstrate beobachtet werden, obwohl die Aktivität gegenüber den Aldehyden vollständig verloren gegangen ist, war keine Aktivität gegenüber Xanthin oder Hypoxanthin messbar. Es weist darauf hin, dass beide Aminosäuren im aktiven Zentrum der mAOX1 essentiell für die Bindung bzw. Erkennung der Substrate sind. Für die mAOX1-Variante M884R konnte bereits ein vollständiger Verlust der Substratumsetzung für Phthalazin und Acetaldehyd beobachtet werden, die Aktivität für Benzaldehyd und Retinaldehyd war stark verringert, was sich in einer Zunahme der Substratspezifität (K_m) für Benzaldehyd widerspiegelte. Die katalytischen Parameter für die V806E-Variante änderten sich in der Zunahme der K_m -Werte für alle Aldehyde (bis auf Retinaldehyd) und in der gleichzeitigen Abnahme der k_{cat} -Werte. Dies deutet darauf hin, dass die Affinität kleiner und symmetrisch aromatischer Aldehyde (siehe Abb. 4.4) durch diese Mutation stärker beeinflusst wird, während die Affinität gegenüber stärkeren hydrophoben Aldehyden, wie z. B. Retinaldehyd, erhöht wurde.

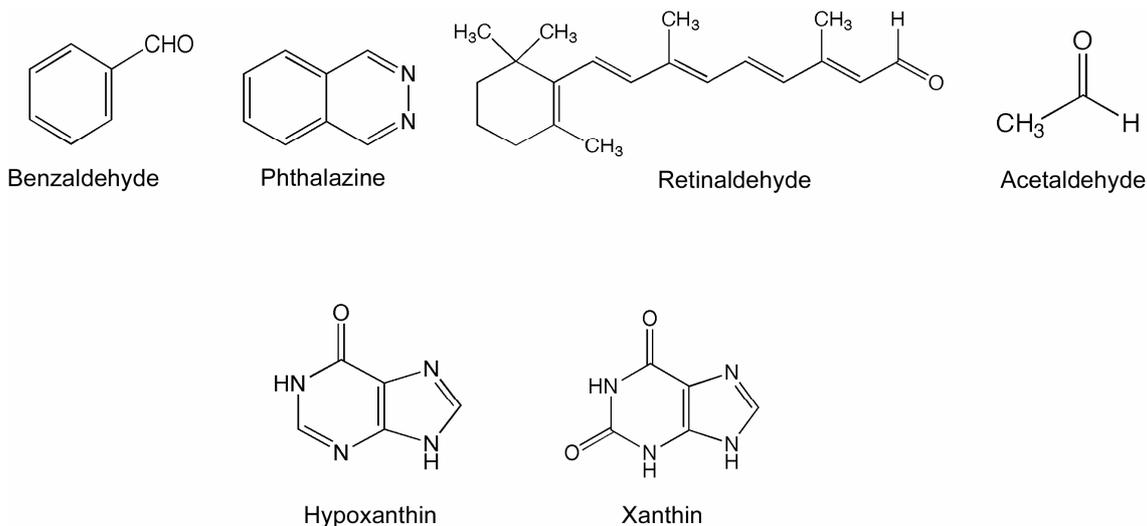


Abb. 4.4 Darstellung der Strukturformeln der verwendeten Substrate für die mAOX1-Varianten sowie die *R. capsulatus* XDH-Varianten

Die Fähigkeit, Aldehydssubstrate zu binden und zu metabolisieren, wurde durch den Austausch der beiden Aminosäuren, welche analog im aktiven Zentrum der *R. capsulatus* XDH vorkommen, herabgesetzt. Eine Hydroxylierung von Xanthin oder Hypoxanthin konnte jedoch mit keiner der erzeugten mAOX1-Varianten erzielt werden. Während in der *R. capsulatus* XDH die beiden Aminosäurereste E232 und R310 dafür verantwortlich sind, welches Substrat wie gebunden wird und wie effizient es metabolisiert wird, scheinen bei der mAOX1 zusätzliche Faktoren die Substratbindung und deren Umsetzung zu beeinflussen. Die mAOX1 ist damit vorrangig auf Aldehydssubstrate adaptiert und kann ihre Substratspezifität durch die Einführung von zwei der XDH analogen Aminosäuren im aktiven Zentrum nicht einfach für Purine umwandeln.

Die Substratbindungstasche befindet sich tief im Enzym, die jedoch durch eine tunnelförmige Öffnung erreichbar ist. Bei der *R. capsulatus* XDH dominieren dabei besonders hydrophobe Aminosäurereste diesen Bereich (L_B303 , P_B306 , F_B344 , F_B459) (Truglio *et al.*, 2002). Diese Aminosäuren sind in der mAOX1 gegen solche Aminosäuren ersetzt, die stärker geladen und/oder hydrophober sind oder größere bzw. längere Seitenketten besitzen (E887, W890, F918, I1013) (Garattini *et al.*, 2003). Damit ist es möglich, dass die aromatischen Purine, die in dieser Arbeit für die Kinetikstudien verwendet wurden, nicht in der Lage sind, das aktive Zentrum der mAOX1 zu erreichen.

4.2.6 Modell des katalytischen Reaktionsmechanismus der mAOX1

Wie bereits für die E730A-Variante in *R. capsulatus* XDH beschrieben, war auch die mAOX1-Variante E1265Q katalytisch inaktiv. Dieses Ergebnis bestätigt die entscheidend wichtige katalytische Funktion dieser Aminosäure (Garattini *et al.*, 2007). Wie bereits für die *R. capsulatus* XDH beschrieben, kann auch Glu1265 in der mAOX1 die Rolle als Base übernehmen und somit das Proton der Mo-OH Gruppe angreifen und dieses aufnehmen. Das freie Elektronenpaar der so entstandenen Mo=O: Gruppe greift seinerseits das Kohlenstoffatom in der Aldehydgruppe des Benzaldehyds an. Der äquatorial angeordnete Schwefel (Mo=S) kann nun ein Hydridion des reaktiven C-Atoms der Aldehydgruppe aufnehmen, resultierend in einer Mo-SH Gruppe. Das Molybdän wird dabei in den Oxidationsstatus IV reduziert. Die beiden konservierten Aminosäuren Val806 und Met884 stabilisieren währenddessen den Übergangszustand des gebundenen Substrates. Da vorrangig spiegelsymmetrisch aromatische Aldehyde getestet wurden, ist eine Aussage über die Orientierung des jeweiligen Substrates nicht möglich bzw. nicht relevant. Wie in Abb. 4.5 zu erkennen, können Val806 und Met884 die Aldehyde vermutlich über Van-der-Waals Wechselwirkungen stabilisieren, unabhängig von der Orientierung des Substrates. Zur vollständigen Hydroxylierung des Aldehyds werden zwei Wasserstoffionen sowie zwei Elektronen benötigt, die vom Lösungsmittel Wasser stammen. Mit der gleichzeitigen Freigabe der entstandenen Carbonsäure werden die reduzierenden Äquivalente in Ein-Elektronenschritten über die Eisen-Schwefel-Zentren zum Flavin transportiert, welches vollständig reduziert wird (FADH₂). Dieses kann durch molekularen Sauerstoff reoxidiert werden.

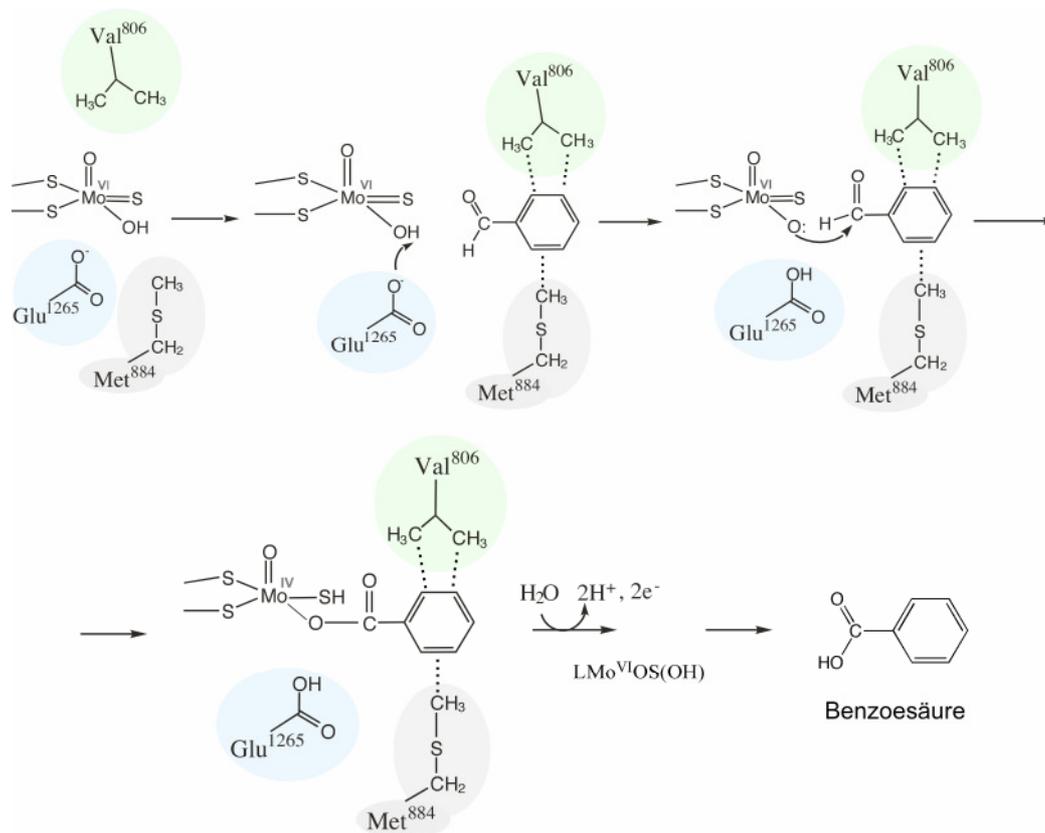


Abb. 4.5 Modell für die Oxidation von Benzaldehyd der mAOX1: Val806 ist für die Substratbindung sowie für die Stabilisierung des Übergangszustandes verantwortlich. Met884 fungiert als Aminosäure für die Substraterkennung. Glu1265 initiiert durch nukleophilen Angriff auf die Mo-OH Gruppe die Substratkatalyse.

5 Zusammenfassung

Die Xanthin-Dehydrogenase aus *Rhodobacter capsulatus* ist ein cytoplasmatisches Enzym, welches ein $(\alpha\beta)_2$ Heterotetramer mit einer Größe von 275 kDa bildet. Die drei Kofaktoren (Moco, 2[2Fe2S], FAD) sind auf zwei unterschiedlichen Polypeptidketten gebunden. So sind die beiden spektroskopisch unterscheidbaren Eisen-Schwefel-Zentren und das FAD in der XdhA-Untereinheit und der Moco in der XdhB-Untereinheit gebunden. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, warum die *R. capsulatus* XDH ein Dimer bildet und ob ein intramolekularer Elektronentransfer existiert. Dafür wurde eine chimäre XDH-Variante $[(\alpha)_2(\beta_1\text{wt}/\beta_2\text{E730A})]$ erzeugt, welche eine aktive und eine inaktive XdhB-Untereinheit trägt. Mit Hilfe von Reduktionsspektren sowie mit der Bestimmung der kinetischen Parameter für die Substrate Xanthin und NAD^+ konnte gezeigt werden, dass die chimäre XDH-Variante katalytisch halb so aktiv war, wie der auf gleiche Weise gereinigte XDH-Wildtyp. Dies verdeutlicht, dass die noch aktive Untereinheit der Chimären selbstständig und unabhängig Substrat binden und hydroxylieren kann und ein intramolekularer Elektronentransfer zwischen den beiden XdhB-Untereinheiten nicht stattfindet.

Ein weiteres Ziel war die funktionelle Charakterisierung der *Mus musculus* AOX1 sowie der humanen AOX1 hinsichtlich ihrer Substratspezifitäten und ihrer biophysikalischen Eigenschaften sowie der Charakterisierung der konservierten Aminosäuren im aktiven Zentrum der mAOX1. Da bislang noch kein heterologes Expressionssystem für ein aktives und stabiles rekombinantes AO-Protein existierte, wurde ein *E. coli* Expressionssystem mit der gleichzeitigen Expression der entsprechenden Mocosulfurase für mAOX1 und hAOX1 in dieser Arbeit etabliert. Mit Hilfe dieser Koexpression konnte die Aktivität der rekombinanten mAOX1 um 50 % gesteigert werden, wenn gleich auch der sulfurierte Moco-Anteil nur 20 % betrug.

Um die konservierten Aminosäuren im aktiven Zentrum hinsichtlich ihrer Funktion der Substratbindung zu charakterisieren, wurden folgende Varianten erzeugt: V806E, M884R, V806/M884R sowie E1265Q. Mit Hilfe von kinetischen Substratuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die beiden Aminosäuren Val806 und Met884 für die Erkennung und die Stabilisierung von Aldehyden und N-Heterozyklen essentiell sind. Ein Austausch dieser beiden gegen Glutamat bzw. Arginin (wie bei *R. capsulatus* XDH) zeigte jedoch keine Xanthin- oder Hypoxanthinumsetzung. Für das Glu1265 wurde ebenfalls die Rolle als die Katalyse initiiierende Aminosäure belegt.

6 Literaturverzeichnis

- Adachi, M.; Itho, K.; Masubuchi, A.; Watanabe, N.; Tanaka, Y. (2007). "Construction and Expression of Mutant cDNAs Responsible for Genetic Polymorphism in Aldehyde Oxidase in Donryu Strain Rats." J Biochem Mol Biol **40**(6): 1021-1027.
- Anderson, GL; Williams, J.; Hille, R.; (1992). "The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase." J Biol Chem **267**(33): 23674-82.
- Al-Salmy, H. S. (2001). "Individual variation in hepatic aldehyde oxidase activity." IUBMB Life **51**(4): 249-53.
- Anderson, R.F. Hille, R., and Massey, V. (1986). "The radical chemistry of milk xanthine oxidase as studied by radiation chemistry technique." J Biol Chem **261**(34): 15870-15876.
- Amrani, L., Cecchetto, G. et al. (1999). "The hxB gene, necessary for the post-translational activation of purine hydroxylases in *Aspergillus nidulans*, is independently controlled by the purine utilization and the nicotinate utilization transcriptional activating systems." Mol Microbiol **31**(4): 1065-73.
- Amrani, L., Primus, J. et al. (2000). "Comparison of the sequences of the *Aspergillus nidulans* hxB and *Drosophila melanogaster* ma-I genes with nifS from *Azotobacter vinelandii* suggests a mechanism for the insertion of the terminal sulphur atom in the molybdopterin cofactor." Mol Microbiol **38**(1): 114-25.
- Asakawa, T.; Itho, K.; Adachi, M.; Hoshino, K.; Watanabe, N.; Tanaka, Y. (2008). "Properties of 130 kDa Subunit of Monkey Aldehyde Oxidase." Biol. Pharm. Bull. **31**(3): 380-.
- Bartels, H. (1930). "Molybdän als Katalysator der biologischen Stickstoffbindung." Arch. Mikrobiol. **1**: 333-342.
- Baudry, N., Laemmel, E. et al. (2008). "In vivo reactive oxygen species production induced by ischemia in muscle arterioles of mice: involvement of xanthine oxidase and mitochondria." Am J Physiol Heart Circ Physiol **294**(2): H821-8.
- Beedham, C., Critchley, D.J. et al. (1995). "Substrate specificity of human liver aldehyde oxidase toward substituted quinazolines and phthalazines: a comparison with hepatic enzyme from guinea pig, rabbit, and baboon." Arch Biochem Biophys **319**(2): 481-90.
- Beedham, C., (1985). "Molybdenum hydroxylases as drug-metabolizing enzymes." Drug Metab Rev **16**(1-2): 119-156.
- Bhattacharyya, A., Tollin, G., Davis, M. and Edmondson D.E. (1983) "Laser flash photolysis studies of intramolecular electron transfer in milk xanthine oxidase." Biochemistry **22**(23): 5270-5279.
- Bittner, F., Oreb, M. et al. (2001). "ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*." J Biol Chem **276**(44): 40381-4.

- Boer, D.R. ; Thapper, A. et al. (2004). "X-ray Crystal structure and EPR Spectra of Arsenite-inhibited *Desulfovibrio gigas* Aldehyde Dehydrogenase: A member of the Xanthine Oxidase family" J Am Chem Soc **126**: 8614-15.
- Bogaart, A.M. and Bernini, L.F. (1981). "The molybdoenzyme system of *Drosophila melanogaster*. I. Sulfite oxidase: identification and properties. Expression of the enzyme in maroon-like (mal), low-xanthine dehydrogenase (lxd), and cinnamon (cin) flies." Biochem Genet **19**(9-10): 929-46.
- Bordas, J., Bray, R.C., Garner, C.D., Gutteridge, S., Harison, S.S. (1980). "X-ray absorption spectroscopy of xanthine oxidase. The molybdenum centres of the functional and the desulpho forms." Biochem J **191**(2): 499-508.
- Boyington, J.C., Gladyshev, V.N. et al. (1997). "Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe₄S₄ cluster." Science **275**(5304): 1305-8.
- Brondino, C.D. ; Romao, M.J. et al. (2006). "Molybdenum and tungsten enzymes: the xanthine oxidase family" Curr Opin Chem Biol. **10**(2): 109-14.
- Cazzaniga, G., Terao, M. et al. (1994). "Chromosomal mapping, isolation, and characterization of the mouse xanthine dehydrogenase gene." Genomics **23**(2): 390-402.
- Cohen, H.J., Fridovich, I., Rajagopalan, K.V. (1971). "Hepatic sulfite oxidase. A functional role for molybdenum." JBC **246**: 374-382.
- Coughlan, M. P. (1980). "Molybdenum and molybdenum containing enzymes." Pergamon Press. Oxford.
- Courtright, J.B. (1967). "Polygenic control of aldehyde oxidase in *Drosophila*." Genetics **57**(1): 25-39.
- Demontis, S., Kurosaki, M. et al. (1999). "The mouse aldehyde oxidase gene: molecular cloning, chromosomal mapping and functional characterization of the 5'-flanking region." Biochim Biophys Acta **1489**(2-3): 207-22.
- Edmondson, D., V. Massey, et al. (1972). "The resolution of active and inactive xanthine oxidase by affinity chromatography." J Biol Chem **247**(5): 1597-604.
- Enroth, C., Eger, B. T. et al. (2000). "Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 10723-8.
- Forrest, H.S., Hanly, E.W. et al. (1961). "Biochemical differences between the mutants Rosy-2 and maroon-like of *Drosophila melanogaster*." Genetics **46**: 1455-63.
- Garattini, E., R. Mendel, et al. (2003). "Mammalian molybdo-flavoenzymes, an expanding family of proteins: structure, genetics, regulation, function and pathophysiology." Biochem J **372**(Pt 1): 15-32.
- Garattini, E., Fratelli, M. et al. (2007). "Mammalian aldehyde oxidases: genetics, evolution and biochemistry." Cell Mol Life Sci. **65**(7-8): 1019-48. Review

- Gremer, L., Meyer, O. (1996). "Characterization of xanthine dehydrogenase from anaerobic bacterium *Veillonella atypical* and identification of a molybdopterin-cytosine-dinucleotide-containing molybdenum cofactor" Eur J Biochem **238**: 862-66
- Godber, B. L. J.; Sschwarz, G.; Mendel, R.; Lowe, D.J.; Bray, R.C.; Eienthal, R.; Harrison, R. (2005). "Molecular characterization of human xanthine oxidoreductase: the enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron-sulfur centers." Biochemical Journal **388**: 501-508.
- Guerrero, M.G.;Vega, J.M.; Losada, M. (1981). Annu Rev. Plant Physiol **32**, 169
- Hänzelmann, P., H. L. Hernandez, et al. (2004). "Characterization of MOCS1A, an oxygen-sensitive iron-sulfur protein involved in human molybdenum cofactor biosynthesis." J Biol Chem **279**(33): 34721-32.
- Heidenreich, T.; Wollers, S.; Mendel, R.; Bittner, F. (2004). "Characterization of the NifS-like domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration." The Journal of Biological Chemistry **280**(6): 4213-4218.
- Heidenreich, T., Wollers, S. et al. (2005). "Characterization of the NifS-like domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration." J Biol Chem **280**(6): 4213-8.
- Hinton, S.M. and Dean, D. (1990). "Biogenesis of molybdenum cofactors." Crit Rev Microbiol **17**(3): 169-188.
- Hille, R., W. R. Hagen, et al. (1985). "Spectroscopic studies on the iron-sulfur centers of milk xanthine oxidase." J Biol Chem **260**(19): 10569-75.
- Hille, R. and R. F. Anderson (1991). "Electron transfer in milk xanthine oxidase as studied by pulse radiolysis." J Biol Chem **266**(9): 5608-15.
- Hille, R. and Nishino, T. (1995). "Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase." Faseb J **9**(11): 995-1003.
- Hille, R. and Nishino, T. (1995). "Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase." The FASEB Journal **9**: 995-1003.
- Hille, R. (1996). "The Mononuclear Molybdenum Enzymes." Chem. Rev. **96**: 2757-2816.
- Hille, R. (2002). "Molybdenum and tungsten in biology." TRENDS in Biochemical Science **27**(7): 360-367.
- Hinton, S. M. and Dean, D. (1990). "Biogenesis of molybdenum cofactors." Crit Rev Microbiol **17**(3): 169-88.
- Holmes, R. S. (1978). "Genetics, Ontogeny and Testosterone Inducibility of Aldehyde Oxidase Isoenzymes in the Mouse: Evidence for two Genetic Loci (*Aox-1* and *Aox-2*) Closely Linked on Chromosome 1." Biochemical Genetics **17**(5/6).
- Hoshino, K., K. Itoh, et al. (2007). "Cloning, expression, and characterization of male cynomolgus monkey liver aldehyde oxidase." Biol Pharm Bull **30**(7): 1191-1198.
- Huang, D. Y., Furukawa, A. et al. (1999). "Molecular cloning of retinal oxidase/aldehyde oxidase cDNAs from rabbit and mouse livers and functional expression of

- recombinant mouse retinal oxidase cDNA in *Escherichia coli*." Arch Biochem Biophys **364**(2): 264-72.
- Huang, D. Y., Ohnishi, T. et al. (1999). "Inhibition by retinoids of benzo(A)pyrene metabolism catalyzed by 3-methylcholanthrene-induced rat cytochrome P-450 1A1." Metabolism **48**(6): 689-92.
- Huber, R., Hof, P. et al. (1996). "A structure-based catalytic mechanism for the xanthine oxidase family of molybdenum enzymes." Proc Natl Acad Sci **93**: 8846-8851.
- Ichida, K., Matsumura, T. et al. (2001). "Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria type II." Biochem Biophys Res Commun **282**(5): 1194-200.
- Itoh, K., H. Maruyama, et al. (2007). "Lack of formation of aldehyde oxidase dimer possibly due to 377G>A nucleotide substitution." Drug Metab Dispos **35**(10): 1860-4.
- Itoh, K., A. Masubuchi, et al. (2007). "Genetic polymorphism of aldehyde oxidase in Donryu rats." Drug Metab Dispos **35**(5): 734-9.
- Johnson, J. L., B. E. Hainline, et al. (1980). "Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine, oxidase, and nitrate reductase. Identification of a pteridine as a structural component." J Biol Chem **255**(5): 1783-6.
- Johnson, J. L., N. R. Bastian, et al. (1990). "Molybdopterin guanine dinucleotide: a modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* forma *specialis denitrificans*." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(8): 3190-4.
- Johnson, J. L. and Wadman, S. K. (1995). "*The metabolic and molecular bases of inherited disease*." (Scriver, C.R., Beaudet, A.L.; Sly, W.S. and Valle D., eds.) McGraw-Hill, New York, 2271-2283.
- Joshi, M.S., Johnson, J.L. et al. (1996). "Molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli* mod and mog mutants." J Bacteriol **178**(14): 4310-2.
- Kitamura, S., Sugihara, K. et al. (2006). "Drug-metabolizing ability of molybdenum hydroxylases." Drug Metab Pharmacokinet **21**(2): 83-98.
- Kitamura, S., Nakatani, DK., Sugihara, K., Ohta, S. (1999). "Strain differences of the ability to hydroxylate methotrexate in rats." Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol **122**(3): 331-336.
- Krenitsky, T. A., Neil, S. M. et al. (1972). "A comparison of the specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase." Arch Biochem Biophys **150**(2): 585-99.
- Krenitsky, T. A., J. V. Tuttle, et al. (1974). "A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase." Comp Biochem Physiol B **49**(4): 687-703.
- Kundu, T. K., Hille, R. et al. (2007). "Characterization of superoxide production from aldehyde oxidase: an important source of oxidants in biological tissues." Arch Biochem Biophys **460**(1): 113-21.

- Kurosaki, M., Demontis, S. et al. (1999). "Molecular cloning of the cDNA coding for mouse aldehyde oxidase: tissue distribution and regulation in vivo by testosterone." Biochem J **341** (Pt 1): 71-80.
- Kurosaki, M.; Terao, M.; Barzago, M.M.; Bastone, A.; Bernadinello, D.; Salmona, M.; Garattini, E. (2004). "The Aldehyde Oxidase Gene Cluster in Mice and Rats." The Journal of Biological Chemistry **279**(48): 50482-50498.
- Kuwabara, Y., Nishino, T. et al. (2003). "Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8170-5.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lake, M.W., Wuebbens, M.M. et al. (2001). "Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-MoaD complex." Nature **414**(6861): 325-9.
- Lake, B. G., Ball, S. E. et al. (2002). "Metabolism of zaleplon by human liver: evidence for involvement of aldehyde oxidase." Xenobiotica **32**(10): 835-47.
- Leimkühler, S., Kern, M. et al. (1998). "Xanthine dehydrogenase from the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* is more similar to its eukaryotic counterparts than to prokaryotic molybdenum enzymes." Mol Microbiol **27**(4): 853-69.
- Leimkühler, S. and Klipp, W. (1999). "The molybdenum cofactor biosynthesis protein MobA from *Rhodobacter capsulatus* is required for the activity of molybdenum enzymes containing MGD, but not for xanthine dehydrogenase harboring the MPT cofactor." FEMS Microbiol Lett **174**(2): 239-46.
- Leimkühler, S. and W. Klipp (1999). "Role of XDHC in Molybdenum cofactor insertion into xanthine dehydrogenase of *Rhodobacter capsulatus*." J Bacteriol **181**(9): 2745-51.
- Leimkühler, S. and Rajagopalan, K.V. (2001). "A sulfurtransferase is required in the transfer of cysteine sulfur in the in vitro synthesis of molybdopterin from precursor Z in *Escherichia coli*." J Biol Chem **276**(25): 22024-31.
- Leimkühler, S., Hodson, R. et al. (2003). "Recombinant *Rhodobacter capsulatus* xanthine dehydrogenase, a useful model system for the characterization of protein variants leading to xanthinuria I in humans." J Biol Chem **278**(23): 20802-11.
- Leimkühler, S., Stockert, A.L. et al. (2004). "The role of active site glutamate residues in catalysis of *Rhodobacter capsulatus* xanthine dehydrogenase." J Biol Chem **279**(39): 40437-44.
- Leydecker, M.T., Moureaux, T. et al. (1995). "Molybdenum Cofactor Mutants, Specifically Impaired in Xanthine Dehydrogenase Activity and Abscisic Acid Biosynthesis, Simultaneously Overexpress Nitrate Reductase." Plant Physiol **107**(4): 1427-1431.
- Mahler, H. R., Mackler, B. and Green, D.E. (1954). "Studies on metalloflavoproteins.III. Aldehyde Oxidase: A molybdoflavoprotein." JBC **210**: 465-480.
- Massey, V. and Edmondson, D. (1970). "On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide." J Biol Chem **245**(24): 6595-8.

- McEwan, A.G.; Ferguson, S.J.; Jackson, J.B.; (1991). "Purification and properties of dimethyl sulphoxide reductase from *Rhodobacter capsulatus*. A periplasmic molybdoenzyme." Biochem J **247**(Pt1):305-7.
- More, C. A., Roger, G.; Guigliarelli, B.; Caldeira, J.; Moura, J.; Bertrand, P. (2005). "Study of the Spin-Spin Interaction between the Metal Centers of *Desulfuvibrio gigas* Aldehyde Oxidoreductase: Identification of the Reducible Sites of the [2Fe-2S]^{1+,2+} Clusters." Biochemistry **44**: 11628-11635.
- Nason, A., Lee, K.Y. et al. (1971). "Invitro formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: nitrate reductase from a *Neurospora* mutant and a component of molybdenum-enzymes." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(12): 3242-6.
- Neumann, M., Schulte, M. et al. (2006). "Rhodobacter capsulatus XdhC is involved in molybdenum cofactor binding and insertion into xanthine dehydrogenase." J Biol Chem **281**(23): 15701-8.
- Neumann, M., W. Stocklein, et al. (2007a). "Identification of a *Rhodobacter capsulatus* L-cysteine desulfurase that sulfurates the molybdenum cofactor when bound to XdhC and before its insertion into xanthine dehydrogenase." Biochemistry **46**(33): 9586-95.
- Neumann, M., W. Stocklein, et al. (2007b). "Transfer of the molybdenum cofactor synthesized by *Rhodobacter capsulatus* MoeA to XdhC and MobA." J Biol Chem **282**(39): 28493-500.
- Neumeier, M., Weigert, J. et al. (2006). "Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin and fenofibric acid in hepatocytes in vitro." Biochem Biophys Res Commun **350**(3): 731-5.
- Nicholas, D.J.D., Nason, A.; McElroy, W.D. (1954). "Molybdenum and nitrate reductase.I. Effects of molybdenum deficiency on the *neurospora* enzymes." JBC **207**: 341-351.
- Nishino, T.; Amaya, Y.; Kawamoto, S.; Kashima, Y.; Okamoto, K.; Nishino, T. (2002). "Purification and Charakterization of multiple Forms of Rat Liver Xanthine Oxidoreductase expressed in Baculovirus-Insect Cell System." J Biochem **132**: 597-606.
- Nishino, T.; Okamoto, K.; Kawaguchi, Y.; Hori, H.; Matsumara, T.; Eger, B.T.; Pai, E.F.; Nishino, T. (2005). "Mechanism of the Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Xanthine Oxidase." The Journal of Biological Chemistry **280**(26): 24888-24894.
- Nishino, T.; Okamoto, K.; Eger, B.T.; Pai, E.F.; Nishino, T. (2008). "Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthin dehydrogenase to xanthine oxidase." The FEBS Journal **275**: 3278-3289.
- Okamoto, K., Matsumoto, K. et al. (2004). "The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: implications for reaction mechanism and enzyme inhibition." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 7931-6.
- Palmer, G. and V. Massey (1969). "Electron paramagnetic resonance and circular dichroism studies on milk xanthine oxidase." J Biol Chem **244**(10): 2614-20.
- Palmer, T., Vasishta, A. et al. (1994). "Isolation of protein FA, a product of the mob locus required for molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*." Eur J Biochem **222**(2): 687-92.

- Palmer, T., Santini, C.L. et al. (1996). "Involvement of the narJ and mob gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **20**(4): 875-84.
- Parschat, K., Canne, C. et al. (2001). "Xanthine dehydrogenase from *Pseudomonas putida* 86: specificity, oxidation-reduction potentials of its redox-active centers, and first EPR characterization." Biochim Biophys Acta **1544**(1-2): 151-65.
- Pateman, J.A., Cove, D.J. et al. (1964). "A Common Co-Factor For Nitrate Reductase And Xanthine Dehydrogenase Which Also Regulates The Synthesis Of Nitrate Reductase." Nature **201**: 58-60.
- Pauff, J. M., Hemann, C. F. et al. (2007). "The role of arginine 310 in catalysis and substrate specificity in xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*." J Biol Chem **282**(17): 12785-90.
- Pauff, J. M., Zhang, J. et al. (2007). "Substrate orientation in xanthine oxidase, crystal structure with 2-hydroxy-6-methylpurine." JBC
- Perry, S.E., Li, H.M. et al. (1991). "In vitro reconstitution of protein transport into chloroplasts." Methods Cell Biol **34**: 327-44.
- Pienkos, P.T., Shah, V.K. et al. (1977). "Molybdenum cofactors from molybdoenzymes and in vitro reconstitution of nitrogenase and nitrate reductase." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5468-71.
- Pitterle, D.M., Johnson, J.L. et al. (1993). "In vitro synthesis of molybdopterin from precursor Z using purified converting factor. Role of protein-bound sulfur in formation of the dithiolene." J Biol Chem **268**(18): 13506-9.
- Pitterle, D.M. and Rajagopalan, K.V. (1993). "The biosynthesis of molybdopterin in *Escherichia coli*. Purification and characterization of the converting factor." J Biol Chem **268**(18): 13499-505.
- Rajagopalan, K. V. and P. Handler (1968). "Studies of Aldehyde Oxidase by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy." JBC **243**(14): 3784-3796.
- Rajagopalan, K.V. and Johnson, J.L. (1992). "The pterin molybdenum cofactors." J Biol Chem **267**(15): 10199-202.
- Rajagopalan, K.V. (1996). "*in Escherichia coli and Salmonella thyphimurium*" (Neidhard, F.C., ed.) pp.674-679, ASM Press, Washington DC
- Rasmussen, J.T., Rasmussen, M.S. et al. (2000). "Cysteines involved in the interconversion between dehydrogenase and oxidase forms of bovine xanthine oxidoreductase." J Dairy Sci **83**(3): 499-506.
- Rech, S.; Deppenmeier, U.; Gunsalus, RP. (1995). "Regulation of the molybdate transport operon modABCD, of *Escherichia coli* in response to molybdate availability." J Bacteriol **177**(4): 1023-9.
- Reichert, D. A. and Westerfeld, W.W. (1953). "Isolation and Identification of the xanthine oxidase factor as molybdenum." JBC **203**: 915-923.

- Reiss, W.G. and Piscitelli, S.C. (1998). "Drug-Cytokone interactions: mechanism and clinical implications." BioDrugs **9**(5): 389-395.
- Reiter, S., Simmonds, H.A. et al. (1990). "Demonstration of a combined deficiency of xanthine oxidase and aldehyde oxidase in xanthinuric patients not forming oxipurinol." Clin Chim Acta **187**(3): 221-34.
- Rodrigues, A. D. (1994). "Comparison of levels of aldehyde oxidase with cytochrome P450 activities in human liver in vitro." Biochem Pharmacol **48**(1): 197-200.
- Romao, M. J., Archer, M. et al. (1995). "Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxidoreductase from *D. gigas*." Science **270**(5239): 1170-6.
- Rubio-Gayosso, I., Platts, S.H. et al. (2006). "Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(6): H2247-56.
- Sagi, M., Fluhr, R. et al. (1999). "Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in a flacca tomato mutant with deficient abscisic acid and wilted phenotype." Plant Physiol **120**(2): 571-8.
- Sagi, M., Scazzocchio, C. et al. (2002). "The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the flacca phenotype in tomato plants." Plant J **31**(3): 305-17.
- Santamaria-Araujo, J. A., B. Fischer, et al. (2004). "The tetrahydropyranopterin structure of the sulfur-free and metal-free molybdenum cofactor precursor." J Biol Chem **279**(16): 15994-9.
- Sato, T., Kurihara, F.N. (1987). "Purification and properties of dimethylsulfoxide reductase containing a molybdenum cofactor from a photodenitrifier, *Rhodospseudomonas sphaeroides* f.s. denitrificans." J Biochem **102**(1): 191-7.
- Schindelin, H., Kisker, C. et al. (1996). "Crystal structure of DMSO reductase: redox-linked changes in molybdopterin coordination." Science **272**(5268): 1615-21.
- Schumann, S.; Saggi, M.; Möller, N.; Anker, S.D.; Lenzian, F.; Hildebrandt, P.; Leimkühler, S. (2008). "The Mechanism of Assembly and Cofactor Insertion into *Rhodobacter capsulatus* Xanthine Dehydrogenase." The Journal of Biological Chemistry **283**(24): 16602-16611
- Schwartz, S.H., Leon-Kloosterziel, K.M. et al. (1997). "Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*." Plant Physiol **114**(1): 161-6.
- Self, W.T., Grunden, A.M. et al. (2001). "Molybdate transport." Res Microbiol **152**(3-4): 311-21.
- Seo, M., Koiwai, H. et al. (2000). "Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*." Plant J **23**(4): 481-8.
- Seo, M., A. J. Peeters, et al. (2000). "The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12908-13.
- Stoll, S.; Schweiger, A. (2006). "EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR." Journal of Magnetic Resonance **178**(1): 42-55.

- Sugihara, K., S. Kitamura, et al. (1995). "Strain differences of liver aldehyde oxidase activity in rats." Biochem Mol Biol Int **37**(5): 861-9.
- Sugihara, K., S. Kitamura, et al. (1997). "Differences in aldehyde oxidase activity in cytosolic preparations of human and monkey liver." Biochem Mol Biol Int **41**(6): 1153-60.
- Tai LA, Hwang, KC (2004). "Cooperative catalysis in the homodimer subunits of xanthine oxidase." Biochemistry **27**(43(16)): 4869-79.
- Temple, C.; Graf, TN; Rajagopalan, KV (2000). "Optimization of Expression of Human Sulfite Oxidase and Its Molybdenum Domain." Arch Biochem Biophys **383**(2): 281-287.
- Terao, M., Cazzaniga, G. et al. (1992). "Molecular cloning of a cDNA coding for mouse liver xanthine dehydrogenase. Regulation of its transcript by interferons in vivo." Biochem J **283** (Pt 3): 863-70.
- Terao, M. K., M.; Demontis, S.; Zanotta, S.; Garattini, E. (1998). "Isolation and characterization of the human aldehyde oxidase gene: conservation of intron/exon boundaries with the xanthine oxidoreductase gene indicates a common origin." Biochemical Journal **332**: 383-393.
- Terao, M.; Kurosaki, M.; Saltini, G.; Demontis, S.; Marini, M.; Salmona, M.; Garattini, E. (2000). "Cloning of the cDNAs Coding for Two Novel Molybdo-flavoproteins Showing High Similarity with Aldehyde Oxidase and Xanthine Oxidoreductase." The Journal of Biological Chemistry **275**(39): 30690-30700.
- Terao, M. K., M.; Marini, M.; Vanoni, M.A.; Saltini, G.; Bonetto, V.; Bastone, A.; Federico, C.; Saccone, S.; Fanelli, R.; Salmona, M.; Garattini, E. (2001). "Purification of the Aldehyde Oxidase Homolog 1 (AOH1) Protein and Cloning of the *AOH1* and Aldehyde Oxidase Homolog 2 (*AOH2*)." The Journal of Biological Chemistry **276**(49): 46347-46363.
- Thapper, A., Boer, D.R. et al. (2007). "Correlating EPR and X-ray structural analysis of arsenite-inhibited forms of aldehyde oxidoreductase." J Biol Inorg Chem **12**(3): 353-66.
- Truglio, J. J., Theis, K. et al. (2002). "Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*." Structure **10**(1): 115-25.
- Van Acker, K.J. and Simmonds, H.A. (1991). "Long-term evolution of type 1 adenine phosphoribosyltransferase (APRT) deficiency." Adv Exp Med Biol **309B**: 91-4.
- Vila, R.; Kurosaki, M. et al. (2004). "Regulation and biochemistry of mouse molybdo-flavoenzymes. The DBA/2 mouse is selectively deficient in the expression of aldehyde oxidase homologues 1 and 2 and represents a unique source for the purification and characterization of aldehyde oxidase." J Biol Chem **279**(10): 8668-83.
- Wahl, R.C., Warner, C.K. et al. (1982). "Drosophila melanogaster ma-I mutants are defective in the sulfuration of desulfo Mo hydroxylases." J Biol Chem **257**(7): 3958-62.
- Wahl, R.C. and Rajagopalan, K.V. (1982). "Evidence for the inorganic nature of the cyanolyzable sulfur of molybdenum hydroxylases." J Biol Chem **257**(3): 1354-9.
- Walker, M.C., Hazzard, J.T., Tollin, G. and Edmondson, D.E. (1991). "Kinetic comparison of reduction and intramolecular electron transfer in milk xanthine oxidase and chicken

- liver xanthine dehydrogenase by laser flash photolysis." Biochemistry **30**(24): 5912-5917.
- Warner, C.K. and Finnerty, V. (1981). "Molybdenum hydroxylases in *Drosophila*. II. Molybdenum cofactor in xanthine dehydrogenase, aldehyde oxidase and pyridoxal oxidase." Mol Gen Genet **184**(1): 92-6.
- Watanabe, T., N. Ihara, et al. (2000). "Deletion mutation in *Drosophila* ma-I homologous, putative molybdopterin cofactor sulfurase gene is associated with bovine xanthinuria type II." J Biol Chem **275**(29): 21789-92.
- Wilson, HL; Wilkinson, S.R.; Rajagopalan, K.V. (2006). "The G473D Mutation Impairs Dimerization and Catalysis in Human Sulfite Oxidase." Biochemistry **45**: 2149-2160.
- Wollers, S.; Heidenreich, T.; Zarepour, M.; Zachmann, D.; Kraft, C.; Zhao, Y.; Mendel, R.; Bittner, F. (2008). "Binding of sulfurated molybdenum cofactor to the C-terminal domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration." The Journal of Biological Chemistry **283**(15): 9642-9650.
- Wuebbens, M. M. and K. V. Rajagopalan (1995). "Investigation of the early steps of molybdopterin biosynthesis in *Escherichia coli* through the use of in vivo labeling studies." J Biol Chem **270**(3): 1082-7.
- Xiang, Q.; Edmondson, DE (1996). "Purification and Characterization of a Prokaryotic Xanthine Dehydrogenase from *Comamonas acidovorans*." Biochemistry **35**: 5441-5450.
- Yamaguchi, Y., Matsumura, T. et al. (2007). "Human xanthine oxidase changes its substrate specificity to aldehyde oxidase type upon mutation of amino acid residues in the active site: roles of active site residues in binding and activation of purine substrate." J Biochem **141**(4): 513-24.
- Zinoni, F., Birkmann, A.; Stadtman, TC; Böck, A. (1986). "Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci USA **83**(13): 4650-4.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Mentorin Prof. Dr. Silke Leimkühler, die mich mit diesem spannenden Projekt betraut hat. Ich möchte mich bei Ihr für die uneingeschränkte Unterstützung und Förderung, sowie für das Vertrauen und der überlassenen Freiräume während der gesamten Promotion bedanken. Des Weiteren bedanke ich mich für die Möglichkeit, Erfahrungen in einem Mailänder Labor gemacht haben zu dürfen.

Enrico Garattini, Mineko Terao sowie Mami Kurosaki vom „Istituto de Ricerche Farmacologiche Mario Negri“ in Mailand danke ich für die Bereitstellung der mAOX1- und hAOX1-Plasmide sowie für die Antikörper anti-mAOX1 sowie anti-mAOH1. Bei Takeshi Nishino von der Nippon Medical School in Tokyo bedanke ich mich für die Bereitstellung des hMCSF-Plasmides. Bei Herrn Manfred Nitz am HZI in Braunschweig möchte ich mich für die hervorragenden ESI-Analysen bedanken. Bei der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Robert Seckler an der Universität Potsdam, insbesondere bei Herrn Dr. Klaus Gast und Christian Fiedler bedanke ich mich für die geduldige Einführung in die Methoden der CD-Spektroskopie sowie der Benutzung Ihrer Geräte.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Leimkühler, insbesondere Alexander Urban, Jennifer Schmitz, Meina Neumann sowie Fleur Gawehns danke ich für Ihre große Hilfsbereitschaft, für die Einweisung an zahlreichen Laborgeräten sowie für ein oft heiteres Arbeitsklima im steten Laboralltag. Ich freue mich, dass ich besonders in Alexander Urban einen neuen Freund gefunden habe, mit dem ich auch außerhalb des Labors viele nette Stunden mit anregenden Gesprächen verbracht habe.

All meinen lieben Freunden sei an dieser Stelle für Ihr großes Verständnis und Ihrer immer währenden Unterstützung gedankt. Sie haben mich zahlreich und häufig bei Problemen von neuem motiviert. Dafür danke ich Euch ganz besonders.

Bei meiner Familie, vor allem jedoch bei meinen Eltern, möchte ich mich dafür bedanken, dass sie immer an mich geglaubt haben. Ohne Eure bedingungslose Unterstützung wäre vieles niemals möglich gewesen.

Zuletzt möchte ich der wichtigsten Person danken, ohne deren liebevolle Unterstützung und fortwährenden Geduld diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre, meinem Freund Notger Heinz.

Eidesstattliche Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation „Funktionelle Charakterisierung von prokaryotischen und eukaryotischen Molybdoenzymen“ selbstständig verfasst und sie bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht habe. Ich bestätige hiermit, dass die Arbeit ausschließlich mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde sowie die benutzten Quellen vollständig angegeben worden.

Potsdam, den 23.09.2008

Silvia Schumann