

VERGLEICH DER HUMANEN CARBONYL-
REDUKTASEN CBR1, CBR3 UND CBR4

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Yasser El-Hawari

Kiel, 2009

Referent: Prof. Dr. Edmund Maser
Korreferent: Prof. Dr. Axel Scheidig

Tag der mündlichen Prüfung: 19. November 2009
Zum Druck genehmigt: Kiel, 19. November 2009

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

ZUSAMMENFASSUNG

Die kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR) stellen mit bislang 46 000 Mitgliedern die größte bekannte Enzym-Superfamilie dar. Untereinheiten der überwiegend dimeren oder tetrameren Enzyme bestehen aus 250–350 Aminosäuren. Die Identität unter einzelnen SDR-Proteinen ist mit 15–30 % niedrig. Überwiegend katalysierte Reaktionen sind die Oxidation von Alkoholen und die Reduktion von Aldehyden und Ketonen, in Abhängigkeit von NAD(H) oder NADP(H).

Von den humanen SDR ist die monomere *Carbonylreduktase 1* (CBR1) eine der am besten untersuchten. Dieses pluripotente Enzym inaktiviert die endogene Verbindung Isatin, einen Inhibitor der Monoamin-Oxidase. Bei Genom-Sequenzierungen ist die *Carbonylreduktase 3* (CBR3) identifiziert worden, welche eine Identität von 72 % zur CBR1 zeigt. Die einzige publizierte Funktion sollte die NADPH-abhängige Reduktion von Menadion sein, einem Modellsubstrat der CBR1. Eine weitere durch Sequenzierungsprojekte identifizierte SDR, bezeichnet als *Carbonylreduktase 4*, zeigt eine Identität von nur 22 % zur CBR1. Über die CBR4 waren keine weiteren Daten publiziert. Das Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der *Carbonylreduktasen* CBR3 und CBR4.

Das Gen der CBR3 wurde in verschiedene Expressionsvektoren kloniert und in *E. coli* überexprimiert. Das Protein konnte durch Nickel-Affinitätschromatographie isoliert werden. Im Gegensatz zu den publizierten Daten reduzierten diese Fraktionen kein Menadion. Um diesen Unterschied zu ergründen, wurde eine Vielzahl von Aldehyden und Ketonen auf Aktivität geprüft. Isatin und 9,10-Phenanthrenchinon, ein weiteres wichtiges Substrat der CBR1, wurden umgesetzt, aber mit deutlich höheren K_m -Werten und niedrigeren Wechselzahlen. Als weitere Substrate wurden das Tumortherapeutikum Oracin und S-Nitrosoglutathion identifiziert.

Diese Ergebnisse zeigten, dass rekombinante CBR3 in aktiver Form gereinigt werden konnte. Die hohe Identität zur CBR1 wurde genutzt, um durch gezielte Mutagenese und Messung von Enzymkinetiken mit Isatin und 9,10-Phenanthrenchinon die Substratbindetaschen beider Enzyme zu untersuchen. Durch die ermittelten Werte konnten eine Reihe von Aminosäuren identifiziert werden, die die Substratspezifität beeinflussen. Einige der zwölf hergestellten Mutanten katalysierten die Reaktionen effizienter als CBR1. Die Aminosäuren, welche die Reduktion von Menadion und anderer Modellsubstrate der CBR1 ermöglichen, sind noch unbekannt.

Das Gen der CBR4 wurde in verschiedene Expressionsvektoren kloniert, aber kein lösliches Protein exprimiert. Durch die Untersuchung verschiedener Expressionsbedingungen eines *Nus-Tag*-gekoppelten Konstrukts konnten lösliche Fraktionen gewonnen werden. Die Ausbeute war für eine weitere Charakterisierung jedoch zu gering.

ABSTRACT

The short chain dehydrogenases/reductases (SDR) represent the largest known enzyme superfamily with more than 46,000 members identified. Subunits of the mainly dimeric or tetrameric enzymes are composed of 250–350 amino acids. Identity among SDR proteins in general is low, about 15–30%. The mainly catalyzed reactions are the oxidation of alcohols and reduction of aldehydes and ketones, depending on NAD(H) or NADP(H).

Of human SDR proteins, the *monomeric carbonyl reductase 1* (CBR1) is one of the best characterized. This pluripotent enzyme catalyzes the inactivation of the endogenous compound isatin, which is an inhibitor of mono-amine-oxidases. In the process of mapping genomes *carbonyl reductase 3* (CBR3), a homologue of CBR1 was identified with a sequence identity of 72%. Its only published function was the NADPH dependent reduction of menadione – a model substrate for CBR1. A further SDR enzyme discovered through genome sequencing was called *carbonyl reductase 4*, with a low identity of 22% to CBR1. No further data were published on CBR4. The aim of this research was to characterize these two enzymes called *carbonyl reductases* CBR3 and CBR4.

The gene of CBR3 was cloned into several expression vectors and overexpressed in *E. coli*. The protein could be purified to homogeneity via nickel affinity chromatography. In contrast to the published data, the purified fractions were inactive towards menadione. To investigate these discrepancies, a broad range of ketones and aldehydes was screened. First, only the compounds 9,10-phenanthrenequinone, an important substrate for CBR1, and isatin could be identified to be reduced, though with poor turnover rates and high K_m values, compared to CBR1. Further substrates identified were the anti cancer drug oracin and S-nitrosoglutathione.

These results indicated that the performed protein purification yielded active enzyme. The high sequence identity towards CBR1 could then be used as the basis for an extensive study of the substrate binding region by site-directed mutagenesis and enzyme kinetics on isatin and 9,10-phenanthrenequinone. The gained data revealed a broad range of critical amino acids, determining the carbonyl reductases' substrate specificity. Twelve mutants could be generated, some of which catalyzed the reactions even more efficiently than CBR1. Surprisingly, the amino acids enabling the reduction of menadione and other model substrates for CBR1 remain unknown.

The CBR4 gene was cloned into several expression vectors, though no soluble fractions of protein could be obtained. To solve this issue, different expression conditions were tested. Finally, the expression with a *Nus-Tag* fusion protein yielded a fraction of soluble protein, yet in an insufficient amount for a further characterization.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	3
Abstract	4
Tabellenverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	13
1.1 Oxidoreduktasen	13
1.2 Kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen	14
1.2.1 Tertiär- und Quartärstruktur	14
1.2.2 SDR-Familien	14
1.2.3 Struktur des katalytischen Zentrums	16
1.2.4 Katalysemechanismus der Reduktion	16
1.2.5 Spektrum SDR-katalysierter Reaktionen	16
1.3 Carbonylreduktasen	17
1.4 Humane Carbonylreduktasen CBR1 und CBR3	18
1.4.1 Struktur	19
1.4.2 Substratspektrum der CBR1	19
1.4.3 Substratspektrum der CBR3	20
1.5 Humane Carbonylreduktase CBR4	20
1.6 Aufgabenstellung	21
2 Material und Geräte	23
2.1 Chemikalien, biologisches Material und Verbrauchsmaterial	23
2.2 Stammlösungen, Puffer und Medien	24
2.3 Expressionsvektoren	27
2.4 Oligonucleotide	27
2.5 Polymerasen	29
2.5.1 Taq-Polymerase	29
2.5.2 Pfu-Polymerase	29
2.5.3 HotStar HiFidelity Polymerase	29
2.6 Restriktionsenzyme	29
2.7 Bakterienstämme	30
2.7.1 XL1-Blue	30
2.7.2 SG13009	30

2.7.3	BL21(DE3)	30
2.7.4	Origami(DE3)	30
2.8	Geräte	31
3	Methoden der Molekularbiologie	33
3.1	Polymerase-Kettenreaktion	33
3.2	Agarose-Gelelektrophorese	35
3.3	DNA-Reinigung	35
3.3.1	Zentrifugiermethode zur Isolierung von DNA aus Gelen	35
3.3.2	DNA-Reinigung für Ligations- und Restriktionsansätze	35
3.3.3	Plasmid-Maxi-Präparation	35
3.3.4	Plasmid-Mini-Präparation	36
3.4	Restriktionsansätze	36
3.5	Ligation	36
3.6	Transformation	37
3.6.1	Herstellung kompetenter E. coli-Zellen	37
3.6.2	Transformation mit Ligationsansätzen	37
3.6.3	Transformation mit Plasmidpräparationen	38
3.7	Kolonie-Screening	38
3.7.1	Kolonie-PCR	38
3.7.2	Kolonie-Screening durch Plasmidpräparation	38
3.8	Sequenzierung	39
3.9	Gewinnung von Ziel-DNA	39
3.9.1	cbr3	40
3.9.2	cbr4	40
3.9.3	cbr1	40
3.9.4	akr1b10	41
3.10	Mutagenese	41
3.11	Herstellung von Konstrukten	41
4	Methoden der Proteinbiochemie	45
4.1	Überexpression und Proteinreinigung	45
4.1.1	CBR1, CBR3 und CBR3-Mutanten, pET-15b-Konstrukte	45
4.1.2	CBR3, pET-15b-Konstrukt – alternatives Protokoll	46
4.1.3	CBR3, pQE-70-Konstrukte	46
4.1.4	CBR4, pET-15b- und pQE-70-Konstrukte	46
4.1.5	CBR4, pET-43b-Konstrukt	46
4.2	Thrombinverdau	48
4.2.1	CBR3	48
4.2.2	CBR4	48
4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	48
4.4	SDS-Gelelektrophorese zur Proteinanalytik	49
4.4.1	Aufbau und Durchführung der Elektrophorese	49
4.4.2	Färbung und Dokumentation	49

4.5	Photometrische Messung von Enzymaktivitäten	50
4.5.1	Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen	50
4.5.2	Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes	50
4.5.3	Durchführung einer Messung	50
4.6	Substrat- und Inhibitorscreening	51
4.6.1	Substratscreening der CBR3	51
4.6.2	Substratscreening der CBR3-Mutanten	51
4.6.3	Inhibitorscreening der CBR3	51
4.7	Enzymkinetiken	53
4.7.1	Menadion-Enzymkinetik von CBR1	53
4.7.2	NADPH-Enzymkinetik von CBR3	53
4.7.3	S-Nitrosoglutathion-Enzymkinetik von CBR1 und CBR3	53
4.7.4	Oracin-Enzymkinetik von CBR3	54
4.7.5	Isatin-Enzymkinetiken von CBR1, CBR3 und CBR3-Mutanten	54
4.7.6	9,10-Phenanthrenchinon-Enzymkinetiken von CBR1, CBR3 und CBR3-Mutanten	54
4.8	Berechnung von Reaktionsgeschwindigkeiten und katalytischen Kon- stanten	56
5	Ergebnisse	57
5.1	Klonierung	57
5.2	Mutagenese	59
5.3	Expression und Reinigung von CBR1, CBR3 und Mutanten der CBR3	63
5.4	Expression und Reinigung der CBR4	63
5.4.1	CBR4-Konstrukte der Vektoren pET-15b und pQE-70	63
5.4.2	CBR4 mit Nus-Fusionstag, Konstrukt des Vektors pET-43b	63
5.5	Funktionelle Charakterisierung der CBR3	68
5.5.1	Screening von Substraten	68
5.5.2	Menadion	68
5.5.3	Isatin	69
5.5.4	9,10-Phenanthrenchinon	69
5.5.5	Oxidation des Kofaktors NADPH	69
5.5.6	S-Nitrosoglutathion (GSNO)	70
5.5.7	Oracin	70
5.5.8	Screening von Inhibitoren	72
5.6	Funktionelle Charakterisierung von Mutanten der CBR3	72
5.6.1	Isatin	72
5.6.2	9,10-Phenanthrenchinon	73
5.6.3	Screening von Substraten der CBR1	74
6	Diskussion	85
6.1	Verwandtschaftsgrad der humanen Carbonylreduktasen CBR1, CBR3 und CBR4	85
6.2	Klonierung, Expression und Reinigung der CBR3	85

6.3	Funktionelle Charakterisierung der CBR3	86
6.3.1	Reduktion von S-Nitrosoglutathion (GSNO) durch CBR3 . . .	87
6.3.2	Reduktion von Oracin durch CBR3	87
6.4	Mutagenese zur Strukturaufklärung von CBR1 und CBR3	88
6.4.1	Mutante SOE	88
6.4.2	Mutanten CHIM und SOE-CHIM	91
6.4.3	Mutanten CBR3-P230W und SOE-P230W	92
6.4.4	Mutante SOE-P230W-142MS	93
6.4.5	Mutanten SOE-P230W-97VA und SOE-P230W-191SSA	93
6.4.6	Mutante SOE-P230W-H270S	93
6.4.7	Mutante SuMu	95
6.4.8	Mutante SuMu-V273R	95
6.4.9	Fazit der Mutagenesestudie	95
6.5	Klonierung und Überexpression der CBR4	96
6.6	Resümee und Ausblick	97
	Literaturverzeichnis	98
A	Anhang	107
A.1	Konstrukte	107
A.1.1	Konstrukte der Wildtypen von <i>cbr1</i> und <i>cbr3</i>	107
A.1.2	Konstrukte von <i>cbr3</i> -Mutanten	108
A.1.3	Konstrukte von <i>cbr4</i>	110
A.1.4	Konstrukt von <i>akr1b10</i>	110
A.2	Verdünnungsschema	111
A.3	Rohdaten der Enzymaktivitätsmessungen	112
A.3.1	Kinetiken	112
A.3.2	Aktivitätsmessung von CBR1, CBR3 und CBR3-Mutanten . .	114
A.4	Proteinogene Aminosäuren	115
A.5	Strukturformeln verwendeter Stoffe	116
A.6	Berechnung und Plotten der Kurven mit Gnuplot	117
	Eigene Publikationen	118
	Danksagung	120
	Lebenslauf	121
	Ehrenwörtliche Erklärung	122

TABELLENVERZEICHNIS

1.1	Carbonylreduktasen – Übersicht	18
2.1	Oligonukleotide	28
3.1	PCR-Reaktionsansätze	34
3.2	PCR-Temperaturprogramme	34
3.3	Restriktionsansatz	37
3.4	PCR-Bedingungen zur Herstellung von Insert-DNA der Wildtypen . .	42
3.5	PCR-Bedingungen zur Konstruktion von Mutanten der CBR3	43
3.6	Klonierung von Expressionsplasmiden der Wildtypen und Mutanten .	44
4.1	Pipettierplan Enzymkinetik	51
4.2	Screening von Substraten mit CBR3	52
4.3	Messdaten zur Bestimmung der Löslichkeit von 9,10-Phenanthrenchinon	55
5.1	Übersicht der hergestellten Mutanten	61
5.2	Screening von Inhibitoren	72
5.3	Screening von Substraten mit CBR1 und CBR3-Mutanten	75
6.1	Kinetische Konstanten von Isatin	89
6.2	Kinetische Konstanten von 9,10-Phenanthrenchinon	90

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Schema Kristallstruktur CBR3	15
1.2	SDR-Familien	15
1.3	Katalysemechanismus der Carbonylreduktion durch SDR	17
3.1	Mutagenese durch <i>splicing by overlap extension</i>	42
5.1	Multiple Cloning Sites der pET-15b Konstrukte	58
5.2	Multiple Cloning Sites der pQE-70 Konstrukte	58
5.3	Strategie der Mutagenese	60
5.4	Alignment von CBR3 und CBR1	62
5.5	SDS-Gele CBR1, CBR3, CBR3-Mutanten – Teil 1	64
5.6	SDS-Gele CBR1, CBR3, CBR3-Mutanten – Teil 2	65
5.7	Thrombinverdau CBR3	66
5.8	Screening von Expressionsbedingung der CBR4_pET-43b	67
5.9	Thrombinverdau CBR4	67
5.10	Menadion-Kinetik CBR1	68
5.11	NADPH-Kinetik CBR3	70
5.12	S-Nitrosoglutathion-Kinetiken CBR1 und CBR3	71
5.13	Oracin-Kinetik CBR3	71
5.14	Isatin-Kinetiken CBR3, CBR3-V244M, CBR1	76
5.15	Isatin-Kinetiken CBR3-P230W, SOE, SOE-P230W	77
5.16	Isatin-Kinetiken CHIM, SOE-CHIM	78
5.17	Isatin-Kinetiken SOE-P230W-97VA, -191SSA	78
5.18	Isatin-Kinetiken SOE-P230W-142MS, -H270S, SuMu, SuMu-V273R	79
5.19	9,10-Phenanthrenchinon-Kinetiken CBR3, CBR3-V244M, CBR1	80
5.20	9,10-Phenanthrenchinon-Kinetiken P230W, SOE, SOE-P230W	81
5.21	9,10-Phenanthrenchinon-Kinetiken CHIM, SOE-CHIM	82
5.22	9,10-Phenanthrenchinon-Kinetiken SOE-P230W-97VA, -191SSA	82
5.23	9,10-Phenanthrenchinon-Kinetiken SOE-P230W-142MS, -H270S, Su- Mu, SuMu-V273R	83
6.1	Kristallstruktur der CBR3, katalytisches Zentrum	91
6.2	Modelling der Mutante SOE-P230W	92
6.3	Schema der katalytischen Zentren von CBR1 und CBR3	94
A.1	Verdünnungsschema Substrate	111

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AKR	Aldo-Keto-Reduktasen
AKR1B10	Aldo-Keto-Reduktase 1B10
AKR1C3	Aldo-Keto-Reduktase 1C3
ANP	atriales natriuretisches Peptid
BSA	Bovines Serumalbumin
CBR1	humane Carbonylreduktase 1 (SDR21C1)
CBR3	humane Carbonylreduktase 3 (SDR21C2)
CBR4	humane Carbonylreduktase 4 (SDR45C1)
cDNA	complementary DNA, DNA-Transkripte von mRNA
CHIM	Bezeichnung für eine in dieser Arbeit hergestellte CBR3-Mutante
DCXR	Dicarbonylreduktase/Xylulose-Reduktase (SDR20C1)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GSH	Glutathion
GSNO	S-Nitrosoglutathion
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KBE	Kolonie bildende Einheit
MDR	mittelkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (<i>medium chain dehydrogenases/reductases</i>)
NAD(H)	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP(H)	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NNAL	<i>nicotine derived nitrosamine alcohol</i> , 4-Methylnitrosamino-1-(3-Pyridyl)-1-Butanol
NNK	<i>nicotine derived nitrosamine ketone</i> , 4-Methylnitrosamino-1-(3-Pyridyl)-1-Butanon
OD	optische Dichte
ONE	4-Oxonon-2-enal

ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , salinischer Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDR	kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (<i>short chain dehydrogenases/reductases</i>)
SOE	<i>splicing by overlap extension</i> , außerdem Bezeichnung für eine in dieser Arbeit hergestellte CBR3-Mutante
SuMu	Bezeichnung für eine in dieser Arbeit hergestellte CBR3-Mutante
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Trometamol
URL	Uniform Resource Locator
wwPDB	World Wide Protein Data Bank [7]

1.1 OXIDOREDUKTASEN

Oxidoreduktasen stellen einen wesentlichen Teil der an Biotransformationsreaktionen beteiligten Enzyme dar und sind daher pharmakologisch und toxikologisch von Interesse. Dabei katalysieren sie in einer als *Phase I* oder *Funktionalisierung* bezeichneten Reaktion die Oxidation und Reduktion von Xenobiotika. Einige der dabei eingeführten oder veränderten funktionellen Gruppen sind einer *Phase-II*-Reaktion zugänglich, die auch als *Konjugationsreaktion* bezeichnet wird [82, 83]. In dieser werden sie mit aktivierten Formen verschiedener endogener Verbindungen wie Glucuronsäure, Sulfat, Acetat oder Aminosäuren verknüpft [84]. Biotransformierte Verbindungen sind oft inaktiviert und stärker wasserlöslich, also renal eliminierbar [51]. Das kann notwendig sein, weil sie toxisch sind oder auf Grund ihrer Lipophilie im Körper akkumulieren würden. Aus denselben Gründen können auch Produkte des physiologischen Stoffwechsels oder durch Reaktion mit reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies entstandene Verbindungen einer Eliminierung bedürfen. Biotransformationen können jedoch ebenso zu einer *Bioaktivierung* führen. Entstehen schädliche Metabolite, spricht man von *Giftung* oder *Toxifizierung*; Arzneimittel werden als *Prodrug* bezeichnet, wenn sie durch Bioaktivierung in die wirksame Form überführt werden. In diesem Zusammenhang sind die Cytochrom-P450-Enzyme als bislang bedeutendste Enzymfamilie zu nennen [82].

In die EC-Klasse der Oxidoreduktasen sind die meisten Mitglieder der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen – SDR (*short chain dehydrogenases/reductases*) einzuordnen. Sie stellen mit über 46 000 bekannten Vertretern in allen Organismen und 72 Vertretern im Menschen* die bisher größte bekannte Enzymsuperfamilie dar [62]. Oxidoreduktasen sind nach der Systematik der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* die erste von sechs Hauptklassen von Enzymen[†]. Sie werden nach Art der umgesetzten Strukturelemente in 22 Unterklassen und diese abhängig vom Kofaktor in Unter-Unterklassen eingeteilt. Wichtigste Funktion der SDR ist die Oxidation von Alkoholen bzw. die Reduktion der korrespondierenden Carbonylverbindungen, in Abhängigkeit von NAD/NADP. Danach sind sie entsprechend der EC-Nomenklatur der Klasse EC 1.1.1 zuzuordnen. Die in dieser Arbeit behandelten Enzyme sind Mitglieder der SDR-Protein-Superfamilie, sie wird im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

*Zum Vergleich: Im Menschen sind insgesamt 57 Enzyme der Cytochrom-P-450 Superfamilie gefunden worden [56].

[†]URL: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>

1.2 KURZKETTIGE DEHYDROGENASEN/REDUKTASEN

Für eine Alkoholdehydrogenase aus *Drosophila melanogaster* und die Ribitoldehydrogenase einer *Klebsiella*-Art wurden 1981 Übereinstimmungen der Struktur festgestellt [37]. Diese Enzyme sind die ersten der Superfamilie der *short chain dehydrogenases/reductases* zugeordneten Proteine, sie wurden ursprünglich *short dehydrogenases* genannt.

Durch Ähnlichkeiten des Substratspektrums, der Kofaktorabhängigkeit und des Katalysemehanismus (Kapitel 1.2.4) werden SDR oft gemeinsam mit Aldo-Keto-Reduktasen – AKR [4, 61] und mittelkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen – MDR [31, 35, 60] genannt. Aldo-Keto-Reduktasen sind überwiegend Monomere*. MDR sind überwiegend dimere und tetramere, zinkabhängige Oxidoreduktasen†.

1.2.1 Tertiär- und Quartärstruktur

Untereinheiten von SDR-Proteinen sind je aus zwei Elementen der weit verbreiteten, nach ihrem Entdecker benannten Rossmann-Faltung [22, 69] zusammengesetzt. Jedes dieser Elemente besteht aus drei oder mehr β -Faltblättern, die durch zwei α -Helices verknüpft sind. In SDR bilden diese Elemente eine mittlere Schicht β -Faltblätter aus, welche zu beiden Seiten von α -Helices flankiert wird. Je Rossmann-Motiv kann *ein Nukleotid* gebunden werden, was die Kofaktorspezifität bezüglich der *Dinukleotide* NAD und NADP bedingt.

Der Anteil homodimerer oder homotetramerer SDR überwiegt [31]. Tetramere bilden sich über Wechselwirkungen zwischen den β -Faltblättern G und α -Helices G der Untereinheiten zur P-Achse sowie der Paarung der α -Helices E und α -Helices F der Untereinheiten zur Q-Achse aus [25]. In der schematischen Darstellung der Struktur der CBR3 (Abbildung 1.1) sind die entsprechenden Sekundärstrukturen dargestellt.

Eine Dimerisierung findet fast ausschließlich über die Q-Achse statt, der ein wesentlicher Beitrag zur Ausbildung der Substratbindetasche zugesprochen wird [24, 66]. Eine Ausnahme stellt die 3α -HSD aus *Comamonas testosteroni* dar [28]. Erste Untersuchungen zeigen, dass eine Oligomerisierung über die P-Achse kein notwendiges Kriterium für enzymatische Aktivität ist [32]. Die einzigen beiden monomeren von 72 SDR des Menschen sind vermutlich die Carbonylreduktasen CBR1 und CBR3 [11] (dazu Kapitel 1.4.1, Seite 19).

1.2.2 SDR-Familien

Die SDR-Superfamilie wird in die sechs Familien *Divergent*, *Extended*, *Classical*, *Intermediate*, *Complex* und *Atypical* eingeteilt [62] (Abbildung 1.2), die Familien der *Clas-*

*Die Tertiärstruktur ist ein *TIM-Barrel*, eine nach der Triosephosphat-Isomerase benannten Tertiärstruktur, die einem Fass (*barrel*) ähnelt.

†Die Tertiärstruktur entspricht der Rossmann-Faltung (Kapitel 1.2.1).

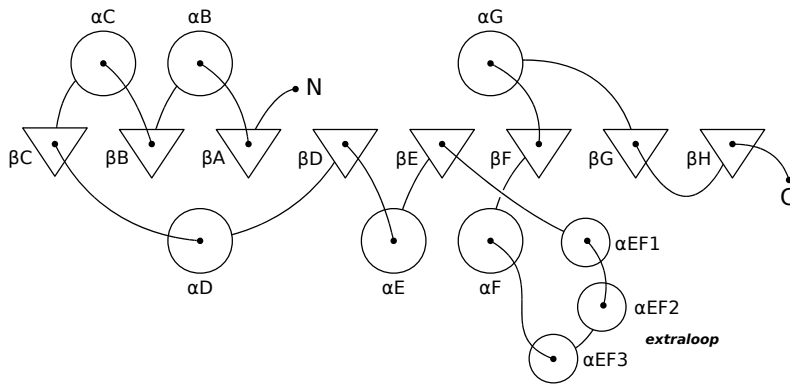


Abbildung 1.1 – Schema der Kristallstruktur der CBR3. Die Abbildung ist in Anlehnung an ein Schema der 3α -HSD aus *Comamonas testosteroni* erstellt worden [31] und beruht auf der Kristallstruktur der CBR3 (PDB Code: 2HRB). Kreise stellen α -Helices, Dreiecke β -Faltblätter dar. Die Buchstaben N und C symbolisieren den N- bzw. C-Terminus. Die *extraloop*-Region^a verhindert die Oligomerisierung über die Q-Achse sowie die P-Achse.

^aBestehend aus α EF1, α EF2 und α EF3, Aminosäuren 141 bis 193 von CBR1 bzw. CBR3 [31], siehe Abbildung 5.4, Seite 62.

sical- und *Extended* SDR weiter in sieben bzw. drei Unterfamilien (nicht abgebildet). Diese Einteilung erfolgt auf Grund von Unterschieden in der Kofaktorbindedomäne, die auch mit der Spezifität bezüglich NAD und NADP assoziiert wird [63]. Hierbei ist zu beachten, dass es sich um eine Einteilung handelt, die funktionelle Aspekte berücksichtigt. Im Gegensatz dazu stellt die Basis für die Nomenklatur der SDR alleine die Primärstruktur dar, unabhängig von möglichen Funktionen [62].

$$\text{SDR} \left\{ \begin{array}{l} \textit{Divergent} \\ \textit{Extendend} \\ \textit{Classical} \left\{ \begin{array}{l} \textit{CBR1} \quad (\textit{SDR21C1}) \\ \textit{CBR3} \quad (\textit{SDR21C2}) \\ \textit{CBR4} \quad (\textit{SDR45C1}) \end{array} \right. \\ \textit{Intermediate} \\ \textit{Complex} \\ \textit{Atypical} \end{array} \right.$$

Abbildung 1.2 – Die Abbildung zeigt die Einteilung der SDR-Superfamilie in sechs Familien. Die in dieser Arbeit behandelten SDR CBR1, CBR3 und CBR4 sind Mitglieder der *classical* SDR. In Klammern angegeben sind die Bezeichnungen entsprechend der neuen Nomenklatur [62].

1.2.3 Struktur des katalytischen Zentrums

Das katalytische Zentrum von SDR setzt sich aus Kofaktor- und Substratbindetasche sowie dem aktiven Zentrum zusammen. Die Bindedomäne des Kofaktors ist N-terminal lokalisiert. Eine hochkonservierte glycinreiche Region mit dem GGG-Motiv, welche durch die Zahl der Aminosäureeinschübe variiert (z. B. GxxxGxG* für *Classical* SDR), ist nahezu allen SDR gemeinsam. Für die Spezifität bezüglich NADP gegenüber NAD sind basische Aminosäuren verantwortlich, die in Wechselwirkung mit der 2'-Phosphatgruppe von NADP treten. Fehlen an entsprechender Stelle negative Ladungen oder sind diese positiv, liegt Spezifität bezüglich NAD vor [78]. Die in Abbildung 5.4, Seite 62 dargestellten Sequenzen der CBR1 und CBR3 zeigen das GGG-Motiv an den Positionen 12, 16 und 18 sowie das KAR-Motiv aus Lysin, Alanin und Arginin [31] an den Positionen 11, 37 und 38 (RAR bei der CBR3). Die 3 α -HSD aus *Comamonas testosteroni* als NAD-abhängiges Enzym beispielsweise besitzt statt des KAR-Motivs die Aminosäuren Threonin, Asparaginsäure und Isoleucin [31].

Das aktive Zentrum stellt neben der Kofaktorbinderegion ein wesentliches Strukturmerkmal von SDR dar. Die Aminosäuren Asparagin, Serin, Tyrosin und Lysin bilden eine hochkonservierte katalytische Tetrade [21]. Wie diese an dem postulierten säurekatalysierten Reaktionsmechanismus beteiligt ist, wird in Kapitel 1.2.4 und Abbildung 1.3 näher erläutert.

Die Substratbindetasche von SDR zeigt keine konservierten Aminosäuren [17], was auf Grund des breiten Substratspektrums und der großen Zahl der Mitglieder nahe liegend ist.

1.2.4 Katalysemechanismus der Reduktion

Für die säurekatalysierte Reaktion wird der in Abbildung 1.3 dargestellte Mechanismus angenommen. Die Elektronendichte am Kohlenstoff der zu reduzierenden Carbonylfunktion wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den freien Elektronenpaaren des Sauerstoffs der Carbonylfunktion und der OH-Seitenketten von Serin sowie Tyrosin reduziert. Ein Hydridshift auf den Carbonyl-Kohlenstoff, getrieben durch die Aromatisierung des C4 des Kofaktors sowie die Übernahme des sauren Protons der Phenolgruppe des Tyrosins führen zur Bildung des Alkohols. Die deprotonierte Phenolseitenkette des Tyrosins wird unter Beteiligung des Peptid-Sauerstoffs vom Asparagin, der Lysin-Seitenkette sowie der OH-Gruppe am C2 der Ribose des Kofaktors regeneriert [21].

1.2.5 Spektrum SDR-katalysierter Reaktionen

Zu den Substraten von prokaryotischen und eukaryotischen SDR gehören Steroide, Zucker, aromatische Kohlenwasserstoffe und Prostaglandine. Im Vordergrund steht

*Das „x“ steht für beliebige Aminosäuren.

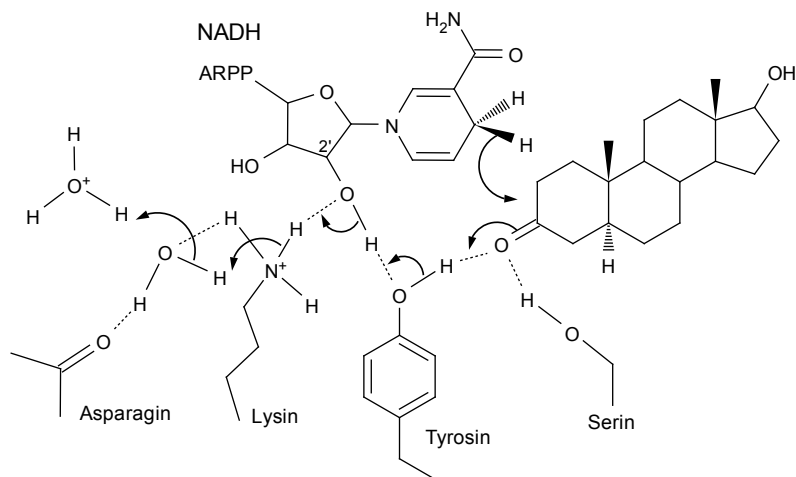


Abbildung 1.3 – Postulierter Katalysemechanismus der Reduktion von Carbonylfunktionen durch SDR. Als Beispiel ist die Reduktion von 5 α -Androstan-3-on-17-ol mit NADH als Kofaktor gezeigt [21]. *ARPP* steht für Adenin, Ribose und zwei Phosphatgruppen.

die Reduktion von Aldehyden und Ketonen bzw. die Oxidation von primären und sekundären Alkoholen [31]. Es sind aber auch eine Reihe anderer SDR-katalysierter Reaktionen untersucht worden (Zusammenfassung in [39]):

- Epimerasen (UDP-Galactose-Epimerase [85])
- Isomerasen (3 β -Hydroxy-5-en-Steroidisomerase [49])
- Dehydratasen (GDP-Mannose-4,6-Dehydratase [89])
- Decarboxylasen (UDP-Glucuronsäuredecarboxylase [3])
- Enoyl-CoA-Reduktasen (Mitochondriale 3,4-Dienoyl-CoA-Reduktase [1])

1.3 CARBONLYREDUKTASEN

Im menschlichen Organismus werden drei Enzyme der SDR-Superfamilie als Carbonylreduktasen bezeichnet: CBR1, CBR3 und CBR4. Die humane CBR1 ist 1973 [70], damals unter der Bezeichnung Aldehyd-Reduktase 1, und damit deutlich früher als die CBR3 und CBR4 identifiziert worden. Diese wurden erstmals im Rahmen von Genom-Sequenzierungsprojekten genannt, CBR3 im Jahr 1998 [94] und CBR4 im Jahr 2002 [76]. Die CBR4 ist im Gegensatz zu CBR1 und CBR3 kein Monomer und gehört einer anderen Unterfamilie an, was auch aus den neuen Bezeichnungen der SDR-Proteine ersichtlich ist, die im Rahmen der Systematisierung der Nomenklatur dieser Superfamilie vergeben wurden [62]. CBR1 und CBR3 sind der Unterfamilie 21 (SDR21C1 bzw. SDR21C2) zugeordnet und werden in Kapitel 1.4 beschrieben. Die CBR4 ist der Unterfamilie 45 zugeordnet (SDR45C1) und wird in Kapitel 1.5

Tabelle 1.1 – Übersicht der Carbonylreduktasen CBR1, CBR3 und CBR4

	CBR1	CBR3	CBR4
Uniprot ^a			
Accession	P16152	O75828	Q8N4T8
wwPDB-Codes	1WMA, 3BHI, 3BHJ, 3BHM, 2PFG	2HRB	–
Aminosäuren	277	277	237
Quartärstruktur	Monomer	Monomer	Heterotetramer
Kofaktor	NADPH	NADPH	NADPH

Die für die CBR4 angegebenen Daten zur Quartärstruktur und dem Kofaktor sind aus [13].

^aURL: <http://www.uniprot.org/>

beschrieben. Eine Übersicht der Eigenschaften von CBR1, CBR3 und CBR4 ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Der Name Carbonylreduktase 2 (CBR2) wird für eine SDR der Maus (*mouse lung carbonyl reductase*) beansprucht [55]. Ein als *human carbonyl reductase 2* (HCR2) bezeichnetes Enzym [43] wird auch nach dem physiologischen Substrat L-Xylulose als Dicarboxylreduktase/Xylulose-Reduktase (SDR20C1) genannt und ist eher als solche bekannt. Ein Defekt dieses Enzyms führt zur Pentosurie [93].

1.4 HUMANE CARBONYLREDUKTASEN CBR1 UND CBR3

Die CBR1 konnte in vielen Geweben identifiziert werden, unter anderem in Leber, Epidermis, Magen, Dünndarm, Niere und Nervengewebe [53, 97, 98]. Im Gegensatz zur CBR1 ist der Transkript-Level der CBR3 deutlich niedriger [38, 53].

Die humane CBR3 wurde 1998 auf der Suche nach Genen identifiziert, die in Zusammenhang mit Trisomie 21 stehen [94]. Das Gen ist 62 kb entfernt in 3'-Richtung von der CBR1 auf dem Chromosom 21q22.2 lokalisiert.

1.4.1 Struktur

Die Primärstruktur beider Enzyme umfasst 277 Aminosäuren und weist eine Identität von 72 % und eine Ähnlichkeit von 85 % auf*. Die *pig testes carbonyl reductase* (PTCR) ist das erste homologe Protein zur humanen CBR1, dessen Kristallstruktur aufgeklärt werden konnte [23]. 1994, und besser aufgelöst 2005, wurde die humane CBR1 kristallisiert [10, 77]. CBR1 und CBR3 sind zwei von drei[†] bislang bekannten monomeren SDR des Menschen [11]. Eine Extraloop-Domäne verhindert die Oligomerisierung über die P- und Q-Achse (Details siehe Kapitel 1.2.1 und Abbildung 1.1).

1.4.2 Substratspektrum der CBR1

Die CBR1 wurde 1981 erstmals umfassend als NADPH-anhängige Reduktase für eine Vielzahl verschiedenster Verbindungen charakterisiert [95]. Unter anderem wurden Enzymaktivitäten für 9,10-Phenanthrenchinon, Menadion, Ubichinon Q-1, Daunorubicin, 4-Nitrobenzaldehyd, Phenylglyoxal, 5 β -Dihydrotestosteron, 5 α -Dihydrotestosteron und die Prostaglandine E₁ und E₂ gemessen. Insbesondere ist eine Rolle der CBR1 bei der Detoxifizierung von Chinonen wahrscheinlich [96].

Als weitere Substrate der CBR1 wurden die Pharmaka Acetohexamid, Haloperidol, Loxoprofen, Metyrapon und Doxorubicin identifiziert [20, 58], für die Metabolisierung von Doxorubicin sogar als wichtigstes Enzym. Bei der Reduktion dieses Zytostatikums zu dem korrespondierenden Alkohol Doxorubicinol verliert der Stoff antineoplastische Wirksamkeit, ist aber stärker kardiotoxisch. Während rekombinante Aldo-Keto-Reduktase AKR1C3 die Reduktion schneller katalysiert als rekombinante CBR1, ist die CBR1 in Organen mit starker Clearance-Aktivität wie Niere, Leber und Organen des Verdauungstraktes stärker exprimiert. Zudem wurden die Inhibitionskonstanten für einen Hemmstoff der CBR1, welcher keinen Einfluss auf AKR1C3 hat, auch bei der Untersuchung von Lebercytosol gefunden [38].

Als toxikologisch relevante Verbindung gilt das tabakspezifische Nitrosamin NNK. Es ist im Tabak einer der verantwortlichen Bestandteile für die Entstehung von Krebs [30]. Durch Reduktion der in NNK enthaltenen Keto-Gruppe zu einem Alkohol entsteht NNAL, welches anschließend durch Glucuronidierung inaktiviert wird [45, 46]. Die CBR1 ist in der Lage, diese Reaktion effizient zu katalysieren [2, 12].

Die physiologische Bedeutung der CBR1 ist nicht eindeutig geklärt. Die nähere Untersuchung der CBR1 als Prostaglandin-9-Ketoreduktase hat gezeigt, dass eine physiologische Rolle im Prostaglandinmetabolismus auf Grund der geringen katalytischen Effizienz unwahrscheinlich ist [74]. Die Beteiligung der CBR1 an der Detoxifizierung

*Berechnet mit EMBOSS Align (URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/>). Parameter: global (needle); Blosum62-Matrix; Gap Open 10,0; Gap Extend 0,5.

[†]Die als atypische SDR eingestufte CC3 (UniProt [14] Identifier HTATIP2) wirkt als Tumorsuppressor [59].

reaktiver Sauerstoffspezies gilt hingegen als wahrscheinlich [47]. Reaktive Sauerstoffspezies werden mit der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Creutzfeld-Jakob in Verbindung gebracht [73]. Sie entstehen durch ein Ungleichgewicht zwischen sauerstoffinduzierter Radikalbildung und den daraus entstehenden reaktiven Verbindungen sowie den physiologischen antioxidativen Mechanismen. CBR1 reduziert das bei der Peroxidation von Membranlipiden gebildete reaktive ONE [16]. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass die Alkengruppierung des ONE ebenfalls reduziert und 4-Oxononanal gebildet werden kann, ein Beispiel für die Vielfalt von SDR katalysierter Reaktionen (siehe auch Kapitel 1.2.5).

Isatin (Indol-2,3-dion) ist eine endogene Verbindung, Bestandteil des Tribulins* und vermutlich ein Metabolit des Tryptophanstoffwechsels [50]. Als Wirkkomponenten wurden Inhibition der Monoaminoxidasen und der ANP-abhängigen Guanylat-Cyclase beschrieben [26, 27, 50]. Isatin ist als natürliches Substrat der CBR1 beschrieben [90].

Ein weiteres Substrat der CBR1, dessen Reduktion im physiologischen Stoffwechsel von Bedeutung sein könnte, ist S-Nitrosoglutathion. Dieses Addukt aus Glutathion und Stickstoffmonoxid (NO) ist Bestandteil der Regulation des NO-Spiegels. Es wird bei der Reaktion vermutlich zu dem Sulfinamid-Derivat des Glutathions reduziert, welches durch Hydrolyse zum Sulfinssäurederivat und Ammoniak zerfällt. Auch diese Reaktion ist ein Beispiel für die Vielfalt von SDR katalysierten Reaktionen (siehe auch Kapitel 1.2.5). Durch die Kristallisation von CBR1 mit inaktivem Hydroxymethylglutathion, dem Formaldehyd-Addukt von Glutathion, konnte die postulierte Glutathionbindetasche [88] von CBR1 nachgewiesen werden [5].

1.4.3 Substratspektrum der CBR3

Das erste und zu Beginn dieses Projekts einzige postulierte Substrat für die humane CBR3 war Menadion, welches mit niedrigen K_m -Werten und hoher katalytischer Effizienz beschrieben wurde [42]. Wie sich dann herausstellte, waren diese Angaben sehr kritisch zu bewerten, wie von uns und anderen Arbeitsgruppen festgestellt werden konnte [18, 53, 64].

1.5 HUMANE CARBONYLREDUKTASE CBR4

Das Gen der CBR4 wurde wie das der CBR3 im Rahmen eines Sequenzierungsprojektes entdeckt [76]. Der Locus des Gens ist 4q32.3. Das Protein besteht aus 237 Aminosäuren. Zu Beginn dieser Arbeit lag keine Veröffentlichung über das Protein vor, welche es biochemisch charakterisiert.

*Bezeichnung für endogene niedermolekulare Verbindungen mit MAO-Inhibitor-Aktivität [72]

1.6 AUFGABENSTELLUNG

Eine katalysierte Reaktion als Ausgangspunkt zur Charakterisierung der verantwortlichen Enzyme kann durch Reinigung aus Geweben mittels chromatographischer Verfahren erfolgen, an deren Endpunkt die Gewinnung homogener und entsprechend aktiver Proteine steht. Diese Proteine können dann strukturell untersucht werden, indem physikochemische Eigenschaften wie der isoelektrische Punkt, die Molmasse, die Primärstruktur oder gar die Kristallstruktur bestimmt werden.

Durch diese Methode können nur Enzyme gefunden werden, die eine gewisse Stabilität aufweisen, ausreichend exprimiert sind und eine bekannte Reaktion katalysieren. Mit den voranschreitenden Möglichkeiten zur Bestimmung der Sequenzen ganzer Genome hat man heute leicht auf jedes Gen Zugriff, welches im Transkriptom einer Zelle vorkommt. Und selbst wenn keine mRNA gebildet wird, können Gene synthetisiert werden. Mit den zur Verfügung stehenden Techniken kann Protein mit vergleichsweise wenig Aufwand im Milligramm-Maßstab hergestellt und der langwierige Weg der Reinigung von Protein aus Geweben dadurch oft umgangen werden. Mit diesem Vorgehen jedoch entstehen neue Herausforderungen, da einer Funktion kein Protein mehr zugeordnet werden muss, sondern dem Protein eine Funktion.

Zu Beginn dieses Projekts beschrieb eine Publikation die CBR3 als Protein [42] und charakterisierte das rekombinante Enzym als NADPH-abhängige Menadion-Reduktase. Die CBR4, in den Datenbanken zuerst als *carbonic reductase 4* und erst später als *carbonyl reductase 4* beschrieben, war als Protein nicht charakterisiert. Diese beiden wenig bzw. nicht charakterisierten Carbonylreduktasen CBR3 und CBR4 sollten rekombinant hergestellt und funktionell und strukturell charakterisiert werden. Dazu sollten sie insbesondere mit der lange bekannten und oft untersuchten CBR1 verglichen werden.

Besonders die hohe Sequenzidentität von CBR1 und CBR3 war Grundlage für den geplanten Strukturvergleich mittels ortsgerichteter Mutagenese (*site-directed mutagenesis*). Die Auswahl relevanter Aminosäuren sollte durch Untersuchung der Primär- und Tertiärstruktur erfolgen und entsprechend generierte Mutanten dann mit selektiven Substraten der CBR1 getestet werden. Ziel war, für die Katalyse relevante einzelne Aminosäuren oder Strukturdomänen zu identifizieren.

2.1 CHEMIKALIEN, BIOLOGISCHES MATERIAL UND VERBRAUCHSMATERIAL

Alle Materialien wurden in hohen Reinheitsgraden verwendet, sodass keine signifikanten Einflüsse auf Versuchsabläufe und Ergebnisse zu erwarten waren.

Acetohexamid⁸ – Acetoin⁸ – Aceton² – Acrylamid⁸ – Agar⁸ – Agarose, analytisch, Plaque GP¹ – Agarose, präparativ, NEEQ ultra² – Ammoniak⁹ – Ammoniumperoxodisulfat¹² – Ampicillin⁷ – 5 α -Androstan-3,17-dion⁸ – 5 β -Androstan-3,17-dion⁸ – 4-Androsten-11 β -ol-3,17-dion⁸ – 2-Benzoylpyridin⁸ – 3-Benzoylpyridin⁸ – 4-Benzoylpyridin¹⁵ – Bradford-Reagenz⁸ – Bromphenolblau¹⁰ – Butandion⁸ – Calciumchlorid⁹ – S-Campherchinon⁸ – R-Campherchinon⁸ – 2-Chloro-3-(N-Succinimidyl)-1,4-naphthochinon¹⁶ – 2-Chloro-3-pyrrolidin-1,4-naphthochinon⁸ – cDNA-Bibliothek Uni-ZAP@XR library⁶ – Chloramphenicol⁸ – Coomassie¹⁰ – Cortisol⁸ – Cortison⁸ – Diacetyl⁸ – Dialyseschlauch Servapor dialysis tubing, 16 mm diameter¹⁰ – 2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon⁸ – 2,6-Dimethyl-p-benzochinon⁸ – Dinatriumhydrogenphosphat⁹ – DMSO⁹ – DNA-Marker 100 bp DNA-Ladder, 100 bp DNA-Ladder-Plus, 1 kb DNA-Ladder-Plus⁵ – dNTP-Mix⁵ – DTT⁸ – EDTA¹¹ – Essigsäure² – Estradiol⁸ – Ethacrynsäure⁸ – Ethanol 99,8 %² – Ethylacetat² – Fenofibrat⁸ – Fertiggele BioRad SDS-Gradientengele mit Acrylamidkonzentrationen von 16 bis 4 %¹⁸ – Formaldehyd 37 %⁹ – Genistein⁸ – Glucose-6-Phosphat¹¹ – Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase⁸ – Glutathion⁸ – D,L-Glycerinaldehyd⁸ – Glycerol⁹ – Glycin⁹ – Harnstoff⁹ – Hefeextrakt⁸ – 2,3-Hexandion⁸ – 3,4-Hexandion⁸ – Hydroxynonenal¹⁹ – 7-Hydroxyflavon⁸ – Imidazol⁹ – S-1-Indanol⁸ – R-1-Indanol⁸ – 1-Indanon⁸ – IPTG² – Isatin⁸ – Isopropanol² – Kaliumacetat⁸ – Kaliumcarbonat⁸ – Kaliumchlorid⁹ – Kaliumdihydrogenphosphat⁹ – Kaliumpermanganat⁹ – Kanamycin¹⁴ – Ketoprofen⁸ – Kupfer(II)-chlorid⁹ – Lysozym⁸ – Magnesiumchlorid⁹ – Menadion⁹ – Methanol² – Methylglyoxal⁸ – 4-Methylpentanal⁸ – Metyrapon⁸ – NADP-Dinatriumsalz² – NADPH-Dinatriumsalz² – Naloxon⁸ – 1,2-Naphthochinon⁸ – 1,4-Naphthochinon⁸ – Naringenin⁸ – Natriumchlorid⁸ – Natriumdihydrogenphosphat¹³ – Natriumhydroxid⁹ – Natriumnitrit⁹ – 4-Nitrobenzaldehyd⁸ – Oracin²⁰ – Oxononenal¹⁹ – Oxononenal, GSH-Addukt¹⁹ – 2,3-Pentandion⁸ – 9,10-Phenanthrenchinon⁸ – PIPES⁸ – Prednison⁸ – 5 β -Pregnan-17 α -21-diol-3,11,20-trion⁸ – 4-Pyridin-Carboxaldehyd⁸ – Quercitrin² – Resveratrol⁸ – RNase A¹⁰ – Rutin⁸ – Salzsäure 30 %⁹ – SDS⁸ – Silbernitrat⁹ – SybrSafe³ – TEMED¹² – Testosteron⁸ – Tetracyclin⁸ – Trichloressigsäure⁹ – Tris⁸ – Trypton⁸

¹Biozym, Hessisch-Oldendorf, Deutschland; ²Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland; ³Invitrogen, Californien, USA; ⁴Qiagen, Hilden, Deutschland; ⁵Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland; ⁶Stratagene, Cedar Creek, Texas; ⁷AGS, Heidelberg, Deutschland; ⁸Sigma-Aldrich, München, Deutschland; ⁹Merck, Darmstadt, Deutschland; ¹⁰Serva, Heidelberg, Deutschland; ¹¹Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland; ¹²GE Healthcare, New Jersey, USA; ¹³Promega, Mannheim, Deutschland; ¹⁴Alexis-Biochemicals, Lörrach, Deutschland; ¹⁵TCI Europe, Zwijndrecht, Belgien; ¹⁶zur Verfügung gestellt vom *Structural Genomics Consortium* Oxford; ¹⁷Hergestellt vom Institut für organische Chemie der Universität Kiel; ¹⁸Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland; ¹⁹Hergestellung und Bezug siehe [16]; ²⁰Zur Verfügung gestellt von Prof. V. Wsol, Tschechische Republik

2.2 STAMMLÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN

In den Methoden-Kapiteln 3 und 4 wird die Bezeichnung der hier alphabetisch aufgelisteten Stammlösungen, Puffer und Medien verwendet. Sind keine Lagerbedingungen angegeben, wurde bei RT gelagert.

Agarosegel-Ladepuffer

Es wurde ein 6-fach-Konzentrat aus 50 mM EDTA, 0,005 % (m/v) Bromphenolblau und 36 % (v/v) Glycerol in Wasser verwendet, alternativ 6-fach-Ladepuffer von Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland).

Agar-Platten

5 g Trypton, 2,5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl und 7,5 g Agar wurden mit 500 ml demineralisiertem Wasser versetzt, suspendiert und autoklaviert. Das Medium kühlte nach dem Autoklavieren solange ab, dass es gerade noch flüssig war. Die entsprechende Menge Antibiotikum wurde zugesetzt und das Medium in Kulturschalen gegossen, je Schale ca. 25 ml. Die erstarrten Platten wurden bei 4 °C und vor Austrocknung geschützt gelagert.

Ampicillin

Ampicillin wurde in einer Konzentration von 100 mg/ml angesetzt und sterilfiltriert (0,22 µm-Sterilfilter). Aliquote wurden bei -20 °C gelagert. Die Lösung wurde als 1000-fach-Konzentrat verwendet.

Calciumchloridlösung

60 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerol, 10 mM PIPES, pH 7,0, sterilisiert

Chloramphenicol

Chloramphenicol wurde in 1000-fach konzentrierten ethanolischen Stammlösungen mit einer Konzentration von 50 mg/ml eingesetzt, die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Imidazol-Puffer

Für die Nickel-Affinitätschromatographie wurden zwei Puffer für Gradientenelution verwendet. Puffer A enthielt 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol und 20 mM Natriumdihydrogenphosphat, pH 7,4. Puffer B enthielt 500 mM Imidazol und war sonst gleich zusammengesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

IPTG-Lösung

IPTG wurde als 0,5 M sterilfiltrierte Stammlösung (0,22 µm-Sterilfilter) eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Kanamycin

Kanamycin wurde in Wasser mit einer Konzentration von 25 mg/ml gelöst, sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße) und als 1000-fach-Konzentrat eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

LB-Medium

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl wurden mit 1 l demineralisiertem Wasser versetzt, suspendiert, autoklaviert und anschließend bei 4°C gelagert.

Lysepuffer

200 mM Natriumhydroxid, 1 % SDS (m/v)

NADPH-regenerierendes System

Als Zusatz zu einem Reaktionsgemisch aus Puffer und Substrat wurde eine Lösung aus 3 mM NADP-Dinatriumsalz, 20 mM Glucose-6-Phosphat, 1,8 U/ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 10 mM MgCl₂ verwendet.

Neutralisationspuffer

3 M Kaliumacetat, pH 5.5

PBS-Puffer

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ in 1000 ml Wasser, pH 7,4

Resuspendierpuffer

50 mM Tris · HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA

RNase-A-Lösung

10 mg RNase A wurden in 1 ml Wasser für 30 min bei 95°C erhitzt. 100 µl 1 M Tris-Puffer pH 7,4 wurden ergänzt. Die Lösung wurde in 100 µl-Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Sammelgel

Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt, Zusammensetzung: 938 µl SDS-Sammelgelpuffer, 2,32 ml Wasser, 15 µl 10 % (v/v) Ammoniumperoxodisulfat, 1,5 µl TEMED.

SDS-Färbelösung

0,02 % (m/v) Coomassie-Blau, 10 % (v/v) Essigsäure

SDS-Laufpuffer

5-fach-Konzentrat aus 125 mM (15,1 g) Tris, 960 mM (72,0 g) Glycin, 17,3 mM (5,0 g) SDS

SDS-Probenpuffer

5-fach-Konzentrat aus 0,0225 M Tris · HCl, pH 6,8, 50 % (v/v) Glycerol, 5 % SDS, 0,05 % (m/v) Bromphenolblau, 0,25 M DTT. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

SDS-Sammelgelpuffer

0,4 % SDS, 0,5 M Tris · HCl, pH 6,8

SDS-Trenngelpuffer

0,4 % SDS, 1,5 M Tris · HCl, pH 8,8

TAE-Puffer

1 mM EDTA, 40 mM Tris-Acetat, pH 8,0, als 50-fach-Konzentrat hergestellt

Tetracyclin

Tetracyclin wurde in 100-fach konzentrierter ethanolischer Stammlösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml eingesetzt, die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung hergestellt.

Trenngel, 8 %

1,9 ml SDS-Trenngelpuffer, 3,6 ml Wasser, 2 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30 %, 24 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat, 2,4 µl TEMED, die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

Trenngel, 10 %

1,5 ml SDS-Trenngelpuffer, 2,5 ml Wasser, 2,0 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30 %, 24 μ l 10 % Ammoniumperoxodisulfat, 2,4 μ l TEMED, die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

Waschpuffer

0,1 M NaCl, 10 mM Tris pH 7,5, 2,5 mM EDTA in 50 % (v/v) Ethanol

Wasser

Es wurde zweifach destilliertes Wasser verwendet, wenn nicht anders angegeben.

2.3 EXPRESSIONSVEKTOREN

Alle verwendeten Vektoren dienen zur *lac*-Operator gesteuerten Proteinexpression in *E. coli*-Systemen, induzierbar durch IPTG. IPTG ist ein Lactose-Derivat, kann jedoch nicht verstoffwechselt werden. Bei der Expression mit diesen Vektoren werden Proteine mit 6 aufeinanderfolgenden Histidinen versehen (6-fach-His-Tag). Durch komplexartige Bindungen zwischen den Imidazol-Stickstoffen der Histidine und auf Sepharose immobilisiertem Nickel kann eine chromatographische Trennung erfolgen. Die Vektoren verleihen transformierten Zellen Ampicillin-Resistenz.

Der Vektor pQE-70 (Qiagen, Hilden, Deutschland) ist 3426 Basenpaare lang und führt zu einem C-terminal exprimierten His-Tag.

Der Vektor pET-15b (Merck/Novagen, Darmstadt, Deutschland) ist 5708 Basenpaare lang und bedingt einen N-terminal exprimierten His-Tag, der zusätzlich über eine Thrombinschnittstelle abverdaut werden kann.

Der Vektor pET-43b (Merck/Novagen, Darmstadt, Deutschland), 7194 Basenpaare lang, zeichnet sich dadurch aus, dass das gewünschte Gen zusammen mit einem Nus-Tags [15] exprimiert wird. Dabei handelt es sich um ein 495 Aminosäuren langes, gut wasserlösliches Protein, welches den Anteil gebildeter *Inclusion-Bodies* verringern kann. Der Nus-Tag ist über eine Thrombinschnittstelle mit dem Zielprotein verknüpft.

2.4 OLIGONUCLEOTIDE

Oligonucleotide für PCR wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, bezogen (Tabelle 2.1). Nach Herstellerangabe wurden die Oligonucleotide mit Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt und in einer Verdünnung von

1:10 für PCR-Reaktionen verwendet. Sämtliche Primerlösungen wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.1 – Verwendete Oligonukleotide

#	Name	Sequenz (5'-3')
1	3'CBR3-142MS	TTCAAAAGCCCTTAAGCTCATCAAACACTGATATTCAC
2	3'CBR3-191SSA	CTTGGACACCCCATAAAGCTGAGCTGGGCCAGCCTTCCCT
3	3'CBR3-1-SOE	TGGGCTCTTGGTGGCCTTGGGTCCC GCCATGTCTGTCTCACTGGT
4	3'CBR3-97VA	AAAGGCATTGGATCAGCAACCTTGAAGGGCAGCGC
5	3'CBR3-met-mut	AGCCCCCTCCTCCATAGTCTGATGTCTGT
6	3'CBR4-CDS	TTACAAAATGAGTTGTAATCC
7	3'CBR4-Xho1-Nhe1	TTCAGCCTCGAGGCTAGCTTACAAAATGAGTTG
8	3'cr3kpn1	TTCAGCGGTACCCAGTTTTGCACAAC
9	3'cr4-kpnbambi2	TTCAGCAGATCTGGATCCGGTACCCAAAATGAGTTGTAA
10	3'CR4-Xho1-pET43	TTCAGCCTCGAGCAAAAATGAGTTGTAA
11	3'-hCR-Xho1-right	GACGACCTCGAGTCACCACTGTTCAAC
12	3'-P230W	CATGTCTGTCTTACCCATCCTGGGCAGCACGC
13	5'A1B10-Spe1Kpn1	GTGATTACTAGTGGTACCATGGCCACGTTTGTG
14	5'CBR3-142MS	GTGAATATCAGTAGTTTGTAGAGCTTAAGGGCTTTTGAA
15	5'CBR3-191SSA	AGGGAAGGCTGGCCAGCTCAGCTTATGGGGTGTCCAAG
16	5'CBR3-1-SOE	GCGGGACCCAAGGCCACCAAGAGCCAGAGGGGGGTGAGACCC
17	5'CBR3-97VA	GCCGTCGCCTTCAAGTTGCTGATCCAATGCCCTT
18	5'cbr3-met-mut	ACAGCATCAGGACTATGGAGGAGGGGGCT
19	5'CBR4-CDS	ATGGACAAAAGTGTGTCTGT
20	5'CBR4-Nde1-Spe1	AGCTTTCATATGACTAGTATGGACAAAAGTGTGT
21	5'cbr4sph1GAspe1	AGCTTTCATGCGAACTAGTGACAAAAGTGTGTCT
22	5'cr3spe1sac2	AGCTTTACTAGTCCGCGGTCTGCTGCAGCCGC
23	5cr4sac2GTthromb	AGCTTTCGCGGGTCTGGTCCCCGGGGCAGCATGGACAAAAGTGTGTCT
24	5'-P230W	GCGTGTGCCAGGATGGGTGAAGACAGACATG
25	CBR1-CDS-3'	TCACCACTGTTCAACTCTCTTCTC
26	CBR1-CDS-5'	ATGTCGTCCGGCATCCAT
27	CBR1-Nde1-neu	ACGACGCATATGTCGTCCGGCATCCATGTAGCGTGGTGACT
28	CBR3-1-soe-chim	GAGGAGGGGGCTGAGACCCCTGTGTACTTG
29	CBR3-pET15b-3'-Xho1	GGACTCGAGTTACCAGTTTTGCACAAC
30	CBR3-pET15b-5'-Nde1	GCACATATGTCGTCTGCAGCCGCGTG
31	ColiDo	AAGCCGGAGCACTGATTATG
32	CR3pET15b3'Xho1-Lng	GACGACCTCGAGTTACCAGTTTTGCACAAC
33	CR3pET15b5'Nde1-Lng	GTGAGAGCACATATGTCGTCTGCAGCCGCGTG
34	H270S-CBR3-Xho1	GACGACCTCGAGTTACCAGTTTTGCACAACCTTGTCACTGACCAA
35	H270S-V273R-gut	GACGACCTCGAGTTACCAGTTTTGAACCCGTTTGTCACTGAC
36	NusTag	TTCACTTCTGAGTTCGGCATG
37	pETup	TAATACGACTCACTATAGG
38	pQE3-4	CGGATAACAATTCACACAG
39	pQErev	GTTCTGAGGTCATTACTGG
40	T7term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
41	xho1-AKR1B10-3'	GGTCTCGAGTCAATATTCTGC

Im Text wird auf die Nummer der Primer verwiesen. Der Name gibt die Bezeichnung des Primers bei der Bestellung an.

2.5 POLYMERASEN

2.5.1 *Taq-Polymerase*

Diese Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland, 5 U/ μ l) aus *Thermus aquaticus* wurde für analytische PCR-Reaktionen eingesetzt, da sie im Gegensatz zur Pfu-Polymerase keine *proofreading*-Aktivität, dadurch aber eine hohe Polymerisationsgeschwindigkeit im Gegensatz zur Pfu-Polymerase (Kapitel 2.5.2) zeigt. Elongationsphasen von 1 min reichen für die Verknüpfung von 1000 Nukleobasen, während die Pfu-Polymerase dafür 2 min benötigt (Kapitel 2.5.2).

2.5.2 *Pfu-Polymerase*

Pfu-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland, 2,5 U/ μ l) aus *Pyrococcus furiosus* wurde für präparative PCR eingesetzt, da sie durch *proofreading*-Aktivität Replikationsfehler korrigiert.

2.5.3 *HotStar HiFidelity Polymerase*

HotStar HiFidelity Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland, 2,5 U/ μ l) wurde für PCR-Reaktionen mit cDNA-Bibliotheken als Matrize eingesetzt. PCR-Reaktionen starten bereits bei Temperaturen, die unspezifische Primer-Matrizen-Paarungen ermöglichen, etwa beim Pipettieren des Ansatzes. Durch den Einsatz von Polymerasen, die erst durch hohe Temperaturen aktiviert werden, kann so der Anteil unspezifischer Amplifikationsprodukte reduziert werden. Ein weiterer Faktor, der die Spezifität der Amplifikate mindert, ist eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (*proofreading*-Aktivität) von Polymerasen. Auf Grund dieser Eigenschaft können Primer und Matrizen-DNA hydrolytisch gespalten und korrigiert werden. Die HotStar HiFidelity Polymerase weist eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität auf, die ebenso wie die Polymeraseaktivität erst durch hohe Temperaturen „freigeschaltet“ wird. Dadurch soll eine gesteigerte Spezifität und Effizienz bei kleinen Mengen Matrizen-DNA ermöglicht werden [68].

2.6 RESTRIKTIONSENZYME

Es wurden für alle Restriktionsansätze folgende Enzyme und die entsprechenden Puffer von New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA) verwendet: *Bgl*II, 10 U/ μ l; *Hinf*I, 10 U/ μ l; *Kpn*I, 10 U/ μ l; *Nde*I, 20 U/ μ l; *Sac*II, 20 U/ μ l; *Sph*I, 5 U/ μ l; *Xho*I, 20 U/ μ l.

2.7 BAKTERIENSTÄMME

2.7.1 *XL1-Blue*

Der XL1-Blue-Stamm (Stratagene, Cedar Creek, Texas, USA) ist für Plasmidpräparationen, optional mit Blau-Weiß-Selektion (wurde nicht verwendet) konzipiert. Der Stamm ist resistent gegen Tetracyclin und defizient bezüglich einiger Endonukleasen und *recA* (ein Protein, das Rekombinationen katalysiert).

2.7.2 *SG13009*

Der *E. coli*-SG13009-Stamm (Qiagen, Hilden, Deutschland) ist für die Expression von pQE-Vektoren konzipiert. Er verfügt über ein Kanamycinresistenz verleihendes Plasmid, welches den *lac*-Repressor exprimiert. Daher ist mit SG13009-Zellen in kanamycinhaltigem Milieu zu arbeiten. Die Überexpression der in pQE-Vektoren klonierten Gene wird durch die Inaktivierung des Repressors nach Zusatz von IPTG induziert.

2.7.3 *BL21(DE3)*

Dem *E. coli*-Proteinexpressionsstamm BL21(DE3) (Merck/Novagen, Darmstadt, Deutschland) fehlen die *lon**- und *ompT*-Proteasen[†]. Er ist zudem ein Lysogen des 1DE3-Phagen, dadurch ist das durch den LacUV5-Promotor kontrollierte Gen der T7-RNA-Polymerase in das Chromosom integriert. Die Expression der T7-RNA-Polymerase ist IPTG-induzierbar.

2.7.4 *Origami(DE3)*

Der Origami(DE3)-Stamm (Merck/Novagen, Darmstadt, Deutschland) ist für die Expression von Proteinen gedacht, die Disulfidbrücken als Strukturelement benötigen. Die Mutationen der Thioredoxinreduktase und der Glutathionreduktase führen bei diesem auf BL21-basierenden *E. coli*-Stamm zu oxidierenden Bedingungen im Cytosol und damit zu einer ausgeprägten Bildung von Disulfidbrücken in exprimierten Proteinen [8]. Die Zellen sind gegen Kanamycin und Tetracyclin resistent.

*ATP-abhängige Protease

[†]*outer membrane protein T*, Serin-Protease

2.8 GERÄTE

Autoklav

Systeme tuttnauer 2540EL (Systec, Wetzlar)

pH-Meter

pH 535 MultiCal® (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland)

SDS-Gel-Scanner und Fixierung

Gele wurden entweder mit Durchlicht eingescannt (PowerLookIII, Umax, Willich) und auf Filterpapier fixiert (SGD2000 Slab Gel Dryer, Fisher Scientific, Schwerte) oder in fixierter Form gescannt (Lide 25, Canon, Krefeld, Deutschland und HP ScanJet 4850, Hewlett-Packard, Böblingen, Deutschland).

Agarose-Gel-Analytik und Dokumentation

Für präparative Zwecke wurde der NU-72KL UV-Flächenstrahler (Benda, Wielsoch, Deutschland) mit 360 nm Wellenlänge, für analytische Zwecke mit 254 nm eingesetzt. Für analytische Zwecke zur Dokumentation wurde der ImageMaster VDS mit FujiFilm Thermal Imaging System FTI 500 (GE Healthcare, New Jersey, USA) verwendet.

Photometer

Folgende Photometer wurden verwendet: Gene Quant II (GE Healthcare, New Jersey, USA) zur Messung von DNA-Konzentrationen; Uvikon™ 810 (Kontron Analytical GmbH, Schweiz) zur Messung der optischen Dichte von Bakterienkulturen; Cary 100 scan photometer (Varian, Californien, USA) zur Messung von Spektren, photometrischer Messung von Enzymkinetiken und zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen; Tecan GENios Pro (Tecan, Männedorf, Schweiz) zur Messung von Proteinkonzentrationen.

Nickel-Affinitätschromatographie

Äkta-Purifier 900er Serie (GE Healthcare, New Jersey, USA) mit HisTrap-HP 1 ml Nickel-Agarose-Säulen (GE Healthcare, New Jersey, USA)

PCR-Cycler

T-Gradient (Biometra, Göttingen, Deutschland)

Zentrifugen

Zur Zentrifugation wurden eingesetzt: TGA-65 Ultracentrifuge (Kontron Analytical GmbH, Schweiz) mit Rotor Kontron TFT 70.38 für Ultrazentrifugation; J2-HS (Beckman, Krefeld, Deutschland) mit Rotoren JA-10 für die Zentrifugation von Bakterienkulturen und JA-20 für Plasmid-Maxipräparationen; Biofuge 15R und Biofuge (Thermo, Waltham, Massachusetts, USA) für die Zentrifugation von Mikroreagiergefäßen. In diesem Fall ist statt der Erdbeschleunigung g die rpm-Zahl angegeben, der Rotordurchmesser beträgt 85,4 mm.

Ultraschallaufschluss von Bakterien

Sonopuls UW2200 Ultraschallstab (Bandelin, Berlin, Deutschland)

Ultrafiltration

Amicon Model 12, 10 ml und Millipore Polyethersulfon-Membranen mit 10 kDa Ausschlussvolumen (Millipore, Schwalbach, Deutschland)

Mechanischer Zellaufschluss

FRENCH Press (Thermo, Waltham, Massachusetts, USA)

Einige der beschriebenen Methoden sind selbst entwickelt oder modifiziert worden, das zuletzt eingesetzte Protokoll wird in diesem Fall genau beschrieben. Die Reihenfolge der Methoden orientiert sich an der Reihenfolge der Arbeitsschritte.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Methoden dienen der Herstellung von Expressionsplasmiden (siehe Anhang A.1, Seite 107). Durch PCR gewonnene Insert-DNA von Wildtypen und Mutanten sowie Plasmid-DNA wurde nach analytischer und präparativer Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2) sowie Aufreinigung (Kapitel 3.3) mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (Kapitel 3.4) und durch Ligasen kovalent verknüpft (Kapitel 3.5). Kompetente *E. coli*-Bakterien (Kapitel 3.6.1) wurden mit den Ligationsansätzen versetzt und einer Hitzeschockbehandlung unterzogen (Kapitel 3.6). Die eingesetzten Plasmide (Kapitel 2.3) erzeugen bei transformierten Kolonien eine Antibiotikaresistenz, die als Selektionskriterium genutzt wird. Auf antibiotikahaltigen Agar-Platten gewachsene KBE wurden durch Kolonie-PCR oder analytischer Plasmidpräparation auf Transformation mit inserthaltigen Plasmiden geprüft (Kapitel 3.7.2 und 3.7.1). Entsprechende KBE wurden dann kultiviert und Plasmid-DNA isoliert (Kapitel 3.3.3 und 3.3.4). Die gereinigte DNA wurde anschließend durch Sequenzierung (Kapitel 3.8) auf PCR-bedingte Replikationsfehler überprüft. Verifizierte Plasmid-DNA wurde zur Transformation von Expressionsstämmen verwendet (Kapitel 3.6.3).

Die Gewinnung von Ziel-DNA, die Herstellung der DNA der Mutanten und wie sie in einzelne Plasmide kloniert wurde, ist in den Kapiteln 3.9, 3.10 und 3.11 beschrieben. Alle anschließend erfolgten Schritte sind in Kapitel 4 erläutert.

3.1 POLYMERASE-KETTENREAKTION

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, mit der es in kürzester Zeit gelingt, spezifische DNA-Fragmente in großer Zahl zu vervielfältigen [71]. In dieser Arbeit wurde diese Methode für die Amplifikation von Zielgenen aus Leber-cDNA-Bibliotheken (Kapitel 3.9), für die Modifikation von DNA zur Klonierung (Kapitel 3.11), zur Mutagenese (Kapitel 3.10) sowie zu analytischen Zwecken (Kapitel 3.7.1) genutzt. Die Zusammensetzungen der Reaktionsansätze sind in Tabelle 3.1, die Temperaturprogramme in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.1 – Reaktionsansätze für PCR

Komponente	Polymerase/Volumen je Reaktionsansatz [μ l]		
	<i>Taq</i> / <i>Pfu</i>	HotStar- <i>Taq</i>	<i>Taq</i> Kolonie- PCR
Polymerase	1	1	0,2
Matrize	1	1	1
dNTPs	1	1	0,4
5'-Primer	1	1	0,4
3'-Primer	1	1	0,4
Puffer	5	10	2
Wasser	ad 50	ad 50	ad 20

Tabelle 3.2 – Temperaturprogramm für PCR

#	Phase	Zeit [min]	Temp. °C	Zurück zu #	Wieder- holungen
1	initiale Denaturierung	3	95		
2	Denaturierung	1	95		
3	Hybridisierung	1	55		
4	Elongation	1 (2)	72	2	24
5	abschließende Elongationsphase	10	72		
6	Kühlung	∞	4		

Der in Klammern angegebene Wert für die Elongationsphase gilt für *Pfu*-Polymerase (siehe auch Kapitel 2.5.2).

3.2 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Zur Herstellung der Gele wurde TAE-Puffer mit 0,8–1 % (m/v) der entsprechenden Agarose (analytische bzw. präparative Qualität) versetzt, bis zur Schlierenfreiheit aufgekocht und verdampftes Wasser anschließend ergänzt. SybrSafe (als Ersatz für Ethidiumbromid) wurde zu einer Konzentration von 0,01–0,02 % (v/v) ergänzt und die Gele gegossen. Die DNA-Proben wurden vor der Elektrophorese mit Agarosegel-Ladepuffer versetzt. Nach Beladen der erstarrten Gele mit Proben und geeignetem DNA-Marker wurde die Elektrophorese bei konstanten Stromstärken von 80 mA bei kleinformatischen Gelen (7 cm Länge und 8,5 cm Breite) und bis zu 140 mA bei großformatigen Gelen (12 cm Länge und 14 cm Breite) durchgeführt.

3.3 DNA-REINIGUNG

3.3.1 Zentrifugiermethode zur Isolierung von DNA aus Gelen

Diese Methode wurde verwendet, um DNA als Vorlage für nachfolgende PCR-Ansätze zu gewinnen und kam bei der Herstellung der Mutanten zum Einsatz (Kapitel 3.10). Der Boden eines 500- μ l-Mikroreagiergefäßes wurde mit einer Kanüle durchstochen und anschließend zu einem Drittel mit silanisierter Glaswolle gefüllt. Der Deckel des Gefäßes wurde abgeschnitten. Das Gefäß wurde in ein 1,5-ml-Mikroreagiergefäß gesteckt. Die DNA-Banden wurden aus den Agarose-Gelen geschnitten (UV-Tisch, 360 nm) und auf die Glaswolle gelegt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 8000 rpm gelangte die DNA in TAE-Puffer in das große Mikroreagiergefäß, die Agarose wurde in der Glaswolle zurückgehalten.

3.3.2 DNA-Reinigung für Ligations- und Restriktionsansätze

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen für Ligationen und Restriktionsansätze wurden die beiden Kits QIAEX II-*Gel Extraction Kit* und QIAquick *Gel Extraction Kit* nach Vorgabe des Herstellers verwendet (Qiagen, Hilden, Deutschland). Zur Reinigung von PCR-Reaktionen wurde das QIAquick *PCR Purification Kit* verwendet (Qiagen, Hilden, Deutschland).

3.3.3 Plasmid-Maxi-Präparation

Dieses Protokoll wurde zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA (bis zu 1 mg) für anschließende präparative Weiterverarbeitung eingesetzt. Das QIAGEN Plasmid Maxi-Protokoll [67] wurde in folgender abgewandelter Form eingesetzt. Mit 2 ml einer Vorkultur von transformierten XL1-Blue-Zellen wurde ein antibiotikahaltiges Kulturvolumen von 200 ml angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 Umdrehungen

kultiviert. Diese Kultur wurde mit je 7 ml des Resuspendier-, Lyse- und Neutralisationspuffers (diese entsprechen den Puffern P1, P2 und P3 des Handbuchs) und einer QIAGEN-tip 500 Säule (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgearbeitet. Alle weiteren Schritte entsprachen den Vorgaben des Handbuchs.

3.3.4 Plasmid-Mini-Präparation

Eine 10 ml Übernachtskultur wurde bei 6000 g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Resuspendierpuffer aufgeschlämmt. 200 µl Lysepuffer wurde zugesetzt, vorsichtig durch Kippen und Schwenken gemischt und für 1 min bei RT inkubiert. 200 µl Neutralisationspuffer wurden zugesetzt und erneut wurde vorsichtig gemischt. Die Mischung wurde bei 13 000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert.

400 µl des Überstands wurden mit 1 ml Ethanol 99,5 % (v/v) versetzt und 20 min und 13 000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl Wasser gelöst und mit 1 µl RNase A-Lösung für 1 h bei RT inkubiert.

Die Lösung wurde mit 500 µl 6 M NaI-Lösung* versetzt, gemischt und durch eine Silicasäule (aus QIAquick *Gel Extraction Kit*, Qiagen, Hilden, Deutschland) zentrifugiert, 1 min bei 13 000 rpm. Das Zentrifugat wurde verworfen. Die Säule wurde mit 750 µl Waschpuffer beladen und für 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen, die Säule erneut zentrifugiert und anschließend in ein neues 1,5-ml-Mikroreagiergefäß gesteckt. 50 µl 10 mM Tris-Puffer, pH 8,5 wurden auf die Säule gegeben und die Säule für 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die DNA-Konzentration im Zentrifugat wurde photometrisch bestimmt.

3.4 RESTRIKTIONSANSÄTZE

Restriktionsansätze wurden in Heizblöcken, Brutschränken oder Wasserbädern bei 37 °C inkubiert, die Inkubationszeit wurde abhängig vom Zweck des Restriktionsansatzes gewählt. Plasmid-DNA für Ligationen wurde für bis zu 3 h verdaut, Insert-DNA für 1 h, analytische Restriktionsansätze aus Plasmidpräparationen für Koloniescreening (Kapitel 3.7.2) für 0,5 h. Ein Ansatz ist beispielhaft in Tabelle 3.3 dargestellt. Das Volumen Restriktionsenzym-Lösung wurde unabhängig von der Aktivität gewählt.

3.5 LIGATION

Sämtliche Ligationen wurden mit dem *Rapid Ligation Kit* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt. Ein Ansatz enthielt 50-100 ng Vektor-DNA, einen mindestens dreifach-molaren Überschuss von Insert-DNA, 4 µl 5 × *Rapid-Ligation-Buffer*,

*Durch das Natriumiodid bindet die DNA stärker [54, 92].

Tabelle 3.3 – Restriktionsansatz

Komponente	Volumen [μl]
Puffer NEBuffer 4	2
BSA 10 \times	2
<i>Nde</i> 1	1
<i>Xho</i> 1	1
Wasser	ad 20

Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Präparation von Insert-DNA. Die Zusammensetzung ist prinzipiell identisch für sämtliche durchgeführten DNA-Restriktionen.

Wasser ad 19 μl und 1 μl T4-DNA-Ligase. Der Ansatz wurde gevortext, an zentrifugiert und bei ca. 22 °C für 5 bis 60 min inkubiert. 5 μl des Ligationsansatzes wurden für die Transformation (Kapitel 3.6.2) eingesetzt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt, wobei 1 AU einer Konzentration von 50 ng/ μl bei 1 cm Schichtdicke gleichgesetzt wurde.

3.6 TRANSFORMATION

3.6.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Von einem Bakterienstamm, bei -80 °C gelagert, wurde eine Übernachtskultur bei RT in 10 bis 20 ml LB-Medium hergestellt. Mit 2 ml dieser Kultur wurden 200 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C bis auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,6 AU wachsen gelassen. Das Kulturmedium ist je nach Stamm mit entsprechenden Antibiotika-Stammlösungen versetzt worden (Kapitel 2.2). Folgende Schritte wurden bei 4 °C oder in Eiswasser durchgeführt. Die Kultur wurde für 20 min auf Eiswasser abgekühlt und für 15 min bei 3000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml auf Eiswasser gekühlter Calciumchloridlösung durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und anschließend 15 min bei 3000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Das Pellet wurde dann in 5 ml Calciumchloridlösung resuspendiert. Diese Suspension wurde in 100- μl -Portionen in 1,5-ml-Mikroreagiergefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

3.6.2 Transformation mit Ligationsansätzen

100 μl kompetenter XL1-Blue-Zellen wurden mit 5 μl Ligationsansatz versetzt, der Ansatz vorsichtig mit der Pipettenspitze gerührt und 30 min in Eiswasser inkubiert.

Durch Hitzeschock bei 42°C für 90 s im Wasserbad oder in einem Heizblock wurde transformiert. Anschließend wurde für weitere 3 min in Eiswasser inkubiert. Dem Ansatz wurden 500 µl LB-Medium zugefügt, die Mischung wurde suspendiert, für 1 h bei 37°C inkubiert und dann komplett auf antibiotikahaltige Agar-Platten gegossen. Die Agar-Platten inkubierten über Nacht bei 37°C. Die Kolonien wurden entweder durch *Miniscreen* oder Kolonie-PCR überprüft (siehe Kapitel 3.7).

3.6.3 Transformation mit Plasmidpräparationen

100 µl kompetenter Zellen wurden mit 1–10 ng Plasmid-DNA nach dem in Kapitel 3.6.2 angegebenen Verfahren transformiert, es wurden jedoch nur 100 µl ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer KBE wurde dann eine Vorkultur mit 5–20 ml antibiotikahaltigem LB-Medium angesetzt (weiter siehe Kapitel 4.1.1 und folgende).

3.7 KOLONIE-SCREENING

3.7.1 Kolonie-PCR

Kolonie-PCR ist eine Methode, um transformierte Kolonien zu identifizieren, die das Zielgen enthalten. Dazu wurde 1 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit Hilfe einer ausgeglühten Impföse mit einer KBE angeimpft und bei 37°C inkubiert, bis nach etwa 8 h eine deutliche Trübung eintrat. Je 1 µl einer Kultur wurde als Matrize in einem PCR-Ansatz wie in Tabelle 3.1 beschrieben verwendet. Es wurden die Primer eingesetzt, mit denen auch das Insert hergestellt wurde. Die Parameter für die PCR sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Es wurden 25 bis 35 Polymerisationszyklen verwendet*. Die 1-ml-Kulturen dienen gleichzeitig zum Animpfen größerer Kulturvolumina für Plasmidpräparationen (Kapitel 3.3.3 und 3.3.4).

3.7.2 Kolonie-Screening durch Plasmidpräparation

Die Methode dient, wie die Kolonie-PCR (Kapitel 3.7.1), zur Identifizierung transformierter Kolonien, die das Zielgen enthalten. Es handelt sich um ein vereinfachtes Protokoll zur Plasmidpräparation, das Prinzip ist in [9] beschrieben.

- 1 ml mit Antibiotikum versetztes Kulturmedium in 1,5-ml-Mikroreagiergefäßen wurde mit einer KBE angeimpft.
- Von jeder Kultur wurde ein Abstrich auf einer Agar-Platte gemacht, um damit später Vorkulturen für Plasmidpräparationen anzupflegen.

*Es hat sich nicht bewährt, Kolonien direkt als Matrize für PCR zu verwenden. Die im Ligations- und dann im Transformationsansatz enthaltene Insert-DNA wird mit ausplattiert und kann falsch-positive Ergebnisse liefern.

- Die Kultur wurde bei 4000 g pelletiert, mit 200 µl Resuspendierpuffer versetzt und durch Vortexen aufgeschlämmt.
- Nach Zusatz von 200 µl Lysepuffer wurde durch vorsichtiges Kippen gemischt und 5 min bei RT inkubiert.
- Nach Zusatz von 200 µl Neutralisationspuffer wurde durch vorsichtiges Kippen gemischt und 15 min auf Eis inkubiert, anschließend 15 min bei 13 000 rpm zentrifugiert.
- Der Überstand wurde mit 600 µl Isopropanol versetzt, nach Inkubation für 5 min auf Eis wurde 10 min bei 13 000 rpm zentrifugiert.
- Das Pellet wurde mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol versetzt und 10 min bei 13 000 rpm zentrifugiert.
- Das Pellet wurde 10 min luftgetrocknet und wie in Kapitel 3.4 und Tabelle 3.3 beschrieben mit 20 µl Lösung für Restriktionsansätze gelöst. Dabei wurden jedoch nur 0,5 µl Restriktionsenzym-Lösung je Probe eingesetzt.
- Die Restriktionsansätze wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.8 SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung wurde von der Firma Seqlab, Göttingen, Deutschland durchgeführt, Typ *Advantage Read 900*. Der Sequenzierung wurde bei zu niedriger Plasmidkonzentration (deutlich unter 100 ng/µl) oder bei fehlgeschlagener Sequenzierung eine *rolling circle amplification* vorgeschaltet (von Seqlab, Göttingen, Deutschland durchgeführt). Sequenziert wurde in die 5'- sowie 3'-Richtung. Für pET-15b-Vektoren wurden die Primer #37 und #40*, für pET-43b-Vektoren die Primer #36 und #31, für pQE-70-Vektoren die Primer #38 und #39 verwendet (siehe Tabelle 2.1, Seite 28).

3.9 GEWINNUNG VON ZIEL-DNA

Die Gewinnung handhabbarer Mengen Ziel-DNA aus cDNA-Bibliotheken ist ein erster entscheidender Schritt auf dem Weg zu einem rekombinant hergestellten Protein. Da im Transkriptom der für die Gewinnung von cDNA verwendeten Zellen möglicherweise keine ausreichende Zahl von mRNA-Kopien des Zielgens vorliegt, kann die Konzentration des Zielgens in der cDNA-Bibliothek zu niedrig für die Amplifikation des Zielgens sein. Auch unspezifische Hybridisierungen können die Erfolgsquote stark mindern. Bereits in Plasmid-DNA ligierte Gene können kommerziell erworben werden, sodass die Gewinnung von DNA kein geschwindigkeitsbestimmender Faktor

*Es wurden mehrere Varianten und Kombinationen von Primern für diesen Zweck getestet, diese haben sich als beste Kombination herausgestellt.

sein muss. Die PCR-Reaktionen zur Gewinnung von Insert-DNA sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

3.9.1 *cbr3*

Die DNA für die humane CBR3 wurde als Konstrukt in dem Vektor pOTB7 erworben (Imagene, früher RZPD – German Resource Center for Genome Research). Der RZPD-Klon IRAUp969E0122D6 wurde in *E. coli* transformiert auf Schrägagar geliefert. Mit einer KBE wurden 150 ml chloramphenicolhaltiges LB-Medium angeimpft und bei 30°C über Nacht inkubiert. Das Plasmid wurde wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben gereinigt und diente als Vorlage für die Klonierung des Gens der CBR3 in den Vektor pET-15b.

3.9.2 *cbr4*

Für die Gewinnung von cDNA der CBR4 wurde eine PCR mit HotStar HiFidelity Taq-Polymerase durchgeführt und als Matrize eine humanen Leber-cDNA-Bibliothek verwendet. Die Annealingtemperaturen waren 48,5°C; 49,2°C; 50,7°C; 52,4°C; 54,1°C und 55,3°C. Für jede Temperatur wurden zwei Ansätze pipettiert, einer enthielt zusätzlich Q-Lösung*: HotStar HiFidelity Taq-Polymerase 1 µl, je 5 µl der Primer #19 und #6, ggf. 10 µl 5 × Q-Lösung, 10 µl 5 × HotStar Puffer, 1 µl dNTP-Lösung, 1 µl cDNA-Bibliothek, Wasser ad 50 µl. Es wurden 40 Zyklen durchlaufen, die weiteren Einstellungen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

10 µl der PCR-Ansätze wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Der Reaktionsansatz mit einer Hybridisierungstemperatur von 48,5°C und Q-Lösung zeigte die stärksten Banden. 25 µl dieses Ansatzes wurden mit 25 µl Wasser und 10 µl Agarosegel-Ladepuffer versetzt und mit einem präparativen Gel aufgetrennt. Die Bande bei 700 bp wurde ausgeschnitten und extrahiert (Kapitel 3.3.2). Die erhaltene Lösung hatte eine Konzentration von 10 ng/µl. 23,5 µl dieser Lösung wurde durch Restriktionsanalyse (siehe Kapitel 3.4) mit 0,5 µl HinfI in einem 30 µl-Ansatz überprüft. Die erwarteten Fragmente einer Länge von 286 und 366 Basenpaaren wurden in einem analytischen Agarosegel identifiziert.

3.9.3 *cbr1*

Die Gewinnung der DNA der CBR1 gelang aus einer humanen Leber-cDNA-Bibliothek mit Hilfe der HotStar HiFidelity Polymerase (Kapitel 2.5.3) bei 55°C Hybridisierungstemperatur, 40 Zyklen und den Primern #25 und #26. Der PCR-Ansatz

*Zusatz von Qiagen (Hilden, Deutschland), der die Effizienz von PCR-Reaktionen verbessern kann

wurde über ein präparatives Agarosegel analysiert und die DNA extrahiert (Kapitel 3.3.2). In Kapitel 3.9.2 ist ein mögliches Verfahren zur Gewinnung und Analyse von Genen aus PCR-Reaktionen mit cDNA als Matrize genauer beschrieben.

3.9.4 *akr1b10*

Das Gen der AKR1B10 ist aus einer cDNA-Bibliothek amplifiziert und in den Vektor pQE-70 kloniert worden [44].

3.10 MUTAGENESE

Die verwendete Methode ist unter dem Namen *splicing by overlap extension* bekannt [91] und schematisch in Abbildung 3.1 beschrieben. Dazu wurden in zwei PCR-Reaktionen die entsprechenden Teilfragmente amplifiziert, aus präparativen Agarosegelen extrahiert und wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben gereinigt. Je 1 μ l wurde dann einer weiteren PCR-Reaktion als Matrize zugeführt. Das fertige Insert wurde wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben gereinigt.

Für einige Mutationen reichte eine PCR-Reaktion, wenn die eingeführten Mutationen im Randbereich lagen. Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze ist in Tabelle 3.1 aufgeführt; wenn nicht anders angegeben, wurde die *Pfu*-Polymerase verwendet. Die verwendeten Primer und PCR-Parameter stehen in Tabelle 3.5.

3.11 HERSTELLUNG VON KONSTRUKTEN

Nachdem die DNA für die Klonierung gewonnen und mit den Sequenzen für die Restriktion versehen wurde, konnte sie mit dementsprechend vorbereiteten Plasmiden ligiert werden. Das genaue Vorgehen bei der Herstellung der Konstrukte ist in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Ein wichtiger Aspekt der Klonierung war die Wahl der Plasmide. Sie waren alle bereits mit einem Gen ligiert. Dadurch konnte effizient kloniert werden. Die genauen Hintergründe und Vermutungen, die dieser Strategie zu Grunde liegen, sind in Kapitel 5.1, Seite 57 beschrieben. Die Primärsequenzen der ORFs der Konstrukte stehen im Anhang A.1 ab Seite 107.

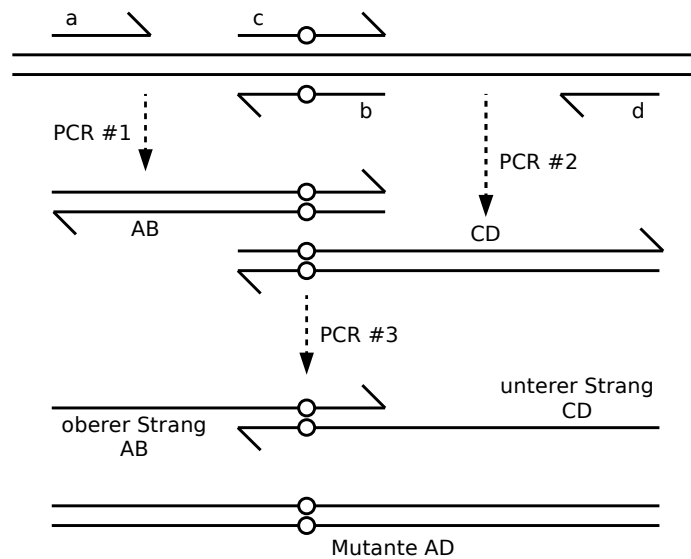


Abbildung 3.1 – Mutagenese durch *splicing by overlap extension*. Das Prinzip der Methode ist die Herstellung von zwei PCR-Fragmenten, mit der selben Basenfolge am 3'-Ende des einen und am 5'-Ende des anderen Fragments. Diese können in einer weiteren PCR-Reaktion an den kompatiblen Enden hybridisieren. In diese kompatiblen Enden ist durch entsprechend gestaltete Primer die Mutation eingebaut. Eines der beiden möglichen Hybride kann durch Polymerasen vervollständigt werden. Die im Reaktionsansatz außerdem enthaltenen Primer zur Amplifikation des vervollständigten Hybrids führen zur ausreichenden Ausbeute für die weiteren Schritte.

Tabelle 3.4 – PCR-Bedingungen zur Herstellung von Insert-DNA der Wildtypen

Konstrukt	Matrize	Primer # 5'/3'	$T_{hybrid.}$ [°C]	Zyklen
cbr1_pET-15b	s. Kapitel 3.9.3	27/11	55	25
cbr3_pET-15b	s. Kapitel 3.9.1	30/29	60	40
cbr3_pQE-70	CBR3-pET-15b	22/8	60	30
cbr4_pET-15b	s. Kapitel 3.9.2	20/7	60	30
cbr4_pQE-70	CBR4-pET-15b	21/9	60	30
cbr4_pET-43b	CBR4-pET-15b	23/10	60	30
akr1b10_pET-15b	s. Kapitel 3.9.4	13/41	60	25

Das Volumen der Matrize für die PCR-Reaktionen betrug jeweils 1 µl oder etwa 1 ng Plasmid-DNA.

Tabelle 3.5 – PCR-Bedingungen zur Konstruktion von Mutanten der CBR3

Konstrukt	PCR #	Matrize	Primer # 5'/3'	T _{hybrid.} [°C]	Zyklen
cbr3-V244M	1	cbr3_pET-15b	33/5	60	36
	2	cbr3_pET-15b	18/32	60	36
	3	PCR1, PCR2	33/32	60	36
soe	1	CBR3	33/3	60	31
	2	cbr3_pET-15b	16/32	60	31
	3	PCR1, PCR2	33/32	60	31
chim	1	cbr1_pET-15b	28/11	55	30
	2	cbr3_pET-15b, PCR1	33/11	62	36
soe-chim	1	cbr1_pET-15b	28/11	55	30
	2	soe, PCR1	33/11	62	36
cbr3-P230W	1	cbr3_pET-15b	33/12	60	36
	2	cbr3_pET-15b	24/32	60	36
	3	PCR1, PCR2	33/32	60	36
soe-P230W	1	soe	33/12	60	36
	2	soe	24/32	60	36
	3	PCR1, PCR2	33/32	60	36
soe-P230W-97VA	1	soe-P230W	33/4	60	35
	2	soe-P230W	17/32	60	35
	3	PCR1, PCR2	33/32	60	35
soe-P230W-142MS	1	soe-P230W	33/1	60	35
	2	soe-P230W	14/32	60	35
	3	PCR1, PCR2	33/32	60	35
soe-P230W-191SSA	1	soe-P230W	33/2	60	35
	2	soe-P230W	15/32	60	35
	3	PCR1, PCR2	33/32	60	35
soe-P230W-H270S*	1	soe-P230W	33/34	45	25
sumu	1	SOE-P230W-142MS	33/34	45	25
sumu-V273R	1	sumu	33/35	58	30

* Für diese PCR-Reaktion wurde statt der *Pfu*- die *Taq*-Polymerase verwendet, da vermutlich *proofreading*-Aktivität die Mutation korrigiert hat. Details zu den hier aufgeführten PCR-Reaktionen sind in Kapitel 3.10 beschrieben.

Tabelle 3.6 – Klonierung von Expressionsplasmiden der Wildtypen und Mutanten

Konstrukt	Restriktions-enzyme	Plasmid	Details zur Klonierung
cbr1_pET-15b	<i>NdeI</i> , <i>XhoI</i>	akr1b10_pET-15b	sequenzieller Verdau
cbr3_pET-15b	<i>NdeI</i> , <i>XhoI</i>	cbr1_pET-15b	cbr1-Konstrukt in <i>XhoI</i> -Schnittstelle des pET-15b-Vektors kloniert [16], sequenzieller Verdau mit <i>NdeI</i> , dann <i>XhoI</i>
cbr3_pQE-70	<i>SpeI</i> , <i>KpnI</i>	cbr4_pQE-70	Doppelverdau des Vektors
cbr4_pET-15b	<i>NdeI</i> , <i>XhoI</i>	cbr3_pET-15b	sequenzieller Verdau des Vektors
cbr4_pQE-70	<i>BglII</i> , <i>SphI</i>	akr1b10_pQE-70	akr1b10-Konstrukt in <i>BglII</i> -Schnittstelle des pQE-70-Vektors kloniert [44], sequenzieller Verdau mit <i>SphI</i> , dann <i>BglII</i>
cbr4_pET-43b	<i>SacII</i> , <i>XhoI</i>	hsd11b1_pET-43b	Plasmid mit hsd11b1 in <i>XhoI</i> -Schnittstelle ligiert, sequenzieller Verdau mit <i>SacII</i> , dann <i>XhoI</i>
akr1b10_pET-15b	<i>SpeI</i> , <i>XhoI</i>	cbr4_pET-15b	sequenzieller Verdau des Vektors
Mutanten	<i>NdeI</i> , <i>XhoI</i>	akr1b10_pET-15b	sequenzieller Verdau des Vektors

Angegeben sind Bezeichnungen der Zielkonstrukte (siehe Anhang A.1, Seite 107), die verwendeten Restriktionsenzyme und Vektoren sowie Details zum Vorgehen bei der Klonierung. Alle Klonierungsvektoren enthielten Insert-DNA, welche im Vorfeld durch Restriktion und Agarose-Gelelektrophorese entfernt wurden, dazu siehe Kapitel 3.11 und Kapitel 5.1.

4.1 ÜBEREXPRESSION UND PROTEINREINIGUNG

4.1.1 *CBR1, CBR3 und CBR3-Mutanten, pET-15b-Konstrukte*

Ein Volumen von 200 ml mit Ampicillin versetztes LB-Medium wurde mit 2 ml einer Vorkultur (siehe Kapitel 3.6.3) angeimpft und bei 37°C und 180 Umdrehungen in Schikane-Schüttelkolben von 500 ml Volumen bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,6 AU angezogen*. Die Überexpression wurde durch Zugabe von 400 µl IPTG-Lösung induziert. Die Zellen wurden nach 3–4 h Inkubation durch 15 min Zentrifugation bei 3000 g und 4°C geerntet. Das Zentrifugat wurde bei -20°C eingefroren.

Das Zellpellet wurde mit 10 ml Imidazol-Puffer A und 10 mg Lysozym versetzt und durch Schwenken aufgeschlämmt†. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde die Suspension in Probenröhrchen überführt. Diese hatten ein Volumen von 15 ml und einen Innendurchmesser von etwa 15 mm. Die Aufschlussbehandlung umfasste sechs Zyklen je 10 s Ultraschall bei 200 W mit je 20 s Pause. Die Probenröhrchen waren dabei ständig von Eiswasser umgeben, der Eiswasserspiegel war mindestens auf Höhe der Probe‡. Die durch Lyse und Ultraschall aufgeschlossenen Zellen wurden bei 100 000 g und 4°C für 1 h zentrifugiert (Ultrazentrifugation).

Der Überstand wurde durch Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurden 1-ml-HisTrap-HP-Säulen mit Imidazol-Puffer B bis zur Konstanz der Leitfähigkeit vorgespült und anschließend mit Imidazol-Puffer A equilibriert, ebenfalls bis zur Konstanz der Leitfähigkeit. Ein Volumen von 10 ml der löslichen Fraktion wurde aufgetragen und die Säule durch stufenweise Erhöhung der Imidazolkonzentration von 10 mM auf 59 mM und auf 108 mM (10% und 20% Imidazol-Puffer B) von unspezifisch bindenden Proteinen gereinigt. Rekombinantes Protein wurde bei 157 mM (30% Imidazol-Puffer B) eluiert.

Das Eluat wurde bei 4°C gelagert. Die Proteinkonzentration des Eluats wurde durch die Bradford-Methode (Kapitel 4.3) bestimmt. Die Reinheit der rekombinanten Enzyme wurde durch SDS-Gelelektrophorese von 0,5–1 µg Protein verifiziert.

*Zur Lagerung von transformierten Expressionsstämmen über lange Zeiträume wurde zu 1 ml Bakteriensuspension mit einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,6 AU 100 µl Glycerol, 87% (v/v) gegeben. Die Mischung wurde durch sorgfältiges Schwenken homogenisiert und bei -80°C eingefroren. Aus diesem Vorrat konnte ohne erneute Transformation eine Vorkultur angesetzt werden.

†Das kontinuierliche Abtragen angetauter Pelletoberfläche sorgte für eine gute Homogenisierung, sodass auf den Einsatz von Magnetrührern oder den Einsatz von Pipetten weitestgehend verzichtet werden konnte.

‡Der Zellaufschluss wurde ohne diese Kühlmaßnahmen und ohne die Verwendung von Probenröhrchen mit kleinem Innendurchmesser mehr als handwarm.

4.1.2 CBR3, pET-15b-Konstrukt – alternatives Protokoll

Bei einigen Experimenten wurde eine Proteinpräparation eingesetzt, deren Herstellung in einigen Punkten von dem in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Protokoll abweicht. Darauf wird an entsprechender Stelle hingewiesen. Das Kulturvolumen betrug 400 ml und die Bakterien wurden nach Pelletierung in 20 ml Imidazolpuffer A resuspendiert und mechanisch mit Hilfe einer *French Press* aufgeschlossen. Nach einem Vorlauf von 5 % Imidazolpuffer B wurde das mit 20 % Imidazolpuffer B eluierte Protein fraktioniert gesammelt und durch SDS-Gelelektrophorese analysiert. Homogene Fraktionen wurden vereint und durch Ultrafiltration viermal auf ein Drittel des Anfangsvolumens ankonzentriert und jeweils mit PBS-Puffer aufgefüllt. Im letzten Schritt wurde die Lösung bis zur Sättigung ankonzentriert und bei 4 °C für 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand 1+1 mit Glycerol 87 % (v/v) versetzt und bei -20 °C gelagert.

4.1.3 CBR3, pQE-70-Konstrukte

Das Konstrukt der CBR3 wurde zusätzlich in den Vektor pQE-70 kloniert und über Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurde wie in Kapitel 4.1.1 verfahren. Das Protein eluierte bei 20 % Imidazol-Puffer B. Es wurde in dieser Form weiterverwendet.

4.1.4 CBR4, pET-15b- und pQE-70-Konstrukte

Die Überexpression des pET-15b-Konstrukts der CBR4 wurde bei 37 °C, RT, 15 °C und mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen getestet. Außerdem wurde versucht, das Protein durch Aufschluss des Proteinpräzipitats* durch 8 M Harnstoff-Anteil im Imidazol-Puffer zu lösen, durch Nickel-Affinitätschromatographie† zu reinigen und durch Rückfaltungsexperimente in Lösung zu halten. Alle diese Versuche haben nicht zu löslichem Protein geführt. Die pQE-70-Konstrukte der CBR4 waren nach Standardbedingungen ebenfalls nicht löslich (siehe Kapitel 4.1.1), die Versuche sind deshalb nicht weiter aufgeführt (siehe auch Kapitel 6.5).

4.1.5 CBR4, pET-43b-Konstrukt

Expressionsbedingungen unter Variation der Temperatur, der Dauer und mit Bakterien in unterschiedlichen Wachstumsphasen wurden getestet. Die Expression wurde bei 16, 20 und 27 °C durchgeführt, jeweils für 3 und 6 Stunden und mit Kulturen, die zum Zeitpunkt der Induktion eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,30, 0,47 und 0,60 AU hatten. Die Konzentration des IPTGs war mit 0,5 mM in allen Ansätzen gleich. Das exakte Vorgehen war wie folgt:

*Das Zellpellet nach Ultrazentrifugation, siehe Kapitel 4.1.1.

†Die Imidazol-Puffer A und B wurden mit 8 M Harnstoff hergestellt.

- Ein Kulturvolumen von 210 ml ampicillinhaltigem LB-Medium wurde mit transformierten Origami-Zellen bei 37°C bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,30 AU angezogen.
- Von dieser Kultur wurden 70 ml abgenommen und mit 70 µl IPTG-Lösung versetzt. Davon wurden jeweils 10 ml bei den drei Expressionstemperaturen 16, 20 und 27°C für 3 und 6 Stunden inkubiert.
- Den verbleibenden 140 ml der Kultur wurden 70 µl Ampicillinlösung zugesetzt.
- Bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,47 AU wurden erneut 70 ml LB-Medium entnommen und jeweils 10 ml bei den drei Expressionstemperaturen 16, 20 und 27°C für 3 und 6 Stunden inkubiert.
- Bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,60 AU wurde den verbleibenden 70 ml der Kultur 35 µl Ampicillinlösung zugesetzt und jeweils 10 ml bei den drei Expressionstemperaturen 16, 20 und 27°C für 3 und 6 Stunden inkubiert.
- 1,5 ml der Kulturen wurden nach Ende der Inkubationszeiten bei 6000 g für 15 min pelletiert und bei -20°C eingefroren*, die Überstände verworfen.
- Die Pellets wurden aufgetaut und in 150 µl 18 mM Imidazol-Puffer (aus Imidazol-Puffer A und B gemischt, mit 1 mg/ml Lysozym versetzt) aufgeschlämmt und für 2,25 h auf Eis inkubiert.
- Die Proben wurden auf Eiswasser mit einem Ultraschallstab behandelt, zweimal 10 s bei 200 W mit 10 s Pause.
- Es wurde 30 min bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert.
- 150 µl des Überstandes wurden mit 50 µl Nickelsepharose† versetzt und für 10 min unter leichtem Schütteln inkubiert.
- Der Überstand wurde verworfen und mit 250 µl 40 mM Imidazol-Puffer (aus Imidazol-Puffer A und B gemischt) gespült und zentrifugiert (RT, 2400 rpm, 3 min).
- Das Pellet wurde mit 100 µl Imidazol-Puffer B versetzt, 10 min unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend zentrifugiert (RT, 2400 rpm, 3 min).
- Vom Überstand wurden 100 µl zum Fällern mit 400 µl Aceton versetzt und für eine Stunde bei -20°C inkubiert, dann für 30 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 30 µl 1-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt, gevortext und per SDS-Gelelektrophorese analysiert.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde eine Expression bei 20°C und einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,45 AU für 6 h gewählt (das SDS-Gel ist in Abbildung 5.8 auf Seite 67 dargestellt). Sonst wurde wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben vorgegangen. Die durch Nickel-

*Das Einfrieren diente zum Nachstellen der Bedingungen eines präparativen Überexpressionsansatzes, bei dem nach der Expression das Zellpellet bis zur Weiterverarbeitung eingefroren wurde.

†Aufarbeitung der Nickelsepharose: 250 µl wurden in einem Mikroreagiergefäß 3 min bei RT und 2400 rpm zentrifugiert und das Zentrifugat mit 1250 µl Wasser versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (dieselben Parameter) wurde das Zentrifugat in 250 µl 40 mM Imidazolpuffer (aus Imidazol-Puffer A und B zusammengesetzt) resuspendiert.

Affinitätschromatographie bei 50 % Imidazol-Puffer B eluierte Fraktion wurde gesammelt.

4.2 THROMBINVERDAU

Thrombin wurde für die Abspaltung des Histidin-Tags des Konstrukts CBR3-pET-15b und für die Abspaltung des Nus-Tags von CBR4-pET-43b verwendet.

4.2.1 CBR3

Für den Verdau von CBR3-pET-15b wurden 4 Ansätze mit je einem Volumen von 50 μ l mit verschiedenen Konzentrationen Thrombin angesetzt. Ein Ansatz enthielt 5 μ l *Thrombin Cleavage Buffer*, 25 μ l Proteinlösung (0,4 mg/ml), 1 μ l verdünnte Thrombinlösung (1:25, 1:50, 1:100 und 1:200 in *Thrombin Dilution Buffer* verdünnt) und 19 μ l Wasser. Nach Inkubation über Nacht bei RT wurde die Probe per SDS-Gelelektrophorese mit einem 8 %-igen SDS-Gel analysiert.

4.2.2 CBR4

Für den ersten Versuch, den Nus-Tag des pET-43b-Konstrukts der CBR4 abzuschneiden, wurde ein Thrombinverdau bei 4 °C für 24 und 48 h durchgeführt. Ein Ansatz enthielt 5 μ l *Thrombin Cleavage Buffer*, 2 μ l verdünnte Thrombinlösung (1:25 und 1:50 in *Thrombin Dilution Buffer* verdünnt) und 43 μ l gereinigte Fraktion (siehe Kapitel 4.1.5). Als Positivkontrolle wurde statt des CBR4-Eluats dasselbe Volumen einer CBR3-Lösung der Konzentration 0,4 mg/ml verwendet. 24 μ l der Ansätze (das entspricht 8 μ g CBR3-pET-15b) wurden durch SDS-Gelelektrophorese analysiert.

4.3 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

In Kunststoffküvetten wurde zu 33 μ l Proteinlösung 1 ml Bradford-Reagenz gegeben. Die Mischung wurde für 5–45 min bei RT inkubiert. Die anschließende Messung der einzelnen Proben erfolgte in einem Zeitraum von maximal 10 min. Diese wurden ggf. mit Wasser vorverdünnt, um innerhalb des Konzentrationsbereichs der Standardreihe zu liegen. Als Standard wurde BSA in einem Konzentrationsbereich von mindestens 0,25 und höchstens 1,4 mg/ml eingesetzt. Die Kalibrierung erfolgte anhand von mindestens vier Messpunkten. Eine Präparation wurde mindestens dreimal bei 595 nm und im kalibrierten Konzentrationsbereich photometrisch vermessen.

Alternativ wurden 5 μ l Proteinlösung nach Zusatz von 250 μ l Bradford-Reagenz in 96-Well-Platten im Tecan *Multiwell-Plate-Reader* vermessen. Dabei wurde grundsätzlich

wie oben beschrieben verfahren. Ein Regressionskoeffizient von 0,95 wurde noch als akzeptabel angenommen.

4.4 SDS-GELELEKTROPHORESE ZUR PROTEINANALYTIK

4.4.1 *Aufbau und Durchführung der Elektrophorese*

Der Aufbau der Apparatur für die SDS-Gelelektrophorese entsprach dem in [41] beschriebenen Prinzip. Die Polymerisationszeiten für die Trenngele und das Sammelgel betragen jeweils etwa eine Stunde. Trenngele wurden während der Polymerisation mit ca. 200 µl Wasser oder Isopropanol überschichtet.

In Mikroreagiergefäßen wurde Protein mit Probenpuffer und ggf. Wasser versetzt, dann für 5 min in einem Heizblock auf 95 °C erhitzt, kurz auf Eis gekühlt und anzen-trifugiert. Das Volumen einer Probe wurde auf mindestens 10 µl eingestellt. Die Gele wurden mit 5 µl Proteinmarker und Proben beladen und liefen bei 120 Volt, bis der Farbstoff fast das komplette Trenngel passiert hatte.

4.4.2 *Färbung und Dokumentation*

Zur Färbung mit Coomassie wurde das Trenngel in SDS-Färbelösung für mindestens 2 h gefärbt und in 10 % Essigsäure über Nacht entfärbt. Bei Silberfärbung wurden 0,5 mm starke SDS-Gele nacheinander mit je 50 ml der folgenden Lösungen (alle Angaben in % (v/v)) behandelt*:

1. 2 % CuCl_2 , 12 % Trichloressigsäure, 50 % Methanol, 5 min
2. 10 % Ethanol, 5 % Essigsäure, 5 min
3. 0,01 % KMnO_4 , 5 min
4. 10 % Ethanol, 5 % Essigsäure, 1 min
5. 10 % Ethanol, 5 min
6. Wasser, 5 min
7. 0,1 % AgNO_3 , 5 min
8. mit Wasser spülen
9. 10 % K_2CO_3 , 2 min
10. 2 % K_2CO_3 , 0,01 % Formaldehyd, 20 s – 2 min
11. Reaktionsstopp mit 10 % Ethanol, 5 % Essigsäure, 5 min

*Für stärkere Gele (1 mm) verlängern sich die Zeiten (Schritt 1: bis zu 20 min, alle anderen Schritte bis zu 10 min). Bei Überentwicklung eines Gels kann 0,5 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung zum Entfärben eingesetzt werden.

4.5 PHOTOMETRISCHE MESSUNG VON ENZYMAKTIVITÄTEN

Die hier beschriebene Methode ist für das Substratscreening (Kapitel 4.6.1), das Inhibitorscreening (Kapitel 4.6.3) und die Kinetiken von Menadion (Kapitel 4.7.1), Isatin (Kapitel 4.7.5), 9,10-Phenanthrenchinon (Kapitel 4.7.6), NADPH (Kapitel 4.7.2) und S-Nitrosoglutathion (Kapitel 4.7.3) verwendet worden.

4.5.1 Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen

Für die Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit für eine Substratkonzentration wurden mindestens 3 bis 6 Messungen nach folgendem Ansatz durchgeführt, für Kinetiken wurden je mindestens 6 verschiedene Substratkonzentrationen vermessen.

Ein Reaktionsansatz bestand aus 100 mM Tris · HCl pH 7,4, 100 µM NADPH, Substrat, ggf. Lösungsmittel für das Substrat und hatte ein Volumen von 790 µl. 10 µl Enzymlösung wurden zum Start der Reaktion zugesetzt. Eine Referenzküvette enthielt dieselbe Lösung ohne Enzym. Das Photometer wurde im Zweistrahlmodus eingesetzt, die Wellenlänge auf 340 nm eingestellt. Es wurde ebenso wie die Reaktionsansätze durch ein Wasserbad auf 25 °C temperiert. Die initialen Abnahme der Absorption wurde über einen Zeitraum von 6 bis 60 s gemessen und durch eine Ausgleichsgerade (Summe der kleinsten Quadrate) die Steigung bestimmt. Je stärker die Absorptionsänderung war, desto kürzer wurde die Messdauer gewählt.

4.5.2 Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes

Die genaue Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist in Tabelle 4.1 beschrieben. Von den Substraten wurden Stammlösungen hergestellt und vor einer Messung überwiegend nach dem Schema in Abbildung A.1 auf Seite 111 oder alternativ durch Mischung mit gleichen Volumenteilen von Lösungsmitteln verdünnt.

4.5.3 Durchführung einer Messung

In 15-ml-Probenröhrchen wurde Tris · HCl-Puffer pipettiert und auf 25 °C vortemperiert. Kurz vor der Messung wurden NADPH- und Substratlösung zugesetzt und bei 25 °C auf dem Wasserbad für 2 min vorinkubiert. Referenzküvette und Messküvette wurden mit 790 µl dieser Lösung befüllt. 10 µl einer Mischung aus 70 % Imidazol-Puffer A und 30 % Imidazol-Puffer B wurde in die Referenzküvette pipettiert und für 2–3 s intensiv gerührt. Dann wurden 10 µl Enzymlösung in die Messküvette pipettiert, für 2–3 s intensiv gerührt und die Messung wurde gestartet. Die Messküvette wurde geleert, mit Wasser gespült, erneut befüllt und gemessen. Die Referenzküvette wurde

Tabelle 4.1 – Pipettierplan für Enzymkinetiken

Komponente	Volumen pro Küvette [μl]	7,46-faches Volumen [μl]
Tris · HCl, 119,4 mM, pH 7,4	670	5000
NADPH, 2 mM	40	298,5
Substrat	80	597
Enzym	10	–
Gesamt	800	5895,5

Das folgende Pipettierschema wurde für eine Vielzahl von Messungen von Enzymkinetiken verwendet (wie jeweils angegeben). Die dritte Spalte gibt an, welche Volumina für einen *Mastermix* pipettiert wurden. Mit diesem *Mastermix* konnte eine Substratkonzentration bis zu sechsmal vermessen werden.

nicht neu befüllt. Die Enzymlösungen wurden ggf. vorverdünnt, ebenfalls mit einer Mischung aus 70 % Imidazol-Puffer A und 30 % Imidazol-Puffer B*.

4.6 SUBSTRAT- UND INHIBITORSCREENING

4.6.1 Substratscreening der CBR3

Die CBR3 (pET-15b-Konstrukt) wurde durch Substratscreening auf Aktivität getestet. Die Substrate sowie die Versuchsbedingungen sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

4.6.2 Substratscreening der CBR3-Mutanten

Einige CBR3-Mutanten wurden mit den Substraten 4-Benzoylpyridin, 2,3-Hexandion, Menadion und 4-Nitrobenzaldehyd getestet (Strukturformeln siehe Anhang A.5, Seite 116), alle sind Modellsubstrate der CBR1 (Tabelle 5.3, Seite 75). An dem Schema in Abbildung 5.3, Seite 60 kann die Auswahl der Mutanten nachvollzogen werden.

4.6.3 Inhibitorscreening der CBR3

Der Ansatz für das Screening der Inhibitoren entsprach dem in Tabelle 4.1 und wurde bei 37°C durchgeführt. Inhibitoren wurden als 10 mM Stammlösungen, Isatin als 21 mM Stammlösung angesetzt. Es wurden 4 μl Inhibitor-Stammlösung bzw. DMSO und 76 μl Isatin-Stammlösung als Substrat zugesetzt. Daraus resultierte eine Inhibitor-konzentration von 50 μM und eine Substratkonzentration von 2,0 mM. Jeder

*Bei dieser Mischung handelt es sich um die Zusammensetzung des Elutionspuffers der Nickel-Affinitätschromatographie.

Tabelle 4.2 – Screening von Substraten mit CBR3

Acetohexamid	3,4-Hexandion (1 mM, Wasser)
Acetoin (Wasser)	Hydroxynonenal (HPLC)
5 α -Androstan-3,17-dion (50 μ M)	S-1-Indanol (NADP)
5 β -Androstan-3,17-dion (50 μ M)	R-1-Indanol (NADP)
4-Androsten-11 β -ol-3,17-dion (50 μ M)	1-Indanon
2-Benzoylpyridin	Isatin
3-Benzoylpyridin	Ketoprofen
4-Benzoylpyridin	Menadion (100 μ M, Ethanol, DMSO und Methanol je 2 und 10 %)
Butandion (Wasser)	Methylglyoxal (1 mM, Wasser)
S-Campherchinon (1 mM, Wasser)	4-Methylpentanal (100 μ M, Wasser)
R-Campherchinon (1 mM, Wasser)	Metyrapon
2-Chloro-3-(N-Succinimidyl)-1,4-naphthochinon (100 μ M)	Naloxon
2-Chloro-3-pyrrolidin-1,4-naphthochinon (100 μ M)	1,2-Naphthochinon
Cortisol (NADP, 50 μ M)	1,4-Naphthochinon
Cortison (50 μ M)	4-Nitrobenzaldehyd
Diacetyl (Wasser)	Oxononenal (50 μ M, Wasser)
2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon	Oxononenal, GSH-Addukt (50 μ M, Wasser)
2,6-Dimethyl-p-benzochinon	2,3-Pentandion (1 mM, Wasser)
Estradiol (NADP)	9,10-Phenanthrenchinon
Ethacrynsäure	Prednison (50 μ M)
Fenofibrat	5 β -Pregnan-17 α -21-diol-3,11,20-trion (50 μ M)
D,L-Glycerinaldehyd (Wasser)	4-Pyridin-Carboxaldehyd
2,3-Hexandion (1 mM, Wasser)	Testosteron (50 μ M)

Substrate der CBR1 aus den Arbeiten [16, 90, 96] und weitere wurden mit CBR3_pET-15b unter den in Kapitel 4.5 genannten Bedingungen getestet. Dazu wurden 1 mM und 10 mM Stammlösungen in DMSO angesetzt und dem Reaktionsansatz als Substrat zugesetzt, die Konzentrationen in den Reaktionsansätzen betragen demnach 0,1 und 1 mM. Die Enzymkonzentration in einem Ansatz betrug mindestens 40 μ g/ml. Das Enzym wurde wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben hergestellt. Abweichende Bedingungen wie Kofaktoren, Lösungsmittelanteil und gewählte Methode sind in Klammern hinter dem Substrat angegeben.

Inhibitor wurde einmal vermessen. Die Proteinlösung wurde wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben aufgearbeitet.

4.7 ENZYMKINETIKEN

4.7.1 *Menadion-Enzymkinetik von CBR1*

Die verwendete Menadion-Stammlösung und die Verdünnungsreihe wurden mit DMSO hergestellt, für Arbeitskonzentrationen von 7,50 bis 120 μM . Sonst wurde entsprechend Kapitel 4.5 vorgegangen (Primärdaten siehe Anhang A.3.1 ab Seite 113).

4.7.2 *NADPH-Enzymkinetik von CBR3*

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter von NADPH und CBR3 wurde ein Ansatz entsprechend Kapitel 4.5 und Tabelle 4.1 gewählt. Isatin wurde in DMSO gelöst. Die Isatinkonzentration betrug 4 mM und NADPH wurde in Konzentrationen von 3,13 bis 100 μM eingesetzt (Primärdaten siehe Anhang A.3.1 ab Seite 113).

4.7.3 *S-Nitrosoglutathion-Enzymkinetik von CBR1 und CBR3*

Die kinetischen Konstanten von GSNO für CBR1 und CBR3 wurde entsprechend Kapitel 4.5 bestimmt. GSNO wurde in einem Konzentrationsbereich von 12,5 bis 100 μM eingesetzt. Die Verdünnungsreihe von GSNO wurde mit Wasser hergestellt (Primärdaten siehe Anhang A.3.1 ab Seite 114). Es wurde nach folgendem Protokoll hergestellt [29]:

1. 1,54 g GSH wurde in einer Mischung aus 5,5 ml Wasser und 2,5 ml 2 M HCl gelöst und 15 min in Eiswasser auf einem Magnetrührer gerührt.
2. 0,345 g NaNO_2 wurden zugesetzt und unter Lichtausschluss wurde für weitere 40 min eiswassergekühlt gerührt.
3. Nach Zusatz von 10 ml eiskaltem Aceton wurde weitere 10 min eiswassergekühlt gerührt.
4. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und der Niederschlag mit 5 ml eiskaltem Wasser, dann mit 3 ml eiskaltem Aceton gewaschen.
5. Der Ansatz wurde über Nacht unter Lichtausschluss luftgetrocknet.

Die Ausbeute GSNO betrug 96 %, die Reinheit 93 %. Um die Reinheit zu bestimmen, wurde eine 1,00 mM Lösung bei 340 nm photometrisch vermessen ($A_{340} = 0,785 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und mit dem molaren Absorptionskoeffizienten ($\epsilon_{340} = 840 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in Beziehung gesetzt [34].

4.7.4 *Oracin-Enzymkinetik von CBR3*

Die Oracin-Enzymkinetik wurde mittels HPLC durchgeführt und weicht vollständig von dem in Kapitel 4.5 beschriebenen Ansatz ab. Das Protein wurde wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben aufgearbeitet.

Für eine Untersuchung der kinetischen Parameter von CBR3 und Oracin wurde folgender Reaktionsansatz verwendet: 5 μl rekombinantes Enzym, 40 μl NADPH-regenerierendes System, 0,6 bis 20 μl einer 5 mM Stammlösung von Oracin in 100 μM Phosphatpuffer, pH 7,4, in einem Gesamtvolumen von 200 μl . Die Oracinkonzentration in den Reaktionsansätzen betrug 15,0 bis 500 μM , die Inkubationstemperatur 37°C und die Inkubationsdauer 1 h.

Die Reaktion wurde durch Zusatz von 80 μl 25 % Ammoniak beendet und zweimal mit 500 μl Ethylacetat durch 30 s Vortexen ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereint, durch Zentrifugation im Vakuum bis zur Trockne eingedampft und in 250 μl der mobilen Phase aufgenommen. 100 μl wurden per HPLC analysiert*. Die Methode ist in [100] beschrieben (Primärdaten siehe Anhang A.3.1 ab Seite 113).

4.7.5 *Isatin-Enzymkinetiken von CBR1, CBR3 und CBR3-Mutanten*

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter von Isatin für CBR1, CBR3 und den CBR3-Mutanten wurde entsprechend Kapitel 4.5 vorgegangen. Isatin-Stammlösungen wurden in Konzentrationen bis zu 40,0 mM in 100 % DMSO hergestellt. Die Arbeitskonzentrationen betragen 3,91 bis 4000 μM .

Die Löslichkeitgrenze von Isatin war mit 4,00 mM in einem Ansatz wie in Tabelle 4.1 beschrieben noch nicht erreicht, die Absorption der Messlösung betrug bei 340 nm über 3 AU, ein konstantes Verhältnis aus Konzentration und Absorption konnte für Lösungen bis 4,00 mM jedoch gefunden werden. Die Messlösung entsprach der für die Kinetikmessung: 670 μl 119,4 mM Tris \cdot HCl, pH 7,4, 40 μl Wasser und 80 μl verschiedener Konzentrationen von Isatin in DMSO. In Konzentrationsbereichen, die keine so hohen DMSO-Anteile erforderlich machten, um Isatin in Lösung zu halten, wurden sie dennoch verwendet, um Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten (Primärdaten siehe Anhang A.3.1 ab Seite 112).

4.7.6 *9,10-Phenanthrenchinon-Enzymkinetiken von CBR1, CBR3 und CBR3-Mutanten*

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter von 9,10-Phenanthrenchinon für CBR1, CBR3 und den CBR3-Mutanten wurde entsprechend Kapitel 4.5 vorgegangen. Die 9,10-Phenanthrenchinon-Stammlösung und deren Verdünnungen wurden mit DMSO hergestellt, für Arbeitskonzentrationen von 2,42 bis 77,3 μM . Bei niedriger katalytischer Effizienz und hohen K_m -Werten für 9,10-Phenanthrenchinon wurden

*Die HPLC-Analyse wurde von Prof. V. Wsol, Tschechische Republik, durchgeführt

Tabelle 4.3 – Messung der Löslichkeit von 9,10-Phenanthrenchinon

Konzentration [μM]	Absorption 266 nm [AU]	Zustand des Ansatzes	Konzentration Überstand [μM]
0	0,2736	klar	
6,12	0,4170	klar	
12,23	0,5616	klar	
24,47	0,8563	klar	
32,62	1,1500	klar	
48,94	1,4400	klar	
97,87	2,5400	klar, übersättigt	
195,75	2,12	Niederschlag	78,5819
1053	2,14	Niederschlag	79,4440

Aus dem linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration der Lösungen (x) bis 97,87 μM 9,10-Phenanthrenchinon und der Absorption ($f(x)$) wurde die Konzentration zweier gesättigter 9,10-Phenanthrenchinon-Lösungen mit den theoretischen Konzentrationen von 195,75 und 1053 μM ermittelt. Durch lineare Regression wurde der Zusammenhang zwischen den Konzentrationen (x) bis 48,94 μM und den jeweiligen Absorptionen ($f(x)$): $f(x) = 0,0232x + 0,2969$ ermittelt und extrapoliert, für Details siehe Kapitel 4.7.6.

eingesetzt: 630 μl des 119,4 mM Tris \cdot HCl-Puffers, pH 7,4, und 50 statt 10 μl der Enzymlösungen. 4 Substratkonzentrationen wurden je 3-fach vermessen (Primärdaten siehe Anhang A.3.1 ab Seite 113).

Zur Bestimmung der Löslichkeit von 9,10-Phenanthrenchinon unter den Reaktionsbedingungen wurden Ansätze aus 670 μl 119,4 mM Tris \cdot HCl, pH 7,4, 40 μl Wasser und 80 μl verschiedener Konzentrationen von 9,10-Phenanthrenchinon in DMSO hergestellt und für 15 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die Absorption der Lösungen bzw. des Überstands wurde bei 266 nm gemessen, einem lokalen Absorptionsmaximum der Lösung. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

4.8 BERECHNUNG VON REAKTIONSGESCHWINDIGKEITEN UND KATALYTISCHEN KONSTANTEN

Zur Berechnung der katalytischen Konstanten von NADPH-abhängigen Reaktionen wurde die initiale Abnahme der Absorption pro Zeit mit dem molaren Absorptionskoeffizienten von NADPH bei 340 nm von $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in Beziehung gesetzt. Die sich daraus ergebende umgesetzte Stoffmenge von NADPH wurde auf 1 min und 1 mg Enzym bezogen:

$$V_{Umsatz} = \frac{\text{Steigung} \cdot (-1)}{E_{1M,1cm}^{NADPH} \cdot \frac{V_{Enzym}}{V_{Ansatz}} \cdot C_{Enzym} \cdot 1000}$$

V_{Umsatz}	Umsatzgeschwindigkeit in $\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$
Steigung	Steigung der Ausgleichsgerade der gemessenen Absorptionsänderung pro Minute
$E_{1M,1cm}^{NADPH}$	Absorptionskoeffizient von NADPH
V_{Enzym}	Volumen der zugegebenen Enzymlösung
V_{Ansatz}	Volumen des vollständigen Reaktionsansatzes
C_{Enzym}	Konzentration der Enzymlösung in mg/ml

Aus den Ergebnissen dieser Berechnungen wurden durch nichtlineare Regression (durchgeführt mit GNU PLOT 4.2, siehe Anhang A.6, Seite 117) nach der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung die Werte für V_{max} und K_m ermittelt und daraus k_{cat} und k_{cat}/K_m . Die Molmassen wurden aus der Primärsequenz der Konstrukte (Anhang A.1, Seite 107) mit den Programmen TRANSEQ* und PROTPARAM† errechnet. Für die Berechnung der katalytischen Konstanten des Substrats GSNO wurde der molare Absorptionskoeffizient von NADPH um den molaren Absorptionskoeffizienten von GSNO zu $\epsilon_{340} = (6220 + 840) \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} = 7060 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ korrigiert.

Die in Tabellen und Abbildungen angegebenen Werte enthalten die *asymptotic standard errors* der nicht-linearen Regression durch die Mittelwerte. Der Fehler für k_{cat}/K_m ist durch Addition der Fehler von k_{cat} und K_m ermittelt worden.

*URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html>

†URL: <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>

5.1 KLONIERUNG

Das Gen der CBR3 wurde als Plasmid erworben. Die Gene der CBR1 und CBR4 konnten aus Leber-cDNA amplifiziert werden. Das Gen der AKR1B10 stand im Arbeitskreis bereits als Konstrukt in dem Vektor pQE-70 zur Verfügung.

Die Gene der CBR3 und CBR4 konnten in die Vektoren pET-15b und pQE-70 kloniert werden (Abbildungen 5.1 und 5.2), das Gen der CBR4 zusätzlich in den Vektor pET-43b. Alle Sequenzen der daraus exprimierten Proteine sind in Anhang A.1, ab Seite 107 aufgelistet.

Die Mutanten der *cbr3* (Kapitel 5.2) sowie die *cbr1* wurden entsprechend der *cbr3* in die *NdeI/XhoI*-Schnittstelle des pET-15b-Vektors ligiert. Für diesen Zweck wurde ein pET-15b-Konstrukt der *akr1b10* hergestellt (Abbildung 5.1), welches durch die Position der Restriktionsschnittstellen *NdeI/XhoI* sehr effizient vorverdaut werden konnte und eine zuverlässige Klonierung erlaubte. Dazu wurde das pET-15b-Konstrukt der *akr1b10* N- sowie C-terminal mit unterschiedlichen und nicht kompatiblen Restriktionsschnittstellen versehen. Das Prinzip der Klonierung mit Hilfe dieses und ähnlicher Konstrukte (siehe auch Kapitel 3.11, Seite 41) beruht auf der Annahme dreier Prinzipien:

1. Zirkuläre DNA zeigt bei Agarose-Gelelektrophorese ein anderes Laufverhalten als linearisierte DNA gleicher Masse. Grundsätzlich kann das bei der präparativen Trennung von geschnittenem und ungeschnittenem Plasmid hilfreich sein. Jedoch können Spuren von ungeschnittenem Plasmid auf teilweise gleicher Höhe wie linearisierte DNA laufen. Dadurch kann ein hoher Anteil von KBE auftreten, die mit Leerplasmid transformiert wurden. Bei einem sequenziellen Verdau solcher Konstrukte kann das mit der ersten Gelextraktion gewonnene linearisierte Plasmid mit geringen, aber noch störenden Mengen intaktem Plasmid kontaminiert sein. Bei der zweiten Restriktion und anschließenden Gelextraktion jedoch wird der Kontaminationsgrad erneut durch die nur teilweise Überschneidung mit linearisierter DNA weiter verringert.
2. Die Klonierung mit unterschiedlichen und nicht kompatiblen Schnittstellen hat den Vorteil, dass die gewünschte Orientierung des Inserts gewährleistet ist. Da in vielen Plasmiden, unter anderem pET-15b und pQE-70, die Restriktionsschnittstellen lückenlos aneinander gereiht sind, kann ein Verdau mit mehreren Restriktionsenzymen sehr uneffizient sein. Viele Endonukleasen benötigen nämlich zu beiden Seiten der Restriktionsschnittstelle einen ausreichend langen

Überhang für eine Restriktion. Dieses Problem besteht bei Konstrukten dieser Art nicht.

3. Zwei Restriktionsschnittstellen mit einem vergleichsweise langem Insert ermöglichen die elektrophoretische Trennung von einfach- und zweifach verdaulichem Plasmid, wenngleich die Auflösung im Kilobasenbereich gering ist.

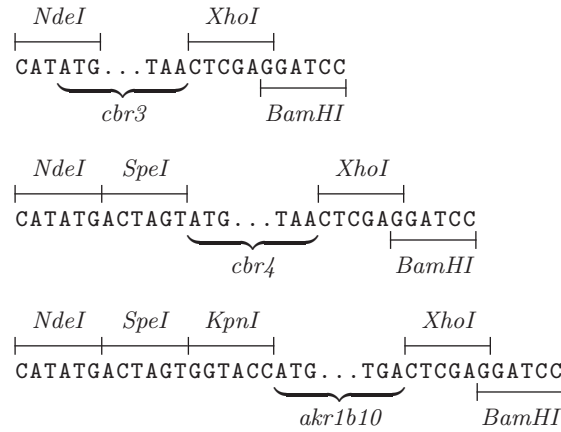


Abbildung 5.1 – Multiple Cloning Sites der pET-15b Konstrukte von cbr3, cbr4 und akr1b10 (Abbildung erstellt mit \TeXshadde [6])

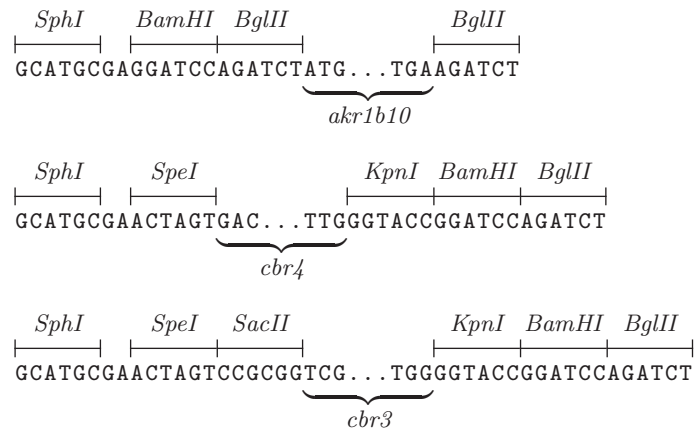


Abbildung 5.2 – Multiple Cloning Sites der pQE-70 Konstrukte von cbr3, cbr4 und akr1b10 (Abbildung erstellt mit \TeXshadde [6])

5.2 MUTAGENESE

Für die Herstellung der Mutanten wurde grundsätzlich nach dem *splicing by overlap extension*-System verfahren [91], wenn die Mutationen nicht direkt durch die endständigen Primer eingeführt werden konnten. Außer bei dem Konstrukt CBR3-V244M, einem CBR3-Polymorph, sind die Aminosäuren der CBR3 immer durch diejenigen der CBR1 an derselben Stelle substituiert worden.

Die geplanten Mutanten wurden *in silico* mit Hilfe eines einfachen Texteditors konstruiert und dann auf die Entstehung neuer möglicher Restriktionsschnittstellen mit Hilfe der Webanwendung WEBCUTTER 2.0* geprüft. Basentriplets wurden gegebenenfalls modifiziert. Alle Mutanten und die Wildtypen von CBR1 und CBR3 konnten so in exakt das gleiche Plasmid kloniert werden.

Bei der Benennung der Mutanten wurde teilweise von der dafür üblichen Nomenklatur abgewichen. Die Abkürzung *SOE* ist auf Grund der in [91] für die Herstellung verwendete PCR-Methode *splicing by overlap extension* als Bestandteil der Bezeichnung der Mutanten gewählt worden. Die Abkürzung *Chim* steht für *Chimäre*, *SuMu* ist die Abkürzung für *Supermutante*.

Die Klonierungs-Strategie ist in Abbildung 5.3 auf Seite 60 dargestellt. In der Tabelle 5.1 auf Seite 61 und der Abbildung 5.4 auf Seite 62, können die ausgetauschten Aminosäuren abgelesen werden. Zum großen Teil wurden die Mutationen sukzessiv durchgeführt. Eine „Linie“ wurde dann weiterverfolgt, wenn sich eine Verbesserung gegenüber dem physiologischen Substrat Isatin gezeigt hat. Die Nähe der mutierten Aminosäuren zum katalytischen Zentrum ist mit Hilfe der Kristallstruktur der CBR3 (wwPDB-Code 2HRB) bestimmt worden. Die Auswahl der Aminosäuren ist in Kapitel 6.4 und den Unterkapiteln ab Seite 88 genauer begründet.

*URL: <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>

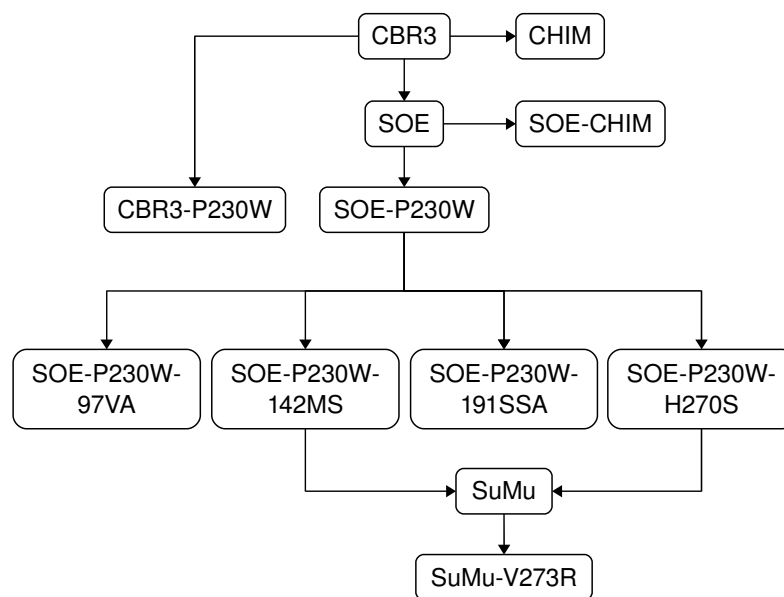

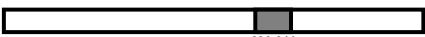



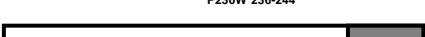



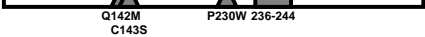



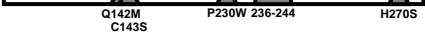


Abbildung 5.3 – Übersicht der von der CBR3 abgeleiteten Mutanten. Zuerst wurde die Mutante SOE hergestellt. Diese zeigte eine Verbesserung der katalytischen Eigenschaften bei der Reduktion von Isatin. Die Chimeren CHIM und SOE-CHIM zeigten keine Verbesserung. Der Austausch des Prolins an Position 230 zu Tryptophan (Mutante CBR3-P230W) ist ohne positiven Effekt gewesen, während die Mutanten SOE-P230W eine Verbesserung der katalytischen Effizienz um drei Größenordnungen zeigte. Auf dieser Basis wurden alle weiteren Mutanten konstruiert. Die Mutanten SOE-P230W-142MS und SOE-P230W-H270S wurden zu SuMu (Supermutante) kombiniert, da beide eine Verringerung des K_m -Wertes bei der Reduktion von Isatin zeigten. Die Ergänzung der Mutation V273R zu SuMu-V273R erfolgte als letzter Versuch, um wesentliche Aminosäuren für die charakteristischen Reduktaseeigenschaften der CBR1 zu identifizieren.

Tabelle 5.1 – Übersicht der hergestellten Mutanten der CBR3.

Bezeichnung des Konstrukts	Schema des Konstrukts	ausgetauschte Aminosäuren
CBR3		Wildtyp
SOE		236-244
CBR3-P230W		230
CBR3-V244M		244, CBR3-Variante
SOE-P230W		236-244, 230
CHIM		262-277
SOE-CHIM		236-244, 262-277
SOE-P230W-97VA		97-98, 230, 236-244
SOE-P230W-142MS		142-143, 230, 236-244
SOE-P230W-191SSA		191, 193, 230, 236-244
SOE-P230W-H270S		230, 236-244, 270
SuMu		142-143, 230, 236-244, 270
SuMu-V273R		142-143, 230, 236-244, 270, 273
CBR1		Wildtyp

Graue Dreiecke stellen einzelne ausgetauschte Aminosäuren dar, graue Blöcken zusammenhängende Bereiche. Bis auf das Konstrukt CBR3-V244M sind Aminosäuren der CBR3 immer durch diejenigen der CBR1 an selber Stelle substituiert worden. Der Abbildung 5.4 auf Seite 62 können die genauen Aminosäuren entnommen werden. Der Name „SOE“ ist auf Grund der in [91] ebenso bezeichneten PCR-Methode *splicing by overlap extension* gewählt worden. „CHIM“ ist die Abkürzung für Chimäre. Eine Bezeichnung wie *142MS* bedeutet, dass an Position 142 gegen Methionin und an Position 143 gegen Serin ausgetauscht wurde. „SuMu“ heißt Supermutante und beschreibt die Kombination der Mutanten SOE-P230W-142MS und SOE-P230W-H270S.

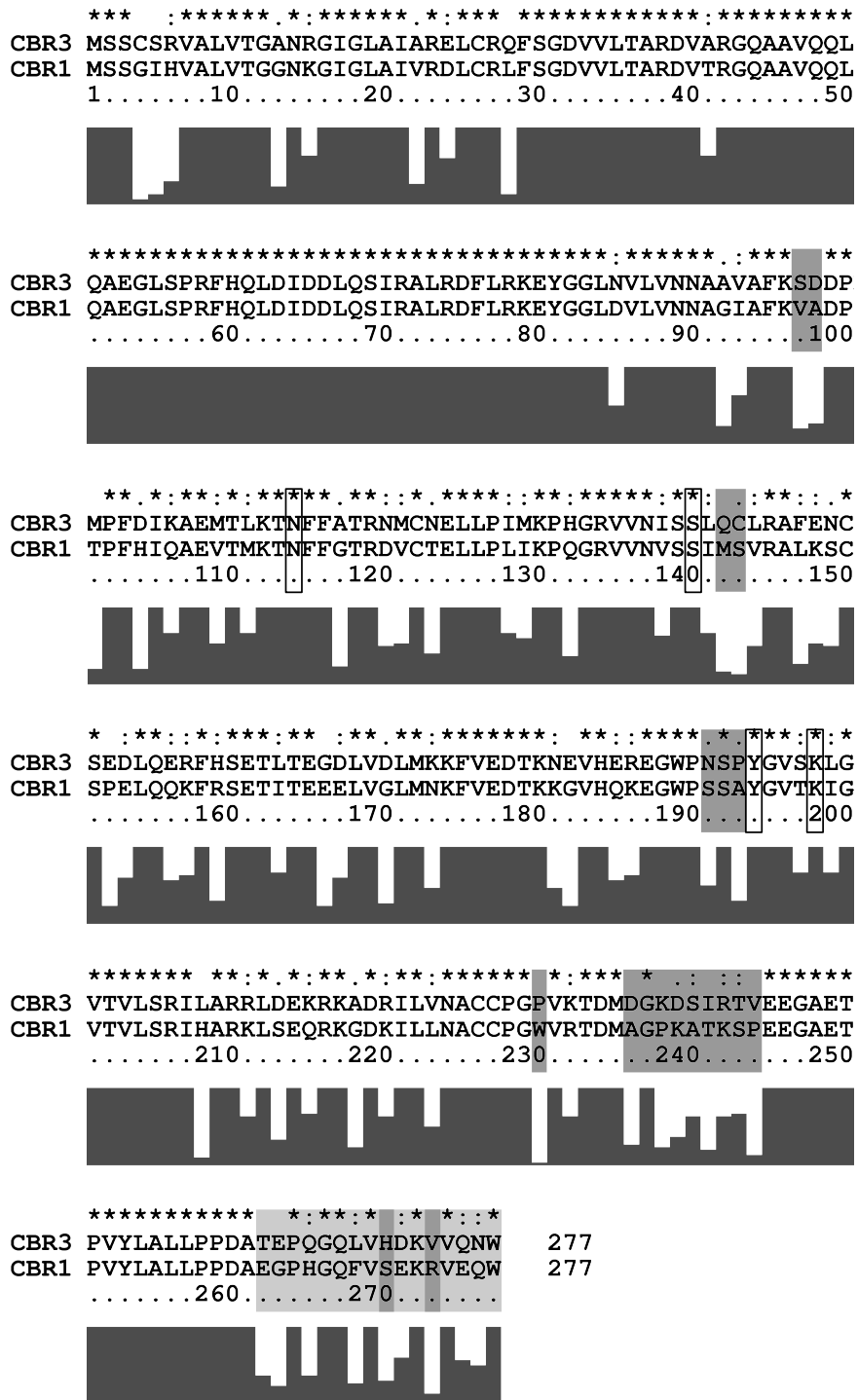


Abbildung 5.4 – ClustalX-Alignment [87] der in dieser Arbeit klonierten CBR1 und CBR3. Identische Aminosäuren sind durch Sterne dargestellt, mit abnehmendem Konservierungsgrad stehen Doppelpunkte, Punkte und Lücken. Die Aminosäuren der katalytische Tetrade Asn-Ser-Tyr-Lys sind schwarz eingerahmt. Aminosäuren der CBR3, die durch Aminosäuren der CBR1 ersetzt wurden, sind dunkelgrau hinterlegt. Der in den Mutanten CHIM und SOE-CHIM ausgetauschte C-Terminus ist hellgrau hinterlegt. Unterhalb der Aminosäurenummern ist die Qualität des Konservierungsgrades abgebildet, welcher mit der Höhe der Balken zunimmt.

5.3 EXPRESSION UND REINIGUNG VON CBR1, CBR3 UND MUTANTEN DER CBR3

Die bakterielle Expression sämtlicher pET-15b-Konstrukte von CBR1, CBR3 und den CBR3-Mutanten ist in löslicher und aktiver Form gelungen. Alle mit N-terminalen His-Tag versehenen, rekombinant hergestellten Proteine wurden bis zur Homogenität durch Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. In den Abbildungen 5.5 und 5.6 sind SDS-Gele gereinigter Fraktionen abgebildet. Die Mutanten sind schematisch in Tabelle 5.1, Seite 61 dargestellt.

Die CBR3 wurde zusätzlich aus einem pQE-70-Konstrukt mit C-terminalem His-Tag in löslicher Form exprimiert und konnte gereinigt werden. Diese Klonierung und Expression erfolgte mit dem Ziel, eine mögliche Beeinflussung der Enzymaktivität auf Grund der Position des His-Tags auszuschließen. Als Testsubstrate wurden Isatin und Menadion ausgewählt. Bezüglich Isatin konnte kein Unterschied in der spezifischen Aktivität festgestellt werden. Menadion wurden von beiden rekombinanten Formen der CBR3 nicht umgesetzt. Um Einflüsse des His-Tags auf die Aktivität bezüglich Menadion auszuschließen, wurde das pET-15b-Konstrukt der CBR3 außerdem mit Trombin behandelt und der His-Tag abverdaut (Abbildung 5.7), jedoch ohne positives Ergebnis (dazu siehe auch Kapitel 5.5.2).

5.4 EXPRESSION UND REINIGUNG DER CBR4

5.4.1 *CBR4-Konstrukte der Vektoren pET-15b und pQE-70*

Die Expression der CBR4 aus den pQE-70- und pET-15b-Konstrukten ist in hoher Ausbeute gelungen, es konnte jedoch kein Enzym in den cytosolischen Fraktionen der Zellysate identifiziert werden. Als Expressionsstämme wurden Origami(DE3)- und BL21(DE3) verwendet (Unterschiede siehe Kapitel 2.7). Durch Aufschluss und Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie mit 8 M-Harnstoff-Imidazol-Puffer konnte das Enzym gereinigt, aber nach Entfernung des Harnstoffs in einer Reihe von Rückfaltungsexperimenten nicht in Lösung gehalten werden. Die Entfernung des Harnstoffs bzw. die Verringerung der Harnstoffkonzentration wurde durch schlagartige Verdünnung in Tensidlösungen sowie durch Dialyse erreicht. Nach Ankonzentrierung durch Ultrafiltration konnten jedoch keine nennenswerten Mengen löslichen Proteins identifiziert werden (Ergebnis nicht dargestellt).

5.4.2 *CBR4 mit Nus-Fusionstag, Konstrukt des Vektors pET-43b*

Diese rekombinante Form der CBR4 war N-terminal mit dem 495 Aminosäuren langen Nus-Tag-Fusionsprotein gekoppelt, welches die Löslichkeit verbessern kann. Der Test verschiedener Expressionsbedingungen hat ergeben, dass unter anderem 20 °C,

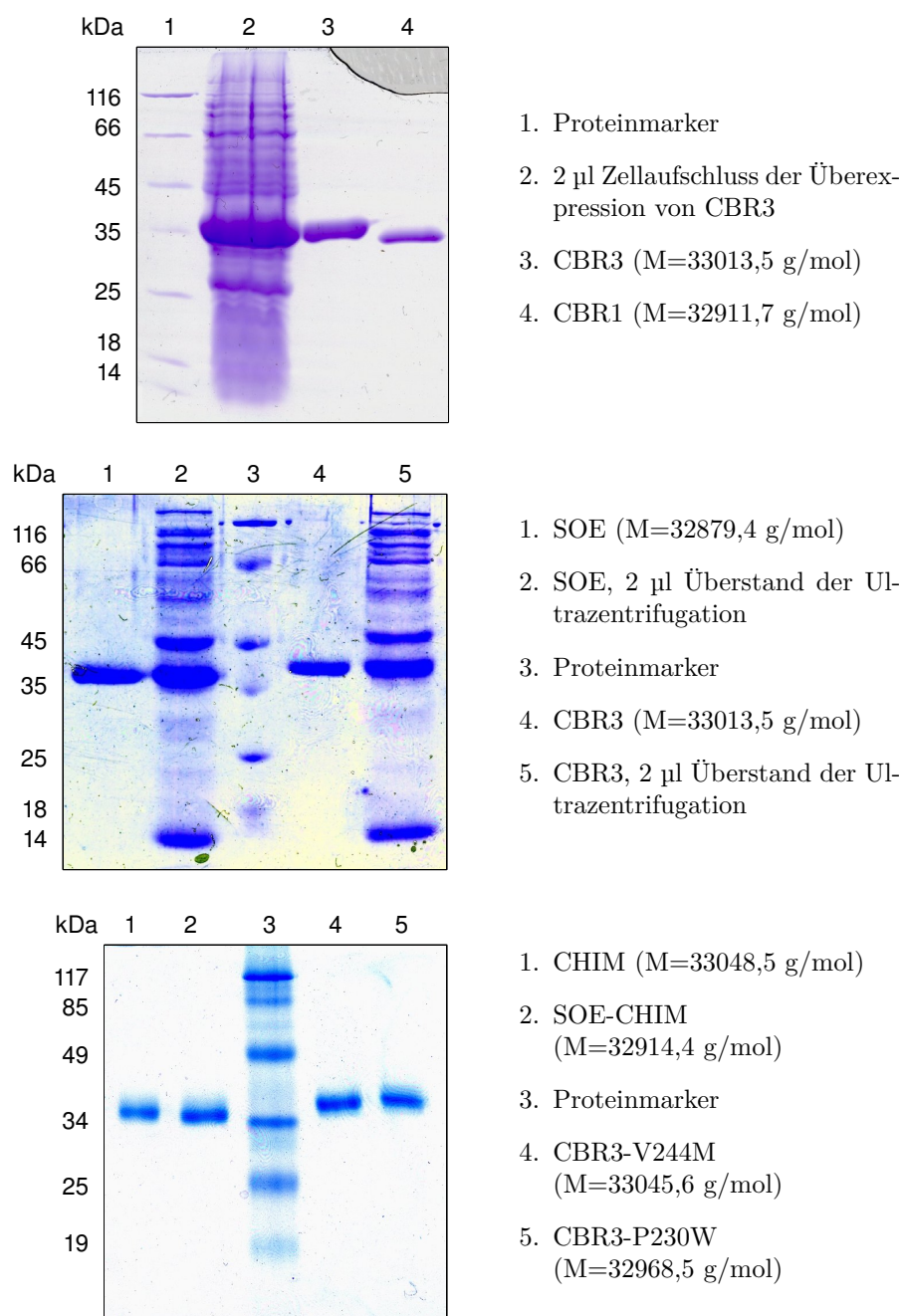
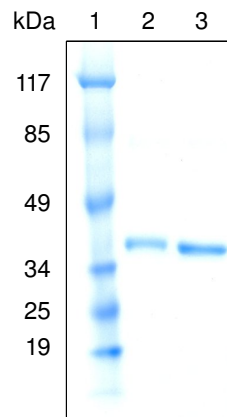
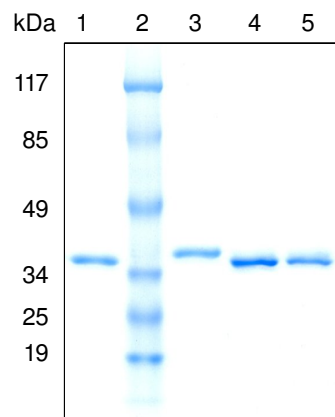


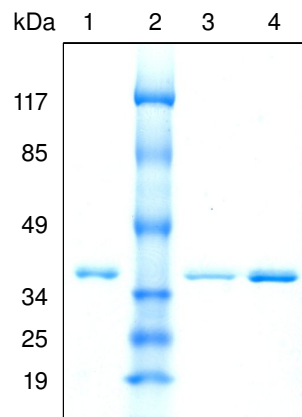
Abbildung 5.5 – Coomassie-gefärbte 10%-ige SDS-Gele der Wildtypen von CBR1 und CBR3 und den Mutanten SOE, SOE-CHIM, CBR3-V244M und CBR3-P230W (vgl. Tabelle 5.1, Seite 61). Es wurden je 1–2 µg Protein aufgetragen. Die Molmassen der Banden der Proteinmarker sind mit der Einheit kg/mol (Kilodalton, kDa) jeweils an dem linken Rand der SDS-Gele angegeben. Die aus den Primärsequenzen (siehe Anhang A.1 ab Seite 107) berechneten Molmassen der Proteine sind in Klammern angegeben.



1. Proteinmarker
2. SOE-P230W-142MS
(M=32955,5 g/mol)
3. SOE-P230W-H270S
(M=32918,5 g/mol)



1. SuMu-V273R
(M=32962,5 g/mol)
2. Proteinmarker
3. SOE-P230W
(M=32968,5 g/mol)
4. CBR1 (M=32911,7 g/mol)
5. CBR3 (M=33013,5 g/mol)



1. SuMu (M=32905,4 g/mol)
2. Proteinmarker
3. SOE-P230W-97VA
(M=32936,6 g/mol)
4. SOE-P230W-191SSA
(M=32915,5 g/mol)

Abbildung 5.6 – Coomassie-gefärbte BioRad SDS-Gradientengele mit Acrylamidkonzentrationen von 16 bis 4%. Je etwa 1 µg der CBR3-Mutanten SOE-P230W, SOE-P230W-97VA, SOE-P230W-142MS, SOE-P230W-191SSA, SOE-P230W-H270S, SuMu, SuMu-V273R, sowie zum Vergleich CBR1 und CBR3 wurden aufgetragen (vgl. Tabelle 5.1). Die Molmassen der Banden der Proteinmarker sind mit der Einheit kg/mol (Kilodalton, kDa) jeweils an dem linken Rand der SDS-Gele angegeben. Die aus den Primärsequenzen (siehe Anhang A.1 ab Seite 107) berechneten Molmassen der Proteine sind in Klammern angegeben.

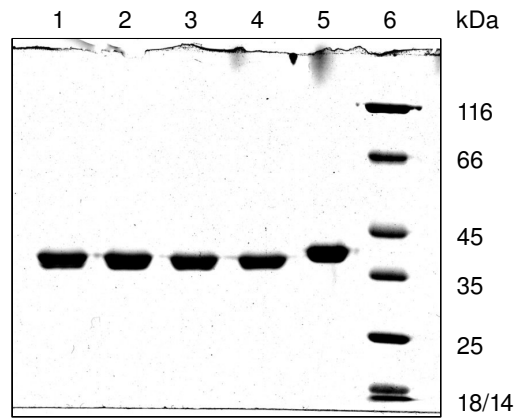


Abbildung 5.7 – Coomassie-gefärbtes 8%-ige SDS-Gel eines Thrombinverdaus von rekombinanter CBR3. Bahn 1–4: CBR3_pET15b mit Thrombin in den Verdünnungen 1:25, 1:50, 1:100 und 1:200 verdaut; Bahn 5: CBR3_pET-15b unverdaut; Bahn 6: Proteinmarker. Erläuterungen zum Thrombinverdau siehe Kapitel 4.2. Die Grafik ist in Graustufen dargestellt. Die berechnete Masse ändert sich nach Verdau des His-Tags von 33 kDa zu 31 kDa.

eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,45 AU und eine Induktiondauer von 6 h mit einer IPTG-Konzentration von 0,5 mM geeignet sind (siehe Abbildung 5.8). Geringe Mengen konnten aus solch einem Ansatz über Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Der Versuch, das Fusionsprotein durch Thrombinverdau abzuschneiden, ist nur sehr unvollständig gelungen, wie Abbildung 5.9 zeigt. Aus diesem Grund wurde auch keine weitere Konzentrationsbestimmung vorgenommen und eine weitere funktionelle Charakterisierung ist ausgeblieben (dazu weiter in Kapitel 6.5).

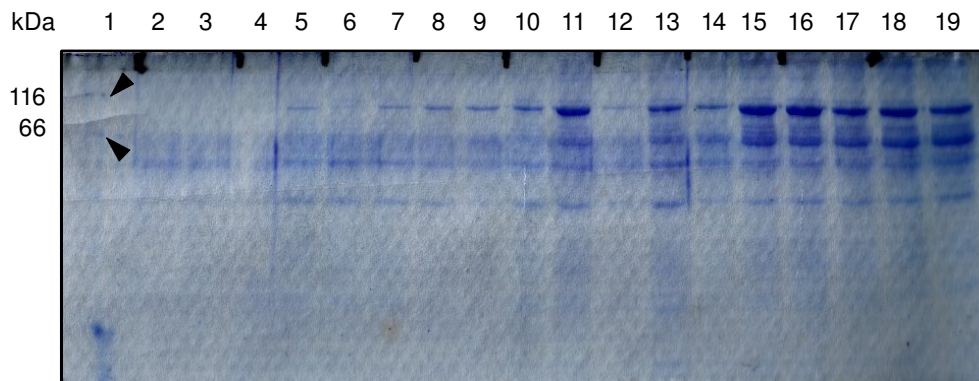


Abbildung 5.8 – Coomassie-gefärbtes 10%-iges SDS-Gel von Überexpressionen der CBR4_pET-43b unter verschiedenen Bedingungen (siehe Kapitel 4.1.5, Seite 46). Bahn 1: Proteinmarker, die beiden gerade noch sichtbaren Banden sind durch die Pfeile markiert; Bahn 2–7: 16°C, Kulturdichten von $OD_{600\text{ nm}} = 0,30, 0,47$ und $0,60$ AU mit je 3 und 6 h Induktion; Bahn 8–13: 20°C, Kulturdichten von $OD_{600\text{ nm}} = 0,30, 0,47$ und $0,60$ AU mit je 3 und 6 h Induktion; Bahn 14–19: 27°C, Kulturdichten von $OD_{600\text{ nm}} = 0,30, 0,47$ und $0,60$ AU mit je 3 und 6 h Induktion. In Abbildung 5.9 kann die Laufweite des 83 kDa schweren CBR4-Konstrukts mit Nus-Tag nachvollzogen werden. Die Art (durch Nickel-Agarose, lösliche Fraktion) und aufgetragene Menge Proteinlösung ergibt sich aus dem Protokoll in Kapitel 4.1.5.

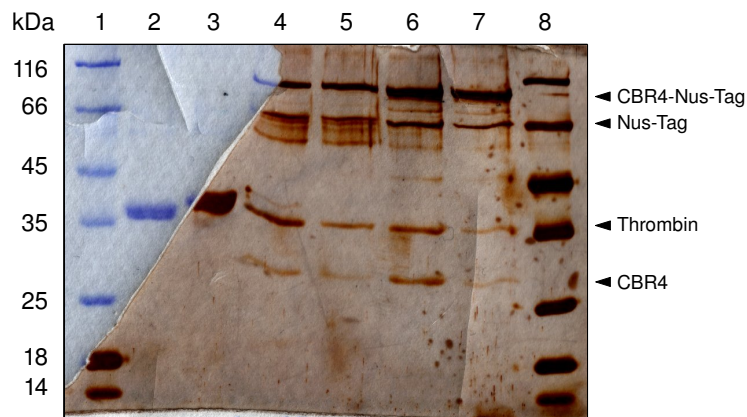


Abbildung 5.9 – Coomassie- und silbergefärbtes 10%-iges SDS-Gel eines Thrombinverdaus von CBR3 und CBR4. Bahn 1: Proteinmarker; Bahn 2–3: CBR3_pET15b mit Thrombin verdaut und unverdaut; Bahn 4–5: 24 h Verdau von CBR4_pET43b bei 4°C mit Thrombin 1:25 und 1:50 verdünnt; Bahn 6–7: 48 h Verdau bei 4°C mit Thrombin 1:25 und 1:50 verdünnt (siehe Kapitel 4.2); Bahn 8: Proteinmarker. Ein Teil des Gels wurde nachträglich mit Silberfärbung behandelt (und dadurch braun gefärbt), da die Bande der CBR4 nur sehr schwach zu sehen war. Die prominenten Banden, an Bahn 6 gut zu erkennen, sind das unverdaute Konstrukt CBR4_pET-43b mit 83 kDa, der Nus-Tag mit 57 kDa auf Höhe der 66 kDa-Bande, Thrombin mit 34 kDa (wwPDB-Code 1PPB) und CBR4 mit 27 kDa.

5.5 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER CBR3

5.5.1 *Screening von Substraten*

Der Test auf enzymatische Aktivität rekombinanter CBR3 mit verschiedenen Carbonylverbindungen (Tabelle 4.2, Seite 52) hat nur für Isatin, 1,2-Naphthochinon und 9,10-Phenanthrenchinon ein positives Ergebnis erbracht. Die Umsetzung von Isatin und 9,10-Phenanthrenchinon wurden daraufhin quantifiziert* (Isatin siehe Kapitel 5.5.3 und 9,10-Phenanthrenchinon siehe Kapitel 5.5.4). Für die anderen Verbindungen war keine Abnahme der Absorption bei 340 nm in den eingesetzten Konzentrationsbereichen messbar.

5.5.2 *Menadion*

Menadion (Strukturformel siehe Seite 116) gilt als ein wichtiges Modellsubstrat der CBR1 und sollte das erste beschriebene Substrat der CBR3 sein [42]. Mit dem pET-15b-Konstrukt rekombinanter CBR3 konnte aber keine katalytische Reduktion von Menadion gemessen werden. Auch nach Abverdau des His-Tags des pET-15b-Konstruktes (Kapitel 4.2 und Abbildung 5.7) zeigte das rekombinante Enzym keine Aktivität mit Menadion. Ein Wechsel des Puffers zu PBS (Kapitel 4.1.2) änderte das Ergebnis nicht. Ein pQE-70-Konstrukt mit C-statt N-terminalem His-Tag zeigte keine Aktivität. Positivkontrollen mit CBR1 bestätigten bei allen Experimenten die Funktionsfähigkeit der jeweiligen Reaktionsansätze; zudem wurden die kinetischen Parameter der CBR1 in dem gewählten Reaktionsansatz bestimmt (siehe Abbildung 5.10).

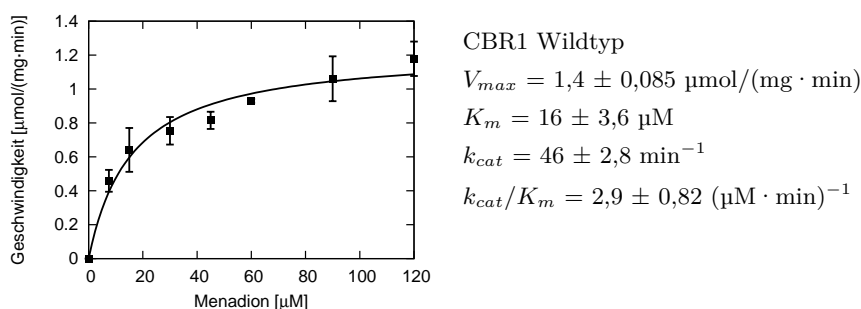


Abbildung 5.10 – Enzymkinetik von Menadion des Wildtyps von CBR1. Die Versuchsbedingungen sind in Kapitel 4.7.1 auf Seite 53 beschrieben.

*1,2-Naphthochinon hat sich auf Grund der Labilität unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht als Substrat geeignet (Messergebnisse nicht dargestellt).

5.5.3 *Isatin*

Isatin (Strukturformel siehe Seite 116) ist ein physiologisches Substrat der CBR1 [90] und wurde daher mit der CBR3 getestet. Den kinetischen Konstanten der CBR1 mit einem K_m -Wert von 7,3 μM und einem k_{cat} -Wert von 14 $(\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$ gegenüber steht ein K_m -Wert von über 4000 μM und ein k_{cat} -Wert von nur 0,023 $(\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$ für die CBR3. Auf die Abbildungen der Kinetiken von Isatin mit CBR1 sowie CBR3 wird im Rahmen der Besprechung der CBR3-Mutanten in Kapitel 5.6 verwiesen.

5.5.4 *9,10-Phenanthrenchinon*

9,10-Phenanthrenchinon ist früh als wichtiges Substrat der CBR1 gefunden worden [96] und ein Hauptbestandteil der bei Diesel-Verbrennung freigesetzten Chinone [33]. Chinone gelten als Element von Redox-Zyklen, welche die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies zur Folge haben [75]. Die funktionellen Unterschiede zwischen CBR1 und CBR3 werden auch hier deutlich, CBR3 setzt 9,10-Phenanthrenchinon nur sehr langsam um, zudem wird das Enzym nicht gesättigt (CBR3: $k_{cat}/K_m = 0,14 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$; CBR1: $k_{cat}/K_m = 8,7 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$, $K_m = 38 \mu\text{M}$). Auf die Abbildungen der Kinetiken von 9,10-Phenanthrenchinon mit CBR1 sowie CBR3 wird im Rahmen der Besprechung der CBR3-Mutanten in Kapitel 5.6 verwiesen.

5.5.5 *Oxidation des Kofaktors NADPH*

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten des Kofaktors NADPH mit der CBR3 ist mit Isatin als konstante Größe durchgeführt worden. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.11 dargestellt. Der K_m -Wert ist mit 2,5 μM in derselben Größenordnung, aber noch kleiner als der K_m -Wert von CBR1 und Isatin, welcher in diesem Messsystem einen Wert von 7,3 μM hat. Isatin ist ein physiologisches Substrat der CBR1 [90]. Mit der Annahme gepaart, dass die Konzentration des Kofaktors kein begrenzender Faktor bei der Katalyse ist, zeigen sich deutliche Hinweise darauf, dass die CBR3 nach dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren in aktiver Form gereinigt werden kann und physiologisch die Funktion einer Reduktase hat.

Der Wert für eine Umsatzgeschwindigkeit des Kofaktors kann nicht direkt bestimmt werden, da diese vom Substrat und seiner Konzentration abhängig ist. Sie entspricht mit 2,1 $(\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min}))$ dem Wert für die Umsatzgeschwindigkeit bei 4 mM Isatin, der im Rahmen der Messung der Isatin-Kinetik von CBR3 gefunden wurde. Das war so zu erwarten, denn es handelte sich um dieselben Messbedingungen.

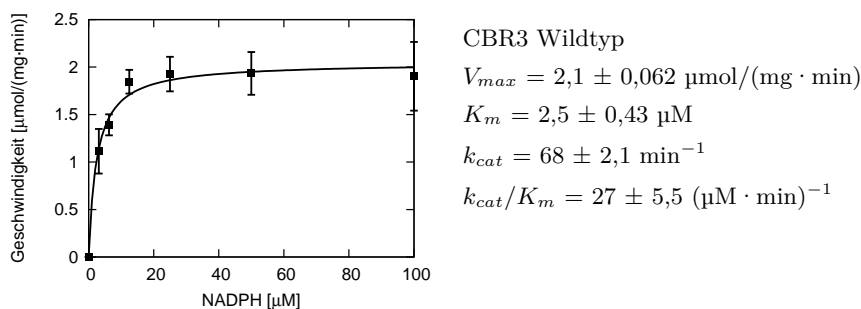


Abbildung 5.11 – Enzymkinetik von NADPH des Wildtyps von CBR3. Isatin wurde in einer Konzentration von 4 μM eingesetzt. Der gefundene, sehr niedrige K_m -Wert von 2,5 μM ist ein deutliches Zeichen dafür, dass die CBR3 in funktionsfähiger Form exprimiert und gereinigt werden konnte. Die Versuchsbedingungen sind in Kapitel 4.7.2 auf Seite 53 beschrieben.

5.5.6 *S*-Nitrosoglutathion (*GSNO*)

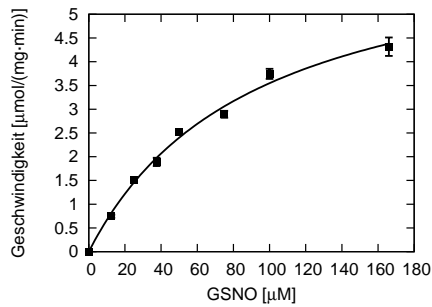
CBR1 wird als physiologische Reduktase für *GSNO* (Strukturformel siehe Seite 116) diskutiert [5]. *GSNO* ist eine Speicherform von Stickstoffmonoxid, diese Umsetzung hat daher Einfluss auf die Regulation des Vasotonus. Die kinetischen Konstanten wurden photometrisch durch Messung der Abnahme der Absorption bei 340 nm bestimmt. Die ermittelte katalytische Effizienz für CBR3 ist mit $0,75 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$ dreifach niedriger als die für CBR1 mit $2,4 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$ (siehe Abbildung 5.12). Dennoch ist *GSNO* (zusammen mit NADPH) das einzige uns bekannte Substrat, welches über den Sättigungsbereich der CBR3 hinaus löslich ist und indirekt photometrisch über die Abnahme der Absorption bei 340 nm gemessen werden kann.

5.5.7 *Oracin*

Oracin ist ein Zytostatikum, welches sich gegenwärtig in klinischen Studien der Phase II befindet (Strukturformel siehe Seite 116). Es ist als Substrat einer Vielzahl von AKR und SDR bekannt [31]. Für die CBR3* konnte mit der im Vergleich zur photometrischen Messung sehr empfindlichen HPLC-Methode [100] der Umsatz von *Oracin* zuverlässig gemessen und kinetische Konstanten bestimmt werden (Abbildung 5.13). Dem k_{cat} -Wert von $1,9 \text{ min}^{-1}$ ähnlich sind die photometrisch bestimmten Umsätze der Mutante SOE-P230W-191SSA mit $1,7 \text{ min}^{-1}$ für 4-Benzoylpyridin[†]. Mit Absorptionsänderungen in diesen Dimensionen ($\approx -0,004$; siehe Anhang, Seite 114) sind Enzymkinetiken kaum zu messen.

*Die CBR1 wurde in der Tschechischen Republik vermessen, die kinetischen Konstanten sind in etwa von derselben Größenordnung (mündliche Mitteilung von Prof. V. Wsol). Die Daten sind noch zu publizieren.

[†]siehe Tabelle 5.3, Seite 75



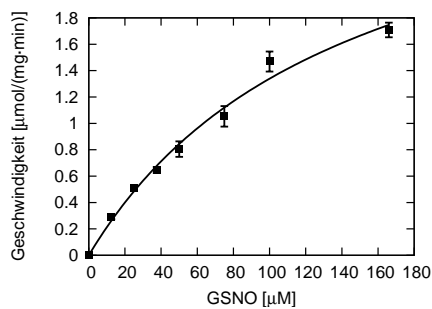
CBR1 Wildtyp

$$V_{max} = 6,8 \pm 0,45 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 92 \pm 12 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 220 \pm 15 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 2,4 \pm 0,47 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$



CBR3 Wildtyp

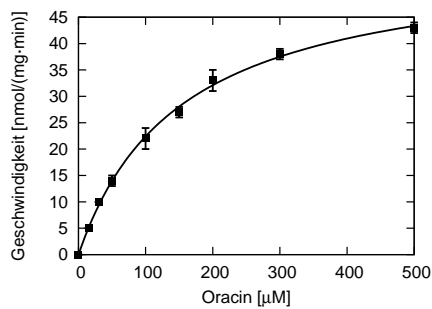
$$V_{max} = 3,24 \pm 0,38 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 140 \pm 20 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 110 \pm 13 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 0,75 \pm 0,24 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$

Abbildung 5.12 – Enzymkinetiken von S-Nitrosoglutathion der Wildtypen CBR1 und CBR3. Für CBR3 ist S-Nitrosoglutathion neben NADPH das einzige uns bekannte Substrat, für das unter den gewählten Versuchsbedingungen mit einer photometrischen Kinetik-Messung eine Halbsättigungskonstante zu ermitteln war. Die Versuchsbedingungen sind in Kapitel 4.7.3 auf Seite 53 beschrieben.



CBR3 Wildtyp

$$V_{max} = 57 \pm 1,3 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 150 \pm 8,5 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 1,9 \pm 0,044 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 0,012 \pm 0,00097 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$

Abbildung 5.13 – Enzymkinetik von Oracin des Wildtyps von CBR3. Die Versuchsbedingungen sind in Kapitel 4.7.4 auf Seite 54 beschrieben. Oracin war, abgesehen vom Kofaktor NADPH, das erste Substrat der CBR3, für das eine Halbsättigungskonstante unterhalb der höchsten Substratkonzentration ermittelt wurde und damit eine vollständige Enzymkinetik bestimmt werden konnte.

5.5.8 Screening von Inhibitoren

Die Suche nach Inhibitoren der CBR3 ergab, dass lediglich die Reduktion von Isatin mit 50 μM Quercitrin um ca. 20 % verringert war (Tabelle 5.2). Im Gegensatz dazu sind die getesteten Substanzen potenzielle Inhibitoren der CBR1 [96].

Tabelle 5.2 – Ergebnisse des Inhibitorenscreenings mit CBR3

Inhibitor	Umsatzgeschwindigkeit [$\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$]	relativ zur Referenz (=1)
Referenz (nur DMSO)	1,50	1
7-Hydroxy-Flavon	1,43	0,95
Genistein	1,47	0,98
Naringenin	1,49	0,99
Quercitrin	1,22	0,81
Resveratrol	1,29	0,86
Rutin	1,48	0,99

Die Inhibitorenkonzentration betrug 50 μM , Isatin als Substrat lag in 2 mM Konzentration vor, jede Messung wurde einmal durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Kapitel 4.6.3 beschrieben.

5.6 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON MUTANTEN DER CBR3

Im Folgenden sind die für die CBR3-Mutanten durchgeführten Aktivitätsmessungen beschrieben. Für Isatin und 9,10-Phenanthrenchinon wurden jeweils mehrere Substratkonzentrationen gemessen, wenn möglich die kinetischen Konstanten ermittelt. Die Mutanten wurden zusätzlich mit einer Auswahl von Substraten der CBR1 getestet, die keine Substrate der CBR3 sind.

5.6.1 Isatin

Als Kriterium, ob eine Mutante als Grundlage für weitere Mutagenese ausgewählt wurde, diente die Aktivität bezüglich Isatin. Zum Vergleich von CBR1 und CBR3 sind die Kinetiken der Wildtypen in Abbildung 5.14 zusammengefasst. Die deutlichen Unterschiede werden sofort ersichtlich. Der niedrige K_m -Wert der CBR1 bei hoher

katalytischer Effizienz steht den sehr niedrigen Aktivitäten der CBR3-Varianten auch bei sehr hoher Substratkonzentration gegenüber.

Als erste Mutante wurde CBR3-SOE hergestellt. Diese Mutante zeigte zumindest bei hohen Isatinkonzentrationen einen Sättigung, wie in Abbildung 5.15 zu sehen ist. Eine zusätzliche Mutation der Aminosäure 230 von Prolin zu Tryptophan (SOE-P230W) war so effizient bei der Umsetzung von Isatin, dass sie als Grundlage für die weitere Mutagenese verwendet wurde. Die durch alleinige Mutation der Aminosäure 230 generierte CBR3-P230W ist interessanterweise noch weniger aktiv als die CBR3.

Der C-Terminus wurde als sehr unkonservierter Bereich im Vergleich zwischen CBR1 und CBR3 zur Mutagenese ausgewählt. Die resultierenden Mutanten CHIM und SOE-CHIM sind aber weniger aktiv als der zugrunde liegende Wildtyp CBR3 bzw. die Mutante SOE (Abbildung 5.16).

Abbildung 5.17 zeigt mit SOE-P230W-97VA und SOE-P230W-191SSA zwei von SOE-P230W abgeleitete Mutanten. Da die Umsetzung von Isatin kaum Unterschiede zu SOE-P230W zeigte, wurden diese Mutanten nicht als Grundlage für weitere Mutationen verwendet.

Die Isatin-Kinetiken der Mutanten SOE-P230W-142MS, SOE-P230W-H270S und der daraus abgeleiteten SuMu und SuMu-V273R sind gemeinsam in Abbildung 5.18 dargestellt. Die SuMu-Mutanten haben durch die Zahl ausgetauschter Aminosäuren große Ähnlichkeit zu CBR1. Da sich durch die Substitution der Aminosäuren 142 und 143 bzw. 270 eine Annäherung an die Eigenschaften der CBR1 bezüglich der Isatinreduktion ergab, wurden diese kombiniert. Die daraus resultierenden Effekte fallen nicht mehr so deutlich aus (anders als bei 9,10-Phenanthrenchinon, dazu siehe Kapitel 5.6.2), ebenso wie durch die zusätzliche Mutation von Valin zu Arginin an Position 273.

5.6.2 9,10-Phenanthrenchinon

Die Abbildung 5.19 zeigt, dass sich die enzymatischen Eigenschaften für 9,10-Phenanthrenchinon von CBR1 und den Wildtypen der CBR3 signifikant unterscheiden. Die katalytische Effizienz der CBR1 für 9,10-Phenanthrenchinon ist über 50 mal höher als für die CBR3-Varianten. Ebenso wie bei Isatin kann für die CBR3-Varianten keine Substratsättigung beobachtet werden, im Gegensatz zur CBR1.

Bei der CBR3-Mutante SOE ist anders als für Isatin keine vollständige Bestimmung der kinetischen Konstanten möglich, da der Sättigungsbereich nicht erreicht wurde. Die katalytische Effizienz konnte gegenüber den Wildtypen der CBR3 aber um das 7-fache gesteigert werden. Die katalytische Effizienz der Mutante CBR3-P230W ist nur halb so groß wie die der Wildtypen. Für die Mutante SOE-P230W ließ sich sowohl K_m als auch k_{cat} bestimmen. Die katalytische Effizienz kommt fast derjenigen der CBR1 gleich. Die Abbildung 5.20 fasst die Ergebnisse zu diesen Mutanten zusammen.

Der alleinige Austausch des C-Terminus der CBR3 zu dem der CBR1 führt zu keiner Veränderung der katalytischen Effizienz. Die Mutation des C-Terminus zeigt bei SOE-CHIM mit Isatin vergleichbare Effekte. Die katalytische Effizienz dieser Mutante ist niedriger als die der Mutante SOE und dazu niedriger als die der Mutante CHIM. Die Plots sind in Abbildung 5.21 dargestellt.

Die Mutanten SOE-P230W-97VA und SOE-P230W-191SSA zeigen gegenüber der Mutante SOE-P230W und CBR1 eine deutliche Steigerung der katalytischen Effizienz und eine Verringerung der Werte für K_m (Abbildung 5.22, für Isatin hingegen ist im Vergleich zu SOE-P230W keine wesentliche Veränderung beobachtet worden).

9,10-Phenanthrenchinon wird im Vergleich zur CBR1 von den Mutanten SOE-P230W-142MS und SOE-P230W-H270S mit einer ca. 3-fach höheren katalytischen Effizienz umgesetzt. Anders als bei Isatin zeigte die Kombination zur Mutante SuMu sehr deutliche Wirkung. SuMu katalysiert die Umsetzung mit einer 12-fach höheren Effizienz als CBR1. Die Ergebnisse für die Mutante SuMu-V273R bezüglich 9,10-Phenanthrenchinon sind wenn überhaupt nur ein kleiner Hinweis darauf, dass die Aminosäure Arginin 273 der CBR1 für die Katalyseeigenschaften wichtig ist. Die Messergebnisse und Plots für diese Mutanten sind in Abbildung 5.23 dargestellt.

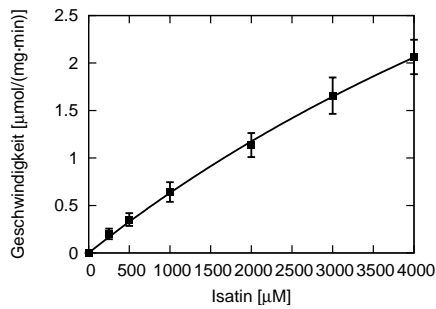
5.6.3 *Screening von Substraten der CBR1*

Für einige CBR3-Mutanten wurden Modellsubstrate der CBR1 getestet, die keine Substrate der CBR3 sind. 4-Benzoylpyridin wurde als einfaches Keton gewählt, 2,3-Hexandion als Verbindung mit benachbarten Ketofunktionen ohne aromatische Gruppen, Menadion als parachinoider Stoff und 4-Nitrobenzaldehyd als aromatischer Aldehyd (Strukturformeln siehe Seite 116). Die Ergebnisse in Tabelle 5.3 zeigen, dass die Mutanten alle deutlich weniger aktiv als CBR1 sind, anders als für Isatin und 9,10-Phenanthrenchinon gemessen. Auffällig ist die Mutante SuMu-V273R, welche deutlich aktiver als die anderen Mutanten ist. Die Fähigkeit zur Reduktion von den aufgezählten und ähnlichen Verbindungen ist aber offensichtlich einer oder mehreren noch nicht bekannten Aminosäuren zuzuordnen.

Tabelle 5.3 – Screening von Substraten mit CBR1 und CBR3-Mutanten

Substrat	Umsatz bei angegebener Substratkonzentration [min^{-1}] (entsprechend der Wechselzahl)			
	4-Benzoyl- pyridin	2,3-Hexandion	Menadion	4-Nitrobenz- aldehyd
Konzentration	500 μM	500 μM	100 μM	1000 μM
CBR1 Wildtyp	59 \pm 2,5	72 \pm 4,9	110 \pm 9,2	39 \pm 2,1
SOE-P230W	1,4 \pm 0,20	n.m.	3,9 \pm 0,83	1,1 \pm 0,20
SOE-P230W-97VA	1,6 \pm 0,042	n.m.	3,7 \pm 0,76	1,5 \pm 0,49
SOE-P230W-191SSA	1,7 \pm 0,19	n.m.	3,4 \pm 0,085	1,5 \pm 0,38
SuMu-V273R	5,2 \pm 0,66	3,4 \pm 0,41	16 \pm 1,2	3,1 \pm 0,55

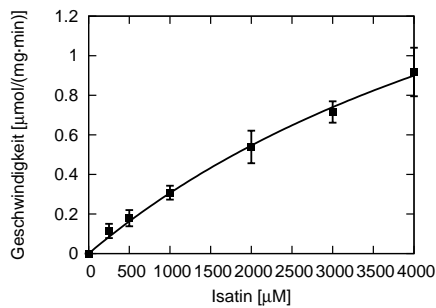
Alle Substrate wurden in 20 % (v/v) Methanol angesetzt, die Methanolkonzentration im Reaktionsansatz betrug 2 %. Angegeben sind Mittelwerte aus je mindestens drei Messungen sowie die Standardabweichung (n.m. – nicht messbar).



CBR3 Wildtyp

$K_m > 4000 \mu\text{M}$

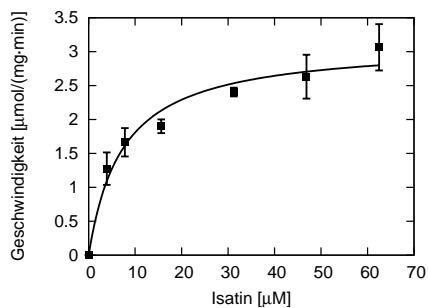
$k_{cat}/K_m = 0,023 \pm 0,0069 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$



CBR3-V244M

$K_m > 4000 \mu\text{M}$

$k_{cat}/K_m = 0,012 \pm 0,0042 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$



CBR1 Wildtyp

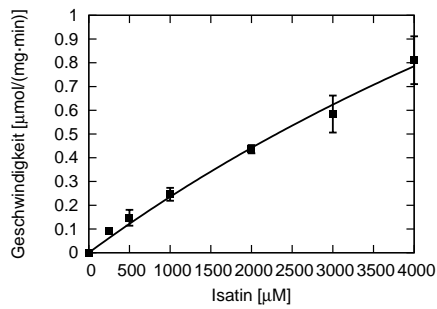
$V_{max} = 3,1 \pm 0,20 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$

$K_m = 7,3 \pm 1,8 \mu\text{M}$

$k_{cat} = 100 \pm 6,5 \text{min}^{-1}$

$k_{cat}/K_m = 14 \pm 4,4 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$

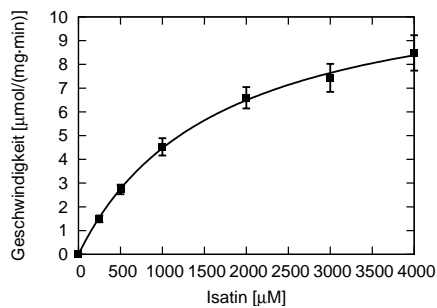
Abbildung 5.14 – Enzymkinetiken von Isatin der Wildtypen von CBR3 und CBR1 und des CBR3-Polymorph CBR3-V244M. Die beiden CBR3-Varianten sind bis zu einer Isatinkonzentration von 4000 μM nicht im Sättigungsbereich, während CBR1 einen K_m -Wert von 7,3 μM zeigt und die katalytische Effizienz um drei Größenordnungen höher ist.



CBR3-P230W

$K_m > 4000 \mu\text{M}$

$k_{cat}/K_m = 0,0068 \pm 0,00021 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$



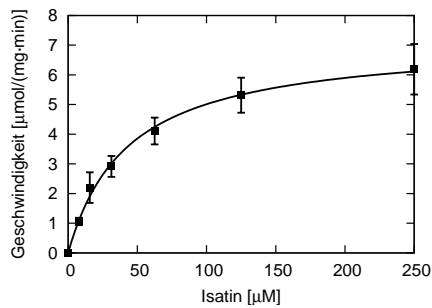
SOE

$V_{max} = 12 \pm 0,32 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$

$K_m = 1600 \pm 100 \mu\text{M}$

$k_{cat} = 390 \pm 11 \text{min}^{-1}$

$k_{cat}/K_m = 0,24 \pm 0,021 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$



SOE-P230W

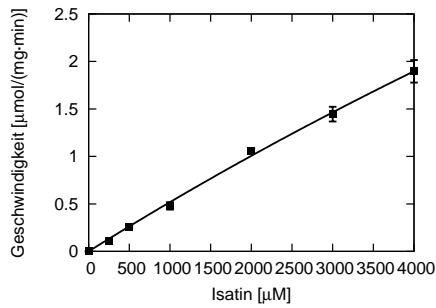
$V_{max} = 7,2 \pm 0,22 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$

$K_m = 43 \pm 3,9 \mu\text{M}$

$k_{cat} = 240 \pm 7,3 \text{min}^{-1}$

$k_{cat}/K_m = 5,5 \pm 0,50 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$

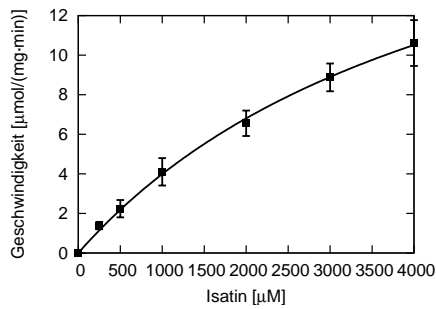
Abbildung 5.15 – Enzymkinetiken von Isatin der Mutanten CBR3-P230W, SOE und SOE-P230W. Diese drei Kinetiken sind gemeinsam abgebildet, da die Kombination der Mutationen von CBR3-P230W und SOE zu SOE-P230W eine grundlegende Veränderung bei der Reaktionsgeschwindigkeit zeigte. Dazu ist insbesondere der Konzentrationsbereich des Isatins in den oberen Graphen mit dem in dem unteren Graphen zu vergleichen. Die Primärstruktur der Mutanten lässt sich Tabelle 5.1, Seite 61 und Abbildung 5.4, Seite 62 entnehmen.



CHIM

$$K_m > 4000 \mu\text{M}$$

$$k_{cat}/K_m = 0,016 \pm 0,00025 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$

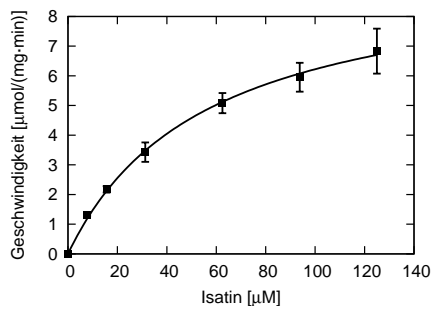


SOE-CHIM

$$K_m > 4000 \mu\text{M}$$

$$k_{cat}/K_m = 0,16 \pm 0,030 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$

Abbildung 5.16 – Enzymkinetiken von Isatin der Mutanten CHIM und SOE-CHIM. Im Vergleich zur Mutante SOE (Abbildung 5.15) ist durch den Austausch des C-Terminus keine Verbesserung der katalytischen Effizienz erreicht worden. Die Primärstruktur der Mutanten lässt sich Tabelle 5.1, Seite 61 und Abbildung 5.4, Seite 62 entnehmen.



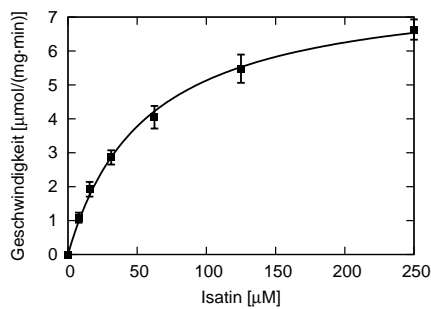
SOE-P230W-97VA

$$V_{max} = 9,7 \pm 0,3 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 56 \pm 4,0 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 320 \pm 9,9 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 5,7 \pm 0,59 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$



SOE-P230W-191SSA

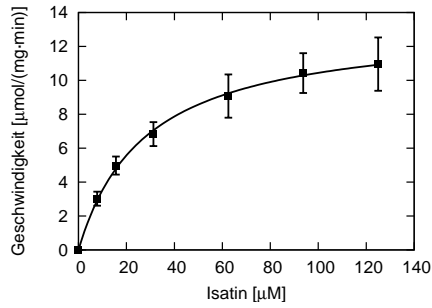
$$V_{max} = 8,0 \pm 0,22 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 56 \pm 4,2 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 260 \pm 7,3 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 4,7 \pm 0,48 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$

Abbildung 5.17 – Enzymkinetiken von Isatin der Mutanten SOE-P230W-97VA und SOE-P230W-191SSA. Die auf Basis der SOE-P230W-Mutante (Abbildung 5.15) zusätzlich eingefügten Mutationen zeigten keine deutliche Verbesserung der katalytischen Effizienz. Die Primärstruktur der Mutanten lässt sich Tabelle 5.1, Seite 61 und Abbildung 5.4, Seite 62 entnehmen.



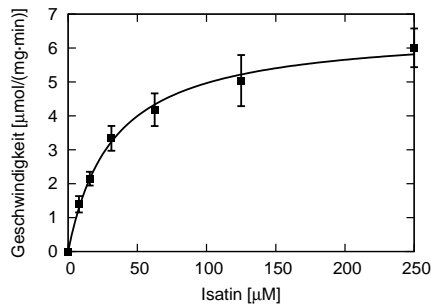
SOE-P230W-142MS

$$V_{max} = 13 \pm 0,26 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 28 \pm 1,6 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 440 \pm 8,4 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 16 \pm 1,2 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$



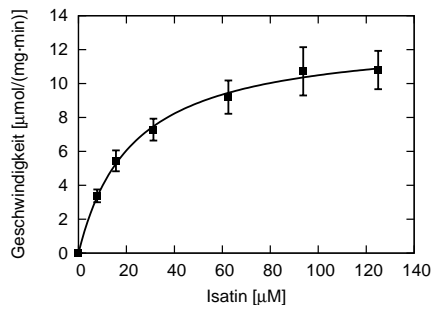
SOE-P230W-H270S

$$V_{max} = 6,6 \pm 0,19 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 32 \pm 2,9 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 220 \pm 6,1 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 6,7 \pm 0,80 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$



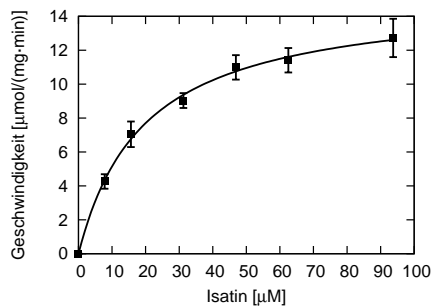
SuMu

$$V_{max} = 13 \pm 0,31 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 22 \pm 1,7 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 420 \pm 10 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 19 \pm 1,9 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$



SuMu-V273R

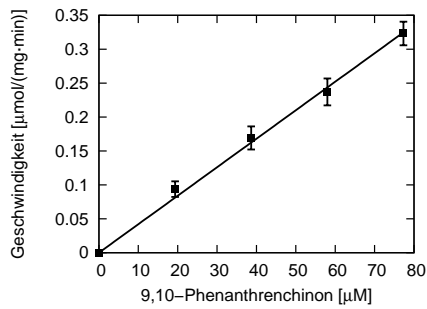
$$V_{max} = 15 \pm 0,39 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 20 \pm 1,5 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 500 \pm 13 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 26 \pm 2,7 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$

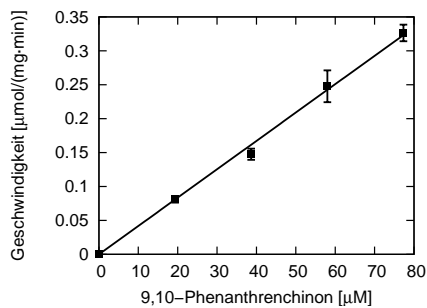
Abbildung 5.18 – Enzymkinetiken von Isatin der Mutanten SOE-P230W-142MS, SOE-P230W-H270S, SuMu und SuMu-V273R. Die Kombination der Mutationen von SOE-P230W-142MS und SOE-P230W-H270S zu SuMu zeigt im Vergleich zu anderen Mutationen geringe Effekte, ebenso wie die zusätzliche Mutation von V273R. Eine Annäherung an die Eigenschaften der CBR1 lässt sich aber beobachten (siehe Abbildung 5.14). Die Primärstruktur der Mutanten lässt sich Tabelle 5.1, Seite 61 und Abbildung 5.4, Seite 62 entnehmen.



CBR3

$$K_m > 78 \mu\text{M}$$

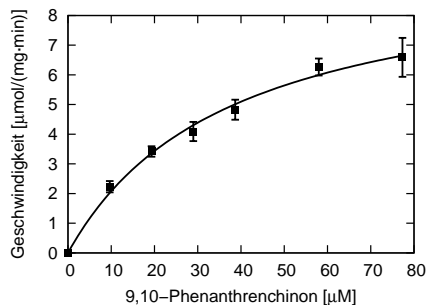
$$k_{cat}/K_m = 0,14 \pm 0,0010 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$



CBR3-V244M

$$K_m > 78 \mu\text{M}$$

$$k_{cat}/K_m = 0,14 \pm 0,0024 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$



CBR1 Wildtyp

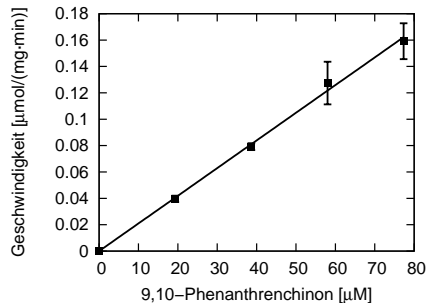
$$V_{max} = 9,9 \pm 0,64 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 38 \pm 5,3 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 320 \pm 21,04 \text{min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 8,7 \pm 1,8 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$

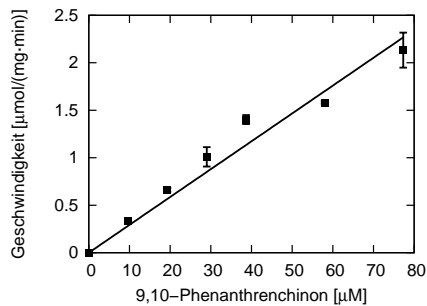
Abbildung 5.19 – Enzymkinetiken von 9,10-Phenanthrenchinon der Wildtypen von CBR3 und CBR1 und des CBR3-Polymorph CBR3-V244M. Die Unterschiede zwischen der CBR1 und den Wildtypen der CBR3 wird auch hier deutlich (zum Vergleich Isatin in Abbildung 5.14). Abgesehen davon, dass die kinetischen Konstanten der CBR1 anders als bei den CBR3-Wildtypen vollständig bestimmbar sind, fallen die Unterschiede aber nicht so deutlich aus wie bei Isatin.



CBR3-P230W

$$K_m > 78 \mu\text{M}$$

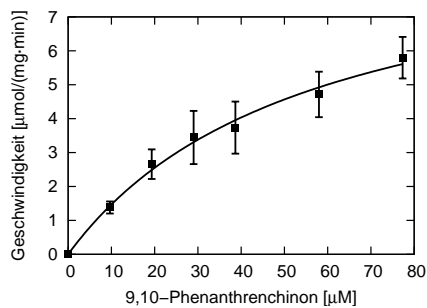
$$k_{cat}/K_m = 0,069 \pm 0,0011 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$



SOE

$$K_m > 78 \mu\text{M}$$

$$k_{cat}/K_m = 0,96 \pm 0,046 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$



SOE-P230W

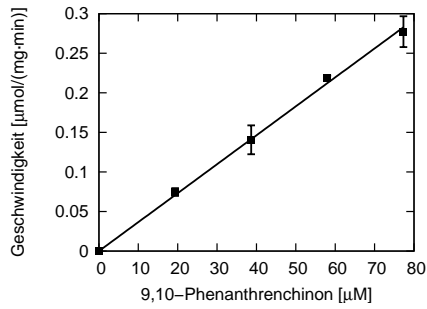
$$V_{max} = 9,6 \pm 0,91 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 56 \pm 9,8 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 320 \pm 30 \text{min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 5,7 \pm 1,5 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$

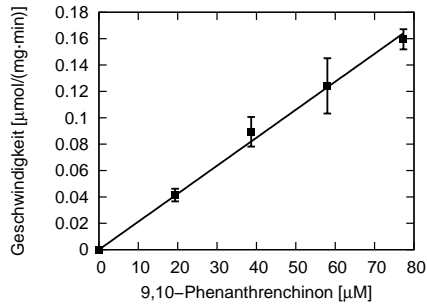
Abbildung 5.20 – Enzymkinetiken von 9,10-Phenanthrenchinon der Mutanten CBR3-P230W, SOE und SOE-P230W. Hier ist wie bei Isatin zu beobachten, dass die Kombination der Mutanten SOE und CBR3-P230W zu SOE-P230W einen signifikanten Einfluss auf die katalytische Effizienz hat. Mit SOE-P230W konnten für eine CBR3-Mutante erstmals K_m - und k_{cat} -Werte bestimmt werden. Die Eigenschaften dieser Mutante sind denen der CBR1 sehr ähnlich (zum Vergleich Abbildung 5.19). Die Primärstruktur der Mutanten lässt sich Tabelle 5.1, Seite 61 und Abbildung 5.4, Seite 62 entnehmen.



CHIM

$$K_m > 78 \mu\text{M}$$

$$k_{cat}/K_m = 0,12 \pm 0,0015 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$

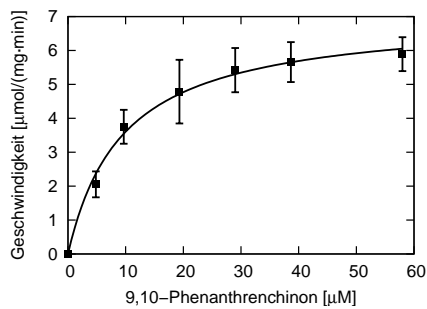


SOE-CHIM

$$K_m > 78 \mu\text{M}$$

$$k_{cat}/K_m = 0,070 \pm 0,0014 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$

Abbildung 5.21 – Enzymkinetiken von 9,10-Phenanthrenchinson der Mutanten CHIM und SOE-CHIM. Beide zeigen im Vergleich zu den CBR3-Wildtypen (Abbildung 5.19) keine wesentliche Veränderung der katalytischen Eigenschaften. Die Primärstruktur der Mutanten lässt sich Tabelle 5.1, Seite 61 und Abbildung 5.4, Seite 62 entnehmen.



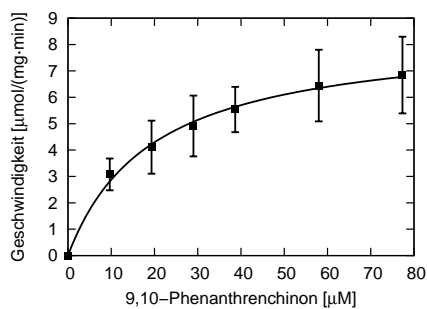
SOE-P230W-97VA

$$V_{max} = 7,0 \pm 0,26 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 9,6 \pm 1,2 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 230 \pm 8,5 \text{min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 24 \pm 3,9 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$



SOE-P230W-191SSA

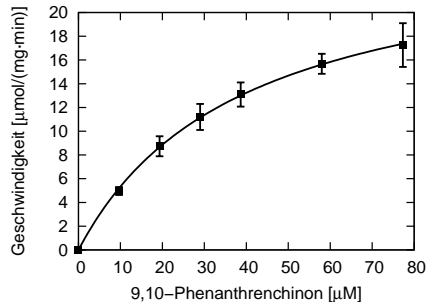
$$V_{max} = 8,5 \pm 0,30 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 20 \pm 2,0 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 280 \pm 9,8 \text{min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 14 \pm 2,0 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$

Abbildung 5.22 – Enzymkinetiken von 9,10-Phenanthrenchinson der Mutanten SOE-P230W-97VA und SOE-P230W-191SSA. Im Vergleich zur Mutante SOE-P230W (Abbildung 5.20) ist ein deutlicher Einfluss auf die katalytischen Konstanten zu beobachten. Die Werte sind mit denen der CBR1 vergleichbar (Abbildung 5.19), anders als bei Isatin (Abbildung 5.17). Die Primärstruktur der Mutanten lässt sich Tabelle 5.1, Seite 61 und Abbildung 5.4, Seite 62 entnehmen.



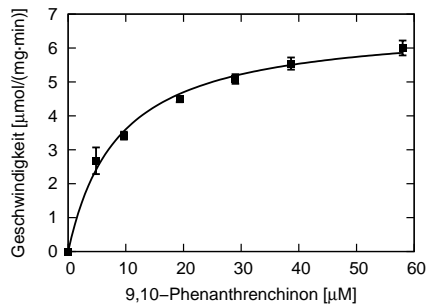
SOE-P230W-142MS

$$V_{max} = 26 \pm 0,43 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 39 \pm 1,4 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 860 \pm 14 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 22 \pm 1,1 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$

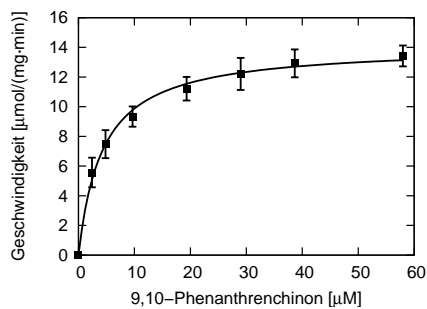


SOE-P230W-H270S

$$V_{max} = 6,7 \pm 0,22 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 8,7 \pm 0,99 \mu\text{M} \quad k_{cat} = 220 \pm 7,1 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 26 \pm 3,7 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$



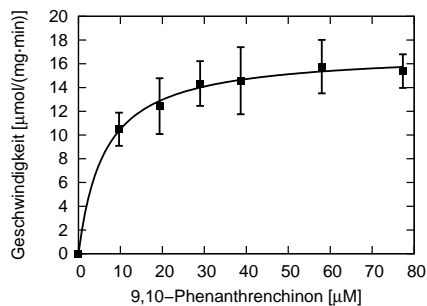
SuMu

$$V_{max} = 14 \pm 0,28 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 4,3 \pm 0,37 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 460 \pm 9,1 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 110 \pm 11 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$



SuMu-V273R

$$V_{max} = 17 \pm 0,35 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$$

$$K_m = 6,2 \pm 0,69 \mu\text{M}$$

$$k_{cat} = 560 \pm 12 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{cat}/K_m = 92 \pm 12 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$

Abbildung 5.23 – Enzymkinetiken von 9,10-Phenanthrenchinon der Mutanten SOE-P230W-142MS, SOE-P230W-H270S, SuMu und SuMu-V273R. Alle diese Mutanten zeigen gegenüber der CBR1 eine deutlich erhöhte katalytische Effizienz. Außerdem sind die K_m -Werte aller Mutanten abgesehen von SOE-P230W-142MS deutlich niedriger (zum Vergleich Abbildung 5.19). Die Primärstruktur der Mutanten lässt sich Tabelle 5.1, Seite 61 und Abbildung 5.4, Seite 62 entnehmen.

Die Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen ist zu einem Großteil nur auf genetischer Ebene identifiziert und untersucht worden. Die wenigsten Mitglieder sind als Protein aus Gewebe gereinigt und charakterisiert worden. Eine der früh entdeckten [70] und am intensivsten untersuchten [60] SDR ist die humane CBR1. Die nächste Verwandte der CBR1 ist die CBR3. Sie ist nicht über die Isolierung aus Gewebe entdeckt worden, sondern im Rahmen von Genom-Sequenzierungsprojekten [94], wahrscheinlich wegen insgesamt zu niedriger Konzentration und der nicht bekannten bzw. offensichtlichen Funktion.

Für die CBR4 gilt ähnliches wie für die CBR3, sie wurde durch Sequenzierungsprojekte identifiziert. Zu Beginn der Arbeiten war zur CBR4 keine Publikation erschienen, die das Protein biochemisch charakterisiert. Auf Grund des Namens lag es daher nahe, auch diese *Carbonylreduktase* zu untersuchen.

6.1 VERWANDTSCHAFTSGRAD DER HUMANEN CARBONYL-REDUKTASEN CBR1, CBR3 UND CBR4

Die beiden menschlichen SDR CBR1 und CBR3 sind auf Grund der geringen Identitäten zur CBR4 als nicht verwandt mit dieser anzusehen. Die Sequenzidentität zur CBR1 beträgt lediglich 22 %, zur CBR3 24 % (Berechnung siehe Kapitel 1.4). Außerdem wurde die Bezeichnung *Carbonic reductase 4* und später *carbonyl reduktase 4* vergeben, bevor eine Funktion des Enzyms bekannt war. Dieser Umstand gilt zwar ebenso für die CBR3, jedoch ist eine Identität von 72 % zur CBR1 eine ausreichende Rechtfertigung, wenn man bedenkt, dass SDR-Proteine untereinander sonst Identitäten im Bereich von 15 bis 30 % aufweisen [36].

6.2 KLONIERUNG, EXPRESSION UND REINIGUNG DER CBR3

Für die Konstruktion von Primern kann nur – anders als bei analytischer PCR – auf begrenzte Bereiche der cDNA zurückgegriffen werden, da der gesamte ORF erfasst werden muss. Diese Primer stellen wahrscheinlich nicht das Optimum dar, beispielsweise den Guanin-Cytosin-Anteil oder Zusammensetzung der Randbereiche betreffend [54]. Die richtigen PCR-Bedingungen zu finden, bis das gewünschte Gen amplifiziert werden kann, ist daher oft ein langwieriger Prozess. Da die Untersuchung von Polymorphismen der CBR3 anhand von Leberproben durchgeführt wurde [42],

sind wir von einer ausreichenden Zahl Transkripte der *cbr3* in Lebergewebe ausgegangen. Deshalb wurde anfangs versucht (Details sind nicht genannt), die DNA aus einer Leber-cDNA-Bibliothek zu gewinnen. Da das nicht gelungen ist, wurde das Gen der CBR3 als Plasmid erworben. Zu diesem Zeitpunkt war noch nicht bekannt, dass die CBR3 im Vergleich zur CBR1 ein insgesamt niedriges Transkriptlevel aufweist [38]. Die Gewinnung von DNA aus dem Plasmid zur Herstellung eines Expressionsvektors war wie erwartet unproblematisch.

6.3 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER CBR3

Die Überexpression löslicher CBR3 erfolgte nach Standardbedingungen (Kapitel 4.1.1). Zu dem Zeitpunkt, als die ersten erfolgreichen Überexpressionen und Reinigungen der CBR3 mittels Nickel-Affinitätschromatographie gelungen waren, ist nur Menadion (Strukturformel siehe Seite 116) als Substrat für CBR3 beschrieben gewesen. Die berichteten katalytischen Eigenschaften mit einem K_m -Wert von 25 μM und einem k_{cat} -Wert von 9,9 s^{-1} suggerierten, dass eine Aktivitätsmessung mit Menadion und NADPH ein geeigneter Ansatz sei, um die Expression und Reinigung von funktionalem Protein zu prüfen [42]. Weder die gereinigten Fraktionen der CBR3 aus der Nickel-Affinitätschromatographie noch das entsprechend der Veröffentlichung in PBS umgepufferte Protein zeigten Aktivität. Ebenfalls zeigte das rekombinante Protein mit abverdaulichem His-Tag keine Aktivität. Somit gewann man den Eindruck, dass das angewendeten Verfahren zur Gewinnung von Enzym nicht geeignet sei. Erst durch den Test von 9,10-Phenanthrenchinon, einem weiteren bekannten Substrat der CBR1 [96], konnte belegt werden, dass es sich bei der gereinigten Fraktion der CBR3 um enzymatisch aktives Protein handelte. Die gemessenen Umsätze waren jedoch mit 0,14 $(\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$ deutlich niedriger als die für CBR1, welche eine katalytische Effizienz von 8,7 $(\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$ zeigte. Das strukturell entfernt ähnliche Substrat Isatin – eine Verbindungen, die benachbarte Carbonylgruppen und ein aromatisches Strukturelement aufweist – wurde ebenfalls umgesetzt, ebenso wie 9,10-Phenanthrenchinon mit einer deutlich geringerer Effizienz von 0,023 $(\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$ gegenüber 14 $(\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$. Die Funktionsfähigkeit der rekombinanten CBR3 konnte endgültig belegt werden, nachdem für den Kofaktor NADPH ein K_m -Wert von 2,5 μM ermittelt wurde. Dieser lag noch unterhalb dem für CBR1 und Isatin ermitteltem K_m -Wert von 7,3 μM . Da es sich bei Isatin um ein physiologisches Substrat der CBR1 handelt [90], kann dieses Ergebnis als deutlicher Hinweis gewertet werden, dass die CBR3 eine physiologische Funktion als NADPH-abhängige Reduktase erfüllt. Diese Annahme beruht auf der Überlegung, dass die Kofaktor-Konzentration *in vivo* kein begrenzender Faktor ist.

Andere Modellsubstrate der CBR1, 4-Benzoylpyridin, 2,3-Hexandion und 4-Nitrobenzaldehyd (Tabelle 5.3, Seite 75), wurden wie Menadion nicht umgesetzt, außerdem nahezu alle der in Tabelle 4.2, Seite 52 aufgelisteten Verbindungen (Ausnahmen siehe Kapitel 5.5.1).

6.3.1 Reduktion von *S*-Nitrosoglutathion (GSNO) durch CBR3

Für die CBR1 wurde bekannt, dass sie GSNO (Strukturformel siehe Seite 116) effizient reduzieren kann und damit auch an der Regulation des Stickstoff-Monoxid-Levels beteiligt ist [5]. GSNO stellt eine Speicherform dieses kleinen radikalischen Botenstoffes dar. Zuerst wurde angenommen, dass die CBR3 diese Reduktion nicht katalysieren kann, der Grund hierfür waren die Aminosäuren an Position 97 und 98, bei CBR1 Valin und Alanin, bei CBR3 Serin und Asparaginsäure. Wechselwirkungen zwischen der NH-Gruppe des Val97* und der Carboxylgruppe des Glycins von GSH (welches statt GSNO mit der CBR1 kristallisiert wurde) wurden beschrieben. Zudem sind Wechselwirkungen zwischen dem Peptidrückgrat von Ala193† und GSH beschrieben, das Alanin ist in der CBR3 durch Prolin substituiert. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carbonsäure des Glutamins von GSH und dem Peptidrückgrat sind unwahrscheinlich, da der Stickstoff-Teil des Prolin-Rests damit tertiär und ohne Wasserstoffsubstituenten ist. Entgegen diesen Überlegungen wurde die Reduktion von GSNO jedoch durch CBR3 katalysiert ($k_{cat}/K_m = 0,75 \text{ (}\mu\text{M} \cdot \text{min)}^{-1}$), aber mit nur einem Drittel der katalytischen Effizienz von CBR1 ($k_{cat}/K_m = 2,4 \text{ (}\mu\text{M} \cdot \text{min)}^{-1}$).

Für die CBR1 publizierte kinetischen Konstanten sind $K_m = 30 \text{ }\mu\text{M}$, $k_{cat} = 450$ und $k_{cat}/K_m = 15 \text{ (}\mu\text{M} \cdot \text{min)}^{-1}$ [5]. Sie sind ähnlicher Größenordnung wie die in dieser Arbeit gemessenen Werte für CBR1, wenngleich der K_m -Wert mit $92 \text{ }\mu\text{M}$ hier etwa dreimal größer und der k_{cat} -Wert mit 220 min^{-1} nur halb so groß ist (siehe Abbildung 5.12, Seite 71). Worin diese Unterschiede begründet liegen, ist zur Zeit unklar. Möglich wären störende Einflüsse des His-Tags, unterschiedliche Aufreinigung oder unterschiedliche Reaktionsbedingungen. Unabhängig von diesen Unterschieden jedoch ist GSNO für die humane CBR3 neben dem Kofaktor NADPH das einzige uns bekannte Substrat, für das eine vollständige Bestimmung der katalytischen Konstanten mit Hilfe eines Photometers möglich ist. Außerdem ist die Löslichkeit von GSNO in Wasser gut, sodass auf organische Lösungsmittel verzichtet werden konnte.

6.3.2 Reduktion von Oracin durch CBR3

Oracin (Strukturformel siehe Seite 116) ist eine zytostatisch wirksame Verbindung, welche durch Reduktion einer Ketofunktion metabolisiert wird. Die Messung der Reduktion von Oracin ist im Vergleich zur photometrischen Messung der Oxidation von NADPH deutlich empfindlicher, bedingt dadurch, dass (i) einerseits über einen Zeitraum von 0,5 h ein konstanter Umsatz gemessen werden kann, (ii) statt der indirekten Messung über die Abnahme der Konzentration von Kofaktor die Konzentration entstandener Reaktionsprodukte bestimmt wird und (iii) Fluoreszenzmessung die Messung deutlich kleinerer Konzentrationen als eine photometrische Bestimmung zulässt. Die pharmakologische Relevanz der CBR3 für den Oracin-Metabolismus ist nicht offensichtlich, da die CBR1 diese Umsetzung schneller katalysiert und sie zudem stärker

*In [5] Val196

†In [5] Ala192

exprimiert ist. Außerdem sind eine Reihe weiterer Reduktasen dazu in der Lage, die Umwandlung von Oracin zu Dihydrooracin zu katalysieren [44, 48, 57, 99].

6.4 MUTAGENESE ZUR STRUKTURAUFKLÄRUNG VON CBR1 UND CBR3

Die Identität der beiden Carbonylreduktasen CBR1 und CBR3 von 72% bei einer gleichzeitig stark unterschiedlichen Substratspezifität war die Grundlage für die durchgeführte Mutationsanalyse. Diese Voraussetzung legte nahe, zusammen mit den vorhandenen Kristallstrukturen [64, 77], einzelne unterschiedliche Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums auszuwählen und auszutauschen. Da für die CBR1 – anders als für die CBR3 – Substrate bekannt waren und so eine funktionelle Charakterisierung grundsätzlich möglich war, wurden Aminosäure der CBR3 durch Aminosäuren der CBR1 substituiert (siehe Abbildung 5.4, Seite 62).

Der Mutagenesestrategie lag die Annahme zu Grunde, dass eine Charakterisierung des katalytischen Zentrums eines Enzyms durch Mutagenese von einer Verbesserung der katalytischen Eigenschaften abhängig ist. Ausgetauschte Aminosäuren können nicht nur über eine schlechtere Substratbindung oder andere negative, aber für die Katalyse spezifische Einflüsse wirken. Eine generelle Konformationsänderung kann zu unspezifischer Beeinträchtigung der Funktion führen, ohne dass eine Aminosäure direkt mit einem Substrat oder dem Katalysemechanismus interagiert. Wenn jedoch eine Verbesserung der katalytischen Effizienz für ein Substrat zu beobachten war, wurde angenommen, dass der modifizierte Bereich unmittelbar relevant für die Katalyse oder Substratbindung ist.

Als Substrate wurden 9,10-Phenanthrenchinon und Isatin untersucht (Strukturformel siehe Seite 116), Oracin war auf Grund der aufwändigen Messmethodik und begrenzten Verfügbarkeit für die Mutagenesestudie nicht geeignet. 1,2-Naphthochinon hat sich in dem hier verwendeten Ansatz als äußerst labiles Substrat herausgestellt (ausgeprägte enzymunabhängige Reaktivität mit NADPH) und wurde nicht verwendet. Menadion wurde jeweils direkt nach der Reinigung der Mutanten gemessen und für eine Auswahl von Mutanten zusammen mit anderen Substraten quantifiziert (Tabelle 5.3, Seite 75).

Die Ergebnisse der Messungen von Enzymkinetiken sind für Isatin in Tabelle 6.1, für 9,10-Phenanthrenchinon in Tabelle 6.2 zusammengefasst.

6.4.1 Mutante SOE

Der erste Ansatz für die Mutagenese waren die Aminosäuren 236 bis 244. Aus der verwendeten Technik zum Austausch der Aminosäuren, *splicing by overlap extension*, leitete sich der Name *SOE* ab. Dieser Bereich zeigte in einem mit ClustalX [86]

Tabelle 6.1 – Kinetische Konstanten der CBR1, CBR3 und CBR3-Mutanten von Isatin

Konstrukt	k_{cat} [min^{-1}]	K_m [μM]	k_{cat}/K_m [$(min \cdot \mu M)^{-1}$]
CBR3		> 4000	0,023 ± 0,0069
CBR3-V244M		> 4000	0,012 ± 0,0042
CBR3-P230W		> 4000	0,0068 ± 0,00021
SOE	390 ± 11	1600 ± 100	0,24 ± 0,021
CHIM		> 4000	0,016 ± 0,00025
SOE-CHIM		> 4000	0,16 ± 0,030
SOE-P230W	240 ± 7,3	43 ± 3,9	5,5 ± 0,50
SOE-P230W-97VA	320 ± 9,9	56 ± 4,0	5,7 ± 0,59
SOE-P230W-142MS	440 ± 8,4	28 ± 1,6	16 ± 1,2
SOE-P230W-191SSA	260 ± 7,3	56 ± 4,2	4,7 ± 0,48
SOE-P230W-H270S	220 ± 6,1	32 ± 2,9	6,7 ± 0,80
SuMu	420 ± 10	22 ± 1,7	19 ± 1,9
SuMu-V273R	500 ± 13	20 ± 1,5	26 ± 2,7
CBR1	100 ± 6,5	7,3 ± 1,8	14 ± 4,4

Die Fehler geben den „asymptotic standard error“ der nicht-linearen Regression bezogen auf die Mittelwerte an.

Tabelle 6.2 – Kinetische Konstanten der CBR1, CBR3 und CBR3-Mutanten von 9,10-Phenanthrenchinon

Konstrukt	k_{cat} [min^{-1}]	K_m [μM]	k_{cat}/K_m [$(min \cdot \mu M)^{-1}$]
CBR3		> 78	0,14 ± 0,0010
CBR3-V244M		> 78	0,14 ± 0,0024
CBR3-P230W		> 78	0,069 ± 0,0011
SOE		> 78	0,96 ± 0,046
CHIM		> 78	0,12 ± 0,0015
SOE-CHIM		> 78	0,070 ± 0,0014
SOE-P230W	320 ± 30	56 ± 9,8	5,7 ± 1,5
SOE-P230W-97VA	230 ± 8,5	9,6 ± 1,2	24 ± 3,9
SOE-P230W-142MS	860 ± 14	39 ± 1,4	22 ± 1,1
SOE-P230W-191SSA	280 ± 9,8	20 ± 2,0	14 ± 2,0
SOE-P230W-H270S	220 ± 7,1	8,7 ± 0,99	26 ± 3,7
SuMu	460 ± 9,1	4,3 ± 0,37	110 ± 11
SuMu-V273R	560 ± 12	6,2 ± 0,69	92 ± 12
CBR1	320 ± 21,04	38 ± 5,3	8,7 ± 1,8

Die Fehler geben den „asymptotic standard error“ der nicht-linearen Regression bezogen auf die Mittelwerte an.

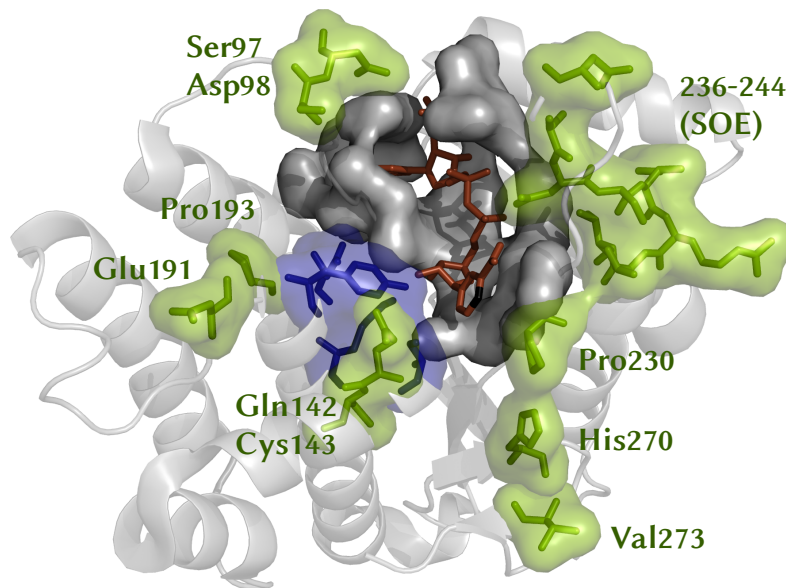


Abbildung 6.1 – Kristallstruktur der CBR3 (wwPDB-Code 2HRB) mit einer Auswahl von Aminosäuren, grün eingefärbt, die im Rahmen der Mutagenese ausgetauscht wurden. NADPH ist braun, das C4-Atom schwarz, die Aminosäuren der katalytischen Tetrade (Asparagin, Serin, Tyrosin und Lysin) in blau dargestellt. Die Oberfläche von Aminosäuren innerhalb von 4 Å um den Kofaktor ist grau dargestellt (Abbildung erstellt mit Pymol^a).

^aURL: <http://pymol.sourceforge.net/>

berechneten Alignment von CBR1 und CBR3 deutliche Unterschiede auf, wie in Abbildung 5.4 auf Seite 62 zu sehen ist. Der Bereich ist außerdem nahe des katalytischen Zentrums lokalisiert, wie die Kristallstruktur zeigt (Abbildung 6.1). Durch den Austausch konnte eine Mutante generiert werden, die eine maßgebliche Steigerung der katalytischen Effizienz um den Faktor 10 bezüglich Isatin zeigte. Außerdem konnten K_m und V_{max} zuverlässig berechnet werden, da eine Halbsättigung des Enzyms bei 1600 μM und damit deutlich unterhalb der 4000 μM Grenze der gemessenen Konzentrationen von Isatin lag. Die katalytische Effizienz bezüglich 9,10-Phenanthrenchinon konnte verbessert, aber noch keine Sättigung erreicht werden. Eine Umsetzung von Menadion konnte nicht gemessen werden.

6.4.2 Mutanten CHIM und SOE-CHIM

Die C-Termini von CBR1 und CBR3 zeigen wenig Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz, wie im Konsensusbalken des Sequenzalignments deutlich wird (Abbildung 5.4, Seite 62). Die Kristallstruktur zeigt, dass diese Aminosäuren Teil der postulierten Substratbindetasche sind. Die Ergebnisse der Kinetikmessungen für die-

se Mutanten enttäuschten wegen geringeren katalytischen Effizienzen, als sie für den CBR3-Wildtyp und die Mutante SOE bestimmt wurden. Der ursprüngliche Gedanke, sukzessive einen großen Bereich auf einzelne Aminosäuren einzuzugrenzen, wurde auf diesem Wege nicht weiter verfolgt.

6.4.3 Mutanten CBR3-P230W und SOE-P230W

Es konnte gezeigt werden, dass die Substitution der Aminosäuren 236–244 einen deutlichen Einfluss auf die enzymatische Aktivität hatte. Es lagen aber immer noch zwei Größenordnungen zwischen den K_m -Werten von SOE und der physiologischen Isatin-Reduktase CBR1, der Wert für k_{cat}/K_m war ebenfalls signifikant niedriger. Mutanten der CBR3 und der SOE, mit der Aminosäure 230 von Prolin zu Tryptophan substituiert, brachten ein überraschendes Ergebnis. Interessanterweise konnte für die Mutante CBR3-P230W eine verringerte Geschwindigkeit für die Reduktion von Isatin gegenüber der CBR3 festgestellt werden, während die Mutante SOE-P230W eine Verbesserung der katalytischen Effizienz gegenüber der CBR3 um den Faktor 200 zeigte, gegenüber SOE um den Faktor 20. *In silico*-Untersuchungen konnten dieses Ergebnis nachbilden (siehe [18] und Abbildung 6.2). Es wird vermutet, dass die Schleife im Bereich um die Positionen 236 bis 244 einen wesentlichen Einfluss auf die Positionierung der Aminosäure 230 hat, da die Mutante P230W alleine geringere katalytische Effizienzen bezüglich Isatin und 9,10-Phenanthrenchinon aufweist. Die Mutante SOE-P230W diente auf Grund dieser Beobachtungen als Grundlage für die Konstruktion weiterer Mutanten, da eine zuverlässige Charakterisierung der katalytischen Eigenschaften von sowohl Isatin als auch 9,10-Phenanthrenchinon möglich wurde. Menadien und andere Modellsubstrate wurden nach wie vor nur sehr langsam umgesetzt (Kapitel 5.3).

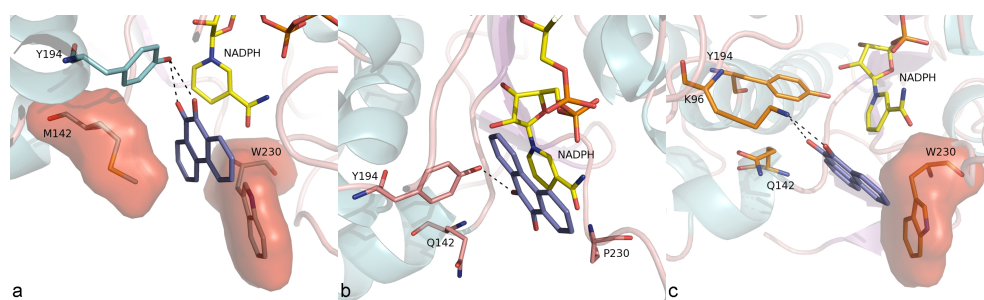


Abbildung 6.2 – Modelling der Mutante SOE-P230W aus [18]. Die Abbildung zeigt, wie unterschiedlich 9,10-Phenanthrenchinon in der Substratbindetasche von CBR1 und SOE-P230W (a und c) auf der einen Seite und der CBR3 (b) auf der anderen Seite bindet.

6.4.4 Mutante SOE-P230W-142MS

Die Aminosäuren 142 und 143 wurden wegen der unmittelbaren Nähe zum katalytischen Zentrum, etwa dem Serin 140 der katalytischen Tetrade, ausgewählt, wie auch Abbildung 6.2 verdeutlicht. Das Methionin an Position 142 ist deutlich hydrophober als das entsprechende Glutamin der CBR3. Über die genauen Einflüsse auf Substratbindung kann nur spekuliert werden. Die Bedeutung für die Umsetzung von Isatin und 9,10-Phenanthrenchinon wird aus den Unterschieden zur Mutante SOE-P230W mit 3-fach bzw. 4-fach höheren Werten für k_{cat}/K_m deutlich. Sogar die Werte für CBR1 wurden im Falle von 9,10-Phenanthrenchinon deutlich überschritten. Für Isatin sind sie nahezu identisch, wenngleich der K_m -Wert der CBR1 mit 7,3 μM nur ein Viertel davon beträgt. Die Reduktion von Menadion war messbar, jedoch so gering, dass eine genaue Quantifizierung nicht erforderlich war.

6.4.5 Mutanten SOE-P230W-97VA und SOE-P230W-191SSA

Die Mutante SOE-P230W-97VA wurde wegen der auffälligen Unterschiede zwischen CBR1 und CBR3 an den Positionen 97 und 98 erstellt (Abbildung 5.4, Seite 62). Der Austausch von Serin und Asparaginsäure durch Valin und Alanin bedingt theoretisch einen deutlichen Anstieg der Hydrophobizität der Umgebung dieser Aminosäuren. Diese Vermutung wird durch den drastisch gesenkten K_m -Wert für 9,10-Phenanthrenchinon gestützt, welcher von 56 μM (SOE-P230W) auf 9,6 μM reduziert wurde, und einer Verbesserung der katalytischen Effizienz um das 4-fache von $5,7 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$ auf $24 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$. In Bezug auf Isatin haben sich durch die Mutagenese keine Unterschiede ergeben.

Die Unterschiede, die sich aus der Mutation der Aminosäure 191, Asparagin zu Serin, und der Aminosäure 193, Prolin zu Alanin, ergeben, sind nicht so auffällig wie die Unterschiede an den Positionen 97 und 98. Sie wurden aber wegen der unmittelbaren Nähe zum Tyrosin der katalytischen Tetrade ausgewählt. Eine Betrachtung der Aminosäuren (siehe Abbildung 6.3) jedoch zeigt, dass die Hydrophobizität des Bereichs durch den Austausch erheblich gesteigert wird (Asparagin mit -3,5 zu Serin mit -0,8; Prolin mit -1,6 zu Alanin mit 1,8). Auch in diesem Fall lässt sich der Effekt auf 9,10-Phenanthrenchinon wie bei der Mutante SOE-P230W-97VA an dem K_m -Wert von 20 μM und der katalytischen Effizienz von $14 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$ ablesen, wenn auch nicht so eindeutig. Für diese Mutante wurde ebenfalls kein Einfluss auf die Umsetzung von Isatin festgestellt. Menadion und andere getestete Modellsubstrate der CBR1 wurden von beide Mutanten kaum umgesetzt (Kapitel 5.3).

6.4.6 Mutante SOE-P230W-H270S

Mit zunehmender Distanz zum katalytischen Zentrum ist mit einem immer geringeren Einfluss auf die katalytische Effizienz zu rechnen. Für die Aminosäure 270 ist im Vergleich zu den Aminosäuren 142 und 143 (Mutante SOE-P230W-142MS) ein

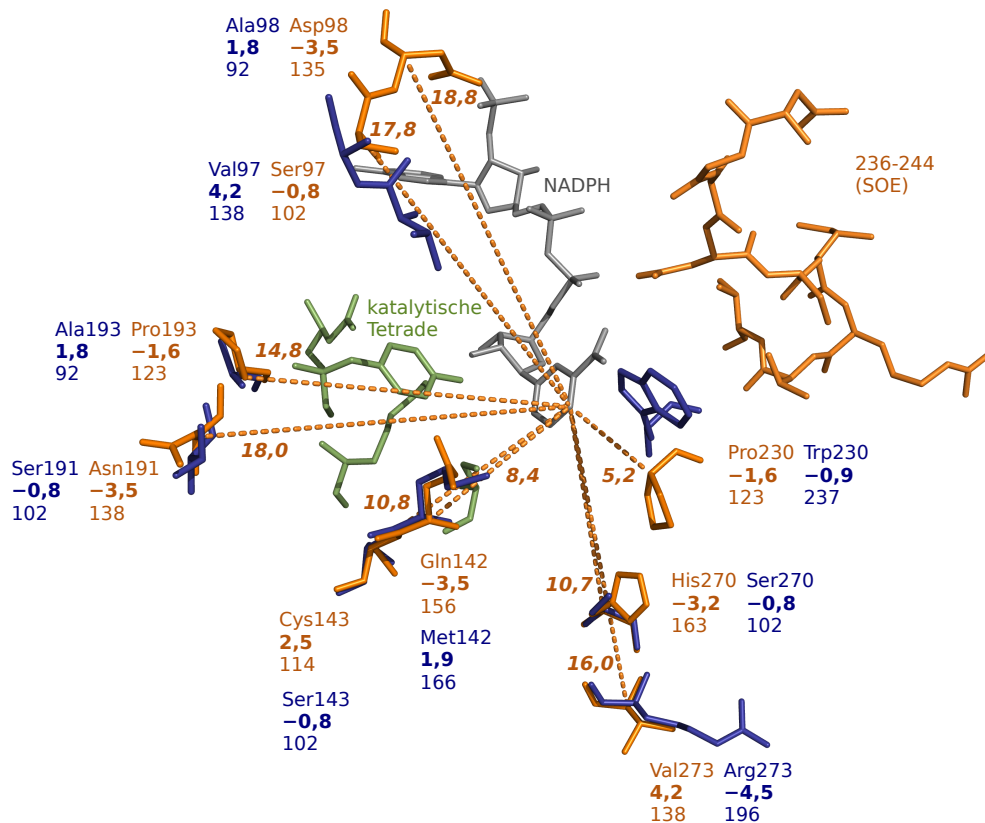


Abbildung 6.3 – Pymol-Strukturalignierung^a der Kristallstrukturen von CBR1 (wwPDB-Code 1WMA) und CBR3 (wwPDB-Code 2HRB). Strukturen und angegebene Daten der CBR1 sind blau, der CBR3 gelb dargestellt. Die in Fettschrift dargestellten Werten sind ein Maß für die Hydrophobizität [40], die in Normalschrift dargestellten Zahlen ein Maß für das van-der-Waals-Volumen [65]. An den gestrichelten Linien sind die Abstände in Ångström (kursiv, fett, gelb) des C4-Atoms des Kofaktors (grau) zu den α -C-Atomen der Aminosäuren angegeben (bezogen auf die Kristallstruktur von CBR3, ermittelt mit Pymol). Die Aminosäuren der katalytische Tetrade (Asparagin, Serin, Tyrosin und Lysin) sind grün dargestellt.

^aURL: <http://pymol.sourceforge.net/>

ähnlicher Einfluss auf Isatin sowie auf 9,10-Phenanthrenchinon festzustellen gewesen. Das Histidin ist im Vergleich zum Serin deutlich voluminöser und bei pH 7,4 positiv geladen (siehe Abbildung 6.3). Der stärkere Einfluss auf 9,10-Phenanthrenchinon als auf Isatin könnte darin begründet sein, dass 9,10-Phenanthrenchinon voluminöser und deutlich hydrophober als Isatin ist, was sich auch in der Löslichkeitsgrenze für die Kinetikmessungen widerspiegelt.

6.4.7 *Mutante SuMu*

Durch die kinetischen Parameter der Mutanten SOE-P230W-H270S und SOE-P230W-142MS konnte gezeigt werden, dass beide Positionen (142/143 und 270) einen wesentlichen Anteil an der Substratbindung und/oder der Katalyse haben. Da die Umsätze beider Mutanten bezüglich Menadion aber nicht denen der CBR1 entsprachen, wurde eine Kombination beider Mutanten erstellt (SuMu), dessen Aktivität allerdings auch keine Quantifizierung erforderlich machten.

Auffällig war aber die vervierfachung der katalytischen Effizienz dieser Mutante mit 9,10-Phenanthrenchinon gegenüber SOE-P230W-H270S und SOE-P230W-142MS. Der Einfluss auf die Reduktion von Isatin ist dagegen eher gering.

Die im Vorfeld beschriebenen Eigenschaften der substituierten Aminosäuren lassen bezüglich 9,10-Phenanthrenchinon wieder eine vergleichsweise einfache Erklärung zu, nämlich die Hydrophobizität der Seitenketten und des 9,10-Phenanthrenchinons.

6.4.8 *Mutante SuMu-V273R*

Als letzter Schritt wurde die Aminosäure 273 der CBR3 substituiert. Dies geschah auf Grund der Tatsache, dass zwar Umsätze mit Menadion gemessen werden konnten, aber keine, die denen der CBR1 nahe kommen. V273 ist neben dem P230 die einzige Aminosäure, deren kodierendes Triplett sich in allen drei Basen unterscheidet. Für diese Mutante konnte interessanterweise eine nochmalige Verbesserung der katalytischen Effizienz für Isatin gefunden werden, während die katalytische Effizienz für 9,10-Phenanthrenchinon wieder abnahm. Diese Beobachtung lässt endgültig den Rückschluss zu, dass an den unterschiedlichen enzymatischen Eigenschaften der CBR1 und CBR3 eine Vielzahl von Aminosäuren beteiligt sind. Durch Austausch der hydrophoben und kleinen Aminosäure Valin zur stark hydrophilen und im Volumen größeren Aminosäure Arginin prägt sich der hydrophile Charakter der Substratbindetasche aus und hindert die Bindung des hydrophoben 9,10-Phenanthrenchinon, während das vergleichsweise gut wasserlösliche Isatin hierdurch noch besser umgesetzt wird.

6.4.9 *Fazit der Mutagenesestudie*

Über die Gründe, weshalb die Mutante SuMu-V273R Menadion in geringerem Maße als CBR1 umsetzt, kann nach wie vor nur spekuliert werden. Offenbar sind mehrere

Aminosäuren an der unterschiedlichen Ausprägung der katalytischen Eigenschaften von CBR1 und CBR3 beteiligt, wie auch für Isatin und 9,10-Phenanthrenchinon festgestellt werden konnte.

Die in vielen Punkten den Erwartungen entsprechenden Ergebnisse erlauben, CBR1 und CBR3 als Modell für die Studie der Substratbindetaschen von SDR zu verwenden. Für mehrere Positionen konnte durch die resultierenden Änderungen der katalytischen Eigenschaften nachgewiesen werden, dass sie das „Wesen“ der Substratbindetasche bedingen. Die Vorstellung, dass nur eine oder zwei Aminosäuren in der Substratbindetasche für die Unterschiede zwischen CBR1 und CBR3 verantwortlich sind, trifft nicht zu. Möglicherweise aber basiert die Fähigkeit der CBR1 zur Reduktion von Stoffen, die in para-Stellung (für *p*-Chinone) bzw. in trans-Konfiguration (für 1,2-Dicarbonylverbindungen) positionierte Carbonylverbindungen enthalten, auf nur wenigen Aminosäuren.

6.5 KLONIERUNG UND ÜBEREXPRESSION DER CBR4

Die Klonierung der CBR4 ist in insgesamt drei Vektoren gelungen, die Ergebnisse der Überexpressionsstudien zeigten jedoch, dass die CBR4 nur schwer löslich ist. In einer zum Ende dieser Arbeit erschienen Veröffentlichung konnte die CBR4 als Bestandteil eines Heterotetramers zusammen mit der 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 8 identifiziert werden [13]. Dieses Heterotetramer übernimmt die Rolle der β -Keto-Acyl-Reduktase des mitochondrialen Fettsäuresynthetase-Komplexes.

Eine weitere aktuelle Veröffentlichung beschreibt die CBR4 als Reduktase für Ortho- und Parachinone wie 9,10-Phenanthrenchinon, 1,4-Naphthochinon, 1,2-Naphthochinon, 1,2-Benzochinon und Derivate, während für Aldehyde und einfache Ketone keine Umsetzung gemessen werden konnte [19]. Die angegebenen katalytischen Konstanten sind jedoch, so wie beschrieben, nur schwer messbar und daher kritisch zu bewerten.

Da die physiologische Funktion der CBR4 aufgeklärt werden konnte [13], bleibt zu untersuchen, ob auch xenobiotische Substrate existieren und eine Bedeutung haben. Zudem scheint das Problem der geringen Löslichkeit geklärt zu sein [13], was die Kristallisation des Heterotetramers ermöglichen könnte. Die Frage bleibt, ob CBR4 als Homotetramer sowie als Heterotetramer mit der 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 8 oligomerisieren kann, da das Enzym auch als Tetramer beschrieben wird [19].

6.6 RESÜMEE UND AUSBLICK

Bislang konnte kein Substrat für die CBR3 identifiziert werden, welches sich durch besondere katalytische Effizienz im Gegensatz zur CBR1 auszeichnet. Auch existieren bisher keine Substrate außer NADPH, Oracin und GSNO, für die der Sättigungsbereich entsprechend einer Michaelis-Menten-Kinetik erreicht werden konnte.

Orthologe Vertreter der humanen Carbonylreduktasen CBR1 und CBR3 sind in einer Reihe von Säugetieren zu finden. Beschrieben sind drei Isoformen des chinesischen Hamsters mit über 70% Identität zur humanen CBR1 [52, 79–81]. Außerdem sind die Carbonylreduktasen CBR1 und CBR3 aus Ratte und Maus durch ihre hohe Ähnlichkeit zu ihren Orthologen im Menschen möglicherweise eine weitere wertvolle Quelle für die Aufklärung der Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion monomerer und vielleicht auch oligomerer SDR. Als Alternative zur Durchführung von Mutagenesestudien an der CBR3 könnte jetzt versucht werden, die Reduktaseaktivität der CBR1 bezüglich Menadion und anderen Carbonylverbindungen zu eliminieren. Durch die hier vorgenommenen Mutationen wurde eine Vielzahl von Aminosäuren als nicht relevant eingestuft, die Zahl der noch zu untersuchenden Aminosäuren konnte so stark eingegrenzt werden.

Für die durch diese Arbeit als relevant eingestuften Aminosäurepositionen gilt, dass sie bei der CBR3 überwiegend hydrophiler sind, wie aus Abbildung 6.3 ersichtlich wird. Daher sind Verbindungen für die Suche nach Substraten in Betracht zu ziehen, welche sich durch hydrophile Komponenten auszeichnen: Zucker oder andere Polyole, auch Substanzen, die über Peptidbindungen verfügen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] ALPHEY, M. S., W. YU, E. BYRES, D. LI and W. N. HUNTER: *Structure and reactivity of human mitochondrial 2,4-dienoyl-CoA reductase: enzyme-ligand interactions in a distinctive short-chain reductase active site*. J Biol Chem, 280(4):3068–3077, Jan 2005.
- [2] ATALLA, A., U. BREYER-PFAFF and E. MASER: *Purification and characterization of oxidoreductases-catalyzing carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human liver cytosol*. Xenobiotica, 30(8):755–769, Aug 2000.
- [3] BAR-PELED, M., C. L. GRIFFITH and T. L. DOERING: *Functional cloning and characterization of a UDP- glucuronic acid decarboxylase: the pathogenic fungus Cryptococcus neoformans elucidates UDP-xylose synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 98(21):12003–12008, Oct 2001.
- [4] BARSKI, O. A., S. M. TIPPARAJU and A. BHATNAGAR: *The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification*. Drug Metab Rev, 40(4):553–624, 2008.
- [5] BATEMAN, R. L., D. RAUH, B. TAVSHANJIAN and K. M. SHOKAT: *Human carbonyl reductase 1 is an S-nitrosoglutathione reductase*. J Biol Chem, 283(51):35756–35762, Dec 2008.
- [6] BEITZ, E.: *TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon*. Bioinformatics, 16(2):135–139, Feb 2000.
- [7] BERMAN, H., K. HENRICK and H. NAKAMURA: *Announcing the worldwide Protein Data Bank*. Nat Struct Biol, 10(12):980, Dec 2003.
- [8] BESSETTE, P. H., F. ASLUND, J. BECKWITH and G. GEORGIU: *Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm*. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(24):13703–13708, Nov 1999.
- [9] BIRNBOIM, H. C. and J. DOLY: *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 7(6):1513–1523, Nov 1979.
- [10] BOHREN, K. M., B. WERMUTH, D. HARRISON, D. RINGE, G. A. PETSKO and K. H. GABBAY: *Expression, crystallization and preliminary crystallographic analysis of human carbonyl reductase*. J Mol Biol, 244(5):659–664, Dec 1994.
- [11] BRAY, J. E., B. D. MARSDEN and U. OPPERMAN: *The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: a bioinformatics summary*. Chem Biol Interact, 178(1-3):99–109, Mar 2009.

- [12] BREYER-PFAFF, U., H.-J. MARTIN, M. ERNST and E. MASER: *Enantioselectivity of carbonyl reduction of 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone by tissue fractions from human and rat and by enzymes isolated from human liver*. Drug Metab Dispos, 32(9):915–922, Sep 2004.
- [13] CHEN, Z., A. J. KASTANIOTIS, I. J. MIINALAINEN, V. RAJARAM, R. K. WIERENGA and J. K. HILTUNEN: *17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 8 and carbonyl reductase type 4 assemble as a ketoacyl reductase of human mitochondrial FAS*. FASEB J, Jul 2009.
- [14] CONSORTIUM, U.: *The Universal Protein Resource (UniProt) 2009*. Nucleic Acids Res, 37(Database issue):D169–D174, Jan 2009.
- [15] DAVIS, G. D., C. ELISEE, D. M. NEWHAM and R. G. HARRISON: *New fusion protein systems designed to give soluble expression in Escherichia coli*. Biotechnol Bioeng, 65(4):382–388, Nov 1999.
- [16] DOORN, J. A., E. MASER, A. BLUM, D. J. CLAFFEY and D. R. PETERSEN: *Human carbonyl reductase catalyzes reduction of 4-oxonon-2-enal*. Biochemistry, 43(41):13106–13114, Oct 2004.
- [17] DUAX, W. L., D. GHOSH and V. PLETNEV: *Steroid dehydrogenase structures, mechanism of action, and disease*. Vitam Horm, 58:121–148, 2000.
- [18] EL-HAWARI, Y., A. D. FAVIA, E. S. PILKA, M. KISIELA, U. OPPERMANN, H.-J. MARTIN and E. MASER: *Analysis of the substrate-binding site of human carbonyl reductases CBR1 and CBR3 by site-directed mutagenesis*. Chem Biol Interact, 178(1-3):234–241, Mar 2009.
- [19] ENDO, S., T. MATSUNAGA, Y. KITADE, S. OHNO, K. TAJIMA, O. EL-KABBANI and A. HARA: *Human carbonyl reductase 4 is a mitochondrial NADPH-dependent quinone reductase*. Biochem Biophys Res Commun, 377(4):1326–1330, Dec 2008.
- [20] FELSTED, R. L. and N. R. BACHUR: *Mammalian carbonyl reductases*. Drug Metab Rev, 11(1):1–60, 1980.
- [21] FILLING, C., K. D. BERNDT, J. BENACH, S. KNAPP, T. PROZOROVSKI, E. NORDLING, R. LADENSTEIN, H. JÖRNVALL and U. OPPERMANN: *Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases*. J Biol Chem, 277(28):25677–25684, Jul 2002.
- [22] GERSTEIN, M.: *A structural census of genomes: comparing bacterial, eukaryotic, and archaeal genomes in terms of protein structure*. J Mol Biol, 274(4):562–576, Dec 1997.
- [23] GHOSH, D., M. ERMAN, W. PANGBORN, W. L. DUAX, S. NAKAJIN, S. OHNO and M. SHINODA: *Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a mammalian steroid dehydrogenase*. J Steroid Biochem Mol Biol, 46(1):103–104, Jul 1993.
- [24] GHOSH, D., M. SAWICKI, V. PLETNEV, M. ERMAN, S. OHNO, S. NAKAJIN and W. L. DUAX: *Porcine carbonyl reductase. structural basis for a*

- functional monomer in short chain dehydrogenases/reductases.* J Biol Chem, 276(21):18457–18463, May 2001.
- [25] GHOSH, D., Z. WAWRZAK, C. M. WEEKS, W. L. DUAX and M. ERMAN: *The refined three-dimensional structure of 3 alpha,20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and possible roles of the residues conserved in short-chain dehydrogenases.* Structure, 2(7):629–640, Jul 1994.
- [26] GLOVER, V., J. M. HALKET, P. J. WATKINS, A. CLOW, B. L. GOODWIN and M. SANDLER: *Isatin: identity with the purified endogenous monoamine oxidase inhibitor tribulin.* J Neurochem, 51(2):656–659, Aug 1988.
- [27] GLOVER, V., A. MEDVEDEV and M. SANDLER: *Isatin is a potent endogenous antagonist of guanylate cyclase-coupled atrial natriuretic peptide receptors.* Life Sci, 57(22):2073–2079, 1995.
- [28] GRIMM, C., E. MASER, E. MÖBUS, G. KLEBE, K. REUTER and R. FICNER: *The crystal structure of 3alpha -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from Comamonas testosteroni shows a novel oligomerization pattern within the short chain dehydrogenase/reductase family.* J Biol Chem, 275(52):41333–41339, Dec 2000.
- [29] HART, T. W.: *Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivatives of L-cysteine and glutathione.* Tetrahedron Letters, 26(16):2013 – 2016, 1985.
- [30] HECHT, S. S.: *Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines.* Chem Res Toxicol, 11(6):559–603, Jun 1998.
- [31] HOFFMANN, F. and E. MASER: *Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily.* Drug Metab Rev, 39(1):87–144, 2007.
- [32] HOFFMANN, F., C. SOTRIFFER, A. EVERS, G. XIONG and E. MASER: *Understanding oligomerization in 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from Comamonas testosteroni: an in silico approach and evidence for an active protein.* J Biotechnol, 129(1):131–139, Mar 2007.
- [33] JAKOBER, C. A., S. G. RIDDLE, M. A. ROBERT, H. DESTAILLATS, M. J. CHARLES, P. G. GREEN and M. J. KLEEMAN: *Quinone emissions from gasoline and diesel motor vehicles.* Environ Sci Technol, 41(13):4548–4554, Jul 2007.
- [34] JENSEN, D. E., G. K. BELKA and G. C. D. BOIS: *S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme.* Biochem J, 331 (Pt 2):659–668, Apr 1998.
- [35] JIN, Y. and T. M. PENNING: *Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 47:263–292, 2007.
- [36] JÖRNVALL, H., B. PERSSON, M. KROOK, S. ATRIAN, R. GONZÁLEZ-DUARTE, J. JEFFERY and D. GHOSH: *Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR).* Biochemistry, 34(18):6003–6013, May 1995.

- [37] JÖRNVALL, H., M. PERSSON and J. JEFFERY: *Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type*. Proc Natl Acad Sci U S A, 78(7):4226–4230, Jul 1981.
- [38] KASSNER, N., K. HUSE, H.-J. MARTIN, U. GÖDTEL-ARMBRUST, A. METZGER, I. MEINEKE, J. BROCKMÖLLER, K. KLEIN, U. M. ZANGER, E. MASER and L. WOJNOWSKI: *Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver*. Drug Metab Dispos, 36(10):2113–2120, Oct 2008.
- [39] KAVANAGH, K. L., H. JÖRNVALL, B. PERSSON and U. OPPERMANN: *Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes*. Cell Mol Life Sci, 65(24):3895–3906, Dec 2008.
- [40] KYTE, J. and R. F. DOOLITTLE: *A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein*. J Mol Biol, 157(1):105–132, May 1982.
- [41] LAEMMLI, U. K.: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227(5259):680–685, Aug 1970.
- [42] LAKHMAN, S. S., D. GHOSH and J. G. BLANCO: *Functional significance of a natural allelic variant of human carbonyl reductase 3 (CBR3)*. Drug Metab Dispos, 33(2):254–257, Feb 2005.
- [43] LIU, S., L. MA, W. HUANG, Y. SHAI, X. JI, L. DING, Y. LIU, L. YU and S. ZHAO: *Decreased expression of the human carbonyl reductase 2 gene HCR2 in hepatocellular carcinoma*. Cell Mol Biol Lett, 11(2):230–241, 2006.
- [44] MARTIN, H.-J., U. BREYER-PFAFF, V. WSOL, S. VENZ, S. BLOCK and E. MASER: *Purification and characterization of akr1b10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics*. Drug Metab Dispos, 34(3):464–470, Mar 2006.
- [45] MASER, E.: *Stress, hormonal changes, alcohol, food constituents and drugs: factors that advance the incidence of tobacco smoke-related cancer?* Trends Pharmacol Sci, 18(8):270–275, Aug 1997.
- [46] MASER, E.: *11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in mouse lung microsomes*. Cancer Res, 58(14):2996–3003, Jul 1998.
- [47] MASER, E.: *Neuroprotective role for carbonyl reductase?* Biochem Biophys Res Commun, 340(4):1019–1022, Feb 2006.
- [48] MASER, E., V. WSOL and H.-J. MARTIN: *11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: purification from human liver and characterization as carbonyl reductase of xenobiotics*. Mol Cell Endocrinol, 248(1-2):34–37, Mar 2006.
- [49] MASON, J. I., D. NAVILLE, B. W. EVANS and J. L. THOMAS: *Functional activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase*. Endocr Res, 24(3-4):549–557, 1998.

- [50] MEDVEDEV, A. E. and V. GLOVER: *Tribulin and endogenous MAO-inhibitory regulation in vivo*. Neurotoxicology, 25(1-2):185–192, Jan 2004.
- [51] MEYER, U. A.: *Overview of enzymes of drug metabolism*. J Pharmacokinet Biopharm, 24(5):449–459, Oct 1996.
- [52] MIURA, T., T. NISHINAKA, M. TAKAMA, M. MURAKAMI and T. TERADA: *Chinese hamster monomeric carbonyl reductases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily*. Chem Biol Interact, 178(1-3):110–116, Mar 2009.
- [53] MIURA, T., T. NISHINAKA and T. TERADA: *Different functions between human monomeric carbonyl reductase 3 and carbonyl reductase 1*. Mol Cell Biochem, 315(1-2):113–121, Aug 2008.
- [54] MÜLHARDT, C.: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Elsevier, 2006.
- [55] NAKANISHI, M., Y. DEYASHIKI, K. OHSHIMA and A. HARA: *Cloning, expression and tissue distribution of mouse tetrameric carbonyl reductase. Identity with an adipocyte 27-kDa protein*. Eur J Biochem, 228(2):381–387, Mar 1995.
- [56] NELSON, D. R., D. C. ZELDIN, S. M. G. HOFFMAN, L. J. MALTAIS, H. M. WAIN and D. W. NEBERT: *Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants*. Pharmacogenetics, 14(1):1–18, Jan 2004.
- [57] NOVOTNA, R., V. WSOL, G. XIONG and E. MASER: *Inactivation of the anti-cancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3*. Toxicol Lett, 181(1):1–6, Sep 2008.
- [58] OHARA, H., Y. MIYABE, Y. DEYASHIKI, K. MATSUURA and A. HARA: *Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver*. Biochem Pharmacol, 50(2):221–227, Jul 1995.
- [59] OMARI, K. E., L. E. BIRD, C. E. NICHOLS, J. REN and D. K. STAMMERS: *Crystal structure of CC3 (TIP30): implications for its role as a tumor suppressor*. J Biol Chem, 280(18):18229–18236, May 2005.
- [60] OPPERMANN, U.: *Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 47:293–322, 2007.
- [61] PENNING, T. M. and J. E. DRURY: *Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms*. Arch Biochem Biophys, 464(2):241–250, Aug 2007.
- [62] PERSSON, B., Y. KALLBERG, J. E. BRAY, E. BRUFORD, S. L. DELLAPORTA, A. D. FAVIA, R. G. DUARTE, H. JÖRNVALL, K. L. KAVANAGH, N. KEDISHVILI, M. KISIELA, E. MASER, R. MINDNICH, S. ORCHARD, T. M. PENNING, J. M.

- THORNTON, J. ADAMSKI and U. OPPERMAN: *The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative*. Chem Biol Interact, 178(1-3):94–98, Mar 2009.
- [63] PERSSON, B., Y. KALLBERG, U. OPPERMAN and H. JÖRNVALL: *Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs)*. Chem Biol Interact, 143-144:271–278, Feb 2003.
- [64] PILKA, E. S., F. H. NIESEN, W. H. LEE, Y. EL-HAWARI, J. E. DUNFORD, G. KOCHAN, V. WSOL, H.-J. MARTIN, E. MASER and U. OPPERMAN: *Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases*. PLoS One, 4(10):e7113, 2009.
- [65] PONTIUS, J., J. RICHELLE and S. J. WODAK: *Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures*. J Mol Biol, 264(1):121–136, Nov 1996.
- [66] PURANEN, T., M. POUTANEN, D. GHOSH, P. VIHKO and R. VIHKO: *Characterization of structural and functional properties of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 using recombinant enzymes and site-directed mutagenesis*. Mol Endocrinol, 11(1):77–86, Jan 1997.
- [67] QIAGEN®: *QIAGEN® Plasmid Purification Handbook*, Jul 1999.
- [68] QIAGEN®: *HotStar HiFidelity PCR Handbook*, Feb 2008.
- [69] RAO, S. T. and M. G. ROSSMANN: *Comparison of super-secondary structures in proteins*. J Mol Biol, 76(2):241–256, May 1973.
- [70] RIS, M. M. and J. P. VON WARTBURG: *Heterogeneity of NADPH-dependent aldehyde reductase from human and rat brain*. Eur J Biochem, 37(1):69–77, Aug 1973.
- [71] SAIKI, R. K., S. SCHARF, F. FALOONA, K. B. MULLIS, G. T. HORN, H. A. ERLICH and N. ARNHEIM: *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 230(4732):1350–1354, Dec 1985.
- [72] SANDLER, M.: *The emergence of tribulin*. Trends in Pharmacological Sciences, 3:471–472, 1982.
- [73] SAYRE, L. M., M. A. SMITH and G. PERRY: *Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease*. Curr Med Chem, 8(7):721–738, Jun 2001.
- [74] SCHIEBER, A., R. W. FRANK and S. GHISLA: *Purification and properties of prostaglandin 9-ketoreductase from pig and human kidney. Identity with human carbonyl reductase*. Eur J Biochem, 206(2):491–502, Jun 1992.
- [75] SQUADRITO, G. L., R. CUETO, B. DELLINGER and W. A. PRYOR: *Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter*. Free Radic Biol Med, 31(9):1132–1138, Nov 2001.

- [76] STRAUSBERG, R. L., E. A. FEINGOLD, L. H. GROUSE, J. G. DERGE, R. D. KLAUSNER, F. S. COLLINS, L. WAGNER, C. M. SHENMEN, G. D. SCHULER, S. F. ALTSCHUL, B. ZEEBERG, K. H. BUETOW, C. F. SCHAEFER, N. K. BHAT, R. F. HOPKINS, H. JORDAN, T. MOORE, S. I. MAX, J. WANG, F. HSIEH, L. DIATCHENKO, K. MARUSINA, A. A. FARMER, G. M. RUBIN, L. HONG, M. STAPLETON, M. B. SOARES, M. F. BONALDO, T. L. CASAVANT, T. E. SCHEETZ, M. J. BROWNSTEIN, T. B. USDIN, S. TOSHIYUKI, P. CARNINCI, C. PRANGE, S. S. RAHA, N. A. LOQUELLANO, G. J. PETERS, R. D. ABRAMSON, S. J. MULLAHY, S. A. BOSAK, P. J. MCEWAN, K. J. MCKERNAN, J. A. MALEK, P. H. GUNARATNE, S. RICHARDS, K. C. WORLEY, S. HALE, A. M. GARCIA, L. J. GAY, S. W. HULYK, D. K. VILLALON, D. M. MUZNY, E. J. SODERGREN, X. LU, R. A. GIBBS, J. FAHEY, E. HELTON, M. KETTEMAN, A. MADAN, S. RODRIGUES, A. SANCHEZ, M. WHITING, A. MADAN, A. C. YOUNG, Y. SHEVCHENKO, G. G. BOUFFARD, R. W. BLAKESLEY, J. W. TOUCHMAN, E. D. GREEN, M. C. DICKSON, A. C. RODRIGUEZ, J. GRIMWOOD, J. SCHMUTZ, R. M. MYERS, Y. S. N. BUTTERFIELD, M. I. KRZYWINSKI, U. SKALSKA, D. E. SMAILUS, A. SCHNERCH, J. E. SCHEIN, S. J. M. JONES, M. A. MARRA and M. G. C. P. TEAM: *Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(26):16899–16903, Dec 2002.
- [77] TANAKA, M., R. BATEMAN, D. RAUH, E. VAISBERG, S. RAMACHANDANI, C. ZHANG, K. C. HANSEN, A. L. BURLINGAME, J. K. TRAUTMAN, K. M. SHOKAT and C. L. ADAMS: *An unbiased cell morphology-based screen for new, biologically active small molecules*. PLoS Biol, 3(5):e128, May 2005.
- [78] TANAKA, N., T. NONAKA, M. NAKANISHI, Y. DEYASHIKI, A. HARA and Y. MITSUI: *Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 Å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family*. Structure, 4(1):33–45, Jan 1996.
- [79] TERADA, T., Y. SUGIHARA, K. NAKAMURA, H. MIZOBUCHI and M. MAEDA: *Further characterization of Chinese hamster carbonyl reductases (CHCRs)*. Chem Biol Interact, 143-144:373–381, Feb 2003.
- [80] TERADA, T., Y. SUGIHARA, K. NAKAMURA, R. SATO, N. INAZU and M. MAEDA: *Cloning and bacterial expression of monomeric short-chain dehydrogenase/reductase (carbonyl reductase) from CHO-K1 cells*. Eur J Biochem, 267(23):6849–6857, Dec 2000.
- [81] TERADA, T., Y. SUGIHARA, K. NAKAMURA, R. SATO, S. SAKUMA, Y. FUJIMOTO, T. FUJITA, N. INAZU and M. MAEDA: *Characterization of multiple Chinese hamster carbonyl reductases*. Chem Biol Interact, 130-132(1-3):847–861, Jan 2001.
- [82] TESTA, B. and S. D. KRÄMER: *The biochemistry of drug metabolism—an introduction: Part 2. Redox reactions and their enzymes*. Chem Biodivers, 4(3):257–405, Mar 2007.

- [83] TESTA, B. and S. D. KRÄMER: *The biochemistry of drug metabolism—an introduction: part 3. Reactions of hydrolysis and their enzymes.* Chem Biodivers, 4(9):2031–2122, Sep 2007.
- [84] TESTA, B. and S. D. KRÄMER: *The biochemistry of drug metabolism—an introduction: part 4. reactions of conjugation and their enzymes.* Chem Biodivers, 5(11):2171–2336, Nov 2008.
- [85] THODEN, J. B., T. M. WOHLERS, J. L. FRIDOVICH-KEIL and H. M. HOLDEN: *Crystallographic evidence for Tyr 157 functioning as the active site base in human UDP-galactose 4-epimerase.* Biochemistry, 39(19):5691–5701, May 2000.
- [86] THOMPSON, J. D., T. J. GIBSON and D. G. HIGGINS: *Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX.* Curr Protoc Bioinformatics, Chapter 2:Unit 2.3, Aug 2002.
- [87] THOMPSON, J. D., T. J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN and D. G. HIGGINS: *The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.* Nucleic Acids Res, 25(24):4876–4882, Dec 1997.
- [88] TINGUELY, J. N. and B. WERMUTH: *Identification of the reactive cysteine residue (Cys227) in human carbonyl reductase.* Eur J Biochem, 260(1):9–14, Feb 1999.
- [89] TONETTI, M., L. STURLA, A. BISSO, U. BENATTI and A. D. FLORA: *Synthesis of GDP-L-fucose by the human FX protein.* J Biol Chem, 271(44):27274–27279, Nov 1996.
- [90] USAMI, N., K. KITAHARA, S. ISHIKURA, M. NAGANO, S. SAKAI and A. HARA: *Characterization of a major form of human isatin reductase and the reduced metabolite.* Eur J Biochem, 268(22):5755–5763, Nov 2001.
- [91] VALLEJO, A. N., R. J. POGULIS and L. R. PEASE: *In vitro synthesis of novel genes: mutagenesis and recombination by PCR.* PCR Methods Appl, 4(3):S123–S130, Dec 1994.
- [92] VOGELSTEIN, B. and D. GILLESPIE: *Preparative and analytical purification of DNA from agarose.* Proc Natl Acad Sci U S A, 76(2):615–619, Feb 1979.
- [93] WANG, Y. M. and J. V. EYS: *The enzymatic defect in essential pentosuria.* N Engl J Med, 282(16):892–896, Apr 1970.
- [94] WATANABE, K., C. SUGAWARA, A. ONO, Y. FUKUZUMI, S. ITAKURA, M. YAMAZAKI, H. TASHIRO, K. OSOEGAWA, E. SOEDA and T. NOMURA: *Mapping of a novel human carbonyl reductase, CBR3, and ribosomal pseudogenes to human chromosome 21q22.2.* Genomics, 52(1):95–100, Aug 1998.
- [95] WERMUTH, B.: *Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase.* J Biol Chem, 256(3):1206–1213, Feb 1981.

- [96] WERMUTH, B., K. L. PLATTS, A. SEIDEL and F. OESCH: *Carbonyl reductase provides the enzymatic basis of quinone detoxication in man.* Biochem Pharmacol, 35(8):1277–1282, Apr 1986.
- [97] WIRTH, H. and B. WERMUTH: *Immunohistochemical localization of carbonyl reductase in human tissues.* J Histochem Cytochem, 40(12):1857–1863, Dec 1992.
- [98] WIRTH, H. P. and B. WERMUTH: *Immunochemical characterization of aldo-keto reductases from human tissues.* FEBS Lett, 187(2):280–282, Aug 1985.
- [99] WSOL, V., B. SZOTAKOVA, H.-J. MARTIN and E. MASER: *Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man.* Toxicology, 238(2-3):111–118, Sep 2007.
- [100] WSÓL, V., E. KVASNICKOVÁ, B. SZOTÁKOVÁ and I. M. HAIS: *High-performance liquid chromatographic assay for the separation and characterization of metabolites of the potential cytostatic drug oracine.* J Chromatogr B Biomed Appl, 681(1):169–175, May 1996.



ANHANG

A.1 KONSTRUKTE

Für alle Konstrukte ist die gesamte in Protein übersetzte DNA im FASTA-Format angegeben. Die Bezeichnung setzt sich, durch Unterstriche getrennt, zusammen aus (i) dem Namen des Gens, der in dieser Arbeit verwendet wurde, (ii) dem verwendeten Vektor (Kapitel 2.3) und (iii) der Nummer des verwendeten Klons, für den Fall, dass mehrere Klone sequenziert wurden. In jeder Zeile der DNA-Sequenz stehen 100 Nucleobasen. Da alle Konstrukte von Mutanten der CBR3 in den Vektor pET-15b kloniert worden sind, ist dieser nicht Bestandteil der Bezeichnung (Anhang A.1.2).

A.1.1 Konstrukte der Wildtypen von *cbr1* und *cbr3*

```
>cbr1_pET-15b_Klon-2
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGTCGTCGGGCATCCATGTAGCGCTGGTACTGGAGGCA
ACAAGGGCATCGGCTTGGCCATCGTGCCGCGACCTGTGCCGGCTGTTCTCGGGGGACGTGGTGCTCACGGCGCGGGACGTGACGCGGGGCCAGGCGGCCGT
ACAGCAGCTGCAGGGGAGGGCCCTGAGCCCGCGCTTCCACCAGCTGGACATCGACGATCTGCAGAGCATCCGCGCCCTGCGCGACTTCTGCGCAAGGAG
TACGGGGCCCTGGACGCTGCTGGTCAACAACCGCGGGCATCGCCCTTCAAGTTGCTGATCCCCACCCCTTTCATATTCAAGCTGAAGTGACGATGAAAAACA
ATTTCTTTGGTACCCGAGATGTGTGCACAGAATTAATCCCTCTAATAAAAACCCCAAGGGAGAGTGGTGAACGTAATCTAGCATCATGAGCGTCAGAGCCCT
TAAAAAGCTGCAGCCAGAGCTGCAGCAGAAGTTCCGCAAGTGCAGCCATCACTGAGGAGGAGCTGGTGGGGCTCATGAACAAGTTTGTGGAGGATACAAAAG
AAGGGAGTGCACACAGAAGGAGGCTGGCCACAGCAGCGCATACGGGGTGACGAAGATTGGCGTCACCGTTCTGTCCAGGATCCACGCCAGGAAAATGAGTG
AGCAGAGAAAAGGGGACAAGATCCTCCTGAATGCCTGCTGCCAGGGTGGGTGAGAAGTGCATGGCGGGACCCAAAGGCCACCAAGGCCAGAAAAGG
TGCAGAGACCCCTGTACTTGGCCCTTTTGCCCCAGATGCTGAGGGTCCCATGGACAATTTGTTTCAGAGAAGAGAGTTGAACAGTGGTGA
```

```
>cbr3_pET-15b
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGTCGTCCTGCAGCGCGTGGCGCTGGTACCGGGGCCA
ACAGGGGCATCGGCTTGGCCATCGCGCGCGAACTGTGCCGACAGTTCTCTGGGGATGGTGGTCAACCGCGCGGGACGTGGCGCGGGGCCAGGCGGCCGT
GCAGCAGCTGCAGGGGAGGGCCCTGAGCCCGCGCTTCCACCAACTGGACATCGACGACTTGCAGAGCATCCGCGCCCTGCGCGACTTCTGCGCAAGGAG
TACGGGGCCCTCAATGTACTGGTCAACAACCGCGCGCTGCGCCCTTCAAGAGTGTATCCAATGCCCTTTGACATTAAGCTGAGATGACACTGAAGACAA
ATTTTTTGGCACTAGAAAACATGTGCAACGAGTTACTGCCGATAATGAAACCTCATGGGAGAGTGGTGAATATCAGTATTTGCAAGTGTAAAGGGCTTT
TGAAAACCTGCAGTGAAGATCTGCAGGAAAAGTTCCACAGTGCAGCACTCACAGAAGGAGACCTGGTGGATCTCATGAAAAGTTTGTGGAGGACAAAAA
AATGAGTGCATGAGAGGGAAGGCTGGCCCACTCACCTTATGGGGTGTCCAAGTTGGGGTGCACAGTCTTATCGAGGATCCTGCCAGGCGCTGTGGATG
AGAAGAGAAAAGCTGACAGGATTTGGTGAATGCCTGCTGCCAGGACAGTGAAGACAGACATGGATGGGAAAAGACAGCATCAGGACTGTGGAGGAGGG
GGCTGAGACCCCTGTACTTGGCCCTTCTGCCTCCAGATGCCACTGAGCCACAAGGCCAGTGGTCCATGACAAAAGTTGTGCAAACTGGTAA
```

```
>cbr3_pQE-70
ATGCGAACTAGTCCGCGGTCGTCCTGCAGCGCGTGGCGCTGGTGACCGGGCCAAACAGGGGCATCGGCTTGGCCATCGCGCGCGAACTGTGCCGACAGT
TCTCTGGGGATGTGGTCTCACCGCGCGGACGTGGCGCGGGGCCAGCGGCCGTGCAGCAGCTGCAGGGGAGGGCCCTGAGCCCGCGCTTCCACCAACT
GGACATCGCAGACTTGCAGACATCCGCGCCCTGCGCGACTTCTGCGCAAGGAGTACGGGGGCTCAATGTACTGGTCAACAACCGCGCCCTGCGCCTTC
AAGAGTGTATCCAATGCCCTTTGACATTAAGCTGAGATGACACTGAAGACAAAATTTTTTGGCACTAGAAAACATGTGCAACGAGTTACTGCCGATAA
TGAAAACCTCATGGGAGAGTGGTGAATATCAGTATTTGCAAGTGTAAAGGGCTTTGAAAACCTGCAGTGAAGATCTGCAGGAAAAGTTCCACAGTGCAG
ACTCACAGAAGGAGCCTGGTGTATCTCATGAAAAGTTTGTGGAGGACAAAAAATGAGGTGCATGAGAGGGAAGGCTGGCCCACTCACCTTATGGG
GTGTCCAAGTTGGGGTGCAGTCTTATCGAGGATCCTGCCAGGCGCTGTGGATGAGAAGAGGAAAAGTGCAGGATTTGTGGTGAATGCCTGCTGCCAG
GACCAGTGAAGACAGACATGATGGGAAAAGACAGCATCAGGACTGTGGAGGAGGGGCTGAGACCCCTGTCTACTTGGCCCTTGGCCTCCAGATGCCAC
TGAGCCACAGGCCAGTTGGTCCATGACAAAAGTTGTGCAAACTGGGTACCGGATCCAGATCTCATCACCATCACCATCACTAA
```

A.1.2 Konstrukte von *cbr3*-Mutanten

>soe_Klon-2
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCTGCGCGGGCAGCCATATGTCGTCTGCAGCCGCTGGCGCTGGTACCGGGGCCA
ACAGGGGATCGGCTTGGCCATCGCGCGGAACTGTGCCGACAGTTCTCTGGGGATGTGGTGCTACCCGCGGGACGTGGCGGGGCCAGCGGGCCGT
GCAGCAGCTGCAGCGGAGGGCCTGAGCCCGCGCTTCCACCACTGGACATCGACGACTTGCAGAGCATCCGCGCCTGCGGACTTCTGCGCAAGGAG
TACGGGGGGCTCAATGTACTGGTCAACAACCGGGCCGTCGCTTCAAGAGTGATGATCCAAATGCCCTTTGACATTTAAAGCTGAGATGACACTGAAGACAA
ATTTTTTGGCCACTAGAAACATGTGCAACGAGTTACTGCCGATAATGAAACCTCATGGGAGAGTGGTGAATATCAGTAGTTTTCAGTGTTTAAGGGCCTT
TGAAAACCTGCAGTGAAGATCTGCAGGAAAGGTTCCACAGTGAGACACTCACAGAAGGAGACCTGGTGGATCTCATGAAAAAGTTTGTGGAGGACACAAAA
AATGAGGTGCATGAGAGGGAAGGCTGGCCAACTCACCTTATGGGGTGTCCAAGTGGGGTTCACAGTCTTATCGAGGATCCTGGCCAGCGCTCTGGATG
AGAAAGGAAAAGCTGACAGGATTCTGGTGAATGCGTGTGCCCAGGACAGTGAAGACAGACATGGGGGGACCCAAAGGCCACCAAGAGCCAGAGGAGGG
GGCTGAGACCCCTGTCTACTTGGCCCTTTCGCTCCAGATGCCACTGAGCCACAAGGCCAGTTGGTCCATGACAAAAGTTGTGCAAAACTGGTAA

>chim_Klon-3c
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCTGCGCGGGCAGCCATATGTCGTCTGCAGCCGCTGGCGCTGGTACCGGGGCCA
ACAGGGGATCGGCTTGGCCATCGCGCGGAACTGTGCCGACAGTTCTCTGGGGATGTGGTGCTACCCGCGGGACGTGGCGGGGCCAGCGGGCCGT
GCAGCAGCTGCAGCGGAGGGCCTGAGCCCGCGCTTCCACCACTGGACATCGACGACTTGCAGAGCATCCGCGCCTGCGGACTTCTGCGCAAGGAG
TACGGGGGGCTCAATGTACTGGTCAACAACCGGGCCGTCGCTTCAAGAGTGATGATCCAAATGCCCTTTGACATTTAAAGCTGAGATGACACTGAAGACAA
ATTTTTTGGCCACTAGAAACATGTGCAACGAGTTACTGCCGATAATGAAACCTCATGGGAGAGTGGTGAATATCAGTAGTTTTCAGTGTTTAAGGGCCTT
TGAAAACCTGCAGTGAAGATCTGCAGGAAAGGTTCCACAGTGAGACACTCACAGAAGGAGACCTGGTGGATCTCATGAAAAAGTTTGTGGAGGACACAAAA
AATGAGGTGCATGAGAGGGAAGGCTGGCCAACTCACCTTATGGGGTGTCCAAGTGGGGTTCACAGTCTTATCGAGGATCCTGGCCAGCGCTCTGGATG
AGAAAGGAAAAGCTGACAGGATTCTGGTGAATGCGTGTGCCCAGGACAGTGAAGACAGACATGGGGGGACCCAAAGGCCACCAAGAGCCAGAGGAGGG
GGCTGAGACCCCTGTCTACTTGGCCCTTTCGCTCCAGATGCCACTGAGCCACAAGGCCAGTTGGTCCATGACAAAAGTTGTGCAAAACTGGTAA

>soe-chim_Klon-4a
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCTGCGCGGGCAGCCATATGTCGTCTGCAGCCGCTGGCGCTGGTACCGGGGCCA
ACAGGGGATCGGCTTGGCCATCGCGCGGAACTGTGCCGACAGTTCTCTGGGGATGTGGTGCTACCCGCGGGACGTGGCGGGGCCAGCGGGCCGT
GCAGCAGCTGCAGCGGAGGGCCTGAGCCCGCGCTTCCACCACTGGACATCGACGACTTGCAGAGCATCCGCGCCTGCGGACTTCTGCGCAAGGAG
TACGGGGGGCTCAATGTACTGGTCAACAACCGGGCCGTCGCTTCAAGAGTGATGATCCAAATGCCCTTTGACATTTAAAGCTGAGATGACACTGAAGACAA
ATTTTTTGGCCACTAGAAACATGTGCAACGAGTTACTGCCGATAATGAAACCTCATGGGAGAGTGGTGAATATCAGTAGTTTTCAGTGTTTAAGGGCCTT
TGAAAACCTGCAGTGAAGATCTGCAGGAAAGGTTCCACAGTGAGACACTCACAGAAGGAGACCTGGTGGATCTCATGAAAAAGTTTGTGGAGGACACAAAA
AATGAGGTGCATGAGAGGGAAGGCTGGCCAACTCACCTTATGGGGTGTCCAAGTGGGGTTCACAGTCTTATCGAGGATCCTGGCCAGCGCTCTGGATG
AGAAAGGAAAAGCTGACAGGATTCTGGTGAATGCGTGTGCCCAGGACAGTGAAGACAGACATGGGGGGACCCAAAGGCCACCAAGAGCCAGAGGAGGG
GGCTGAGACCCCTGTCTACTTGGCCCTTTCGCTCCAGATGCCACTGAGGGTCCCATGGACAAATTTGTTTCAGAGAAAGAGTTGAACAGTGGTGA

>cbr3-P230W_Klon-CP4
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCTGCGCGGGCAGCCATATGTCGTCTGCAGCCGCTGGCGCTGGTACCGGGGCCA
ACAGGGGATCGGCTTGGCCATCGCGCGGAACTGTGCCGACAGTTCTCTGGGGATGTGGTGCTACCCGCGGGACGTGGCGGGGCCAGCGGGCCGT
GCAGCAGCTGCAGCGGAGGGCCTGAGCCCGCGCTTCCACCACTGGACATCGACGACTTGCAGAGCATCCGCGCCTGCGGACTTCTGCGCAAGGAG
TACGGGGGGCTCAATGTACTGGTCAACAACCGGGCCGTCGCTTCAAGAGTGATGATCCAAATGCCCTTTGACATTTAAAGCTGAGATGACACTGAAGACAA
ATTTTTTGGCCACTAGAAACATGTGCAACGAGTTACTGCCGATAATGAAACCTCATGGGAGAGTGGTGAATATCAGTAGTTTTCAGTGTTTAAGGGCCTT
TGAAAACCTGCAGTGAAGATCTGCAGGAAAGGTTCCACAGTGAGACACTCACAGAAGGAGACCTGGTGGATCTCATGAAAAAGTTTGTGGAGGACACAAAA
AATGAGGTGCATGAGAGGGAAGGCTGGCCAACTCACCTTATGGGGTGTCCAAGTGGGGTTCACAGTCTTATCGAGGATCCTGGCCAGCGCTCTGGATG
AGAAAGGAAAAGCTGACAGGATTCTGGTGAATGCGTGTGCCCAGGACAGTGAAGACAGACATGGGGGGACCCAAAGGCCACCAAGAGCCAGAGGAGGG
GGCTGAGACCCCTGTCTACTTGGCCCTTTCGCTCCAGATGCCACTGAGCCACAAGGCCAGTTGGTCCATGACAAAAGTTGTGCAAAACTGGTAA

>soe-P230W_Klon-SP6
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCTGCGCGGGCAGCCATATGTCGTCTGCAGCCGCTGGCGCTGGTACCGGGGCCA
ACAGGGGATCGGCTTGGCCATCGCGCGGAACTGTGCCGACAGTTCTCTGGGGATGTGGTGCTACCCGCGGGACGTGGCGGGGCCAGCGGGCCGT
GCAGCAGCTGCAGCGGAGGGCCTGAGCCCGCGCTTCCACCACTGGACATCGACGACTTGCAGAGCATCCGCGCCTGCGGACTTCTGCGCAAGGAG
TACGGGGGGCTCAACGTAAGTGTCAACAACCGGGCCGTCGCTTCAAGAGTGATGATCCAAATGCCCTTTGACATTTAAAGCTGAGATGACACTGAAGACAA
ATTTTTTGGCCACTAGAAACATGTGCAACGAGTTACTGCCGATAATGAAACCTCATGGGAGAGTGGTGAATATCAGTAGTTTTCAGTGTTTAAGGGCCTT
TGAAAACCTGCAGTGAAGATCTGCAGGAAAGGTTCCACAGTGAGACACTCACAGAAGGAGACCTGGTGGATCTCATGAAAAAGTTTGTGGAGGACACAAAA
AATGAGGTGCATGAGAGGGAAGGCTGGCCAACTCACCTTATGGGGTGTCCAAGTGGGGTTCACAGTCTTATCGAGGATCCTGGCCAGCGCTCTGGATG
AGAAAGGAAAAGCTGACAGGATTCTGGTGAATGCGTGTGCCCAGGATGGGTGAAGACAGACATGGGGGGACCCAAAGGCCACCAAGAGCCAGAGGAGGG
GGCTGAGACCCCTGTCTACTTGGCCCTTTCGCTCCAGATGCCACTGAGCCACAAGGCCAGTTGGTCCATGACAAAAGTTGTGCAAAACTGGTAA

>cbr3-V244M_Klon-CV2
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCTGCGCGGGCAGCCATATGTCGTCTGCAGCCGCTGGCGCTGGTACCGGGGCCA
ACAGGGGATCGGCTTGGCCATCGCGCGGAACTGTGCCGACAGTTCTCTGGGGATGTGGTGCTACCCGCGGGACGTGGCGGGGCCAGCGGGCCGT
GCAGCAGCTGCAGCGGAGGGCCTGAGCCCGCGCTTCCACCACTGGACATCGACGACTTGCAGAGCATCCGCGCCTGCGGACTTCTGCGCAAGGAG
TACGGGGGGCTCAATGTACTGGTCAACAACCGGGCCGTCGCTTCAAGAGTGATGATCCAAATGCCCTTTGACATTTAAAGCTGAGATGACACTGAAGACAA
ATTTTTTGGCCACTAGAAACATGTGCAACGAGTTACTGCCGATAATGAAACCTCATGGGAGAGTGGTGAATATCAGTAGTTTTCAGTGTTTAAGGGCCTT
TGAAAACCTGCAGTGAAGATCTGCAGGAAAGGTTCCACAGTGAGACACTCACAGAAGGAGACCTGGTGGATCTCATGAAAAAGTTTGTGGAGGACACAAAA
AATGAGGTGCATGAGAGGGAAGGCTGGCCAACTCACCTTATGGGGTGTCCAAGTGGGGTTCACAGTCTTATCGAGGATCCTGGCCAGCGCTCTGGATG
AGAAAGGAAAAGCTGACAGGATTCTGGTGAATGCGTGTGCCCAGGATGGGTGAAGACAGACATGGGGGGACCCAAAGGCCACCAAGAGCCAGAGGAGGG
GGCTGAGACCCCTGTCTACTTGGCCCTTTCGCTCCAGATGCCACTGAGCCACAAGGCCAGTTGGTCCATGACAAAAGTTGTGCAAAACTGGTAA

A.1.3 Konstrukte von *cbr4*

```
>cbr4_pQE-70
ATGCGAACTAGTGACAAAGTGTGTGCTGTTTTGGAGGCTCCCGAGGCATTGGCAGAGCTGTGGCCAGTTAATGGCCCGGAAAGGCTATCGACTGGCGG
TCATTGGCCAGAAACCTGGAAGGGGCCAAAGCCGCGCGGTGACCTCGGCCGAGATCATTGGCATTAGCTGTGATGTTGCTAAAGAACATGATGTTCA
AAATACATTTGAAAGAGCTGGAGAAACATTTAGTTCGAGTAAATTTCTGGTAAATGCAGCTGGTATTAACAGGGATGGTCTTTAGTAAAGAACAAAACT
GAAGATATGGTATCTCAGCTTCACTAACCTCTTGGGTTCCATGCTGACCTGTAAGCTGCCATGAGGACTATGATTAACAACAGGGAGGCTATTG
TTAATGTAGGAAGCATTGTTGGCTTAAAGGCCAAGCTCGGCCAGTCCGTTTACAGTCCAGTAAAGGAGGATTAGTTGGATTTTACAGTGTCTTGGCTAA
AGAGGTAGCAAGAAAGAAATTAGAGTGAATGTAGTTGCACCAGGATTTGTACACACAGATATGACGAAAGACTTGAAGAAGAACATTTAAAGAAAAAT
ATTCTCTTGGGAGGTTTGGAGAACTATTGAGGTGGCAGATCGGTTGTGTTCTTTTAGAATCACCGTATATTACAGGGCATGTTCTGGTAGTGGAT
GGGGATTACAACCTCATTTTGGGTACCGGATCCAGATCTCATCACCATCACCATCACTAA
```

```
>cbr4_pET-15b
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGTGCGCGCGGCAGCCATAGTACTAGTATGGACAAAGTGTGTGCTGTTTTGGAGGCT
CCCGAGGCATTGGCAGAGCTGTGGCCAGTTAATGGCCCGGAAAGGCTACCGACTGGCGGTCAATGGCAGAAACCTGGAAGGGGCCAAAGCCGCGCGG
TGACCTCGGGCGGAGATCATTGGCATTAGCTGTGATGTTGCTAAAGAACATGATGTTCAAAATACATTTGAAGAGCTGGAGAACATTTAGGTCGAGTA
AATTTCTTGGTAAATGCAGCTGGTATTAACAGGGATGGTCTTTAGTAAAGAACAAAACTGAAGATATGGTATCTCAGCTTCACTAACCTTGGGTT
CCATGCTGACCTGTAAGCTGCCATGAGGACTATGATTAACAACAGGGAGGCTCTATTGTTAATGTAGGAAGCATTGTTGGCTTAAAGGCCAAGCTTGG
CCAGTCCGTTTACAGTGGCCAGTAAAGGAGGATTAGTTGGATTTTACAGTGTCTTGGCTAAAGAGGTAGCAAGAAAGAAAAATTAGAGTGAATGTAGTTGCA
CCAGGATTTTACACACAGATATGACGAAAGACTTGAAGAAGAACATTTAAAGAAAAATTTCTCTTGGGAGGTTTGGAGAACTATTGAGGTGGCAG
ATGCGGTTGTGTTTTCTTTAGAATCACCGTATATTACAGGGCATGTTCTGGTAGTGGATGGGGATTACAACCTCATTTTGTAA
```

```
>cbr4_pET-43b
ATGAACAAGAAATTTGGCTGATGTTGAAGCCGTATCCAATGAAAGCGCTACCTCGGAGAGATTTTGAAGCATTGGAAGCGCGGTGGCGACAG
CAACAAGAAAAATATGAACAAGAGATCGAGCTCCGCGTACAGATCGATCGCAAAAGCGGTGATTTTGACACTTTCCGTCGCTGGTTAGTTGTTGATGA
AGTCAACCCGCGGACCAAGGAAATCACCCCTTGAAGCCGACGTTATGAAGATGAAAGCCTGAACCTGGGCGATTACGTTGAAGATCAGATTGAGTCTGTT
ACCTTTGACCGTATCACTACCCAGCAGGAAAAACAGGTTATCGTGCAGAAAGTGCAGGAGCCGACGCGGATGGTGGTGTATCAGTTCCGTAACACG
AAGGTGAATCATCACCGCGGTGGTGAAGAAAGTAAACCGCGCAACATCTCTGATCTGGCAACAACGCTGAAGCCGTGATCCTCGCGCAAGATAT
GCTGCGCGGTGAAGAACTTCCGCGCTGGCGACCGCGTTCTGGCGGTGCTTATTCCGTTCCGCGGAAAGCGCGTGGCGCGCAACTGTTCTGCTACTGTTCC
AAGCCGGAATGCTGATCGAAGCTGTTCCGTTATTGAAGTGCAGAAATCGGCGAAGAGTATTGAAATTAAGCAGCGGCTCCGATCCGCGTCTCGTG
CGAAATCGCGGTGAAGAAACCAACAGATAAACCTATCGATCCGTTAGTGTGCTTGGTATGCTGCGTGGCGCGGTGTTCAAGCCGCTGCTACTGAAGTGGG
TGCGAGCGTATCGATATCGTCTGTGGGATGATAACCCGCGCAGTTCGTTGATTAAGCGAATGGCACCGCGAGACGTTGCTTCTATCGTGGTGGATGAA
GATAAACACACCATGGACATCGCCGTTGAAGCCGTTAATCTGGCGCAGGCGATTGGCCGTAACGGTCAAGAGCTGCGCTGGCTCCGCACTGAGCGGTT
GGGAACCTCAACGTGATGACCGTTGACGACCTGCAAGCTAAGCATCAGGCGGAAGCGCACGAGCGATCCGACACCTTCAACCAATATCTCGACATCGACGA
AGACTTCGCGACTGTTCTGTTAGAAGAAGGCTTCTCGACGCTGGAAGAAATGGCCTATGTGCGGATGAAGAGCTGTTGGAATCGAAGCCCTGATGAG
CCGACCGTTGAAGCACTGGCGGACGCTGCTAAAAATGCACTGGCCACCATTTGCAAGGCGGAGGAAAGCCTCGGTTGATAACAAACCGGCTGACGATC
TGCTGAACCTTGAAGGGTAGATCGTATTGGCATTCAAACCTGGCGCGCGTGGCGTTTGTACGCTGGAAGATCTCGCCGAACAGGGCATTGATGATCT
GGCTGATATCGAAGGTTGACGCGAAGAAAGCCGAGCAGTATTATGGCTGCCGTAATATTTGCTGGTTCGGTGACGAAGCGACTAGTGGTCTGCTGT
CATCACCATCACCTACTCCGCGGTCTGGTCCCGCGGGCAGCATGGACAAAGTGTGTGCTGTTTTGGAGGCTCCCGAGGCATTGGCAGAGCTGTGG
CCCACTTAAATGGCCCGGAAAGGCTACCGACTGGCGGTCAATGGCAGAAACCTGGAAGGGGCCAAAGCCGCGCGGTGACCTCGGGGAGATCATTGGC
ATTTAGCTGTGATGTTGCTAAAGAACATGATGTTCAAATACATTTGAAGAGCTGGAGAAACATTTAGTTCGAGTAAATTTCTTGGTAAATGCAGCTGGT
ATTAACAGGGATGGTCTTTAGTAAAGAACAAAACTGAAGATATGGTATCTCAGCTTCACTAACCTCTTGGGTTCCATGCTGACCTGTAAGCTGCCA
TGAGGACTATGATTAACAACAGGGAGGCTCTATTGTTAATGTAGGAAGCATTGTTGGCTTAAAGGCCAAGCTTGGCCAGTCCGTTTACAGTCCCAAGTAA
AGGAGGATTAGTTGGATTTTACAGTGTCTTGTCAAAGAGGTAGCAAGAAAGAAAAATTAGAGTGAATGTAGTTGACAGGATTTGTACACACAGATATG
ACGAAAGACTTGAAGAAGAACATTTAAAGAAAAATTTCTCTTGGGAGGTTTGGAGAACTATTGAGGTGGCAGATCGGTTGTGTTCTTTAGAAT
CACCGTATATTACAGGGCATGTTCTGGTAGTGGATGGGGATTACAACCTCATTTTGTGCGAGCACCCACCCACCCACTAA
```

A.1.4 Konstrukt von *akr1b10*

```
>akr1b10_pET-15b
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGTGCGCGCGGCAGCCATAGTACTAGTGTACCATGGCCAGTGTGGAGCTCAGTA
CCAAAGCCAAAGATGCCATTTGGGCGCTGGGCATTTGGAAGTCTCCTCTTGGCAAAGTGAAGAGCAGTGAAGGTGGCCATTGATGCAGGATATCGGCA
CATTGACTGTGCTATGCTATCAGAAATGAACATGAAGTGGGGAAAGCCATCCAAGAGAAGATCCAAGAGAAGGCTGTGAAGCGGGAGGACCTGTTTCAATC
GTCAGCAAGTTGTGGCCACTTCTTTGAGAGACCCCTTGTGAGGAAAGCCTTTGAGAAGCCCTCAAGACCTGAAGCTGAGCTATCTGGACGCTATC
TTATCTACTGGCCACAGGGATTCAAGTCTGGGATGACCTTTTCCCAAAGATGATAAGGTAATGCCATCGGTTGAAAGCAACGTTCTTGGATGCCCTG
GGAGGCCATGGAGGAGCTGGTGGATGAGGGGCTGGTGAAGCCCTTGGGTTCTCCAATTTCCAGCCACTTCCAGATCGAGAAGCTCTTGAACAAACCTGGA
CTGAAATATAAACCAAGTACTAACCGGTTGAGTGTACCCATACCTCACACAGGAGAAACTGATCCAGTACTGCCACTTCAAGGGCATCACGTTACGG
CCTACAGCCCTTGGGCTCTCCGGATAGACCTTGGGCCAAGCCAGAAGCCCTTCCCTGCTGGAGGATCCCAAGATTAAGGAGATTGCTGCAAGCACAA
AAAAACCGCAGCCAGGTTCTGATCCGTTTCCATATCCAGAGGAATGTGATTGCTATCCCAAGTCTGTGACACCGACGCAATTTGTGAGAACATTCAG
GTCTTTGACTTTAAATGAGTGTAGGAGATGGCAACCATCTCAGCTTCAACAGAACTGGAGGCGCTGAACGTTGCAATCTCTCATTTTGGAG
ACTATCCCTTCGATGCAAGATTTGACTCGAGGATCC
```

A.2 VERDÜNNUNGSSCHEMA

Für die Herstellung der Substratlösungen zur Messung einer Enzymkinetik wurde angestrebt, einen breiten Bereich Substratkonzentrationen gleichmäßig abzudecken, anders als es bei einem 1+1 Verdünnungsschema (100; 50; 25; 12;5 . . .) erreicht wird. Dafür wurde das in Abbildung A.1 dargestellte Schema erarbeitet. Es ist so konzipiert, dass mit nur einer Pipette und einer Volumeneinstellung gearbeitet werden kann, was eine Quelle für Verdünnungsfehler ausschließt.

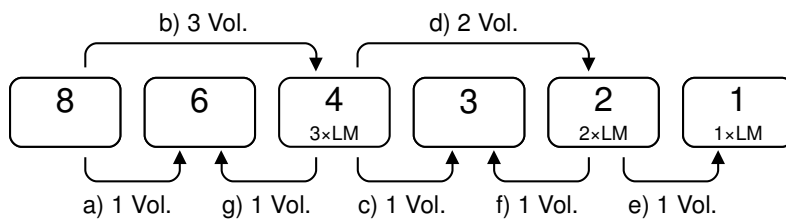


Abbildung A.1 – Verdünnungsschema für Substrate zur Messung kinetischer Parameter. Es wurden mindestens 6 Volumenteile der Stammlösung (8-fach konzentriert) hergestellt und die entsprechenden Volumenteile Lösungsmittel (LM) in die Gefäße für die 4-, 2- und 1-fach konzentrierte Lösung vorgelegt. Nachdem in alphabetischer Reihenfolge die angegebenen Volumenteile pipettiert wurden, lagen 2 Volumenteile der jeweiligen Konzentration vor.

A.3 ROHDATEN DER ENZYMAKTIVITÄTSMESSUNGEN

Die Rohdaten sind wie folgt zu lesen: Die ersten drei Einträge sind das Substrat, das vermessene Konstrukt und die Konzentration des Enzyms in mg/ml. Nach dem ersten Semikolon folgen die Messdaten, getrennt durch Semikola. Dabei ist der erste Wert der Verdünnungsfaktor der Enzymlösung, der zweite die Substratkonzentration in μM , die folgenden Werte sind die Beträge der initialen Abnahmen der Absorption in AU. Der Dezimaltrenner ist ein Punkt. Die Rohdaten können durch Kopieren in einen Texteditor folgendermaßen aufgearbeitet werden:

1. Ersetzen der Zeilenumbrüche durch Leerzeichen
2. Ersetzen der Zeichenkombination Schrägstrich+Leerzeichen durch Zeilenbruch
3. Ersetzen der Semikola durch Zeilenumbrüche

Anschließend kann diese Datei z. B. mit einer Tabellenkalkulation ausgewertet werden. Die Daten für Oracin enthalten als ersten Wert die Oracinkonzentration in μM , die folgenden Werte sind die Umsätze in $\text{nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$.

A.3.1 Kinetiken

Isatin

```
Isatin CBR3 0.80;2 250 0.0084 0.0063 0.0071;2 500 0.0141 0.0111 0.0127;2 1000 0.0250 0.0221 0.0181 0.0233;2 2000 0.0361 0.0379 0.0402 ;2
3000 0.0568 0.0558 0.0599;2 4000 0.0708 0.0727 0.0705/

Isatin CBR3 0.80;2 250 0.0058 0.0058 0.0055;2 500 0.0141 0.0120 0.0110;2 1000 0.0204 0.0205 0.0188;2 2000 0.0386 0.0374 0.0363;2 3000
0.0515 0.0477 0.0519;2 4000 0.0662 0.0621 0.0605/

Isatin CBR3 1.10;2 250 0.0129 0.0097 0.0101;2 500 0.0115 0.0174 0.0112 0.0153;2 1000 0.0301 0.0263 0.0327;2 2000 0.0478 0.0569 0.0478;2
3000 0.0748 0.0760 0.0766;2 4000 0.0937 0.0858 0.0902/

Isatin CBR3 0.98;1 250 0.0091 0.0102 0.0106;1 500 0.0220 0.0213 0.0229;1 1000 0.0360 0.0388 0.0395;1 2000 0.0784 0.0749 0.0690 0.0763;1
3000 0.1015 0.1099 0.1051;1 4000 0.1395 0.1414 0.1390/

Isatin CBR3-V244M 1.18;1 250 0.0104 0.0100 0.0072 0.0110;1 500 0.0140 0.0144 0.0136 0.0119;1 1000 0.0266 0.0262 0.0241 0.0262;1 2000 0.0413
0.0405 0.0443;1 3000 0.0704 0.0668 0.0681;1 4000 0.0870 0.0831 0.0821/

Isatin CBR3-V244M 1.63;1 250 0.0104 0.0230 0.0205 0.0128 0.0104;1 500 0.0302 0.0218 0.0302 0.0245 0.0184;1 1000 0.0370 0.0432 0.0473 0.0427
0.0384;1 2000 0.0799 0.0791 0.0680 0.0768;2 3000 0.0508 0.0405 0.0425 0.0433 0.0438;2 4000 0.0657 0.0638 0.0602 0.0404 0.0610/

Isatin SOE 1.15;2 250 0.0766 0.0655 0.0667;2 500 0.1226 0.1296 0.1205;2 1000 0.2093 0.2083 0.2242;2 2000 0.3251 0.3011 0.3056;2 3000 0.3623
0.3503 0.3653;2 4000 0.3709 0.3987 0.3803/

Isatin SOE 1.26;2 250 0.0780 0.0777 0.0768;2 500 0.1287 0.1322 0.1282;2 1000 0.2248 0.2242 0.2333;2 2000 0.3231 0.3222 0.2944 0.3175;2 3000
0.3514 0.3728 0.3581 0.3570;2 4000 0.4059 0.3740 0.3666 0.3689/

Isatin SOE 0.74;1 250 0.0815 0.0800 0.0736 0.0702;3 500 0.0511 0.0481 0.0464;3 1000 0.0758 0.0750 0.0789;3 2000 0.1205 0.1173 0.1328;5 3000
0.0814 0.0835 0.0809;5 4000 0.1011 0.0868 0.1049 0.0958/

Isatin SOE 1.15;2 250 0.0713 0.0722 0.0663;2 500 0.1423 0.1280 0.1176 0.1327;2 1000 0.2045 0.2234 0.2002;2 2000 0.2633 0.2966 0.3296;2 3000
0.2726 0.3138 0.3451 0.3736;2 4000 0.4160 0.4151 0.4364/

Isatin CBR3-P230W 1.20;1 250 0.0080 0.0078 0.0080;1 500 0.0118 0.0118 0.0114;1 1000 0.0244 0.0205 0.0249 0.0187 0.0236;1 2000 0.0429 0.0404
0.0425;1 3000 0.0623 0.0610 0.0599;1 4000 0.0871 0.0825 0.0732 0.0833 0.0828/

Isatin CBR3-P230W 1.22;1 250 0.0098 0.0099 0.0089;1 500 0.0129 0.0142 0.0213 0.0146 0.0167 0.0132;1 1000 0.0275 0.0216 0.0225 0.0257
0.0223;1 2000 0.0396 0.0405 0.0402;1 3000 0.0494 0.0477 0.0490;1 4000 0.0692 0.0657 0.0647/

Isatin CHIM 0.66;1 250 0.0055 0.0056 0.0058;1 500 0.0132 0.0127 0.0140;1 1000 0.0259 0.0223 0.0257;1 2000 0.0533 0.0557 0.0540;1 3000
0.0723 0.0717 0.0801 0.0725;1 4000 0.0921 0.1035 0.0921 0.1016/

Isatin SOE-CHIM 0.67;1 250 0.0618 0.0641 0.0674;2 500 0.0473 0.0464 0.0458;2 1000 0.0868 0.0894 0.0881;3 2000 0.1051 0.1084 0.0989;3 3000
0.1475 0.1382 0.1403;3 4000 0.1567 0.1729 0.1702/

Isatin SOE-CHIM 0.41;2 250 0.0220 0.0262 0.0250;2 500 0.0381 0.0425 0.0433 0.0406;2 1000 0.0709 0.0789 0.0746 0.0714;2 2000 0.1159 0.1120
0.1124;2 3000 0.1510 0.1432 0.1526 0.1525;2 4000 0.1871 0.1848 0.1840/

Isatin SOE-P230W 0.89;2 7.81 0.0406 0.0399 0.0435 0.0399;2 15.63 0.0644 0.0727 0.0691 0.0680;2 31.25 0.1093 0.1196 0.1198 0.1103;4 62.50
0.0788 0.0822 0.0812 0.0791;4 125.00 0.1047 0.1037 0.1081;4 250.00 0.1179 0.1241 0.1039 0.1201 0.1240/

Isatin SOE-P230W 1.01;2 7.81 0.0429 0.0394 0.0426;3 15.63 0.0503 0.0449 0.0476 0.0490;5 31.25 0.0430 0.0434 0.0460;5 62.50 0.0639 0.0585
0.0560 0.0626;5 125.00 0.0814 0.0803 0.0805;5 250.00 0.0829 0.1089 0.0967/

Isatin SOE-P230W 1.01;1 7.81 0.0644 0.0750 0.0772 0.0771;5 15.63 0.0442 0.0487 0.0475;5 31.25 0.0376 0.0418 0.0420 0.0417;5 62.50 0.0585
0.0576 0.0609;5 125.00 0.0779 0.0745 0.0824 0.0702;5 250.00 0.0807 0.0830 0.0814/

Isatin SOE-P230W-97VA 1.34;3 7.81 0.0466 0.0444 0.0450;3 15.63 0.0763 0.0772 0.0697;3 31.25 0.1087 0.1159 0.1118;3 62.50 0.1692 0.1719
0.1586;3 93.75 0.1976 0.1970 0.1822;3 125.00 0.2146 0.2133 0.2128/

Isatin SOE-P230W-97VA 0.46;1 7.81 0.0463 0.0479 0.0491;1 15.63 0.0796 0.0745 0.0823;1 31.25 0.1413 0.1327 0.1151;1 62.50 0.1934 0.1898
0.1926;1 93.75 0.2264 0.2314 0.2257;1 125.00 0.2759 0.2617 0.2688/
```


Isatin SDE-P230W-142MS 1.13;5 7.81 0.0399 0.0455 0.0482 0.0559 0.0498;5 15.63 0.0773 0.0864 0.0818 0.0849;5 31.25 0.1217 0.1165 0.1238 0.1173 0.1130;5 62.50 0.1578 0.1593 0.1697 0.1570 0.1598;5 93.75 0.1817 0.1852 0.1795 0.1861 0.1747;5 125.00 0.1898 0.1919 0.1831 0.2011/

Isatin SDE-P230W-142MS 1.13;10 7.81 0.0209 0.0252 0.0238;10 15.63 0.0469 0.0498 0.0444 0.0404;10 31.25 0.0490 0.0553 0.0632 0.0543 0.0571;10 62.50 0.0825 0.0918 0.0803 0.0847 0.0943;10 93.75 0.1030 0.0983 0.1003 0.0903;10 125.00 0.1082 0.1008 0.1014 0.1051 0.1027 0.1152/

Isatin SDE-P230W-142MS 0.61;4 7.81 0.0413 0.0370 0.0390 0.0391;4 15.63 0.0623 0.0694 0.0621 0.0689;4 31.25 0.0916 0.0954 0.0926 0.0943;4 62.50 0.1180 0.1283 0.1232 0.1311;4 93.75 0.1373 0.1473 0.1338 0.1470;4 125.00 0.1567 0.1506 0.1552 0.1482 0.1472/

Isatin SDE-P230W-142MS 1.36;10 7.81 0.0276 0.0325 0.0302 0.0348;10 15.63 0.0412 0.0474 0.0458 0.0476;10 31.25 0.0646 0.0661 0.0658 0.0613;10 62.50 0.0758 0.0709 0.0718 0.0764;10 93.75 0.0918 0.1107 0.0848 0.0864 0.1009;10 125.00 0.0905 0.0831 0.0871 0.0982 0.0936/

Isatin SDE-P230W-142MS 1.36;10 7.81 0.0347 0.0406 0.0392 0.0318;10 15.63 0.0565 0.0532 0.0559;10 31.25 0.0705 0.0747 0.0814 0.0797 0.0717;10 62.50 0.0906 0.0863 0.0907 0.0969;10 93.75 0.1116 0.1039 0.1042 0.1103;10 125.00 0.1044 0.1099 0.1117 0.1033 0.1155/

Isatin SDE-P230W-191SSA 0.97;2 7.81 0.0359 0.0399 0.0364;2 15.63 0.0683 0.0717 0.0690;2 31.25 0.1060 0.1191 0.1109 0.1144;2 62.50 0.1504 0.1624 0.1641 0.1669 0.1607;2 125.00 0.2054 0.2005 0.1988 0.2031;2 250.00 0.2366 0.2667 0.2432 0.2484 0.2438 0.2409/

Isatin SDE-P230W-191SSA 0.97;3 7.81 0.0288 0.0251 0.0347 0.0279;3 15.63 0.0553 0.0432 0.0568 0.0439;3 31.25 0.0722 0.0637 0.0676;3 62.50 0.0958 0.0896 0.0925;3 125.00 0.1189 0.1499 0.1516 0.1425;3 250.00 0.1748 0.1629 0.1763/

Isatin SDE-P230W-H27OS 1.40;5 7.81 0.0261 0.0322 0.0240 0.0307 0.0290 0.0337;5 15.63 0.0552 0.0449 0.0463 0.0463 0.0490;5 31.25 0.0869 0.0773 0.0709 0.0788 0.0783 0.0761;5 62.50 0.0988 0.0993 0.1055 0.0975;5 125.00 0.1273 0.1258 0.1277;5 250.00 0.1446 0.1451 0.1414/

Isatin SDE-P230W-H27OS 0.96;5 7.81 0.0293 0.0183 0.0204 0.0195;5 15.63 0.0338 0.0282 0.0300 0.0358 0.0281 0.0312;5 31.25 0.0442 0.0453 0.0442 0.0435;5 62.50 0.0548 0.0562 0.0600 0.0534;5 125.00 0.0672 0.0690 0.0623 0.0669;5 250.00 0.0824 0.0856 0.0896 0.0757 0.0883/

Isatin SuMu 1.09;4 7.81 0.0619 0.0679 0.0665;4 15.63 0.1008 0.1068 0.1097;4 31.25 0.1423 0.1513 0.1566 0.1396 0.1382;4 62.50 0.1859 0.1788 0.1843 0.1760 0.1761;4 93.75 0.1830 0.2021 0.1950;4 125.00 0.1999 0.2267 0.2139 0.2079 0.2010/

Isatin SuMu 0.82;4 7.81 0.0521 0.0653 0.0549 0.0568;4 15.63 0.0857 0.0843 0.0927 0.1056 0.0839;4 31.25 0.1301 0.1244 0.1267;4 62.50 0.1626 0.1697 0.1630;4 93.75 0.1760 0.1930 0.1769 0.1992 0.1855;4 125.00 0.1871 0.1879 0.1956 0.1889/

Isatin SuMu-V273R 0.63;25 7.81 0.0083 0.0089 0.0095;25 15.63 0.0129 0.0127 0.0161 0.0149 0.0158;25 31.25 0.0163 0.0172 0.0186;25 46.88 0.0205 0.0193 0.0216;25 62.50 0.0217 0.0229 0.0202 0.0209;25 93.75 0.0222 0.0258 0.0237/

Isatin SuMu-V273R 0.91;5 7.81 0.0605 0.0596 0.0544 0.0586;5 15.63 0.0850 0.0975 0.0943 0.0970;5 31.25 0.1308 0.1272 0.1326;5 46.88 0.1652 0.1587 0.1656;5 62.50 0.1650 0.1637 0.1791 0.1645;5 93.75 0.1604 0.1991 0.1943 0.1887/

Isatin CBR1 0.22;1 3.91 0.0275 0.0240 0.0237 0.0250 0.0259;1 7.81 0.0314 0.0304 0.0268;1 15.63 0.0300 0.0348 0.0307 0.0323;1 31.25 0.0424 0.0413 0.0410;1 46.88 0.0422 0.0420 0.0436;1 62.50 0.0498 0.0487 0.0419/

Isatin CBR1 0.32;1 3.91 0.0281 0.0212 0.0254 0.0309 0.0284;1 7.81 0.0336 0.0437 0.0475 0.0362 0.0357;1 15.63 0.0487 0.0503 0.0474 0.0460;1 31.25 0.0614 0.0603 0.0688 0.0570;1 46.88 0.0778 0.0706 0.0640 0.0734;1 62.50 0.0816 0.0827 0.0841 0.0810/

Menadion

Menadion CBR1 0.32;1 7.5 0.0117 0.0155 0.0116 0.0130;1 15 0.0226 0.0138 0.0172 0.0188;1 30 0.0208 0.0194 0.0246 0.0203;1 45 0.0213 0.0228 0.0248 0.0232;1 60 0.0265 0.0264 0.0259;1 90 0.0287 0.0355 0.0274 0.0282;1 120 0.0308 0.0326 0.0374 0.0323/

NADPH

NADPH CBR3 0.36;1 3.125 0.0318 0.0374 0.0243;1 6.25 0.0424 0.0381 0.0364;1 12.5 0.0568 0.0506 0.0489 0.0504;1 25 0.0593 0.0568 0.0516 0.0480;1 50 0.0625 0.0503 0.0579 0.0464 0.0535;1 100 0.0567 0.0660 0.0439 0.0465/

Oracın

CBR3;0 0 0;15 5.78 5.17 5.98;30 10.03 10.84 10.66;50 14.28 14.17 16.01;100 20.6 22.95 24.92;150 28.69 25.95 28.89;200 34.01 30.87 35.12;300 36.41 38.77 39.19;500 43.74 41.82 45.44/

9,10-Phenanthrenchinon

Phenanthrenchinon CBR3 0.68;1 19.33 0.0061 0.0050 0.0050;1 38.66 0.0102 0.0077 0.0101 0.0084;1 57.99 0.0127 0.0107 0.0122 0.0118;1 77.32 0.0180 0.0166 0.0155 0.0165/

Phenanthrenchinon CBR3 0.68;0.2 19.33 0.0234 0.0220 0.0228;0.2 38.66 0.0438 0.0429 0.0444;0.2 57.99 0.0664 0.0676 0.0677;0.2 77.32 0.0897 0.0880 0.0874/

Phenanthrenchinon CBR3-V244M 1.49;1 19.33 0.0093 0.0089 0.0100;1 38.66 0.0177 0.0176 0.0160;1 57.99 0.0307 0.0256 0.0298;1 77.32 0.0383 0.0362 0.0389/

Phenanthrenchinon SDE 0.58;1 9.67 0.0162 0.0149 0.0137;1 19.33 0.0291 0.0309 0.0296;1 28.99 0.0499 0.0460 0.0407;1 38.66 0.0629 0.0610 0.0661;1 57.99 0.0719 0.0713 0.0707;1 77.32 0.0962 0.0860 0.1064/

Phenanthrenchinon CBR3-P230W 1.01;0.2 19.33 0.0145 0.0158 0.0163;0.2 38.66 0.0320 0.0313 0.0300;0.2 57.99 0.0442 0.0568 0.0491;0.2 77.32 0.0679 0.0623 0.0572/

Phenanthrenchinon CHIM 0.61;0.2 19.33 0.0188 0.0178 0.0165;0.2 38.66 0.0318 0.0382 0.0300;0.2 57.99 0.0512 0.0525 0.0520;0.2 77.32 0.0614 0.0706 0.0652/

Phenanthrenchinon SDE-CHIM 0.35;0.2 19.33 0.0056 0.0063 0.0050;0.2 38.66 0.0108 0.0138 0.0119;0.2 57.99 0.0192 0.0137 0.0178;0.2 77.32 0.0211 0.0229 0.0211/

Phenanthrenchinon SDE-P230W 1.04;1 9.67 0.1116 0.1204 0.1214 0.1130;1 19.33 0.2765 0.2735 0.2837;1 29.00 0.4110 0.3961 0.3862;1 38.66 0.4066 0.4114 0.3970;1 57.99 0.4435 0.4616 0.4431 0.4397;1 77.32 0.5394 0.5489 0.5214 0.5209/

Phenanthrenchinon SDE-P230W 0.89;3 9.67 0.0287 0.0246 0.0251 0.0272;3 19.33 0.0623 0.0571 0.0560 0.0581;3 29.00 0.0671 0.0743 0.0632;3 38.66 0.0698 0.0736 0.0658 0.0709;3 57.99 0.0908 0.0879 0.0901;3 77.32 0.1141 0.1301 0.1060 0.1145/

Phenanthrenchinon SDE-P230W 1.04;3 9.67 0.0386 0.0395 0.0362;3 19.33 0.0689 0.0619 0.0627 0.0657;3 29.00 0.0770 0.0838 0.0838 0.0788;3 38.66 0.0952 0.0981 0.0960;3 57.99 0.1354 0.1311 0.1380;3 77.32 0.1479 0.1556 0.1547 0.1586/

Phenanthrenchinon SDE-P230W 1.04;3 9.67 0.0435 0.0433 0.0409;3 19.33 0.0682 0.0621 0.0628;3 29.00 0.0851 0.0903 0.0902 0.0810 0.0860;3 38.66 0.0926 0.0974 0.0976;3 57.99 0.1233 0.1156 0.1094 0.1164;3 77.32 0.1565 0.1600 0.1597 0.1534/

Phenanthrenchinon SDE-P230W-97VA 0.46;3 4.83 0.0263 0.0294 0.0282;3 9.67 0.0432 0.0502 0.0504 0.0518;3 19.33 0.0593 0.0697 0.0680 0.0653;3 28.99 0.0684 0.0713 0.0733 0.0736;3 38.66 0.0728 0.0737 0.0747;3 57.99 0.0733 0.0751 0.0775/

Phenanthrenchinon SOE-P230W-97VA 1.34;5 4.83 0.0271 0.0401 0.0420 0.0434;5 9.67 0.0663 0.0714 0.0675;5 19.33 0.0765 0.0840 0.0790;5 28.99 0.0969 0.1007 0.1009 0.1039;5 38.66 0.1029 0.1098 0.1080;5 57.99 0.1140 0.1093 0.1184/

Phenanthrenchinon SOE-P230W-142MS 1.13;4 9.67 0.1014 0.1051 0.0985;4 19.33 0.1726 0.1720 0.1720;4 29.00 0.2317 0.2228 0.2277 0.2163;4 38.66 0.2639 0.2813 0.2792 0.2629 0.2763;4 57.99 0.3278 0.3402 0.3231 0.3220;4 77.32 0.3453 0.3331 0.3463 0.3454/

Phenanthrenchinon SOE-P230W-142MS 0.61;3 9.67 0.0846 0.0809 0.0841 0.0800;3 19.33 0.1446 0.1499 0.1509 0.1488;3 29.00 0.1915 0.2016 0.1841 0.1926;3 38.66 0.2379 0.2256 0.2133 0.2046;3 57.99 0.2541 0.2590 0.2657 0.2589;3 77.32 0.3046 0.3122 0.2880 0.2915/

Phenanthrenchinon SOE-P230W-191SSA 1.31;4 9.67 0.0674 0.0728 0.0727;4 19.33 0.0834 0.0742 0.0754;4 29.00 0.0987 0.0983 0.0830 0.1012;4 38.66 0.1171 0.1239 0.1131;4 57.99 0.1222 0.1339 0.1265;4 77.32 0.1366 0.1326 0.1351/

Phenanthrenchinon SOE-P230W-191SSA 1.05;4 9.67 0.0419 0.0756 0.0628 0.0748 0.0767;4 19.33 0.0753 0.0944 0.1028 0.1039 0.1079;4 29.00 0.1076 0.1018 0.1003 0.1273 0.1336 0.1262;4 38.66 0.1283 0.1300 0.1253 0.1237;4 57.99 0.1496 0.1513 0.1570 0.1564;4 77.32 0.1664 0.1633 0.1607 0.1631/

Phenanthrenchinon SOE-P230W-H270S 0.96;3 4.83 0.0483 0.0669 0.0718;3 9.67 0.0842 0.0840 0.0857;3 19.33 0.1142 0.1129 0.1083;3 29.00 0.1285 0.1273 0.1216 0.1216;3 38.66 0.1315 0.1472 0.1380 0.1376 0.1397;3 57.99 0.1444 0.1467 0.1506 0.1520 0.1395/

Phenanthrenchinon SOE-P230W-H270S 0.91;3 4.83 0.0715 0.0685 0.0613;3 9.67 0.0811 0.0848 0.0757 0.0816;3 19.33 0.1041 0.1063 0.1074;3 29.00 0.1210 0.1238 0.1219;3 38.66 0.1283 0.1289 0.1305;3 57.99 0.1410 0.1507 0.1439 0.1433/

Phenanthrenchinon SuMu 1.09;8 2.42 0.0506 0.0470 0.0440;8 4.83 0.0675 0.0675 0.0732;8 9.67 0.0935 0.0959 0.0938 0.0938;8 19.33 0.1088 0.1131 0.1092;8 29.00 0.1354 0.1253 0.1198 0.1155 0.1135;8 38.66 0.1347 0.1244 0.1307 0.1246;8 57.99 0.1404 0.1377 0.1350 0.1307/

Phenanthrenchinon SuMu 0.82;8 2.42 0.0466 0.0515 0.0451 0.0539 0.0514;8 4.83 0.0657 0.0702 0.0630 0.0617 0.0567;8 9.67 0.0840 0.0706 0.0748 0.0832 0.0733;8 19.33 0.0969 0.0936 0.0881 0.0891 0.0982;8 29.00 0.1034 0.1104 0.1044 0.0990;8 38.66 0.1075 0.1163 0.1056 0.1096 0.1010;8 57.99 0.1091 0.1142 0.1121 0.1114/

Phenanthrenchinon SuMu-V273R 0.91;10 9.67 0.0755 0.0874 0.0877;10 19.33 0.1037 0.1060 0.1060 0.1065;10 29.00 0.1160 0.1204 0.1054 0.1088;10 38.66 0.1178 0.1262 0.1195;10 57.99 0.1342 0.1213 0.1205;10 77.32 0.1160 0.1195 0.1171/

Phenanthrenchinon SuMu-V273R 1.09;10 9.67 0.0757 0.0815 0.0854 0.0794;10 19.33 0.0944 0.0891 0.0829 0.0923;10 29.00 0.1014 0.1168 0.1108 0.1035;10 38.66 0.1009 0.1012 0.1035;10 57.99 0.1175 0.1156 0.1178;10 77.32 0.1260 0.1196 0.1144/

Phenanthrenchinon CBR1 0.22;1 9.67 0.0374 0.0372 0.0421 0.0402;1 19.33 0.0568 0.0627 0.0603 0.0542;1 28.99 0.0749 0.0705 0.0600 0.0667;1 38.66 0.0856 0.0929 0.0817 0.0802;1 57.99 0.1107 0.1149 0.1053;1 77.32 0.1267 0.1297 0.1033 0.1041/

Phenanthrenchinon CBR1 0.32;1 9.67 0.0498 0.0511 0.0625 0.0525;1 19.33 0.0858 0.0882 0.0811;1 28.99 0.1098 0.1075 0.0995;1 38.66 0.1228 0.1106 0.1120;1 57.99 0.1514 0.1548 0.1475;1 77.32 0.1637 0.1599 0.1495/

S-Nitrosoglutathion

S-Nitrosoglutathion CBR1 0.56;1 12.5 0.0351 0.0374 0.0381;1 25 0.0735 0.0747 0.0745;1 37.5 0.0898 0.0952 0.0900 0.0986;1 50 0.1236 0.1240 0.1246;1 75 0.1384 0.1431 0.1471 0.1435;1 100 0.183 0.1910 0.1811;1 166 0.2022 0.2184 0.2193/

S-Nitrosoglutathion CBR3 0.36;1 12.5 0.0094 0.0086 0.0095;1 25 0.0160 0.0161 0.0167;1 37.5 0.0198 0.0207 0.0212;1 50 0.0237 0.0256 0.0281 0.0249;1 75 0.0331 0.0361 0.0312;1 100 0.0478 0.0439 0.0483;1 166 0.0523 0.0557 0.0548/

A.3.2 Aktivitätsmessung von CBR1, CBR3 und CBR3-Mutanten

4-Benzoylpyridin

4-Benzoylpyridin CBR1 0.56;1 500 0.1444 0.1330 0.1407/

4-Benzoylpyridin SOE-P230W 0.83;1 500 0.0037 0.0035 0.0028/

4-Benzoylpyridin SOE-P230W-97VA 1.14;1 500 0.0038 0.0037 0.0039/

4-Benzoylpyridin SOE-P230W-191SSA 1.05;1 500 0.0035 0.0044 0.0038/

4-Benzoylpyridin SuMu-V273R 0.91;1 500 0.0111 0.0110 0.0143 0.0128/

2,3-Hexandion

2,3-Hexandion CBR1 0.56;1 500 0.1829 0.1704 0.1598/

2,3-Hexandion SuMu-V273R 0.91;1 500 0.0088 0.0069 0.0082/

Menadion

Menadion CBR1 0.56;1 100 0.2281 0.2694 0.2599/

Menadion SOE-P230W 0.83;1 100 0.0083 0.0078 0.0114/

Menadion SOE-P230W-97VA 1.14;1 100 0.0105 0.0087 0.0069/

Menadion SOE-P230W-191SSA 1.05;1 100 0.0082 0.0080 0.0078/

Menadion SuMu-V273R 0.91;1 100 0.0351 0.0352 0.0401/

4-Nitrobenzaldehyd

4-Nitrobenzaldehyd CBR1 0.56;1 1000 0.0977 0.0921 0.0877/

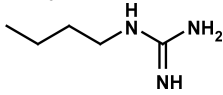
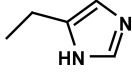
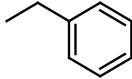
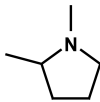
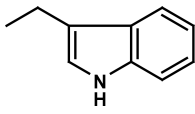
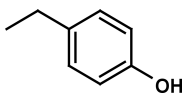
4-Nitrobenzaldehyd SOE-P230W 0.83;1 1000 0.0020 0.0027 0.0029/

4-Nitrobenzaldehyd SOE-P230W-97VA 1.14;1 1000 0.0035 0.0025 0.0048/

4-Nitrobenzaldehyd SOE-P230W-191SSA 1.05;1 1000 0.0034 0.0044 0.0026/

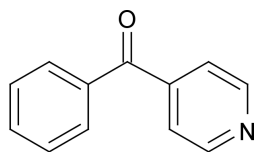
4-Nitrobenzaldehyd SuMu-V273R 1.09;1 1000 0.0058 0.0069 0.0087 0.0081/

A.4 PROTEINOGENE AMINOSÄUREN

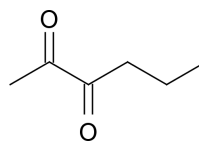
Aminosäure	Dreibuchstaben- code	Einbuchstaben- code	Strukturformel Seitenkette
Alanin	Ala	A	-CH ₃
Arginin	Arg	R	
Asparagin	Asn	N	-CH ₂ -CONH ₂
Asparaginsäure	Asp	D	-CH ₂ -COOH
Cystein	Cys	C	-CH ₂ -SH
Glutamin	Gln	Q	-CH ₂ -CH ₂ -CONH ₂
Glutaminsäure	Glu	E	-CH ₂ -CH ₂ -COOH
Glycin	Gly	G	-H
Histidin	His	H	
Isoleucin	Ile	I	-CH(CH ₃)-CH ₂ -CH ₃
Leucin	Leu	L	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂
Lysin	Lys	K	-(CH ₂) ₄ -NH ₂
Methionin	Met	M	-CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃
Phenylalanin	Phe	F	
Prolin	Pro	P	
Serin	Ser	S	-CH ₂ -OH
Threonin	Thr	T	-CH(CH ₃)-OH
Tryptophan	Trp	W	
Tyrosin	Tyr	Y	
Valin	Val	V	-CH(CH ₃) ₂

A.5 STRUKTURFORMELN VERWENDETER STOFFE

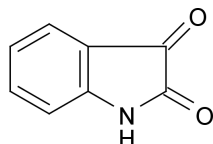
4-Benzoylpyridin



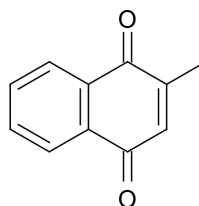
2,3-Hexandion



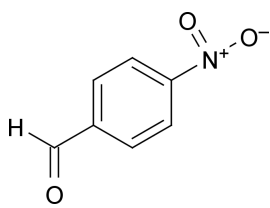
Isatin



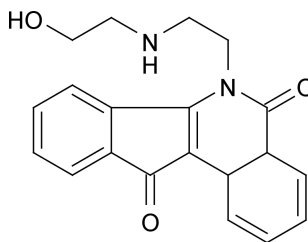
Menadion (Vitamin K3)



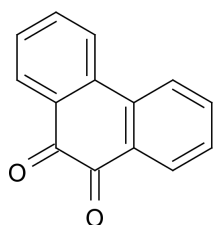
4-Nitrobenzaldehyd



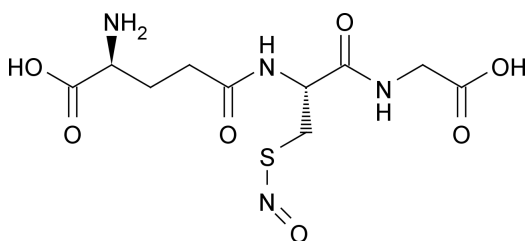
Oracin



9,10-Phenanthrenchinon



S-Nitrosoglutathion



A.6 BERECHNUNG UND PLOTTEN DER KURVEN MIT GNUPLOT

Der für die Berechnung der katalytischen Konstanten und Darstellung der Plots mit Gnuplot 4.2 wurden folgender Quellcode eingesetzt. Die Messwerte sind mit einem Punkt als Dezimaltrenner in einer Datei mit dem Namen kinetik.data hinterlegt. In dieser Datei stehen zeilenweise, durch Leerzeichen getrennt und nach Substratkonzentration sortiert: die Substratkonzentration (μM), der Mittelwert der Messungen ($\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$) und die Standardabweichung. In der ersten Zeile stehen drei Nullen für einen Ansatz ohne Substrat.

```
#Zeichenkodierung (Betriebssystemabhängig)
set encoding iso_8859_1
set size 0.5,0.5
#Achsenbeschriftung
set xlabel '{Substratkonzentration [{/Symbol m}M]}'
set ylabel '{Geschwindigkeit [{/Symbol m}mol/(mg\267min)]}'

#nichtlineare Regression der Daten der Datei 'kinetik.data'
f(x)=v*x/(k+x) #Michaelis-Menten
fit f(x) 'kinetik.data' via v, k

#Alternative zur Durchführung linearer Regression mit
#y-Achsenabschnitt = 0
#f(x)=a*x
#fit f(x) 'kinetik.data' via a

#Darstellung der Plots inklusive Fehlerbalken
unset key
set style line 1 lw 3
set style line 2 lw 3 lt 1 pt 5 ps 1
plot 'kinetik.data' using 1:2:3 with errorbars ls 2, f(x) ls 1

#Ausgabe des Plots in Datei
set output "Kinetik.eps"
set terminal postscript eps enhanced
replot
#Ende
```

EIGENE PUBLIKATIONEN

Referierte Publikationen

1. EL-HAWARI, Y., A. D. FAVIA, E. S. PILKA, M. KISIELA, U. OPPERMANN, H.-J. MARTIN and E. MASER: *Analysis of the substrate-binding site of human carbonyl reductases CBR1 and CBR3 by site-directed mutagenesis*. Chem Biol Interact, 178(1-3):234–241, Mar 2009.
2. BALENDIRAN, G. K., H.-J. MARTIN, Y. EL-HAWARI and E. MASER: *Cancer biomarker AKR1B10 and carbonyl metabolism*. Chem Biol Interact, 178(1-3):134–137, Mar 2009.
3. PILKA, E. S., F. NIESEN, W. H. LEE, Y. EL-HAWARI, J. E. DUNFORD, G. KOCHAN, V. WSOL, H.-J. MARTIN, E. MASER and U. OPPERMANN: *Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases*. PLoS One, 4(10):e7113, 2009.

Abstract des Vortrags

EL-HAWARI, Y., F. NIESEN, K. L. KAVANAGH, E. S. PILKA, V. WSOL, U. OPPERMANN and E. MASER: *Crystal structure and characterization of human carbonyl reductase 3*. Abstracts of the 48th Spring Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, March 13-15, 2007, Mainz, Germany. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 375 Suppl 1:13–111, Mar 2007.

Posterpräsentationen und Abstracts

1. EL-HAWARI, Y., F. NIESEN, K. L. KAVANAGH, E. S. PILKA, V. WSOL, U. OPPERMANN and E. MASER: *Characterization of the human carbonyl reductase 3 (CBR3) by site directed mutagenesis*. Abstracts of the 49th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology. March 11-13, 2008. Mainz, Germany. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 377 Suppl 1:10–98, Mar 2008.
2. EL-HAWARI, Y., F. NIESEN, K. L. KAVANAGH, E. S. PILKA, V. WSOL, U. OPPERMANN and E. MASER: *Characterization of the human carbonyl reductase 3 (CBR3) by site directed mutagenesis*. 14th International Meeting on Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Kranjska Gora, Slovenia, Jul 2008.

3. KISIELA, M., Y. EL-HAWARI, B. EBERT, A. GÖHLER, J. STEGK, G. XIONG and E. MASER: *Hydroxysteroid-dehydrogenases as molecular switch for steroid action in marine bacteria and in human medicine*. Cluster Retrieve Future Ocean, Salzau, Germany, Mar 2009.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Edmund Maser für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung anfertigen zu können und für die Unterstützung und Freiheiten, die mir bei der Gestaltung gewährt wurden.

Prof. Dr. Axel Scheidig gilt mein Dank dafür, dass er mir ermöglicht hat, Einblicke in die Kristallographie von Proteinen zu erhalten und natürlich für die Übernahme des Korreferats.

Dr. Hans-Jörg Martin danke ich für die intensive Unterstützung beim Erlernen der Methoden und für das stets offene Ohr bei Diskussionen um den Sinn und Unsinn von vielen Ideen.

Dr. Andreas Blum möchte ich nicht nur für die eine oder andere wertvolle Lebensweisheit danken, sondern auch für einen entscheidenden Tipp – was wäre nur ohne diesen gewesen!

Least but not last danke ich Michael Kisiela. Mit ihm habe ich sicher die meiste Zeit verbracht! Seine Unterstützung bei selbsterklärenden Fragestellungen zur Bioinformatik und seine Fähigkeiten als Chemielaborant haben mehr als einen kritischen Moment entschärfen können.

Meinen Leidensgenossen und -genossinnen Manuela Perle, Jochen Stegk, André Göhler, Wiebke Wilkars, Christoph Garbers, Marta Anna Ziemba, Romy Stüwe-Jung und Anneke Kramm danke ich für die tolle Stimmung im Laboralltag!

Sabine Mörchel, Sigrid Ulrich und Mohammed Azozz danke ich dafür, dass sie mir das Leben im Labor vereinfacht und das Leben im Sozialraum, in der Villa Kunterbunt und am Zellkultur-Kiosk versüßt haben.

In der Riege der Praktikanten danke ich Thilo Hanken, Frank Reimann, Martin Weisenborn, Gesche Först, Lena Rebecca Larsen, Marta Ziemba, Lennart Anger, Martje Weidmann, Sabine Woidich, Sandra Ulrich, Farid Rayhani, Diana Brüggemann, Irma Gundrum, Agnes Lison, Christian „Uschi“ Gradert, Jan Hintzpeter, Matthias Wulf, Franziskarr Gersonde und Jakob Halekotte für die wirklich tolle Zeit und Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und vor allem Inke danken! Sie hat mich tapfer ertragen und mich trotzdem immer unterstützt!

LEBENS LAUF

Yasser El-Hawari
Schauenburgerstraße 61
24118 Kiel
E-Mail: yasser@el-hawari.de

Geburtsdatum: 14.06.1978
Geburtsort: Hamburg
Nationalität: deutsch

BERUFS- UND HOCHSCHULBILDUNG

11/2005 – 09/2009 Promotion am Institut für Toxikologie und Pharmakologie für
Naturwissenschaftler der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel
08/2005 3. Staatsexamen und Approbation als Apotheker
07/2004 – 06/2005 Praktisches Jahr in der Annen-Apotheke in Altenholz
04/2000 – 05/2004 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel
09/1999 – 02/2000 PTA-Ausbildung an der Bernd-Blindow-Schule Raisdorf

WEHRDIENST

09/1998 – 06/1999 Grundausbildung und Sanitätslehrgang in Hildesheim,
anschließend Verwaltung der Gesundheitskartei im
Standortsanitätszentrum Schleswig

SCHULBILDUNG

1990 – 1998 Deutsche Evangelische Oberschule Kairo und Domschule
Schleswig, Gymnasium, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit

Vergleich der humanen Carbonylreduktasen CBR1, CBR3 und CBR4

nach Inhalt und Form – abgesehen von der Beratung durch den Betreuer – selbstständig von mir erstellt wurde und ihre Inhalte unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden sind.

Diese Arbeit wurde weder vollständig noch in Teilen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Kiel, September 2009

Yasser El-Hawari