

**NMR-spektroskopische Untersuchungen an  
der Xylanase aus *Bacillus agaradhaerens***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften

vorgelegt dem Fachbereich 14  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

von  
Marco Betz  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2003

Vom Fachbereich 14 Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main als Dissertation  
angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Rüterjans

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

Tag der Disputation: 30.05.2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1998 bis Dezember 2002 am Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Rüterjans angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich meinem akademischen Lehrer Herrn Prof. Dr. H. Rüterjans herzlich für die interessante Themenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und seine großzügige Förderung danken.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. Frank Löhr für die kompetente Hilfestellung bei den NMR-Experimenten, sowie bei Dr. Hans Wienk für seine Messungen der Residualen Dipolaren Kopplungen.

Dr. Krishna Saxena sowie Dr. Frank Bernhard danke ich für ihre Hilfe bei den molekularbiologischen Fragestellungen.

Dr. Vladimir Rogov gilt mein Dank für die gute Einführung in das allgemeine Themengebiet der Proteine.

Birgit Schäfer und Juliana Winkler danke ich für ihre hilfreiche Unterstützung bei zahlreichen Handgriffen der täglichen Laborpraxis.

Mein ganz besonderer Dank gilt Francesco Abbate, Krishna Saxena, Hans Wienk und Marcus Maurer, mit denen mich gemeinsames Arbeiten wie auch treue Freundschaft verbindet.

Allen nicht namentlich genannten Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für das freundschaftliche Arbeitsklima.

Mein letzter, aber um so herzlicher Dank gilt meinen Familien für ihre tatkräftige Unterstützung und ihrem beständigen Interesse an meinem Werdegang.

---

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
1.1. XYLAN UND XYLANASEN: BIOTECHNOLOGISCHE POTENTIALE.....	8
1.2. ANWENDUNG DER XYLANASEN IN DER PAPIERINDUSTRIE .....	8
1.3. VORAUSSETZUNGEN FÜR EINEN TECHNOLOGISCHEN EINSATZ VON XYLANASEN IN DER PAPIERINDUSTRIE.....	9
1.4. FAMILIE 11 XYLANASEN: STRUKTUR.....	10
1.5. FAMILIE 11 XYLANASEN: MECHANISMUS.....	12
1.6. ZIELSETZUNG DER DISSERTATION.....	13
<b>2. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>15</b>
<b>3. METHODEN .....</b>	<b>17</b>
3.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	17
3.1.1. Kompetente Zellen .....	17
3.1.2. Transformation von <i>E. coli</i> .....	18
3.1.3. Präparation von Plasmid-DNA.....	18
3.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	19
3.1.5. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	19
3.1.6. Agarosegel-Elektrophorese .....	20
3.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten .....	20
3.1.8. DNA-Sequenzierung .....	21
3.2. PROTEINCHEMISCHE METHODEN .....	21
3.2.1. Expression der Xylanase in <i>E. coli</i> .....	21
3.2.2. Isotopenanreicherung der Xylanase .....	23
3.2.3. Präparation der Xylanase aus <i>E. coli</i> .....	23
3.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	24
3.2.5. Konzentrationsbestimmung.....	26
3.2.6. Optimierung der Pufferbedingungen für die pH-Titration.....	26
3.3. CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT .....	27
3.3.1. Bestimmung der relativen Aktivität der Xylanase .....	27
3.3.2. pH-Abhängigkeit der relativen Xylanase-Aktivität .....	28
3.4. NMR-EXPERIMENTE .....	29
3.4.1. Allgemeine Bedingungen.....	29
3.4.2. Sequentielle Zuordnung der Resonanzen des Proteinerückgrats.....	30
3.4.3. Zuordnung der Resonanzen der Seitenketten.....	32

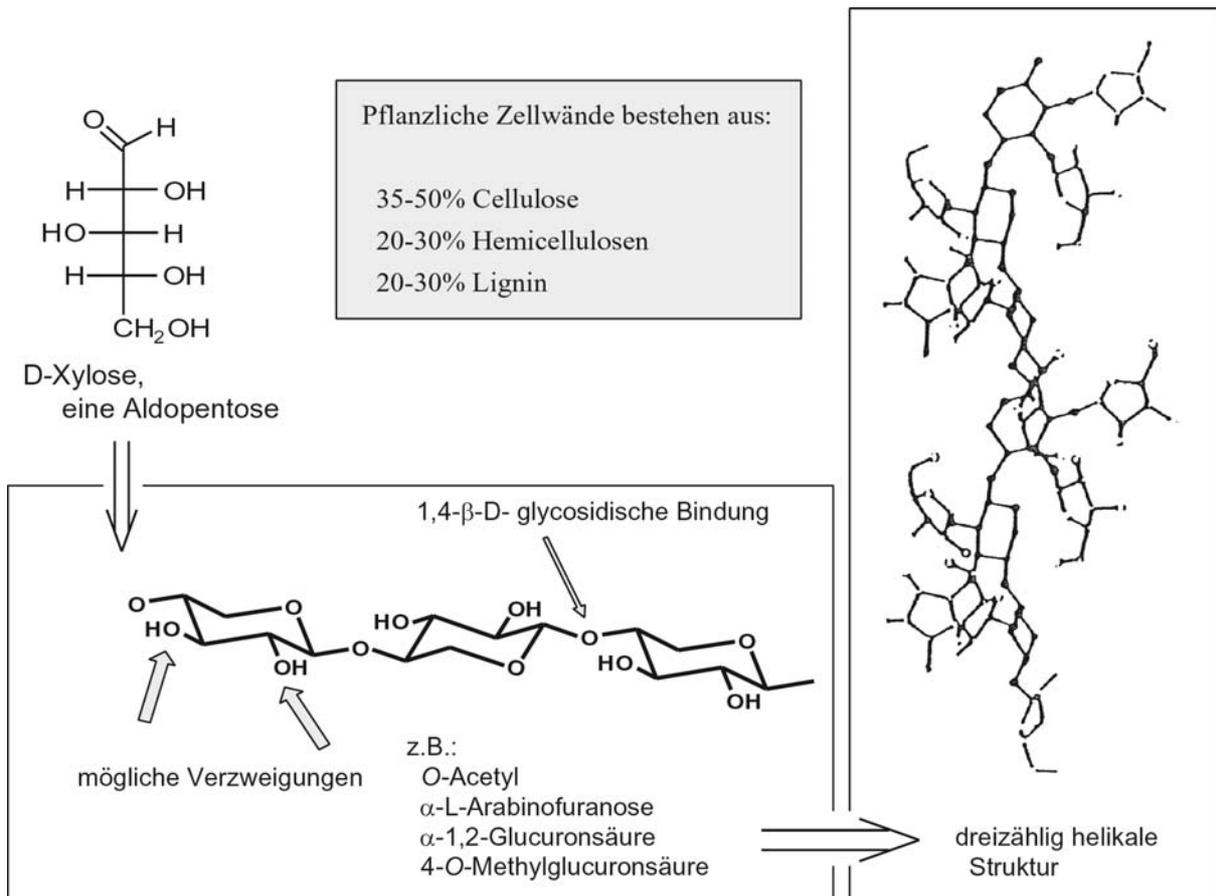
3.4.4.	Zuordnung der Seitenketten-Carboxylat- <sup>13</sup> C-Resonanzen.....	34
3.4.5.	Zuordnung der Resonanzen der Histidinseitengruppe .....	35
3.4.6.	Vorhersage der Sekundärstruktur: „ <i>Chemical shift index</i> “ (CSI).....	38
3.4.7.	Bestimmung einer vorläufigen Lösungsstruktur .....	38
3.4.8.	pH-Titration.....	40
3.5.	BESTIMMUNG DER PK <sub>S</sub> -WERTE MITTELS NMR-SPEKTROSKOPIE.....	42
3.5.1.	Theorie der NMR-Titrationskurven .....	42
3.5.2.	Datenanalyse und Evaluierung (F-Test).....	46
3.5.3.	Theoretische Überlegungen zur chemischen Verschiebung .....	48
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
4.1.	PRÄPARATION DER XYLANASE.....	50
4.1.1.	Klonierung des Xylanase-Genes in Expressionsvektoren und Proteinexpression.....	50
4.1.2.	Expression der Xylanase .....	53
4.1.3.	Aufreinigung der Xylanase .....	57
4.2.	CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT .....	59
4.2.1.	Temperatur-Abhängigkeit der relativen Xylanase-Aktivität .....	59
4.2.2.	pH-Abhängigkeit der relativen Xylanase-Aktivität .....	60
4.3.	ZUORDNUNG DER <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- UND <sup>15</sup> N-RESONANZEN DER XYLANASE .....	61
4.3.1.	Sequentielle Zuordnung der Resonanzen des Proteinerückgrats.....	61
4.3.2.	Zuordnung der Resonanzen des aliphatischen Teils der Seitenketten .....	62
4.3.3.	Zuordnung Aspartat, Glutamat.....	64
4.3.4.	Zuordnung der Histidin- bzw. Tryptophan-Resonanzen.....	65
4.4.	VALIDIERUNG DER ZUORDNUNG: LÖSUNGSSTRUKTUR DER XYLANASE.....	66
4.5.	PROTONIERUNGSVERHALTEN DER XYLANASE.....	68
4.5.1.	Durchführung der pH-Titration.....	68
4.5.2.	Einfluss des pH-Wertes auf die <sup>15</sup> N-Resonanzen des Proteinerückgrats.....	72
4.5.3.	Protonierungsverhalten der Carboxylatgruppen .....	76
4.5.4.	pH-Abhängigkeit der Imidazol- <sup>13</sup> C-Resonanzen .....	79
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>82</b>
5.1.	LÖSUNGSTRUKTUR DER XYLANASE .....	82
5.2.	OPTIMIERTE PUFFERBEDINGUNGEN – AUSWIRKUNG AUF DIE RESONANZEN DES PROTEINRÜCKGRATS.....	84
5.3.	IDEALES TITRATIONSVERHALTEN .....	85

---

5.4.	KEIN TITRATIONSSCHRITT; HYDROPHOBES ZENTRUM.....	86
5.5.	GRUPPIERUNG HIS60 – GLU167.....	90
5.6.	GRUPPIERUNG HIS11 – ASP12 – HIS32.....	95
5.7.	ASPARTAT 21 - WEITREICHENDE WECHSELWIRKUNGEN ÜBER 9 ÅNGSTRØM.....	97
5.8.	GRUPPIERUNG <i>SUBSITE-2</i> : ASP15 - GLU17 – GLU178.....	101
5.9.	GRUPPIERUNG <i>SUBSITE-1</i> : GLU94 – E184 (KATALYTISCHE DYADE).....	104
<b>6.</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>113</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>123</b>
7.1.	MATERIAL.....	123
7.1.1.	Bakterienstämme.....	123
7.1.2.	Plasmide.....	124
7.1.3.	Oligodesoxyribonukleotide.....	125
7.1.4.	Enzyme.....	126
7.1.5.	Chemikalien.....	126
7.1.6.	Standards und Kits.....	127
7.1.7.	Geräte.....	127
7.1.8.	Säulen- und Chromatographiematerialien.....	129
7.1.9.	Sonstiges Material.....	129
7.1.10.	Medien und Antibiotika.....	129
7.2.	ZUORDNUNG DER XYLANASE <i>B. AGARADHAERENS</i> .....	132
<b>8.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE.....</b>	<b>137</b>
8.1.	ABKÜRZUNGEN.....	137
8.2.	SYMBOLE.....	138

# 1. Einleitung

Holz und andere pflanzliche Biomassen bestehen bis zu einem Drittel aus Hemicellulosen, die bei der Isolierung von Cellulose anfallen. Hemicellulosen sind ein heterogen aus Polysacchariden zusammengesetzt, die neben dem Hauptbestandteil Xylan (Abb. 1-1) auch Mannan und Galactan enthalten. Xylan ist somit die zweithäufigste regenerierbare biologische Rohstoffquelle, ein Potential, das zunehmend an Bedeutung gewinnt.



**Abb. 1-1: Die Struktur des Xylans**

*Links oben:* D-Xylose bildet den monomeren Grundbaustein des Xylans; *links unten:* durch 1,4-β-D-glycosidische Bindung der Xylanopyranose-Einheiten wird die hochpolymere Xylan-Kette aufgebaut; *rechts:* Verknüpfungen mit weiteren Heterosacchariden in 2,3-Position führen zu einer dreizählig helikalen Makrostruktur; *grau:* ungefähre Zusammensetzung von pflanzlichen Zellwänden.

Rekombinant hergestellte Xylanasen (1,4-β-D-Xylan Xylanohydrolasen, EC 3.2.1.8) sind die bevorzugten Katalysatoren für den Abbau der Xylan-Fasern, da sie hohe Spezifität, milde Reaktionsbedingungen und vernachlässigbaren Substanzverlust gewährleisten. Xylanasen werden in vielen Bakterien, Algen und Pilzen gefunden, aber auch in Protozoen, Schnecken und Gliederfüßlern (Biely, 1985). Die meisten Bakterien bzw. Pilze sekretieren Xylanasen

extrazellulär, um sich heterotroph von freigesetzter Xylose zu ernähren. Auch Mikroorganismen, die symbiontisch im Verdauungstrakt von Wiederkäuern leben, produzieren Xylanasen.

### **1.1. Xylan und Xylanasen: Biotechnologische Potentiale**

Xylanasen haben eine wirtschaftlich bedeutsame Funktion bei der *Aufbereitung von Nahrungsmitteln* pflanzlicher Herkunft. Trübungen in Fruchtsäften und Weinen werden mit Xylanasen geklärt, sie werden zur Optimierung der Viskosität bei der Herstellung von flüssigem Kaffee-Extrakt verwendet. Auch Biere werden während der Fermentation mit Xylanasen behandelt, um Probleme bei der Filtration zu vermeiden (Courtin *et al.*, 1999).

In der *Landwirtschaft* finden Xylanasen ebenfalls eine Anwendung. Silofutter wird vorbehandelt, um die Verwertbarkeit der Nährstoffe bei der Massenhaltung derjenigen Tiere zu steigern, die nicht von symbiontischen Organismen wie die Wiederkäuer profitieren.

In der *pharmazeutischen Industrie* werden Tabletten mit Xylan verkapselt. Xylanasen hydrolysieren langsam den ‚Schutzmantel‘, der eigentliche Wirkstoff wird verzögert freigesetzt.

Da die Kohle- und Erdölvorräte in naher Zukunft durch regenerierbare Biomasse kompensiert werden müssten, wäre die Entwicklung effizienter Technologien, die Cellulose in Kombination mit Xylan in nutzbare *Grundkomponenten wie z.B. Furfural, Xylitol und Ethanol* umwandeln, bereits heute eine sinnvolle Herausforderung (Lee, 1997).

### **1.2. Anwendung der Xylanasen in der Papierindustrie**

Die bei weitem größte Menge von Xylanasen wird in der Papierindustrie eingesetzt (Buchert *et al.*, 1994). Marktanalysen haben ergeben, dass optische Helligkeit von Papier verkaufsfördernd gegenüber der natürlichen Braunfärbung des unbehandelten Produktes ist. Restliches Lignin oder genauer Lignin-Polysaccharid-Strukturen, die noch in der Papiermasse enthalten sind, bewirken die unerwünschte Färbung. Konventionelle Produktionsstrategien verwenden deshalb Chlordioxid in Kombination mit Wasserstoffperoxid, um diese Chromophore in der Rohpapiermasse zu bleichen. Allerdings ist der Nebeneffekt nicht zu vermeiden, dass auch chlorierte Aromaten (z.B. Chlorophenole, polychlorierte Biphenyle) aus der Reaktion des

aktiven Chlors mit Lignin freigesetzt werden. Neben der Toxizität droht auch Gefahr durch die gleichzeitige Persistenz dieser Verbindungen, sie akkumulieren sich stetig in den umliegenden Ökosystemen.

Eine Alternative dazu wäre die Verwendung von Xylanasen.

Die Rohpapiermasse muss in der Regel durch Erhitzen im alkalischen Milieu vorbehandelt werden. Dabei wird das eher hydrophobe Xylan aus den Zellwänden herausgelöst und präzipitiert auf der Oberfläche der Pflanzenfasern. Einerseits wird Lignin an der Diffusion nach außen behindert und andererseits gelangt das Oxidationsmittel zum Bleichen nicht in das Innere der Fasern.

Eine enzymatische Vorbehandlung mit Xylanasen begünstigt die Permeabilität: Es entstehen Poren in der ‚Schutzschicht‘ aus Xylan, bzw. die gesamte Struktur wird aufgeweitet. Geringere Mengen an Chlorchemikalien werden benötigt, die einerseits Produktionskosten senken und andererseits die Freisetzung der toxischen Nebenprodukte vermindern. Nach neuesten Produktionsstrategien kann Chlordioxid durch Sauerstoff und Ozon ersetzt werden. Um Marktanteile konkurrieren gegenwärtig mehrere kommerzielle Produkte z.B. ‚Cartazyme-NS-10‘ von Clariant, ‚Ecopulp‘ von Alko-ICI und ‚Pulpenzyme HC‘ von Novo-Nordisk A/S.

### **1.3. Voraussetzungen für einen technologischen Einsatz von Xylanasen in der Papierindustrie**

Die wichtigsten Anforderungen an eine Xylanase, die zur Vorbehandlung von Rohpapiermasse verwendet werden soll, sind Thermostabilität, ein pH-Optimum der katalytischen Aktivität höher als  $\text{pH} = 8$  und fehlende Cellulaseaktivität. Intakte Cellulosefasern sind notwendig, um dem Papier seine Festigkeit zu geben.

Xylanasen, die aus Pilzen gewonnen werden, sind weniger geeignet für die Verwendung in der Papierindustrie. Sie sind einerseits weniger thermostabil als Xylanasen bakterieller Herkunft und das pH-Optimum der enzymatischen Aktivität liegt in der Regel unterhalb von  $\text{pH} 5.5$ . Die wenigen Ausnahmen werden von den Pilzen gebildet, die thermophilen oder alkalophilen Lebensbedingungen angepasst sind. Ausserdem haben viele dieser Xylanasen die unerwünschte Nebenwirkung, auch Cellulose zu einem geringen Anteil zu hydrolysieren.

Nach Henrissat und Bairoch (Henrissat *et al.*, 1989; Henrissat & Davies, 1997) werden Xylanasen in zwei Familien eingeteilt:

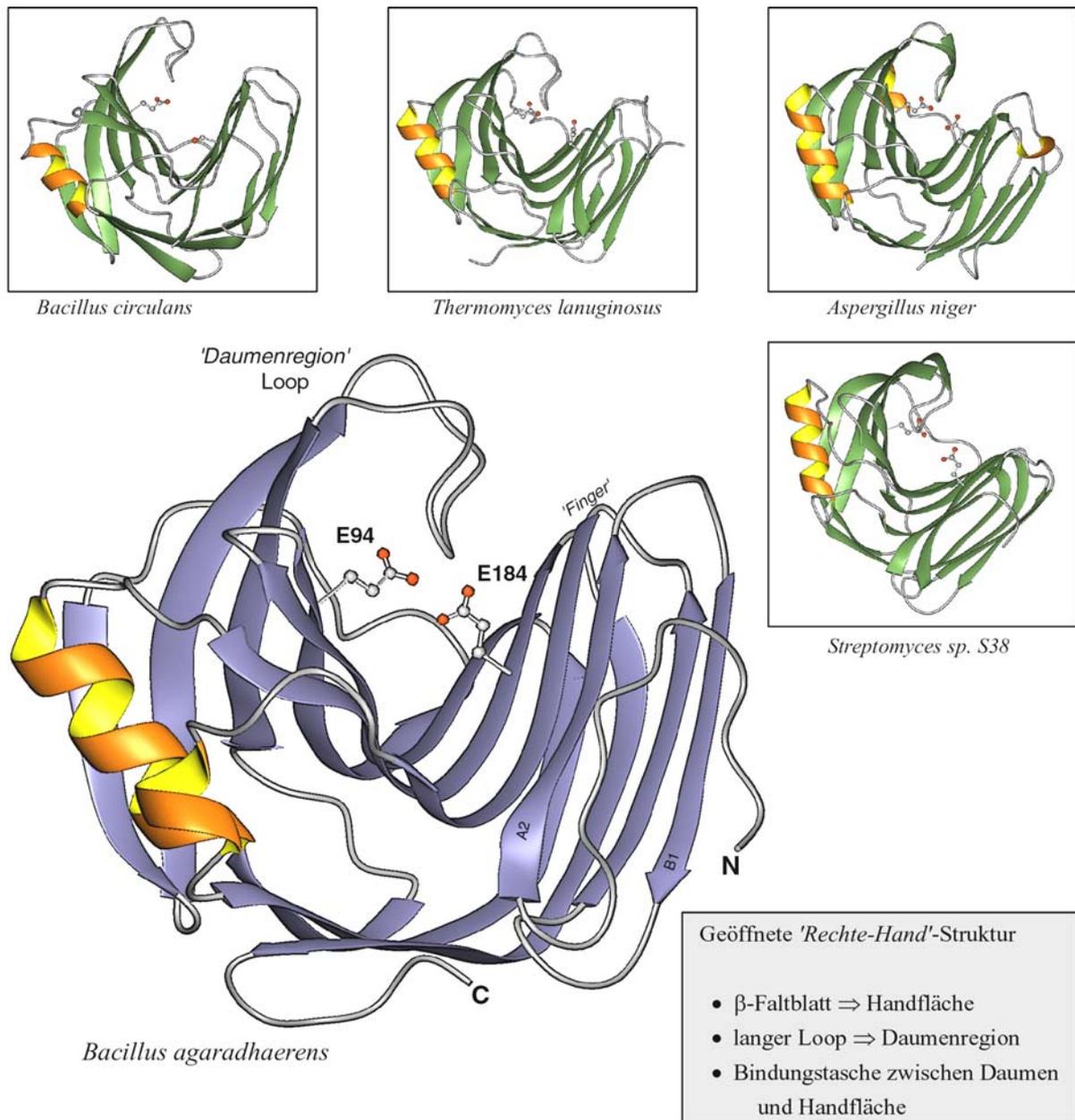
- **Familie 10:** endo-1,4- $\beta$ -D-Xylanasen mit einem höherem Molekulargewicht ( $> 30$  kDa) und saurem pI-Wert; dreidimensional als  $(\alpha/\beta)_8$  ‚Fasstruktur‘ gefaltet.
- **Familie 11:** endo-1,4- $\beta$ -D-Xylanasen mit niedrigerem Molekulargewicht ( $< 30$  kDa) und eher basischem pI (Ausnahme bei Pilzen); Zwei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter bilden eine konkave ‚Rechte-Hand‘-Struktur.

Bakterien produzieren in der Regel beide Arten von Xylanasen, in Pilzen sind Xylanasen der Familie 11 verbreitet. In der Papierindustrie konzentriert sich die Forschung auf Xylanasen der Familie 11, da viele Enzyme aus der Familie 10 aufgrund einer nicht zu vernachlässigenden Cellulaseaktivität ausscheiden.

#### 1.4. Familie 11 Xylanasen: Struktur

Xylanasen der Familie 11 haben eine charakteristische Faltung gemeinsam (Abb. 1-2):

- Eine einzige Domäne, die aus zwei übereinanderliegenden  $\beta$ -Faltblättern, A und B, besteht.
- Die zwei  $\beta$ -Faltblätter krümmen sich um die Bindungsspalte (B außen, A innen, vergleichsweise wie eine ‚geöffnete Rechte-Hand‘), die mindestens vier Xylano-pyranose-Einheiten aufnehmen kann.
- Die Bindungsspalte enthält viele Seitenketten saurer und aromatischer Aminosäuren; zwei konservierte Glutamate ragen von der jeweils gegenüberliegenden Seite in die Enzymspalte, sie bilden eine katalytische Dyade.
- Ein längere Schleife zwischen  $\beta$ -Strang A8 und A7 bildet eine ‚Daumenregion‘ über der Bindungsspalte.
- Eine  $\alpha$ -Helix, auf der konvexen Seite des Enzyms



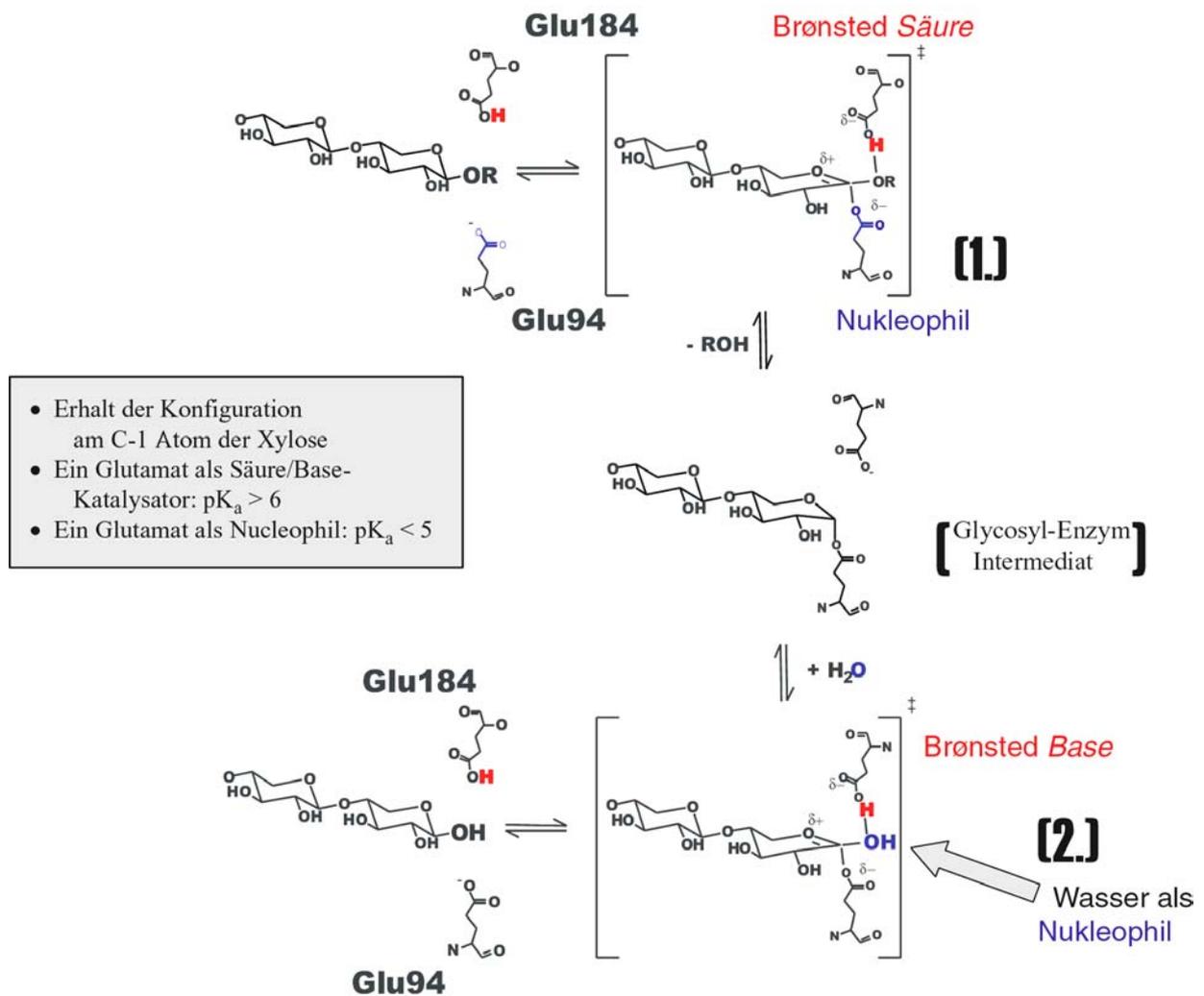
**Abb. 1-2: Kristallstrukturen ausgewählter Familie 11 Xylanasen**

Schematische Darstellung der Kristallstrukturen von *B. circulans*: (Wakarchuk *et al.*, 1994b), *T. lanuginosus*: (Gruber *et al.*, 1998), *A. niger*: (Krengel & Dijkstra, 1996), *Streptomyces sp. S38*: (Wouters *et al.*, 2001) und *B. agaradhaerens*: (Sabini *et al.*, 1999); Kugel-Stab-Repräsentation der beiden Glutamate der katalytischen Dyade; repräsentative Bezeichnung  $\beta$ -Stränge A2 und B1; C und N bezeichnen das carboxy- bzw. aminoternale Ende der Peptidkette; Graphik: MOLMOL Windows NT Version 2.5.1 (Koradi *et al.*, 1996).

Die wenigen Unterschiede der Kristallstrukturen konzentrieren sich auf die Länge des  $\alpha$ -helikalen Bereichs und auf die Ausdehnung des zweiten  $\beta$ -Faltblattes. In einigen Xylanasen, so z.B. *B. circulans* und *B. agaradhaerens*, kommt es vor, dass der erste  $\beta$ -Strang A1 fehlt. Das Faltblatt A besteht somit aus acht Strängen anstelle von neun.

**1.5. Familie 11 Xylanasen: Mechanismus**

Die Hydrolyse von Xylan erfolgt in zwei Schritten, die über eine Enzym-Glykosyl-Zwischenstufe verlaufen (Sabini *et al.*, 1999; siehe Abb. 1-3). Zuerst bereitet eine Carboxylgruppe der katalytischen Dyade (für *B. agaradhaerens*: Glu184) die Abgangsgruppe vor, indem sie das Brücken-Sauerstoffatom der glycosidischen Bindung protoniert. Das gegenüberliegende Carboxylat (~ Glu94) greift nukleophil an und bildet die kovalente Bindung zur Zwischenstufe. Im zweiten Schritt erfolgt die Umkehrung des ersten, Wasser ist nun das angreifende Nukleophil und die frühere Brønsted Säure fungiert als Base.



**Abb. 1-3: schematischer Mechanismus der Hydrolyse von Xylan**

Zur Übersicht wird Xylan ohne die Verknüpfungen in Position 2 bzw. 3 dargestellt; die folgenden Xylonopyranose-Einheiten werden als Abgangsgruppe *R* zusammengefasst; nur die Aminosäuren der katalytischen Dyade wurden gezeichnet; *rot*: Brønsted Säure / Base; *blau*: angreifendes Nukleophil.

## 1.6. Zielsetzung der Dissertation

Die Xylanase aus *Bacillus agaradhaerens* wurde von der Firma Novo-Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dänemark zur Verfügung gestellt. Die elektrostatischen Eigenschaften dieser Xylanase in Abhängigkeit vom pH-Wert sollten mit der NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Aus pH-abhängigen Messungen von Resonanzen individueller Atomgruppen des Enzyms können  $pK_s$ -Werte von Aminosäureseitenketten bestimmt werden.

Aus dem Ionisierungsverhalten einzelner Seitenkettenatome ergeben sich Hinweise über eine lokale Mikroumgebung, falls die  $pK_s$ -Werte von den tabellierten Messwerten an kleinen Modellpeptide abweichen. Nicht nur Einflüsse über kurze Distanzen können detektiert werden, sondern auch Effekte über einen größeren Abstand. Eine Protonierung bzw. Deprotonierung einer Seitengruppe kann mit dem Verhalten benachbarter Gruppen korrelieren bzw. makroskopische Eigenschaften des Gesamtproteins könnten sich aus der pH-Abhängigkeit erklären lassen. Coulombkräfte beeinflussen z.B. die Assoziationsrate des Substrates, sie tragen zur Stabilisierung bzw. Destabilisierung des Übergangszustandes bei. Nicht nur Xylanasen, auch andere Hydrolasen initiieren durch Protonierung des Substrats die Katalyse. Somit tragen Erkenntnisse über das Ionisierungsverhalten dazu bei, Vorgänge während der Katalyse besser zu verstehen.

Aus der Bestimmung der  $pK_s$ -Werte können Hinweise gewonnen werden, durch gerichtete Mutation das pH-Optimum der Xylanase weiter in den alkalischen Bereich zu verschieben und/oder die Thermostabilität zu verbessern.

Des Weiteren können die experimentellen Daten dazu verwendet werden, theoretische Modelle zum Ionisierungsverhalten des Proteins zu überprüfen (Karshikoff *et al.*, 1989; Koumanov *et al.*, 2001) (Übersichtsartikel siehe: Nakamura, 1996; Ullmann & Knapp, 1999; Warshel, 1998).

Um individuelle Ionisierungskonstanten im Enzym mit der NMR-Spektroskopie bestimmen zu können, müssen die Resonanzen des Proteins soweit zugeordnet werden, dass die titrierbaren Gruppen eindeutig in ihrer Sequenznummer identifiziert sind. Für die Xylanase aus *B. agaradhaerens* mit einem Molekulargewicht von ca. 23 kDa bedeutet dies, dass das Enzym mit den Isotopen  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$  markiert werden muss. Erst dann kann durch die multidimensionale NMR-Spektroskopie eine gute Dispersion der zahlreichen Resonanzen erzielt werden. Darüber hinaus können die zunehmend ungünstigen Relaxationseigenschaften kompensiert werden, indem Magnetisierungsansätze über  $^1\text{J}-[^{13}\text{C}, ^{13}\text{C}]$ - bzw.  $^1\text{J}-[^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}]$ -Kopplungen

verwendet werden (Griesinger *et al.*, 1987; Griesinger *et al.*, 1989; Kay *et al.*, 1990; Vuister *et al.*, 1988).

Die [<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C]-markierte Probe der Firma erwies sich als ungeeignet für die entsprechenden NMR-Experimente. Die Probe enthielt zwei unterschiedliche Proteinspezies, die wegen der Überlappung der Signale eine Zuordnung der Resonanzen verhinderten. Diese Komponenten konnten durch Ionenaustausch-Chromatographie getrennt werden, aber für die umfangreichen NMR-Experimente waren die Stoffmengen zu gering. Des Weiteren war nicht eindeutig geklärt, worin sich die beiden Proteinfractionen unterschieden. Nach Angaben des zuständigen Laborleiters wurde sekretorisch in *Bacillus subtilis* exprimiert. Es ist zu vermuten, dass ein Teil des Zielproteins posttranslatorisch modifiziert wurde.

Deshalb wurde der rekombinante Expressionsvektor als Templat zur Umklonierung verwendet. Ein neues Expressionssystem in *Escherichia coli* wurde etabliert, um bei guter Ausbeute eine *homogene* Expression zu gewährleisten. Die [<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C]-Markierung und Präparation der Proteinprobe erfolgte nach Optimierung der Expression.

## 2. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, mit der Methode der NMR-Spektroskopie die elektrostatischen Eigenschaften der Xylanase aus *Bacillus agaradhaerens* in Abhängigkeit vom pH-Wert zu charakterisieren.

Für die vorliegende Arbeit wurde das Strukturgen der Xylanase in verschiedene Expressionsvektoren des pET-Systems kloniert, wobei das Enzym auf 207 Aminosäuren verkürzt wurde. Dies entspricht der publizierten Kristallstruktur von Sabini *et al* (1999). Die Expression in pET3a und die Aufreinigung des Genproduktes mit Ionenaustauschchromatographie wurde optimiert, sodass homogenes Protein mit guten Ausbeuten erhalten werden konnte. Die Ausbeute aus 1 l LB-Medium betrug bis zu 200 mg, für M9-Minimalmedium etwa 60-80mg.

Die Xylanase wurde mit den Isotopen  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$  markiert und heteronukleare, mehrdimensionale NMR-Spektren wurden für die Zuordnung der Resonanzen des Proteins aufgenommen. Die chemischen Verschiebungswerte des Proteinrückgrats und die der aliphatischen Seitenketten wurden vollständig zugeordnet. Als eine weitere Voraussetzung für eine pH-Titration wurden sequenzspezifisch die Resonanzen der Histidin- bzw. Carboxylatgruppen bestimmt.

Die Lösungsstruktur der Xylanase wurde anhand mehrerer automatisierter Prozeduren errechnet, um die Zuordnung der Resonanzen zu validieren. Alle Strukturelemente, die bereits aus der Kristallstruktur bekannt sind, werden korrekt wiedergegeben. Da die Lösungsstruktur mit einem *backbone* RMSD-Wert von  $2.44 \pm 0.29 \text{ \AA}^2$  als vorläufig zu betrachten ist, wurde im Folgenden ausschließlich die Kristallstruktur zur Bewertung der Distanzbeziehungen verwendet.

In Abwesenheit des Substrats wurden die pH-abhängigen Resonanzen der Histidin- und Carboxylatgruppen sowie der Amide des Proteinrückgrats gemessen. Die Auswertung ergab 220 Titrationsprofile der  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen in einem pH-Bereich von 3.2 bis 8.7. Durch nichtlineare Regression der gemessenen Werte an eine modifizierte Henderson-Hasselbalch Gleichung wurden die  $\text{pK}_s$ -Werte der Seitenketten von Aspartat und Glutamat, sowie für das C-terminale Carboxylat und für die Histidingruppen bestimmt.

Die Titrationskurven der katalytischen Dyade zeigten eine ausgeprägte gegenseitige Wechselwirkung. Die Auswertung ergab einen  $\text{pK}_s$ -Wert von 3.9 für das Glu94 und 6.5 für

Glu184. Diese  $pK_s$ -Werte stimmen gut mit dem vorhergesagten enzymatischen Mechanismus überein und belegen, dass das Nukleophil Glu94 bei einem neutralem pH-Wert deprotoniert ist, während die Brønsted Säure/Base Glu184 zu ca. 30% protoniert ist.

Die Mehrheit der titrierbaren Gruppen (das C-terminale Carboxylat, fünf Aspartate, sechs Glutamate und zwei Histidine) zeigen apparente  $pK_s$ -Werte, die mit den Werten übereinstimmen, wie sie an unstrukturierten Oligopeptiden gemessen werden können. Andererseits weichen die  $pK_s$ -Werte für eine Reihe von Seitenketten zum Teil erheblich von den Werten der Modellsubstanzen ab. Zur Interpretation wurden die strukturellen Details der korrespondierenden Mikroumgebungen für diese Seitenketten untersucht.

Die starke Abweichung des  $pK_s$ -Wertes von Glu184 ist zum Beispiel das Ergebnis einer ungewöhnlich hydrophoben Mikroumgebung, die durch mehrere aromatische Seitenketten gebildet wird.

In nativ gefalteter Xylanase sind die Seitenketten von Asp99, Asp118, Asp123 und His162 im untersuchten pH-Bereich deprotoniert ( $pK_s < 2.7$ ). Die Aminosäurereste von Asp99 und His162 sind vollständig, die von Asp118 und Asp123 nur teilweise in dem hydrophoben Kern des Enzyms eingeschlossen. Der chemische Austausch mit den Solvensmolekülen ist stark eingeschränkt und die deprotonierte Form dieser Seitenketten wird durch ein weitläufiges Netzwerk an Wasserstoffbrücken stabilisiert, an dem sich auch ein internes Wassermolekül beteiligt.

Die Charakterisierung der Aminosäure Asp21 ( $pK_s = 3.5$ ) zeigt ein ungewöhnliches pH-Profil der chemischen Verschiebungswerte, das auf eine weitreichende Wechselwirkung über 9 Ångström mit der katalytisch aktiven Carboxylgruppe Glu184 deutet. Diese Wechselwirkung scheint durch zwei Wasserstoffbrücken über die Aminosäure Asn45 vermittelt zu werden, die ebenfalls am katalytischen Mechanismus beteiligt ist.

Um die Untersuchungen zur katalytischen Aktivität zu vervollständigen, wurden alle pH-abhängigen [ $^{15}\text{N}$ ]-Resonanzen der Amide des Proteinrückgrats wie auch die der Indolstickstoffe in der Substratbindungsspalte analysiert. Die Wendepunkte konnten dem Titrationsverhalten der benachbarten Aminosäurereste Glu17, Glu94 und Glu184 zugeordnet werden. Aber es erscheint sehr wahrscheinlich, dass ein wesentlich komplexerer Ablauf stattfindet. Die asymmetrische Wechselwirkung von Trp87 und Trp145 bezüglich der katalytischen Dyade wie auch das wechselnde Monotonieverhalten der Titrationskurven deuten auf eine simultane Reorganisation der Seitenkettenkonformere bei  $\text{pH} \approx 6$  und/oder auf eine Änderung des Wasserstoffbrückennetzwerkes innerhalb der Bindungsspalte.

### **3. Methoden**

#### **3.1. Molekularbiologische Methoden**

Alle Arbeiten mit Bakterienstämmen, DNA und anderem biologischen Material unterliegen der Sicherheitsstufe S1 und wurden gemäss dem Gentechnikgesetz (GenTG) vom 20. 05. 1996 durchgeführt.

Es wurde an der Sterilbank bzw. an der Flamme eines Bunsenbrenners gearbeitet, um Sterilität zu gewährleisten. Alle verwendeten Lösungen, Medien und Gefässe wurden entweder bei 121°C und 2.5 bar für 20 min autoklaviert oder sterilfiltriert. Mit Bakterien oder DNA kontaminierte Lösungen wurden autoklaviert (30 min, 121°C, 2.5 bar) behandelt.

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle molekularbiologischen Methoden entsprechend Sambrook *et al.*, 1989 bei RT durchgeführt.

##### **3.1.1. Kompetente Zellen**

Aus den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)CodonPlus und DH5 $\alpha$  wurden nach der Methode von Hanahan (1985) kompetente Zellen hergestellt.

5 ml LB-Medium (ggf. mit entsprechendem Antibiotikum) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (Biofuge, 5 min, 4800 rpm, 4 °C) und der Überstand wurde verworfen. Es wurde in 100 ml LB-Medium resuspendiert und bei 37 °C bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert.

Der Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert, dann wurde zentrifugiert (Biofuge, 10 min, 4800 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 15 ml TFB I (100 mM RbCl, 100 mM MnCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerin, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 mM KAc, pH 5.8 mit HAc, 4 °C) resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde in 4 ml TFB II (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerin, pH 7, 4 °C) resuspendiert.

Es wurde in je 100  $\mu$ l aliquotiert und bei -196 °C schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80 °C für ca. 6 Monate gelagert.

### 3.1.2. Transformation von *E. coli*

*E. coli*-Zellen wurden nach der Methode von Cohen (1972) transformiert. 100 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Es wurden ca. 1-5 µl der entsprechend präparierten Plasmid-Lösung hinzugefügt. Der Ansatz wurde 45 min auf Eis, 1 min bei 42 °C und 10 min bei RT inkubiert. Es wurde 1 ml S.O.C-Medium hinzugefügt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Davon wurden 10 µl entnommen, mit LB-Medium auf 100 µl verdünnt und mit einem Drygalski-Spatel auf einer LB-Platte mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

War ein Ligationsansatz zur Transformation verwendet worden, so wurde die gesamte Zellmenge des S.O.C-Mediums durch Zentrifugation pelletiert (Biofuge, 5 min, 4800 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden im Restvolumen resuspendiert und ausplattiert.

### 3.1.3. Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers präpariert.

Für analytische Zwecke, z.B. ein Ligations-Screening, wurde der QIAprep Spin Plasmid™-Kit verwendet. Aus 3 ml Übernachtskultur konnte ca. 2-8 µg Plasmid-DNA isoliert werden. Die Isolation von Plasmid-DNA für Sequenzierungsreaktionen erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Mini™-Kit. Plasmid-DNA im präparativen Massstab wurde mit dem QIAfilter Plasmid Midi™-Kits durchgeführt (ca. 100-200 µg DNA aus 50 ml Übernachtskultur).

Die Extinktion von DNA-Lösungen wurde mit einem UV-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine  $E_{260}$  Einheit ist definiert als die Substanzmenge, die in einem Volumen von 1 ml bei einer Schichtdicke von 1 cm die Extinktion 1 ergibt. Eine  $E_{260}$  Einheit entspricht etwa 50 µg ds-DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

Die Konzentration kleinerer DNA-Mengen z.B. für die Ligation wurde über analytische Agarosegele mit Hilfe von DNA-Massenstandards abgeschätzt.

### 3.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Restriktions-Schnittstellen in der Templat-DNA wurden mit der Polymerase-Kettenreaktion eingeführt (Mullis & Faloona, 1987).

In einer Standardreaktion wurden 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>milli</sub> mit 1 µl ds-Templat-DNA (8 ng/µl), 3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 5 µl 10x *Pfu* DNA-Polymerase-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 5 µl 200 µM dNTP-Mix, 2 µl BSA-Lösung (2 mg/ml) und mit je 1 µl Primer A bzw. B (30 pg/µl) versetzt.

Analog wurde ein Negativ-Kontrollansatz hergestellt, Templat-DNA wurde durch H<sub>2</sub>O<sub>milli</sub> ersetzt.

Der PCR-Ansatz wurde 2 min bei 94 °C inkubiert und 2.5 U *Pfu* DNA-Polymerase hinzugegeben. In 25 Zyklen (siehe Tab. 3-1) wurde das DNA-Templat mit seinen neuen Restriktions-Schnittstellen amplifiziert.

**Tab. 3-1: Temperaturprogramm der Polymerase-Kettenreaktion**

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Reaktion
1	94°C	2	Denaturierung, Hot-Start
2	94°C	1	Denaturierung ds-DNA
3	50 oder 45°C	1	Anlagerung der Primer
4	72°C	1	Elongation
		25 Zyklen	
5	72°C	5	Komplettierung

Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mit dem QIAquick PCR-Purification™-Kit gereinigt und mit analytischer Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

### 3.1.5. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen der Klasse II erfolgte bei den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen. Reaktionen mit 2 Restriktionsenzymen wurden unter Reaktions- und Pufferbedingungen durchgeführt, die eine möglichst optimale Aktivität beider Enzyme gewährleisteten. 1 U ist als die Enzymmenge definiert, die bei 37 °C 1 µg λ-DNA in 1 h vollständig hydrolysiert. Für analytische Ansätze (ca. 0.5 µg Plasmid-DNA) wurde ein Volumen von 10 µl gewählt.

Der Restriktionsverdau wurde für 1 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur (i.d.R. 37°C) inkubiert.

Präparative Ansätze (ca. 10 µg Plasmid-DNA) wurden in 50 µl Volumen durchgeführt, nach Zugabe einer entsprechenden Menge an Restriktionsenzym 1 h bei 37 °C inkubiert. Um vollständige Hydrolyse zu gewährleisten, wurde nochmals ein Aliquot an Restriktionsenzym hinzugefügt und eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert.

Die Restriktionsenzyme wurden nach der Reaktion für 5 min bei 65 °C hitzedenaturiert.

### **3.1.6. Agarosegel-Elektrophorese**

Die Auftrennung von doppelsträngiger DNA zu analytischen oder präparativen Zwecken erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989). Die Agarosekonzentration (0.8-2%) der Gele richtete sich nach der Grösse der zu isolierenden DNA-Fragmente. Als Gel- und Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE-Puffer (40 mM Tris/Ac, 1 mM EDTA, pH 7.5) verwendet.

Die Proben mit 6x Probenpuffer (0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol, 30% (v/v) Glycerin) versetzt. Die Geltaschen wurden mit den Proben und einem DNA-Molekularstandard gefüllt, die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 10 V/cm für ca. 1.5 h. Anschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) für 30 min gefärbt. Der Farbstoff, der in die DNA interkalierte, wurde auf einem UV-Transilluminator ( $\lambda = 254$  nm) sichtbar und konnte mit einem Gelprint-System dokumentiert werden.

### **3.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten**

Ligationen von DNA-Fragmenten mit kohäsiven Enden, wie sie z.B. nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen vorliegen, wurden im allgemeinen mit einem Vektor:Insert-Verhältnis von 1:1 bis 1:10 durchgeführt.

In einem 10 µl Reaktionsansatz wurden 100 ng Vektor-DNA mit der entsprechenden Menge DNA-Insert versetzt und 5 min auf 45°C erwärmt. Anschließend wurde auf Eis abgekühlt und 10x Ligationspuffer (660 mM Tris/HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7.5) sowie 1 U T4 DNA-Ligase hinzugefügt.

Analog wurde ein Negativ-Kontrollansatz hergestellt, Insert-DNA wurde durch H<sub>2</sub>O<sub>milli</sub> ersetzt.

Die Ligationsansätze wurden für 1 h bei 16°C inkubiert. Die Reaktionsmischung konnte direkt zur Transformation eingesetzt werden.

### **3.1.8. DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierungsreaktion mit neuen Plasmidkonstrukten wurde nach der Didesoxy-Methode durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Hierfür wurde das ‘Taq DyeDesoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit’ eingesetzt.

Als Templat für die Reaktion diente doppelsträngige, zirkuläre Plasmid-DNA.

Die Agarosegel-Elektrophorese der Sequenzierungsprodukte wurde von Mitarbeitern der Firma *Scientific Research and Development GmbH*, Oberursel, durchgeführt.

## **3.2. Proteinchemische Methoden**

### **3.2.1. Expression der Xylanase in *E. coli***

#### *3.2.1.1. Analytische Testexpression*

Die Expressionsplasmide für die Xylanase wurden in den jeweiligen DE3-lysogenen *E. coli* BL21 Stamm transformiert. Auf einer LB-Agar-Platte (mit entsprechenden Antibiotika) wurde ein Aliquot des Transformationsansatzes über Nacht bei 37 °C inkubiert. 9 x 3 ml LB-Roller-Kulturen (mit entsprechenden Antibiotika) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis OD<sub>600</sub> ≈ 0.8 inkubiert. Es wurde je ein Aliquot von 500 µl entnommen, die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (Biofuge, 5 min, 4800 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung (ca. 8 h) bei +4 °C gelagert.

Der Rest der LB-Kulturen wurde mit 1 mM IPTG induziert und weitere 4 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Ein Negativ-Kontrollansatz wurde mitgeführt, der nicht induziert wurde.

Der Gehalt an Zielprotein wurde mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft. Der Einzelklon mit der höchsten Expressionsrate wurde für eine Expression im (semi-) präparativen Massstab verwendet.

### 3.2.1.2. Testexpression im semipräparativen Massstab

Eine 3 ml LB-Roller-Kultur (alle folgenden Schritte mit entsprechenden Antibiotika) wurde mit der besten Einzelkolonie angeimpft und bei 30 °C und 160 rpm über Nacht inkubiert. Es wurde ein Aliquot von 1 ml entnommen, die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (Biofuge, 5 min, 4800 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 100 ml LB-Medium resuspendiert und bei 37 °C in einem Schüttelkolben (mit Schikane, 160 rpm) bis  $OD_{600} \approx 0.8$  inkubiert. Die LB-Kultur wurde mit 1 mM IPTG induziert und weitere 4 h bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Sorvall, GSA, 15 min, 4800 rpm, 4 °C) gewonnen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

Die Zeit für die Expression nach Induktion wurde zwischen 4 und 16 h variiert. Es wurde ebenfalls getestet, die Expressionstemperatur auf 30 °C abzusenken.

### 3.2.1.3. Expression im präparativen Massstab

Eine 3 ml LB-Roller-Kultur (alle folgenden Schritte mit entsprechenden Antibiotika) wurde mit der besten Einzelkolonie angeimpft und bei 30 °C und 160 rpm über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (Biofuge, 5 min, 4800 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 200 ml LB-Medium resuspendiert und bei 37 °C in einem Schüttelkolben bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Sorvall, GSA, 15 min, 4800 rpm, 4 °C) gewonnen und zur Inokulation von 10 l LB-Medium verwendet. In einer Braun Fermentationsanlage wurde der Ansatz bei konstanten Bedingungen (Luftzufuhr 1200 hPa, pH 7.0, 300 rpm, 37 °C) bis  $OD_{600} \approx 0.8$  inkubiert. Die LB-Kultur wurde mit 1 mM IPTG induziert und weitere 4 h bei 37 °C inkubiert.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Beckman, JLA 8.1000, 15 min, 4800 rpm, 4 °C) gewonnen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

### **3.2.2. Isotopenanreicherung der Xylanase**

Es wurden 2 l [<sup>15</sup>N]-M9-Minimalmedium ohne Antibiotika und Kohlenstoff-Quelle vorbereitet und 50 ml wurden für eine M9-Vorkultur entnommen. Eine 3 ml LB-Roller-Kultur (alle folgenden Schritte mit entsprechenden Antibiotika) wurde mit der besten Einzelkolonie angeimpft und bei 30 °C und 160 rpm über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (Biofuge, 5 min, 4800 rpm, 4 °C). Die M9-Vorkultur wurde bis zu einer Konzentration von 0.25% (w/v) mit [<sup>13</sup>C]-Glyzerin und 0.1% mit (w/v) [<sup>13</sup>C]-Glucose versetzt. Das Zellpellet wurde darin resuspendiert und bei 37 °C in einem Schüttelkolben (mit Schikane, 160 rpm) bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Sorvall, GSA, 10 min, 4800 rpm, 4 °C) gewonnen und zur Inokulation der M9-Hauptkultur verwendet. Die entsprechenden [<sup>13</sup>C]-Nährstoffe wurden hinzugegeben und der Ansatz wurde bei 37 °C in Schüttelkolben (mit Schikane, 160 rpm) bis OD<sub>600</sub> ≈ 0.8 inkubiert. Die M9-Hauptkultur wurde mit 1 mM IPTG induziert und weitere 12 h bei 37 °C und 160 rpm inkubiert.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Beckman, JLA 8.1000, 15 min, 4800 rpm, 4 °C) gewonnen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei –80 °C gelagert.

Für eine einfach markierte [<sup>15</sup>N]-Xylanase wurde unmarkiertes Glyzerin bzw. Glucose verwendet.

### **3.2.3. Präparation der Xylanase aus *E. coli***

Alle chromatographischen Methoden wurden an einem ÄktaBasic-System von Pharmacia durchgeführt.

#### **3.2.3.1. Vorbereitungen zur Ionenaustausch-Chromatographie**

60 ml des aufgeschlammten Kationenaustausch-Materials SP Sepharose (in 50% (v/v) Ethanol) wurden abgemessen. Um feinporiges Material zu entfernen, wurde wiederholt mit 100 ml 10 mM NaOAc pH 5.2 gewaschen, sedimentiert und dekantiert. Das Säulenmaterial wurde entgast und in den Säulekörper XK 16/20 (~ 25 ml Säulenbettvolumen) gegossen.

### 3.2.3.2. Vorbereitungen zur Gelfiltration

Die gebrauchsfertige Gelfiltrations-Säule Superdex 75 26/60 (~ 300 ml Säulenbettvolumen) wurde in 50% (v/v) Ethanol gelagert. Zur Equilibrierung wurde die Säule mit 700 ml 10 mM NaOAc pH 5.2 und einer Flussrate von 0.5 ml/min bei RT gespült.

### 3.2.3.3. Isolation der Xylanase

Das Zellpellet aus 1 l *E. coli*-Kultur wurde auf Eis aufgetaut und in ca. 35 ml Puffer A (10 mM NaOAc pH 5.2) resuspendiert. Es wurde 1 mg/ml Pefabloc<sup>®</sup> SC und 0.05 mg/ml Benzoase zugesetzt. Die Zellen wurden mit einem Ultraschallhomogenisators (10 Pulse, 200 W, Schwingsonde 5 T) fein verteilt und anschließend dreimal mit einer FrenchPress behandelt. Es wurde zentrifugiert (Sorvall, SS34, 45 min, 20000 rpm, 4 °C), der Überstand wurde sterilfiltriert und mit Puffer A auf 150 ml verdünnt.

Diese lösliche Proteinfraction wurde auf die SP Sepharose Säule gegeben und mit 125 ml Puffer A, einer Flussrate von 1.5 ml/min bei RT gespült. Anschließend wurde bei gleichen Flussbedingungen die Ionenkonzentration innerhalb von 275 ml auf 30% Puffer B angehoben (10 mM NaOAc pH 5.2, 600 mM NaCl). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde bei  $\lambda = 280$  nm detektiert.

Die Hauptfraktion (~ 50 ml) wurde bei RT auf 12 ml eingengt. Jeweils 5 ml der gewonnenen Fraktion wurden auf eine Gelfiltrations-Säule Superdex 75 26/60 gegeben und mit 0.6 ml/min Puffer A (10 mM NaOAc pH 5.2) bei RT eluiert. Es wurde bei  $\lambda = 280$  nm detektiert.

Die vereinigten Eluate (~ 30 ml) wurden bei RT auf eine Proteinkonzentration von 1.5 - 2 mM Xylanase eingengt.

### 3.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde zur Analyse der Homogenität von Xylanase-Proben verwendet (Laemmli, 1970).

### Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele

Die Elektrophorese wurde in einer Mini-Protean II-Gelelektrophorese Apparatur durchgeführt. Die Zusammensetzung des 12.5%igen Trenngels und des 4%igen Sammelgels sind der folgenden Tabelle 2-2 zu entnehmen, die angegebenen Volumina beziehen sich auf zwei Minigele (Dicke 1 mm):

**Tab. 3-2: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel der diskontinuierlichen SDS-PAGE**

	Sammelgel (4%)	Trenngel (12.5%)
H <sub>2</sub> O <sub>milli</sub>	2.6 ml	1.45 ml
87% (v/v) Glycerin	-	1 ml
1.5 M Tris/HCl, pH 8.8	-	2.5 ml
0.5 M Tris/HCl, pH 6.8	1.25 ml	-
30% Acrylamid/ 0.8% Bisacrylamid	0.65 ml	4 ml
1% (w/v) SDS	0.5 ml	1 ml
TEMED	10 µl	25 µl
10% (w/v) APS	25 µl	50 µl

Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8,3.

### Probenvorbereitung zur Analyse des Gesamtproteingehalts

20 µl einer *E. coli* Zellkultur wurden mit 5 µl 5x SDS-Probepuffer versetzt (250 mM Tris/HCl, 50% (v/v) Glycerin, 7.5 g/l SDS, 0.5 mg/ml Bromphenolblau, pH 8.0; 20 mM β-Mercaptoethanol) und für 10 min bei 95°C inkubiert.

### Probenvorbereitung der löslichen bzw. unlöslichen Proteinfraction

Die Zellen aus 1.5 ml *E. coli* Zellkultur wurden in 200 µl TE-Puffer resuspendiert und mit einem Ultraschall-Homogenisator (3 x 10 Pulse, 20 W, Schwingsonde 12T) aufgeschlossen. Es wurde zentrifugiert (Biofuge, 15 min, 13000 rpm, 4 °C), 20 µl des Überstandes wurden mit 5x SDS-Probepuffer versetzt und analog hitzedenaturiert. Die unlösliche Proteinfraction des Pellets wurde in 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>milli</sub> homogenisiert. Analog wurden 20 µl dieser Fraktion für den Probenauftrag vorbereitet.

### Durchführung der Gelelektrophorese

Die Geltaschen wurden mit den Proben und einem Protein-Molekularstandard gefüllt, die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V für 12 min und anschließend bei 200 V für 42 min.

Das Trenngel wurde in eine Färbelösung (0.1% PhastGel<sup>®</sup> Blue R, 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) HAc) überführt, für 3 min erhitzt und dann für weitere 15 min in der Färbelösung inkubiert. Der überschüssige Farbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen in Entfärbelösung (40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) HOAc, 5% (v/v) Glycerin) entfernt. Anschließend wurden die Gele getrocknet und dokumentiert.

### 3.2.5. Konzentrationsbestimmung

Die Extinktion einer Xylanase-Lösung wurde mit einem UV-Spektralphotometer zwischen  $\lambda = 240$  und  $360$  nm gemessen. Mit dem Spektrum wurde die Reinheit überprüft und aus dem Lambert-Beerschen-Gesetz  $E = \epsilon_{280, \text{theo}} \cdot c \cdot d$  wurde die Konzentration bestimmt. Die theoretischen Extinktionskoeffizienten (Tab. 3-3) wurde als Summe der Extinktionen der einzelnen Aminosäuren errechnet (Sambrook *et al.*, 1989).

**Tab. 3-3: Die theoretischen Extinktionskoeffizienten der Xylanase**

$\lambda$ [cm <sup>-1</sup> ]	276	278	279	280	282
Ext. Koeffizient [mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	56.65	57.40	57.11	56.47	54.80

### 3.2.6. Optimierung der Pufferbedingungen für die pH-Titration

Die Löslichkeit der Xylanase ist pH-abhängig. Ab einem pH-Wert  $> 5.6$  fällt die Konzentration einer Xylanase-Lösung (1 mM Xylanase in 10 mM NaOAc pH 5.2) zunehmend unter 0.1 mM. Es wurden Vortests durchgeführt, die optimale Pufferbedingungen geeignet für die NMR-Spektroskopie ermöglichen sollten. In einem Endvolumen von 25  $\mu$ l wurde eine 100 mM Pufferlösung (pH 3.0 und 8.2) mit unterschiedlichen Zusätzen (25-50 mM, Tab. 3-4) kombiniert. Zu diesem Ansatz wurden 25  $\mu$ l Xylanase-Lösung (10 mM NaOAc pH 5.2) gegeben, 5 min bei 40 °C, dann bei RT über Nacht inkubiert. Als Blindwert wurden 25  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>milli</sub> mit 25  $\mu$ l Xylanase-Lösung versetzt und analog inkubiert.

**Tab. 3-4: Kombinationen Puffer - Zusätze**

Puffer	Zusatz										
	LiCl	NaCl	KCl	MgCl <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Glycerin	Ethandiol	CHAPS	Glycin	Arginin	Betaine
Acetat	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Tris/HCl	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Phosphat	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Borsäure		x	x	x	x				x	x	
CAPS		x	x	x	x				x	x	
MOPS		x	x	x	x				x	x	
HEPES		x	x	x	x				x	x	

Es wurde zentrifugiert (Biofuge, 15 min, 13000 rpm, RT), 5 - 20 µl des Überstandes wurden auf 1 ml verdünnt. Ein UV-Spektrum wurde aufgenommen und die Konzentration wurde aus der Extinktion bei  $\lambda = 280$  nm bestimmt.

Von den besten Zusätzen Glycerin, MgCl<sub>2</sub>, CHAPS und Arginin wurden alle Permutationen unter systematischer Verringerung der Konzentrationen getestet.

### 3.3. Charakterisierung der enzymatischen Aktivität

#### 3.3.1. Bestimmung der relativen Aktivität der Xylanase

##### 3.3.1.1. Relative Aktivität aufgereinigter Xylanase

Die relative Aktivität der Xylanase wurde photometrisch durch die Freisetzung eines an Xylan gebundenen Farbstoffs Remazol Brilliant Blue R (RBB) gemessen.

0.5 ml RBB-xylan-Lösung (5.75 mg/ml in 10 mM NaOAc pH 5.2, 50 mM NaCl) wurden auf 30 °C temperiert und mit 10 µl einer 0.01 mM Xylanase-Lösung (10 mM NaOAc pH 5.2, 50 mM NaCl) versetzt. Es wurde 60 min bei 50 °C inkubiert und die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 96 % (v/v) Ethanol beendet. Überschüssiges Substrat präzipitierte durch weitere Inkubation für 30 min bei RT. Es wurde zentrifugiert (Biofuge, 15 min, 13000 rpm, RT) und die Extinktion des Überstandes wurde bei 595 nm gemessen. Der Blindwert wurde durch eine analoge Reaktion bestimmt, bei der die Enzymlösung durch H<sub>2</sub>O<sub>milli</sub> ersetzt wurde. Es wurden jeweils 10 Messungen durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Die relative Aktivität wurde durch Normierung auf die höchste Extinktion an freigesetztem Farbstoff errechnet.

### 3.3.1.2. Konzentrationsabschätzung exprimierter Xylanase durch relative Aktivität

Die Zellen aus 3 ml *E. coli* Zellkultur wurden in 300 µl TE-Puffer resuspendiert und mit einem Ultraschall-Homogenisator (3 x 10 Pulse, 20 W, Schwingsonde 12T) aufgeschlossen. Es wurde zentrifugiert (Biofuge, 15 min, 13000 rpm, 4 °C), 200 µl des Überstandes wurden mit 500 µl RBB-xylan-Lösung versetzt. Analog wie unter 3.3.1.1 beschrieben wurde die Freisetzung des Farbstoffs photometrisch bestimmt.

Als Bezug diente die relative Aktivität einer LB-Kultur, die im Anschluss präparativ aufgereinigt wurde. Die Proteinmenge wurde quantifiziert und auf die gemessene OD<sub>595nm</sub> bezogen. Da die Löslichkeit von RBB-Xylan stark von der Hintergrundmatrix abhängig ist und die Proteinmenge zur Quantifizierung aus mehreren Arbeitsschritten hergestellt worden war, stellt die photometrische Bestimmung der Expressionsrate *nur eine Abschätzung* dar.

### 3.3.2. pH-Abhängigkeit der relativen Xylanase-Aktivität

Die pH-Abhängigkeit der relativen Xylanase-Aktivität wurde durch eine analoge Reaktion bestimmt, nur die Pufferbedingungen für den entsprechenden pH-Wert wurden variiert (Tab. 3-5).

**Tab. 3-5: Pufferbedingungen zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Xylanase-Aktivität**

pH-Bereich	Puffer
3.0 – 5.0	20 mM Bernsteinsäure, 50 mM NaCl
5.0 – 7.0	20 mM MES, 50 mM NaCl
7.0 – 8.5	20 mM HEPES, 50 mM NaCl

Es wurden jeweils 5 Messungen pro pH-Schritt durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

### 3.4. NMR-Experimente

Die sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen titrierbarer Gruppen ist eine notwendige Voraussetzung, um die pH-Abhängigkeit der Signale verfolgen zu können.

Xylanase aus *B. agaradhaerens* wurde  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiert (Fogh *et al.*, 1994; Remeroski *et al.*, 1994), um heteronukleare zwei- bzw. drei-dimensionale Spektren aufnehmen zu können. Gegenüber einer einfach markierten  $^{15}\text{N}$ -Probe ergibt sich der Vorteil, dass überlagerte Resonanzen in die zusätzliche  $^{13}\text{C}$ -Dimension ‚gespreizt‘ werden (Griesinger *et al.*, 1987; Griesinger *et al.*, 1989; Kay *et al.*, 1990; Vuister *et al.*, 1988). Werden Magnetisierungstransfers im Rahmen von NOESY- und TOCSY-Experimenten verwendet, so ist die Effizienz stark von der Sekundärstruktur (Diederwinkel vicinaler Atome) abhängig. Mit einem doppelt markiertem Protein können Magnetisierungstransfers über  $^1\text{J}$ -Kopplungen verwendet werden. Dies hat zwei Vorteile: Unabhängigkeit von der Sekundärstruktur und kürzere Mischzeiten für den optimalen Transfer, da  $^1\text{J}$ -Kopplungen deutlich größer als  $^3\text{J}$ -Kopplungen sind. Besonders bei größeren Proteinen (Xylanase: 23kDa) mit ungünstigen Relaxationseigenschaften verbessert sich die Empfindlichkeit der NMR-Experimente.

#### 3.4.1. Allgemeine Bedingungen

Für NMR-Experimente wurde die Proteinlösung bei RT auf 95%  $\text{H}_2\text{O}$  / 5%  $\text{D}_2\text{O}$  (v/v) mit 10 mM perdeutertem NaOAc, pH 5.2 und einer Endkonzentration von 1.5 mM Xylanase umgepuffert. Es wurde 0.01% Pefabloc<sup>®</sup> SC (w/v) zur Proteaseinhibition, 0.05%  $\text{NaN}_3$  (w/v) zur Konservierung und 0.05 mM DSS als interner Standard hinzugefügt.

Die Aufnahme der Spektren erfolgte an den Spektrometern des Typs DMX500 bzw. DMX600 (Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten) bei einer Temperatur von 30°C. Die Spektrometer waren mit Tripelresonanz-Probenköpfen  $^1\text{H}\{^{13}\text{C}^{15}\text{N}\}$  mit XYZ-Gradientenkapazität ausgestattet. In allen Experimente wurden heteronukleare Gradientenechos zur Wasser- und Artefaktunterdrückung in Verbindung mit kohärenzselektiven Rücktransfers auf Protonen verwendet (Cavanagh & Rance, 1990; Cavanagh & Rance, 1993; Sattler *et al.*, 1995; Schleucher *et al.*, 1993). Die Prozessierung der NMR-Spektren erfolgte mit dem Programm XWINNMR 2.1 (Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten). Vor der Fourier-

Transformation wurde der FID mit leeren Adressen erweitert, in der Regel wurden die entsprechenden Dimensionen mit einer Sinusquadrat-Funktion multipliziert. Eine anschließende Basislinienkorrektur erfolgte in der  $\omega_2$ - (bzw.  $\omega_3$ -) Dimension mit einem Polynom höherer Ordnung. Die Auswertung wurde an LINUX-Rechnern mit der Software PRONTO (v.19990506, Kjaer *et al.*, 1994) und NMR2VIEW 5.0.4 (Merck and Co., INC, New Jersey, USA) durchgeführt.  $^1\text{H}$  Resonanzpositionen wurden mit internem DSS kalibriert, während die  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$  chemischen Verschiebungen indirekt referenziert wurden, indem über die absoluten Frequenzwerte umgerechnet wurde (Wishart *et al.*, 1995).

### 3.4.2. Sequentielle Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrats

#### 3.4.2.1. HNCO

Im HNCO-Experiment (Grzesiek & Bax, 1992; Kay *et al.*, 1991; Kay *et al.*, 1990; Kay *et al.*, 1994; Powers *et al.*, 1991) erhält man eine Korrelation zwischen  $\text{H}^{\text{N}}(i)$ ,  $\text{N}(i)$  und dem Carbonyl-Atom  $\text{C}'(i-1)$  der vorhergehenden Aminosäure (Schema: siehe Abb. 4-12, S. 61).

Die Magnetisierung wird auf  $\text{H}^{\text{N}}$  angeregt und über zwei Polarisations-transfer-Schritte auf  $^{15}\text{N}$  und von dort auf das  $\text{C}'(i-1)$ -Atom übertragen. Nach einer Evolutionszeit ( $t_2$ ) der Carbonyl-kohlenstoffresonanzen erfolgt der Rücktransfer auf das Stickstoffatom mittels eines weiteren Polarisations-transfer-Schrittes. Nach einer *constant-time* Evolutionszeit ( $t_3$ ) wird die Magnetisierung mit einem kohärenzselektiven Rücktransfer auf die Amidprotonen übertragen und dort detektiert ( $t_1$ ).

#### 3.4.2.2. (HCA)CO(CA)NH

Zusätzlich zu der Information aus dem HNCO erhält man im (HCA)CO(CA)NH-Experiment eine Korrelation zwischen  $\text{H}^{\text{N}}(i)$ ,  $\text{N}(i)$  und den Carbonyl-Atomen der *eigenen*  $\text{C}'(i)$  wie auch der vorhergehenden Aminosäure  $\text{C}'(i-1)$  (Schema: siehe Abb. 4-12, S. 61).

Die Magnetisierung wird beginnend mit dem  $\text{H}^{\alpha}$  in einem INEPT-Schritt auf das  $\text{C}^{\alpha}$  transferiert. Ein weiterer Polarisations-transfer-Schritt überträgt die Magnetisierung auf die  $\text{C}'(i-1)$  und  $\text{C}'(i)$  Atome, da die beiden  $^1\text{J}(\text{C}^{\alpha}(i), \text{C}'(i))$ - und  $^2\text{J}(\text{C}^{\alpha}(i), \text{C}'(i-1))$ -Kopplungen ähnlich

groß sind (7 bzw. 11 Hz). Nach dem Rücktransfer über N mit *constant-time* Evolutionszeit wird die Magnetisierung in einem COS-INEPT-Schritt auf das  $H^N$  übertragen und dort detektiert.

Der Vorteil dieses Experiments liegt in der Kombination mit dem HNCO. Werden entsprechende  $^{15}N$ -Ebenen beider Spektren gleichzeitig ausgewertet (siehe Abb. 4-12, S. 61), so ergibt sich eine bessere Übersicht während der Zuordnung der Proteinrückgratresonanzen.

### 3.4.2.3. HNCACB

In Analogie zum (HCA)CO(CA)NH-Experiment erfolgt der Transfer im HNCACB (Muhandiram & Kay, 1994; Wittekind & Mueller, 1993) zur eigenen als auch zu der vorhergehenden Aminosäure. Man erhält maximal 4 Signale, die die Resonanzen  $H^N(i)$  und  $N(i)$  mit den aliphatischen Kohlenstoffresonanzen  $C_\alpha(i)$ ,  $C_\beta(i)$ ,  $C_\alpha(i-1)$ , und  $C_\beta(i-1)$  korrelieren (Schema: siehe Abb. 4-12, S. 61).

Zu Beginn wird die Magnetisierung der  $C_\alpha$ ,  $C_\beta$ -Atome über den Transfer  $H^N \rightarrow N \rightarrow C_\alpha, C_\beta$  angeregt. Man bezeichnet diese Art der Experimente als ‚*out-and-back*‘ (Archer *et al.*, 1991), im Gegensatz im konventionellen CBCANH- Experiment (Grzesiek & Bax, 1992), das mit der Anregung der Magnetisierung aliphatischer Protonen beginnt, die dann auf  $C_\alpha$  und  $C_\beta$  übertragen wird. In beiden Verfahren werden nach einer Evolutionszeit ( $t_2$ ) die Transferwege  $C_\beta \rightarrow C_\alpha$  und  $C_\alpha \rightarrow C_\alpha$  selektiert. Es folgen zwei Polarisations-transfer-Schritte, in denen die Magnetisierung auf den Amidstickstoff der eigenen ( $^1J_{C_\alpha,N}$ ) und der benachbarten Aminosäure ( $^2J_{C_\alpha,N}$ ) übertragen wird. Dort wird die chemische Verschiebung während einer weiteren Zeit ( $t_3$ ) evolviert. Mit einem kohärenzselektiven Rücktransfer wird die Magnetisierung auf die Amidprotonen übertragen und dort detektiert.

### 3.4.2.4. Übersicht über die Parameter der NMR-Zuordnung des Proteinrückgrats

**Tab. 3-6: Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente**

*Punkte aufgen.* : tatsächliche Anzahl der Punkte während der Datenakquisition;  
*Punkte transform.*: Grösse der prozessierten Daten; Spektrometer DMX 500  
 entspricht 500 MHz ( $^1\text{H}$ ), 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 50 MHz ( $^{15}\text{N}$ ).

Kern	Punkte aufgen.	Spektrale Weite [Hz]	Punkte transform.	Lineare Vorhersage	Apodisierung	Digitale Auflösung [Hz / Pkt]
<b>HNCO</b>					Spektrometer: DMX 500	
t1( $^1\text{H}$ )	1024	6562	512	-	(sin) <sup>2</sup>	12.8
t2( $^{13}\text{C}$ )	160	1572	256	128 → 200	(sin) <sup>2</sup>	3.9
t3( $^{15}\text{N}$ )	192	1825	256	128 → 252	(sin) <sup>2</sup>	3.6
<b>(HCA)CO(CA)NH</b>					Spektrometer: DMX 500	
t1( $^1\text{H}$ )	1024	6614	512	-	(sin) <sup>2</sup>	6.5
t2( $^{13}\text{C}$ )	72	1572	128	64 → 92	(sin) <sup>2</sup>	8.5
t3( $^{15}\text{N}$ )	144	1634	256	128 → 252	(sin) <sup>2</sup>	4.3
<b>HNCACB</b>					Spektrometer: DMX 500	
t1( $^1\text{H}$ )	1024	6562	512	-	(sin) <sup>2</sup>	6.4
t2( $^{13}\text{C}$ )	160	7246	256	128 → 192	(sin) <sup>2</sup>	18.9
t3( $^{15}\text{N}$ )	152	1634	256	128 → 256	(sin) <sup>2</sup>	3.2

(vgl. Abb. 4-12, S. 61)

### 3.4.3. Zuordnung der Resonanzen der Seitenketten

#### 3.4.3.1. HBHACONH

Im HBHACONH-Experiment (Grzesiek & Bax, 1993a) werden die Resonanzen der aliphatischen Protonen  $\text{H}_\alpha(i-1)/\text{H}_\beta(i-1)$  mit den Backbone-Amiden der nachfolgenden Aminosäure  $\text{H}^{\text{N}}(i)$  und  $\text{N}(i)$  korreliert (Schema: siehe Abb. 4-14, S. 62).

Zuerst wird die transversale  $\text{H}^\alpha$ - und  $\text{H}^\beta$ -Magnetisierung angeregt, die in einer *semi-constant-time* Periode evolviert (Grzesiek & Bax, 1993a; Logan *et al.*, 1993). Danach wird diese auf die entsprechenden  $\text{C}^\alpha$ - und  $\text{C}^\beta$ -Atome übertragen. Der restliche Teil des HBHACONH-

Experiment ist analog dem konventionellen CBCANH- Experiment, das in Kap. 3.4.2.3 beschrieben wurde.

### 3.4.3.2. (H)CC(CO)NH und H(CC)(CO)NH

Durch homonukleare C,C-TOCSY-Experimente (Cavanagh & Rance, 1990; Clowes *et al.*, 1993; Montelione *et al.*, 1992) wurden Resonanzen *aller* aliphatischer Seitenketten-Kohlenstoffe mit den Amidprotonen der nachfolgenden Aminosäure korreliert (Schema: siehe Abb. 4-14, S. 62). Dies stellt einen Informationsgewinn gegenüber dem HNCACB dar, da hier nur die Resonanzen der C $_{\alpha}$ /C $_{\beta}$ -Atome zugeordnet werden können.

Die Empfindlichkeit während des TOCSY-Transfers ist geringer, da die Magnetisierung über das gesamte Spinssystem verteilt wird und nur ein kleiner Teil auf den C $_{\alpha}$ -Kern übertragen wird. Darüber hinaus ist es schwierig, eine optimale Mischzeit der C $_{\text{aliph}}$ →C $_{\alpha}$ -Transfers für alle Kopplungstopologien der verschiedenen Aminosäuren zu finden (Eaton *et al.*, 1990). Anschließend wird die Magnetisierung der C $_{\alpha}$ -Atome durch drei Polarisations-transfer-Schritte von C $_{\alpha}$ →C', von C'→N (Evolutionszeit t $_3$ ) und von N→H $^{\text{N}}$  übertragen, die dann detektiert werden.

In Analogie wird im H(CC)(CO)NH-Experiment die chemische Verschiebung auf den aliphatischen Protonen evolviert anstelle der aliphatischen Kohlenstoffe im (H)CC(CO)NH. Vergleicht man dieses Experiment mit dem HBHACONH, so kann man zwischen den H $_{\alpha}$ /H $_{\beta}$  und den restlichen aliphatischen Protonen unterscheiden.

### 3.4.3.3. Übersicht der Parameter der Seitenketten-Zuordnung

**Tab. 3-7: Akquisitions- und Prozessierungsparameter**

*Punkte aufgen.* : tatsächliche Anzahl der Punkte während der Datenakquisition;  
*Punkte transform.*: Grösse der prozessierten Daten; Spektrometer DMX 500  
 entspricht 500 MHz ( $^1\text{H}$ ), 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 50 MHz ( $^{15}\text{N}$ ).

Kern	Punkte aufgen.	Spektrale Weite [Hz]	Punkte transform.	Lineare Vorhersage	Apodisierung	Digitale Auflösung [Hz / Pkt]
<b>HBHACONH</b>						Spektrometer: DMX 500
t1( $^1\text{H}$ )	1024	6614	512	-	(sin) <sup>2</sup>	6.5
t2( $^1\text{H}$ )	103	3226	256	128 → 136	(sin) <sup>2</sup>	11.9
t3( $^{15}\text{N}$ )	144	1634	256	128 → 288	(sin) <sup>2</sup>	2.8
<b>(H)CC(CO)NH</b>						Spektrometer: DMX 500
t1( $^1\text{H}$ )	1024	6611	512	-	(sin) <sup>2</sup>	6.5
t2( $^{13}\text{C}$ )	144	8166	256	128 → 136	(sin) <sup>2</sup>	21.3
t3( $^{15}\text{N}$ )	128	1627	256	128 → 192	(sin) <sup>2</sup>	4.2
<b>H(CC)(CO)NH</b>						Spektrometer: DMX 500
t1( $^1\text{H}$ )	1024	6611	512	-	(sin) <sup>2</sup>	6.5
t2( $^1\text{H}$ )	184	3856	256	128 → 220	(sin) <sup>2</sup>	8.8
t3( $^{15}\text{N}$ )	116	1627	256	128 → 180	(sin) <sup>2</sup>	4.5

(vgl. Abb. 4-14, S. 62 und Abb. 4-16, S.63)

### 3.4.4. Zuordnung der Seitenketten-Carboxylat- $^{13}\text{C}$ -Resonanzen

Die  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen der Seitenketten-Carboxylatgruppen wurden zugeordnet und mit dem aliphatischen Teil der Seitenketten sequenzspezifisch verknüpft.

#### 3.4.4.1. CT-H(CA)CO

Das ursprüngliche CT-HCACO-Experiment (Grzesiek & Bax, 1993b; Powers *et al.*, 1991) wurde modifiziert (Yamazaki *et al.*, 1994), um die Korrelationen zwischen den aliphatischen  $\text{H}^{\beta/\beta'}$ -Protonen (für Asx, bzw. für Glx:  $\text{H}^{\gamma/\gamma'}$ ) und dem Seitenketten-Carboxyl-Atom  $\text{C}^{\gamma}$  (bzw.

$C^\delta$ ) zu erhalten (Schema: siehe Abb. 4-18, S. 64). Da die Resonanzen der  $H^{\beta/\beta'}$ -Protonen in den Seitenketten-TOCSY-Experimenten zugewiesen wurden, vervollständigt dieses Experiment die Zuordnung der sauren Aminosäuren.

Die Magnetisierung wird auf den diastereotopen  $H^{\beta/\beta'}/H^{\gamma/\gamma'}$  angeregt und über ein INEPT-Schritte auf das entsprechende aliphatische  $C^{\beta/\gamma}$ -Atom übertragen. Mit einer Evolutionszeit ( $t_2$ ) erfolgt ein Transfer auf das benachbarte Carboxyl- $C^{\gamma/\delta}$ -Atom, um von dort -in umgekehrter Reihenfolge - wieder die  $H^{\beta/\beta'}/H^{\gamma/\gamma'}$ -Protonen zu erreichen. Diese werden dann detektiert ( $t_1$ ).

In der ,CT'-Version des H(CA)CO-Experiments wird die transversale  $C^{\beta/\gamma}$ -Magnetisierung in einer *constant-time* Periode aufrecht erhalten.

#### 3.4.4.2. Übersicht der NMR-Parameter für Seitenketten-Carboxylat-Experimente

**Tab. 3-8: Akquisitions- und Prozessierungsparameter**

*Punkte aufgen.* : tatsächliche Anzahl der Punkte während der Datenakquisition;  
*Punkte transform.*: Grösse der prozessierten Daten; Spektrometer DMX 500 entspricht 500 MHz ( $^1H$ ), 125 MHz ( $^{13}C$ ), 50 MHz ( $^{15}N$ ).

Kern	Punkte aufgen.	Spektrale Weite [Hz]	Punkte transform.	Lineare Vorhersage	Apodisierung	Digitale Auflösung [Hz / Pkt]
CT-H(CA)CO				Spektrometer: DMX 500		
t1( $^1H$ )	768	4735	1024	-	(sin) <sup>2</sup>	4.6
t2( $^{13}C$ )	196	3787	512	-	(sin) <sup>2</sup>	7.4

(vgl. Abb. 4-18, S. 64)

#### 3.4.5. Zuordnung der Resonanzen der Histidinseitengruppe

Die zuvor beschriebenen Experimente erlauben eine komplette Zuordnung der Backbone-Resonanzen und die der aliphatischen Seitenketten. Für die pH-Titration war es aber notwendig, die Resonanzen der Histidinseitengruppen zuzuordnen und sie mit den aliphatischen

Teil der Seitenkette sequenzspezifisch zu verknüpfen. In den folgenden Experimenten werden teilweise auch Tryptophan-Resonanzen detektiert, da sich Korrelationen in beiden heteroaromatischen Systemen gleichen.

#### 3.4.5.1. 3D HCN

Im 3D HCN-Experiment (Sudmeier *et al.*, 1996) werden zwei Korrelationswege aufgebaut. Einerseits wird  $H^{\delta 2}$  mit  $C^{\delta 2}$  und  $N^{\epsilon 2}$  korreliert, andererseits  $H^{\epsilon 1}$  mit  $C^{\epsilon 1}$  und  $N^{\epsilon 2}/N^{\delta 1}$ . Mit einem Experiment können somit alle Resonanzen ausser der des  $C^{\gamma}$  im Imidazolring zugeordnet werden (Schema: siehe Abb. 4-21, S. 66).

Die Magnetisierung wird auf den  $H^{\delta 2}/H^{\epsilon 1}$  angeregt und über zwei Polarisationstransfer-Schritte auf das entsprechende Kohlenstoffatom (Evolutionszeit  $t_2$ ) bzw. von dort weiter auf die benachbarten  $N^{\epsilon 2}/N^{\delta 1}$ -Atome übertragen. Nach einer Evolutionszeit ( $t_3$ ) auf den Stickstoff erfolgt der Rücktransfer in umgekehrter Richtung, die  $H^{\delta 2}/H^{\epsilon 1}$ -Protonen werden detektiert ( $t_1$ ).

#### 3.4.5.2. 2D [ $^{15}N, ^1H$ ]-TROSY-HNC<sup>ar</sup>

Mit dem [ $^{15}N, ^1H$ ]-TROSY-HNC<sup>ar</sup>-Experiment können aromatische Kohlenstoffresonanzen zugeordnet werden, die zu den Imidazol- bzw. Indol-Stickstoffen über eine  $^1J_{N_{Car}}$ -Spin-Kopplung benachbart sind (Schema: siehe Abb. 4-16, S. 65).

In seinem Prinzip ist das [ $^{15}N, ^1H$ ]-TROSY-HNC<sup>ar</sup> dem HNCO-Experiment (siehe Kap. 3.4.2.1, S. 30) ähnlich, nur die  $^{13}C$ -Carrier-Frequenz wird im aromatischen Bereich positioniert.

#### 3.4.5.3. [ $^{13}C, ^1H$ ]-TROSY-H(CDCG)CB

Das [ $^{13}C, ^1H$ ]-TROSY-H(CDCG)CB-Experiment (Löhr *et al.*, 2002) verknüpft sequenzspezifisch die Resonanzen des Heteroaromaten mit dem aliphatischen Teil der Seitenkette. Es

erfolgt eine Korrelation zwischen dem aromatischen  $^1\text{H}^{\delta 2}$ -Proton und dem aliphatischen  $\text{C}^{\beta}$ -Kohlenstoff (Schema: siehe Abb. 4-21, S. 66).

Um an Empfindlichkeit zu gewinnen wird, wird in der Pulssequenz langsam relaxierende  $^1\text{H}$ -gekoppelte  $^{13}\text{C}$  Magnetisierung nach der TROSY-Methode (Pervushin *et al.*, 1997) selektiert. Zu Beginn wird die Magnetisierung auf dem  $\text{H}^{\delta 2}$  angeregt und mit einem INEPT-Schritt auf das  $\text{C}^{\delta 2}$  übertragen. Es folgen zwei weitere Transfer-Schritte über je eine Bindung zum intra-residualen  $\beta$ -Kohlenstoff:  $\text{C}^{\delta 2} \rightarrow \text{C}^{\gamma}$  und  $\text{C}^{\gamma} \rightarrow \text{C}^{\beta}$ . Die Evolutionszeit ( $t_2$ ) auf den  $\beta$ -Kohlenstoff wird zur Aufnahme der chemischen Verschiebung nach der HMQC-Methode benutzt (Bax *et al.*, 1983; Bendall *et al.*, 1983). Es erfolgt ein Rücktransfer auf die  $\delta$ -Protonen ( $t_1$ ), wobei ein Kohärenztransfer über eine Selektion des Spinzustandes ( $\text{S}^3\text{CT}$ ) erfolgt.

#### 3.4.5.4. Übersicht über die Parameter der Zuordnung der Histidinresonanzen

**Tab. 3-9: Akquisitions- und Prozessierungsparameter**

*Punkte aufgen.* : tatsächliche Anzahl der Punkte während der Datenakquisition;  
*Punkte transform.*: Grösse der prozessierten Daten; Spektrometer DMX 500 entspricht 500 MHz ( $^1\text{H}$ ), 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 50 MHz ( $^{15}\text{N}$ ).

Kern	Punkte aufgen.	Spektrale Weite [Hz]	Punkte transform.	Lineare Vorhersage	Apodisierung	Digitale Auflösung [Hz / Pkt]
<b>3D HCN</b>				Spektrometer: DMX 500		
$t_1(^1\text{H})$	768	4735	512	-	$(\sin)^2$	9.2
$t_2(^{13}\text{C})$	72	3030	128	64 $\rightarrow$ 96	$(\sin)^2$	15.8
$t_3(^{15}\text{N})$	272	5573	512	256 $\rightarrow$ 320	$(\sin)^2$	8.7
<b>2D [<math>^{15}\text{N}</math>, <math>^1\text{H}</math>]-TROSY-HNC<sup>ar</sup></b>				Spektrometer: DMX 500		
$t_1(^1\text{H})$	1024	8013	512	-	$(\sin)^2$	15.6
$t_2(^{13}\text{C})$	36	1613	128	-	$(\sin)^2$	12.6
<b>[<math>^{13}\text{C}</math>, <math>^1\text{H}</math>]-TROSY-H(CDCG)CB</b>				Spektrometer: DMX 500		
$t_1(^1\text{H})$	768	4735	512	-	$(\sin)^2$	9.2
$t_2(^{13}\text{C})$	32	1562	128	64 $\rightarrow$ 40	$(\sin)^2$	19.5

### **3.4.6. Vorhersage der Sekundärstruktur: „Chemical shift index“ (CSI)**

Im entfalteten Zustand eines Proteins werden charakteristische Werte der einzelnen Aminosäureresonanzen beobachtet. Nur Wechselwirkungen mit den direkten Nachbarn in der Peptidkette bzw. mit dem Lösungsmittel sind zu erwarten. Diese Werte können durch Messungen an entfalteten Modellpeptiden tabelliert werden. Eine geordnete Sekundärstruktur verändert die chemischen Verschiebungen z.B. über die Torsionswinkel  $\phi/\psi$  des Proteinrückgrats (siehe Kap. 3.5.3, S. 48). Außerdem treten zusätzliche Wechselwirkungen über größere Distanz auf, da durch die Sekundärstrukturelemente Wasserstoffbrücken gebildet werden. Es verschieben sich z.B.  $C^\alpha$  und CO Resonanzen zu tieferem Feld, wenn sie sich in einer  $\alpha$ -Helix befinden. Umgekehrt erfolgt eine Verschiebung dieser Resonanzen zu höherem Feld, wenn die Aminosäure Teil eines  $\beta$ -Faltblattes ist. Wishart & Sykes (1994) werteten Daten statistisch aus, in denen Proteinresonanzen sowohl zugeordnet worden waren, als auch die Kristallstruktur bekannt war. Es ergab sich ein Algorithmus (Programm CSI, Version 1.0), der eine Vorhersage der Sekundärstruktur aus den Werten der chemischen Verschiebung der  $^1H^\alpha$ ,  $C^\alpha$ ,  $C^\beta$  and CO Resonanzen erlaubt.

### **3.4.7. Bestimmung einer vorläufigen Lösungsstruktur**

Wichtigste Parameter zur Bestimmung von Lösungsstrukturen sind die Abstandsbeschränkungen, die durch die Auswertung von  $^1H$ - $^1H$ -NOEs in 2D NOESY-Spektren erhalten werden. Mit zunehmender Molekülgröße treten in den Spektren mehr und mehr Überlagerungen auf. Eine eindeutige Auswertung der NOEs wird dadurch erschwert und weniger interatomare Abstände können bestimmt werden, die als *restraints* für eine Strukturrechnung verwendet werden. Eine Verbesserung der Auflösung lässt sich durch heteronukleare Korrelationen in einer weiteren Dimension erreichen (Fesik & Zuiderweg, 1988; Ikura *et al.*, 1990; Marion *et al.*, 1989; Zuiderweg & Fesik, 1989). Es wurde ein 3D NOESY- $[^{15}N, ^1H]$ -HSQC aufgenommen (Parameter siehe Tab. 3-10), das einer Kombination des homonuklearen 2D-NOESY-Experiments mit einem  $[^{15}N, ^1H]$ -HSQC entspricht.

**Tab. 3-10: Akquisitions- und Prozessierungsparameter**

*Punkte aufgen.* : tatsächliche Anzahl der Punkte während der Datenakquisition;  
*Punkte transform.*: Grösse der prozessierten Daten; Spektrometer DMX 600  
entspricht 600 MHz ( $^1\text{H}$ ), 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 60 MHz ( $^{15}\text{N}$ ).

Kern	Punkte aufgen.	Spektrale Weite [Hz]	Punkte transform.	Lineare Vorhersage	Apodisierung	Digitale Auflösung [Hz / Pkt]
3D NOESY- $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC				Spektrometer: DMX 600		
t1( $^1\text{H}$ )	1536	8170	512	-	(sin) <sup>2</sup>	16.0
t2( $^1\text{H}$ )	272	8170	256	128 → 352	(sin) <sup>2</sup>	11.6
t3( $^{15}\text{N}$ )	148	1953	256	128 → 352	(sin) <sup>2</sup>	2.8

Die aus dem 3D NOESY- $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC gewonnenen NOE-Abstandsbeschränkungen wurden intern kalibriert und in Kategorien von 1.9, 3.5, 4.2, 5.0 und 6.0 Å eingeteilt. Als Orientierung dienten gut aufgelöste NOE-Kreuzsignale geminaler Protonen (z.B. Glycin  $\text{H}^\alpha$ ) sowie Signale, die für  $\alpha$ -Helix- oder  $\beta$ -Faltblatt-Bereiche charakteristisch sind. Unter Zuhilfenahme der Kristallstruktur (Sabini *et al.*, 1999) wurde eine Zuordnung der NOE-Signale mit dem Programm NMR2ST erhalten (Pristovšek *et al.*, 2000; Pristovšek *et al.*, 2002).

Die Zuordnungstabelle der Xylanase aus *B. agaradhaerens* wurde für die Bestimmung angulärer *restraints* herangezogen. Es wurde das Datenbanksystem TALOS verwendet (Cornilescu *et al.*, 1999), das empirisch die *backbone* Torsionswinkel  $\phi/\psi$  aus den Werten chemischer Verschiebung ( $\text{H}^\alpha$ ,  $\text{C}^\alpha$ ,  $\text{C}^\beta$ , CO,  $\text{N}_{bb}$ ) errechnet. Der Algorithmus des Programms ist eine Erweiterung der Überlegungen zum *Chemical Shift Index*, bei der die Differenz der beobachteten chemischen Verschiebungen mit *random coil* Werten benützt werden (siehe Kap. 3.4.6, S. 38). In Analogie vergleicht das Programm TALOS die Resonanzpositionen und korreliert diese mit Werten aus homologen Aminosäuresequenzen, deren Kristall- bzw. Lösungsstruktur bekannt ist. Für den Fall einer hohen Übereinstimmung ist es möglich, eine Vorhersage der *backbone* Torsionswinkel  $\phi/\psi$  zu treffen.

Die gewonnenen Informationen wurden anschließend in DYANA-Läufen verwendet (Wüthrich *et al.*, 1983). Chemisch äquivalente Protonen und nicht zugeordnete Stereoisotope werden von DYANA als Pseudoatome behandelt.

**Tab. 3-11: Pseudoatomkorrekturen in (Å) für chemisch äquivalente Protonen zur verbesserten Angabe von NOE-Abstandsbeschränkungen in Proteinen**

Die Grossbuchstaben A, B, G, D, E und H wurden in Übereinstimmung mit den Positionen der Seitenkettenprotonen in den jeweiligen Aminosäuren verwendet (Wüthrich *et al.*, 1983).

Chemisch äquivalente Protonen	Pseudoatome	Korrekturfaktor (Å)
Methylen-Gruppe	QA, QB, QG, QD, QE, QH	0,9
Methyl-Gruppe	QG, QD	1,1
Isopropyl-Gruppe	QQG, QQD	2,3
Phenylring (H $\delta$ oder H $\epsilon$ )	QD, QE	2,2
Phenylring (alle Protonen)	QR	2,5

Zur Verfeinerung der Lösungsstruktur der Xylanase wurde ein strukturgefilterter Iterationsprozess durchlaufen. Es wurden jeweils 100 Strukturen gerechnet, die Abstandsverletzungen der 20 besten Konformeren anhand der NMR-Spektren analysiert und die Abstandsbeschränkungen - falls erforderlich - korrigiert. Mit den verbesserten NOE-Abstandsbeschränkungen wurden dann neue DYANA-Läufe gestartet.

### 3.4.8. pH-Titration

Für die NMR-Titrations-Experimente wurde die Proteinlösung bei RT auf 90% H<sub>2</sub>O / 5% D<sub>2</sub>O / 5% perdeutertem Glycerin (v/v/v) umgepuffert (10 mM NaOAc, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% Pefabloc<sup>®</sup> SC, 0.05% NaN<sub>3</sub>; Endkonzentration 0.5 mM Xylanase).

Das pH-Meter wurde jedesmal in dem entsprechenden pH-Interval kalibriert. Der pH-Wert wurde vor und nach den NMR-Experimenten bei einer Temperatur von 30 °C gemessen ( $\Delta \leq 0.1$  pH Einheiten) und ein Mittelwert wurde daraus errechnet. Weiterhin wurde angenommen, dass sich die pH-Verschiebung aufgrund des D<sub>2</sub>O-Anteils und dessen Einfluss auf das Protolyse-Gleichgewicht innerhalb der Messgenauigkeit kompensieren. Insgesamt dürfte die Unsicherheit nicht mehr als 0.05 pH-Einheiten betragen.

Für jeden Schritt wurde der pH-Wert der Proteinlösung durch Zugabe von 0.5 – 1.5  $\mu$ l 1 M NaOH bzw. HCl eingestellt, der Ansatz wurde anschließend 5 min bei 40 °C inkubiert. Denaturiertes Protein wurde pelletiert (Biofuge, 10 min, 13000 rpm, RT) und der Überstand

wurde 10 min auf 30 °C temperiert. Im Anschluss erfolgte die pH-Messung. Im Verlauf der Titration sank die Xylanase-Konzentration auf 0.3 mM.

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Resonanzen der titrierbaren Gruppen Asp, Glu und His sowie der Amide des Proteinrückgrats wurde gemessen. Es wurden 24 Schritte von pH = 3.18 bis 8.65 aufgenommen mit je vier Experimenten: 1D  $^1\text{H}$ -Spektrum (Kalibrierung), [ $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-TROSY-HSQC, CT-HCDCG<sup>His</sup> und CT-H(CA)CO für die Seitenketten-Carboxylatgruppen.

Die Spektren der ionisierbaren Seitenketten, CT-HCDCG<sup>His</sup> und CT-H(CA)CO, wurden, wie unter Kap. 3.4.5.4 und Kap. 3.4.4.2 beschrieben, prozessiert und mit AURELIA (Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten) ausgewertet. Die zahlreichen Resonanzen des Proteinrückgrats sowie der Tryptophanseitenketten in den [ $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-TROSY-HSQC Spektren wurden mit Hilfe des Programms NMR2VIEW 5.0.4 (Merck and Co., INC, New Jersey, USA) ausgewertet, das mit einem eigens programmierten Tcl-Skript (Baumann, 2002, unpubliziert) erweitert worden war.

### 3.5. Bestimmung der $pK_s$ -Werte mittels NMR-Spektroskopie

Der protonierte (chemische Verschiebung  $\delta_{\text{prot}}$ ) und der deprotonierte ( $\delta_{\text{deprot}}$ ) Zustand einer titrierbaren Gruppe A wandeln sich in einem dynamischen Gleichgewicht ineinander um. Dass man beide Resonanzen getrennt von einander beobachten kann, hängt von der mittleren Lebensdauer  $\tau$  ab. Man erhält zwei Signale, wenn die chemische Umwandlung beider Zustände langsam bezüglich der NMR-Zeitskala verläuft, d.h. wenn  $\tau \cdot |\delta_{\text{prot}} - \delta_{\text{deprot}}| \gg 1$ . Im allgemeinen ist der chemische Austausch zwischen beiden Zuständen wesentlich schneller als ein einzelnes Messintervall. Es wird daher nur ein *Mittelwert* gemessen.

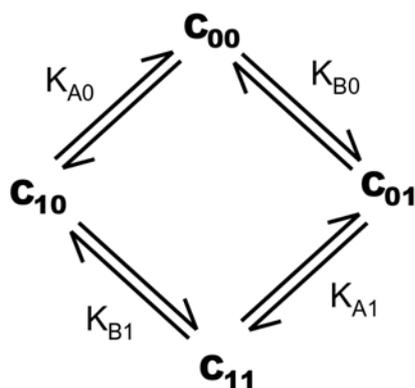
#### 3.5.1. Theorie der NMR-Titrationskurven

##### 3.5.1.1. Voraussetzungen; allgemeine Gleichung

Der *intrinsische*  $pK_s$ -Wert einer titrierbaren Gruppe bezeichnet die Ionisierungskonstante, die nur auf das chemische Potential der Gruppe selbst zurückzuführen ist, z.B. der  $pK_s$ -Wert einer einfachen Carbonsäure wie Benzoesäure ( $pK_s = 4.21$ ). Verfügt ein Molekül über eine weitere funktionelle Gruppe, so kann dies den Protonierungszustand beeinflussen. Es werden nun *apparente*  $pK_s$ -Werte gemessen, die von den intrinsischen abweichen. Als Beispiel sei Salicylsäure genannt, die einen apparenten  $pK_s$ -Wert von 2.89 aufweist, der um 1.32 pH-Einheiten gegenüber Benzoesäure erniedrigt ist. Diese erhöhte Acidität kann durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke des Carboxylat-Anions mit der ortho-Hydroxygruppe erklären werden.

Neben Einflüssen, welche die chemische Bindung selbst betreffen, ist auch die Elektrostatik des umgebenden Mediums zu beachten: Die Verschiebung der  $pK_s$ -Werte kann das Ergebnis von Wechselwirkungen zwischen ionischen Gruppen sein, aber auch die Polarität bzw. Dielektrizität einer hydrophoben Mikroumgebung sind zu berücksichtigen.

Im folgenden wird das Model von Shrager *et al.* (1972) erläutert, das *allgemein* die Wechselwirkung zweier titrierbarer Gruppen A und B beschreibt; es erweitert Überlegungen, die Edsall *et al.* (1958) erarbeitet haben. Der Gesamtzustand des Systems sei durch vier Konzentrationen beschrieben:



**Abb. 3-1: Reaktionsschema eines Systems mit zwei Protolyse-Gruppen**

$C_{00}$  = beide unbesetzt,  $C_{10}$  = nur A besetzt,  $C_{01}$  = nur B besetzt,  $C_{11}$  = beide besetzt,  $K_{A0}$  = Ionisierungskonstante falls B unbesetzt,  $K_{A1}$  = Ionisierungskonstante falls B besetzt und umgekehrt.

Es werden die Gleichungen für das thermodynamische Gleichgewicht aufgestellt:

$$\begin{aligned}
 K_{A0} &= \frac{C_{10}}{C_{00}[H_3O^+]}; & K_{B0} &= \frac{C_{01}}{C_{00}[H_3O^+]}; & \Rightarrow & K_{A0}K_{B1} = K_{A1}K_{B0}; & \text{Gl. 1} \\
 K_{A1} &= \frac{C_{11}}{C_{01}[H_3O^+]}; & K_{B1} &= \frac{C_{11}}{C_{10}[H_3O^+]}; & & & 
 \end{aligned}$$

Die beobachtbare chemische Verschiebung  $\delta_X$  kann für eine Gruppe X nur als *Mittelwert* der vier möglichen Zustände gemessen werden. Weder X protoniert bzw. deprotoniert kann NMR-spektroskopisch getrennt beobachtet werden, noch ist die Beeinflussung durch die ebenfalls schnell austauschenden Zustände der Nachbargruppe unterscheidbar:

$$\begin{aligned}
 \delta_A &= \frac{C_{00}\delta_{A00} + C_{01}\delta_{A01} + C_{10}\delta_{A10} + C_{11}\delta_{A11}}{C}; & \text{bzw.} & & \text{Gl. 2} \\
 \delta_B &= \frac{C_{00}\delta_{B00} + C_{01}\delta_{B01} + C_{10}\delta_{B10} + C_{11}\delta_{B11}}{C}; & & & 
 \end{aligned}$$

Ersetzt man die Konzentrationen in Gl. 2 mit Gleichgewichtskonstanten aus Gl. 1, so ergibt sich ein neues Gleichungssystem, das unterbestimmt ist:

$$\delta_A = \frac{a_1 + a_2[H_3O^+] + a_3[H_3O^+]^2}{1 + a_4[H_3O^+] + a_5[H_3O^+]^2}; \quad \delta_B = \frac{a_6 + a_7[H_3O^+] + a_8[H_3O^+]^2}{1 + a_4[H_3O^+] + a_5[H_3O^+]^2}; \quad \text{Gl. 3}$$

mit

$$a_1 = \delta_{A00};$$

$$a_2 = K_{A0}\delta_{A10} + K_{B0}\delta_{A01};$$

$$a_3 = K_{A1}K_{B0}\delta_{A11};$$

$$a_4 = K_{A0} + K_{B0};$$

$$a_5 = K_{A0}\delta_{A10} + K_{B0}\delta_{A01};$$

$$a_6 = \delta_{B00};$$

$$a_7 = K_{B0}\delta_{B01} + K_{A0}\delta_{B10};$$

$$a_8 = K_{A1}K_{B0}\delta_{B11};$$

direkt lösbar:

$$\delta_{A00} = a_1; \quad \delta_{A11} = \frac{a_3}{a_5};$$

$$\delta_{B00} = a_6; \quad \delta_{B11} = \frac{a_8}{a_5};$$

Es bleiben die Parameter

$$K_{A0}; K_{A1}; K_{B0}; \delta_{A01}; \delta_{A10};$$

$$\delta_{B01}; \delta_{B10};$$

die mit  $a_2; a_4; a_5$  gelöst werden müssen

$$a_7$$

Zwar erlaubt eine nichtlineare Regression mit den gemessenen Titrationskurven, die Koeffizienten  $a_1$  bis  $a_8$  zu bestimmen, aber die Umrechnung in die einzelnen Parameter des Modells scheitert an dem unterbestimmten Gleichungssystem. Die Lösung ist nur unter weiteren Annahmen möglich.

### 3.5.1.2. Lösung für Spezialfälle der allgemeinen Gleichung

Es wird die relative Änderung des Messwertes in Bezug auf die Gesamtänderung definiert:

$$\rho_A = \frac{\delta_A - \delta_{A00}}{\delta_{A11} - \delta_{A00}}; \quad \text{bzw.} \quad \rho_{A01} = \frac{\delta_{A01} - \delta_{A00}}{\delta_{A11} - \delta_{A00}}; \quad \text{Gl. 4}$$

In Gleichung Gl. 4 wird Gl. 3 unter der Annahme folgender zwei Spezialfälle eingefügt:

- **Model 1:** Der Einfluss des Ionisierungszustandes der einen Gruppe auf das *Gleichgewicht* der anderen wird vernachlässigt:

$$K_{A0} = K_{A1} \equiv K_A \quad \text{bzw.} \quad K_{B0} = K_{B1} \equiv K_B; \quad \text{Gl. 5}$$

$K_A$  und  $K_B$  sind *unabhängige, makroskopische* Konstanten.

$$\rho_A = \frac{(K_A \rho_{10} + K_B \rho_{01})H + K_A K_B H^2}{(1 + K_A H)(1 + K_B H)} = \frac{c_A K_A H}{(1 + K_A H)} + \frac{c_B K_B H}{(1 + K_B H)}; \quad \text{Gl. 6}$$

mit

$$c_A = (K_B - K_A \rho_{10} - K_B \rho_{01}) / (K_B - K_A); \quad c_B = (K_A - K_A \rho_{10} - K_B \rho_{01}) / (K_A - K_B); \\ c_A + c_B = 1;$$

Gl. 6 entspricht der Summe von zwei Henderson-Hasselbalch Gleichungen. In Analogie können auch  $j$  Titrationsschritte hergeleitet werden, wobei sich wieder eine Linearkombination von  $j$  Henderson-Hasselbalch Gleichungen ergibt. Diese Linearkombination wird in Gl. 4 eingesetzt und nach  $\delta_A$  umgeformt. Die Konzentrationen werden auf den negativen dekadischen Logarithmus bezogen und es werden die Protonierungsschritte für A und B auf die numerischen Werte von  $j$  verallgemeinert. Das Ergebnis (Gl. 7) wird für die nichtlineare Regression der gemessenen Werte verwendet.

$$\delta(pH) = \delta_b + \sum_{i=1}^j \frac{c_i (\delta_a - \delta_b) \cdot 10^{(pK_i - pH)}}{1 + 10^{(pK_i - pH)}}; \quad \sum_{i=1}^j c_i = 1; \quad j = 1, 2 \text{ oder } 3; \quad \text{Gl. 7}$$

mit

$$\delta_A \equiv \delta(pH); \quad \delta_{A00} \equiv \delta_b \text{ untere Asymptote}; \quad \delta_{A11} \equiv \delta_a \text{ obere Asymptote};$$

- **Model 2:** Der Einfluss des Ionisierungszustandes der einen Gruppe auf die *chemische Verschiebung* der anderen wird vernachlässigt:

$$\delta_{A01} = \delta_{A00}; \quad \text{bzw.} \quad \delta_{A10} = \delta_{A11}; \quad \text{Gl. 8}$$

$K_{A0}$ ,  $K_{A1}$ ,  $K_{B0}$  und  $K_{B1}$  sind voneinander *abhängige, mikroskopische* Konstanten (siehe auch Laskowski & Scheraga, 1954).

Die Vereinfachungen aus Gl. 8 werden in Gl. 3 eingesetzt und der Ausdruck  $K_{A1}K_{B0}$  wird aus Zähler und Nenner ausgeklammert. Einführung des negativen dekadischen Logarithmus und ein Koeffizientenvergleich liefert Gl. 9, die für eine Regression der gemessenen Werte verwendet wurde.

$$\delta(pH) = \frac{\delta_a \cdot 10^{-2pH} + \delta_b \cdot 10^{-pH-pK_1} + \delta_c \cdot 10^{-pH-pK_2} + \delta_d \cdot c \cdot 10^{-pK_1-pK_2}}{10^{-2pH} + 10^{-pH-pK_1} + 10^{-pH-pK_2} + c \cdot 10^{-pK_1-pK_2}}; \quad \text{Gl. 9}$$

mit

$$K_1 = K_{A1} + K_{B1}; \quad K_2^{-1} = K_{A0}^{-1} + K_{B0}^{-1};$$

Der Term  $c \cdot 10^{-pK_1-pK_2}$  zusammen mit der Variable  $\delta_d$  beschreibt die gegenseitige Abhängigkeit der Konstanten  $K_1$  und  $K_2$ .

### 3.5.1.3. Abschätzung der Kooperativität; Hill-Koeffizient

Es wurde auch eine modifizierte Hill-Gleichung für ein Titrationsverhalten mit nur einer Protonierung bzw. Deprotonierung angewendet (siehe Gl. 7,  $j = 1$ ). Der Faktor  $n$  im Exponenten dient als Abschätzung für die Kooperativität zweier ionisierbarer Gruppen, falls keine offensichtlichen Wendepunkte mehrere Titrationschritte indizieren (Markley, 1975).

$$\delta(pH) = \delta_b + \frac{(\delta_a - \delta_b) \cdot 10^{n \cdot (pK_i - pH)}}{1 + 10^{n \cdot (pK_i - pH)}}; \quad \text{Gl. 10}$$

### 3.5.2. Datenanalyse und Evaluierung (F-Test)

Die gemessenen Titrationskurven wurden mit dem Programm Origin 6.0 (Microcal Software Inc., Northampton, Mass., USA) ausgewertet. Es wurde eine nichtlineare Regression sowohl nach der Levenberg-Marquardt-Methode (Marquardt, 1963) als auch mit dem Simplex-

Algorithmus (Caceci & Cacheris, 1984) angewendet. Für die Iterationen wurde eine Toleranz von 0.01 vorgegeben.

Um die Güte der Regression abzuschätzen, wurden die ausgegebenen Parameter innerhalb eines Intervalls  $\pm 30\%$  zufällig variiert. Diese wurden wieder als Startwert zur nichtlinearen Regression eingesetzt. Dadurch konnte abgeschätzt werden, wie ‚robust‘ die Fit-Prozedur war, d.h. ob immer die gleichen Werte errechnet wurden. Die Streuung der ausgegebenen Parameter wurde dann zur Fehlerabschätzung verwendet.

Um zwei unterschiedliche Ergebnisse aus nichtlinearer Regression einer Datenreihe zu evaluieren, wurde ein Signifikanztest, der F-Test, durchgeführt. Dazu wurden die Summen der quadratischen Abweichungen ( $SSR_j$ ) der Messpunkte  $(x_i, y_i)$  von der verwendeten Fit-Funktion ( $F_j$ ) errechnet.

$$SSR_j = \sum_{i=1}^n (y_i - F_j(x_i, \alpha_j))^2; \quad n = 24 \text{ Messpunkte}; \quad \text{Gl. 11}$$

$F_j$  Fit - Funktion mit Parametern  $\alpha_j$ ;  
 $j \equiv$  Datenanalyse mit Ergebnis 1 oder 2

Für den F-Test wurde die Nullhypothese aufgestellt, die beiden Summen der quadratischen Abweichungen seien innerhalb eines Signifikanzniveaus von 1 % gleich. Die Gegenhypothese bedeutet, dass beide Ergebnisse zu signifikant unterschiedlichen Normalverteilungen um die Fit-Funktion führen.

Es wurden zwei Fälle unterschieden:

- **Fall a:** Vergleich zweier unterschiedlicher Ergebnisse *einer* Fit-Funktion (*gleiche* Parameteranzahl  $\alpha_j$ )

$$F = \frac{SSR_1}{SSR_2}; \quad \text{Gl. 12}$$

- **Fall b:** Vergleich von zwei Ergebnissen *unterschiedlicher* Fit-Funktionen (*ungleiche Parameteranzahl*  $\alpha_j$ ) (Motulsky & Ransnas, 1987)

$$F = \frac{(SSR_1 - SSR_2) / (df_1 - df_2)}{SSR_2 / df_2}, \quad \text{Gl. 13}$$

mit  $df_j \cong$  Anzahl der Freiheitsgrade ( $n - \text{Parameteranzahl}(\alpha_j)$ )

Dies berücksichtigt die Tatsache, dass eine Fit-Funktion mit einer größeren Anzahl an Parametern natürlich ‚besser‘ an den experimentellen Verlauf angepasst ist ( $SSR_j$  kleiner). Aber das bedeutet nicht, dass dieses Modell den physikalischen Sachverhalt besser beschreibt.

#### **Entscheidungskriterium:**

Ist der Quotient F größer als der tabellarische Wert der Fisher-Verteilung (Wilrich, 1987), kann die Gegenhypothese, dass beide Ergebnisse signifikant unterschiedlich normalverteilt seien, nicht mehr abgelehnt werden.

### **3.5.3. Theoretische Überlegungen zur chemischen Verschiebung**

Modellrechnungen versuchen die komplexen Zusammenhänge näherungsweise zu beschreiben, die die chemischen Verschiebungswerte in Proteinen bedingen. Grundsätzlich wird die Abschirmung  $\sigma$  als Summe von drei Parametern berechnet:

$$\sigma_{\text{gesamt}} = \sigma_{\text{nahe}} + \sigma_{\text{elektrostatisch}} + \sigma_{\text{magnetisch}}; \quad \text{Gl. 14}$$

Beispiele für die Abhängigkeit der Abschirmung  $\sigma_{\text{nahe}}$  sind Bindungslängen, Bindungswinkel und die Torsionswinkel  $\phi/\psi$ , aber auch der *gauche*-Effekt der Seitenkettenkonformation über die Torsion  $\chi_1$  (de Dios *et al.*, 1993). Die Elektrostatik wird über die räumliche Lage der Multipole einbezogen. Schwächere elektrostatische Wechselwirkungen werden durch ein Ladungsfeld nach der *self-consistent-field* Methode (Cummins *et al.*, 1987; Jaman *et al.*, 1991; Tosell, 1991) oder der *multipole-shielding* Polarisierbarkeit (Augspurger *et al.*, 1991)

angenähert. Der letzte Term  $\sigma_{magnetisch}$  beschreibt die magnetische Suszeptibilität des Proteins, dessen magnetische Anisotropie sowie mögliche Ringstromeffekte benachbarter aromatischer Systeme.

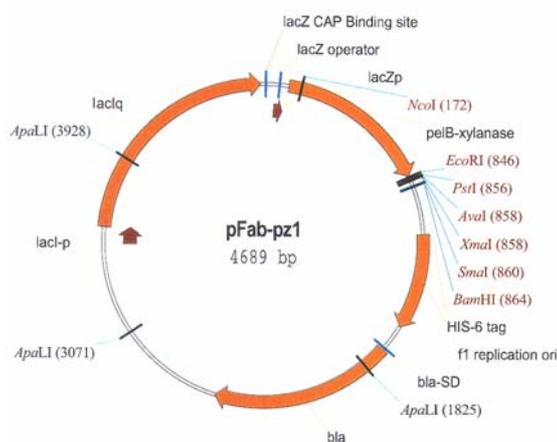
Die chemischen Verschiebungswerte von  $^{13}\text{C}^\alpha / ^{13}\text{C}^\beta$  können durchaus mit experimentellen Ergebnissen in Übereinstimmung gebracht werden, die Messungen für die NH-Gruppen im Proteinrückgrat sind jedoch sehr schwer zu reproduzieren. Zwei Gründe werden hier aufgeführt: Einerseits sind die Effekte von Wasserstoffbrücken schwierig zu berechnen, und andererseits führt der Multipol-Charakter der Peptidbindung zu einer unwägbare leichten Polarisierbarkeit des Stickstoffs (Szilagyi, 1995).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Präparation der Xylanase

#### 4.1.1. Klonierung des Xylanase-Genes in Expressionsvektoren und Proteinexpression

Der Expressionsvektor pFab-pz1 (Abb. 4-1) wurde von der Firma Novo-Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dänemark zur Verfügung gestellt. Eine pelB-Leader-Sequenz dirigiert das Protein nach seiner Biosynthese in das Periplasma des Wirts-Bakteriums (Matthey *et al.*, 1999).



**Abb. 4-1: Vektorkarte pFab-pz1 der Firma Novo-Nordisk A/S**

Abk.: f1 replication ori = Replikationsursprung des Bakteriophagen *f1*, kann zur Einzelstrangpräparation verwendet werden; lacI Strukturgen, kodiert zusätzlichen lac Operator-Repressor; lacZ-Gen, ermöglicht blau-weiss Screening durch  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität; His-6 tag = Sequenz für einen Poly-Histidin-Tag; pelB = periplasmatische Leadersequenz.

Analytische Tests ergaben keine bzw. geringe Expressionsrate.

Der Vektor pFab-pz1 diente im folgenden als *Templat* zur Umklonierung, wobei die Xylanase auf 207 Aminosäuren verkürzt wurde. Dies entspricht der publizierte Kristallstruktur (Sabini *et al.*, 1999).

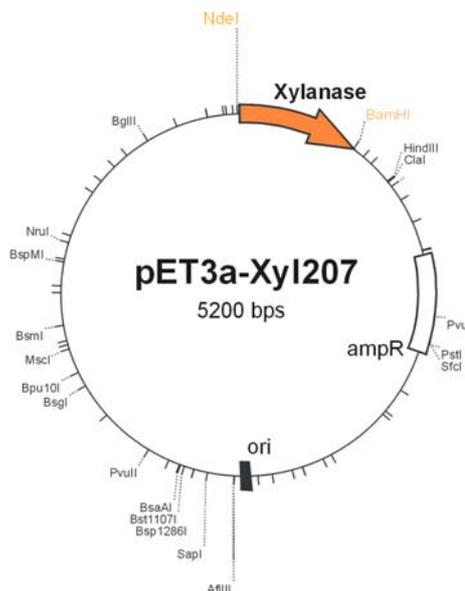
Parallel wurden mehrere Konstrukte auf der Basis des T7-Transkriptions-Systems hergestellt:

- pET3a in *E. coli*; es wird ein unmodifiziertes Protein exprimiert, das konventionell aufgereinigt werden muss.
- pET16b; der Expressionsvektor enthält einen N-terminalen Poly-Histidin-Tag, der proteolytisch (Faktor Xa oder TEV Protease) entfernt werden kann. Es ermöglicht eine Aufreinigung mit Affinitätschromatographie.

- pMAL und pKM; die Xylanase ist N-terminal mit einem Fusionsprotein verbunden (das Maltose-Bindungs-Protein oder das Glutathion S-Transferase-Protein). Da die gut löslichen Fusionsproteine zuerst gebildet werden, dienen sie als Hilfe, dass das Zielprotein ebenfalls nativ gefaltet im Cytoplasma exprimiert wird. Insgesamt solle die Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten (*inclusion bodies*) verhindert werden. Nach einer Aufreinigung über Affinitätschromatographie kann das Fusionsprotein proteolytisch entfernt werden.

#### 4.1.1.1. Klonierung der Xylanase in pET3a

Das Strukturgen der Xylanase auf dem Templat pFab-pz1 wurde mit den Primern 1 und 2 (3'-Nde I-Xylanase-BamH I-5') mittels PCR amplifiziert. Dadurch wurden die entsprechenden Restriktionsschnittstellen eingeführt. Das Ergebnis wurde in die 'multiple cloning-site' des pET3a-Plasmids ligiert und kompetente Zellen *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden mit dem Ligationsansatz transformiert. Einzelkolonien wurden mit einem PCR-Screening getestet, drei positive Klone wurden zur analytischen Plasmidpräparation (pET3a-Xyl207, Abb. 4-2) verwendet.

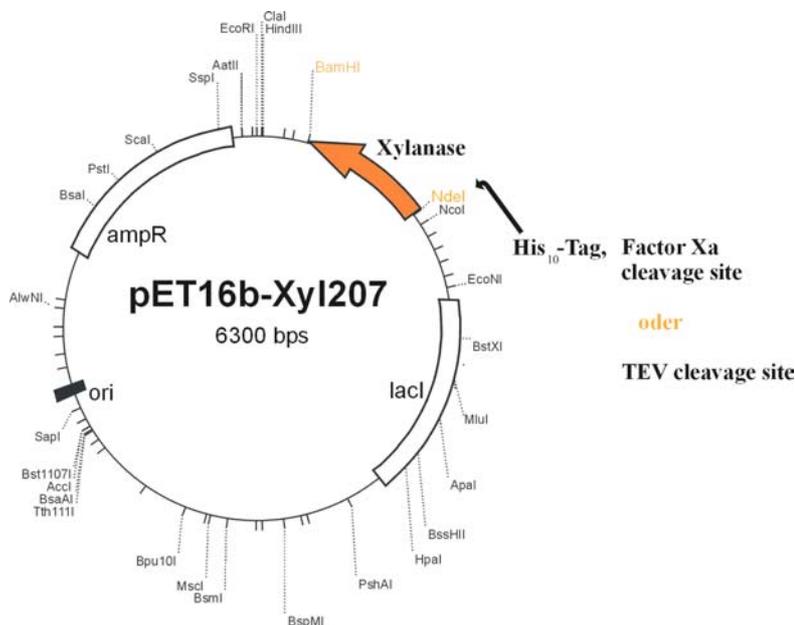


**Abb. 4-2: Vektorkarte pET3a-Xyl207**

*Pfeilrichtung* indiziert die Transkriptionsrichtung; die Xylanase (Zielgen *gelb* hervorgehoben) wurde N-terminal über die *Nde* I-, C-terminal über die *Bam*H I-Restriktionsschnittstelle eingefügt; Abk.: ampR = Strukturgen  $\beta$ -Lactamase, vermittelt Ampicillin Resistenz; bps = Basenpaare; ori = Replikationsursprung aus pBR322.

#### 4.1.1.2. Klonierung der Xylanase in pET16b

Analog zu Kap. 4.1.1.1 wurde die Xylanase in den Expressionsvektor pET16b kloniert. Der Originalvektor codiert eine N-terminale Poly-Histidin-Sequenz für die Affinitätschromatographie, die sich mit der Protease Faktor Xa abspalten lässt (Abb. 4-3). Aus wirtschaftlichen Überlegungen wurde ein analoges Konstrukt hergestellt, nur die Erkennungssequenz wurde für die TEV- Protease verändert. Die TEV-Protease ist rekombinant verfügbar und kann im Labor hergestellt werden.



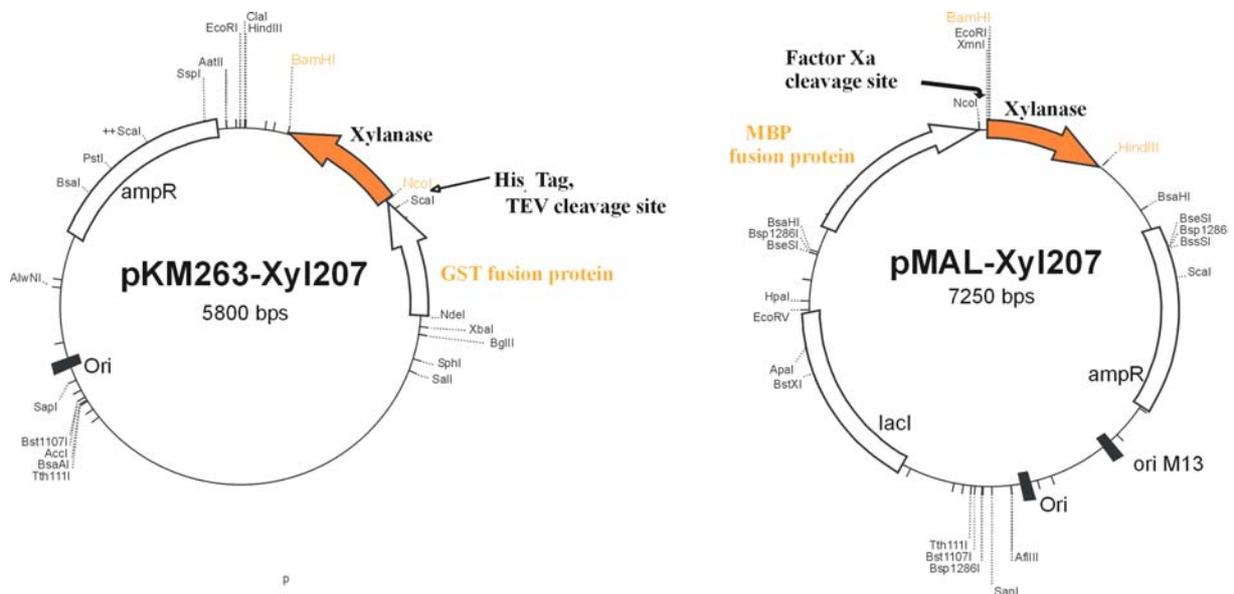
**Abb. 4-3: Vektorkarte pET16b-Xyl207 bzw. pET16bTEV-Xyl207**

*Pfeilrichtung* indiziert die Transkriptionsrichtung; die Xylanase (Zielgen *gelb* hervorgehoben) wurde N-terminal über die *Nde* I-, C-terminal über die *Bam*H I-Restriktionsschnittstelle eingefügt; Abk.: ampR = Strukturgen  $\beta$ -Lactamase, vermittelt Ampicillin Resistenz; bps = Basenpaare; ori = Replikationsursprung aus pBR322.

#### 4.1.1.3. Klonierung der Xylanase mit Fusionsproteinen

Für die Fusionierung mit dem Maltose-Bindungs-Protein (MBP, 43.8 kDa; pMAL™ Vektor-System, siehe rechte Seite Abb. 4-4) wurde das Templat mit den Primern 4 und 5 (3'–*Bam*H I–Xylanase–*Hind* III–5') amplifiziert.

Die Fusion mit dem Glutathione S-Transferase-Protein (GST, 22.7 kDa; pKM-Vektor, siehe linke Seite Abb. 4-4) erfolgt über Amplifikation mit den Primern 2 und 3 (3'-*Nco* I-Xylanase-*Bam*H I-5'). Die weiteren Arbeitsschritte gleichen den vorangegangenen Klonierungsarbeiten.



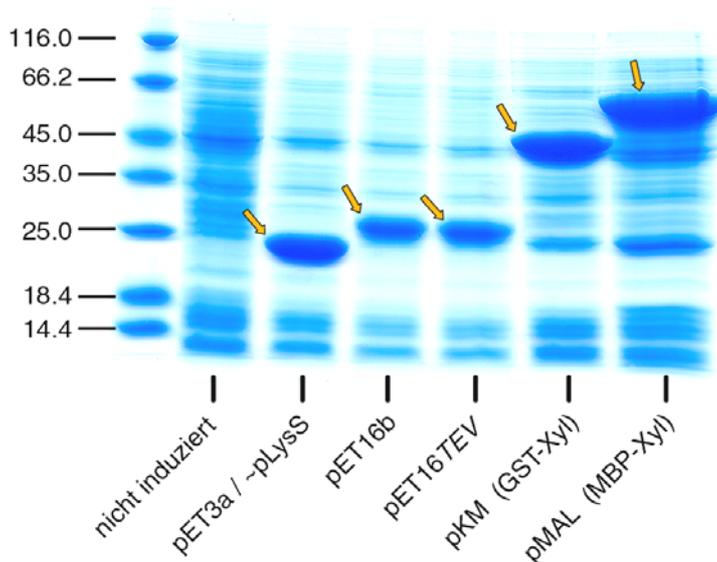
**Abb. 4-4: Vektorkarte pKM263-Xyl207 und pMAL-Xyl207**

*Pfeilrichtung* indiziert die Transkriptionsrichtung; die Xylanase (Zielgen *gelb* hervorgehoben) wurde N-terminal über die *Nde* I-, C-terminal über die *Bam*H I-Restriktionsschnittstelle eingefügt; Abk.: *ampR* = Strukturgen  $\beta$ -Lactamase, vermittelt Ampicillin Resistenz; bps = Basenpaare; *Ori* = Replikationsursprung aus pBR322; *ori* M13 = Replikationsursprung des Phagen M13, dient der Einzelstrangpräparation.

#### 4.1.2. Expression der Xylanase

##### 4.1.2.1. Analytische Testexpression aller Klonierungsprodukte

Nach dem PCR-Screening aller Konstrukte wurden je drei positiv getestete Einzelklone zur analytischen Plasmidpräparation verwendet. Die Plasmide wurden in verschiedene Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3) / ~pLysS / ~CodonPlus transformiert und eine analytische Testexpression wurde durchgeführt. Der Anteil der Xylanase am Gesamtproteingehalt wurde mit SDS-PAGE (Abb. 4-5) abgeschätzt.



**Abb. 4-5: Xylanase in verschiedenen Expressionsvektoren**

Gesamtproteingehalt analytischer Testexpressionen aufgetrennt durch SDS-PAGE, Sammelgel 4%ig, Trenngel 12.5 %ig; aufgetragen 20  $\mu$ l *E. coli* BL21(DE3) Zellkultur; Zielprotein *gelb* hervorgehoben.

Alle sechs Expressionssysteme zeigen gute Überexprimierung an Xylanase. Der Anteil an exprimiertem Zielprotein beträgt ca. 30-40% des Gesamtproteingehalts. Wird die lösliche und unlösliche Proteinfraction mittels SDS-PAGE verglichen, zeigt sich, dass die Xylanase immer löslich im Cytoplasma exprimiert wird. Eine Expression über Fusionsproteine ist nicht erforderlich.

Zusätzlich wurde das Zielgen des jeweiligen Expressionssystems sequenziert. In allen Vektoren war die korrekte Basensequenz der Xylanase enthalten.

#### 4.1.2.2. Xylanase-Expression mit dem Vektor pET3a-Xyl207

Im Folgenden wurde nur die Expression mit dem Vektor pET3a-Xyl207 verbessert:

- Die Xylanase besitzt einen hohen theoretischen pI = 8.6, ein großer Anteil der *E. coli* eigenen Proteine jedoch einen niedrigeren pI-Wert. Dies ermöglicht eine Aufreinigung mit klassischer Ionenaustauschchromatographie. Arbeitet man im pH-Bereich von 5 – 7, so ist ein großer Anteil der *E. coli* eigenen Proteine anionischer Natur, die Xylanase hingegen kationisch geladen.
- Affinitätschromatographie der Produkte aus den pET16-Expressionssystemen würde noch einen zusätzlichen Arbeitsschritt durch Protease-Verdau erfordern.

- Eine Expression mit Hilfe der Fusionsproteine wurde nicht erwogen. Die Xylanase wird mit konventioneller Expression löslich im Cytoplasma gebildet. Zur Abtrennung des Fusionsproteins würde ebenfalls ein Protease-Verdau benötigt werden. Außerdem würden teure [ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-Nährstoffe für die Proteinbiosynthese der Fusionsproteine verbraucht werden. Setzt man zur Abschätzung gleiche molare Ausbeuten an exprimiertem Zielgen voraus, so würde die Abtrennung des GST-Fusionsproteins (22.7 kDa, Xylanase 23 kDa) die Ausbeute halbieren, MBP (43.8 kDa) sogar um zwei Drittel reduzieren.

#### Abhängigkeit vom verwendeten Wirts-Bakterium

Es wurden drei verschiedene *E.coli* Stämme im semipräparativen Massstab getestet, die Expressionsrate wurde photometrisch durch Freisetzung des Farbstoffs RBB abgeschätzt:

**Tab. 4-1: photometrische Abschätzung der Expressionsrate**

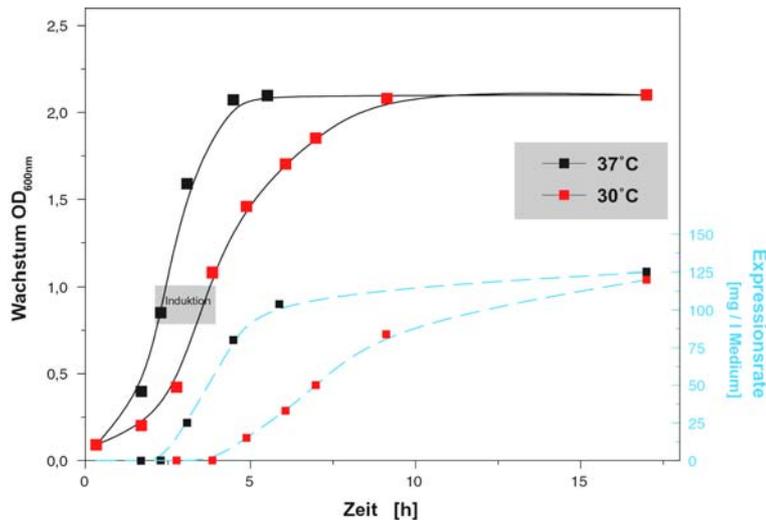
Wirts-Bakterium	Expressionsrate
	[mg pro Liter Medium]
BL21(DE3)	30
<b>BL21(DE3) pLysS</b>	<b>150</b>
BL21(DE3) CodonPlus (RIL)	45

Es konnte nicht geklärt werden, welchen Einfluss die Verwendung des Hilfsplasmids pLysS auf die Xylanase-Expression hat. Xylanase ist nicht toxisch für das Wirts-Bakterium, die Unterdrückung basaler T7 RNA Polymerase-Aktivität vor Induktion sollte keinen Einfluss haben.

#### Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Expressionsrate

Es wurde getestet, ob die Absenkung der Temperatur die Ausbeute an nativem Protein erhöht. Dazu wurde eine Testexpression im semipräparativen Massstab durchgeführt. Aber es zeigte sich, dass Zellwachstum und Biosynthese des Zielproteins nur verlangsamt wurden (siehe Abb. 4-6).

Weiterhin war ersichtlich, dass etwa 5 h nach Induktion bei 37°C die maximale Menge an Xylanase exprimiert wurde.



**Abb. 4-6: Expression Xylanase *E. coli* BL21(DE3) pLysS / pET3a-Xyl207 in LB-Medium**

Photometrische Abschätzung: *Wachstum* durch die Trübung bei OD<sub>600nm</sub>, *Expressionsrate* durch Freisetzung des Farbstoffs RBB.

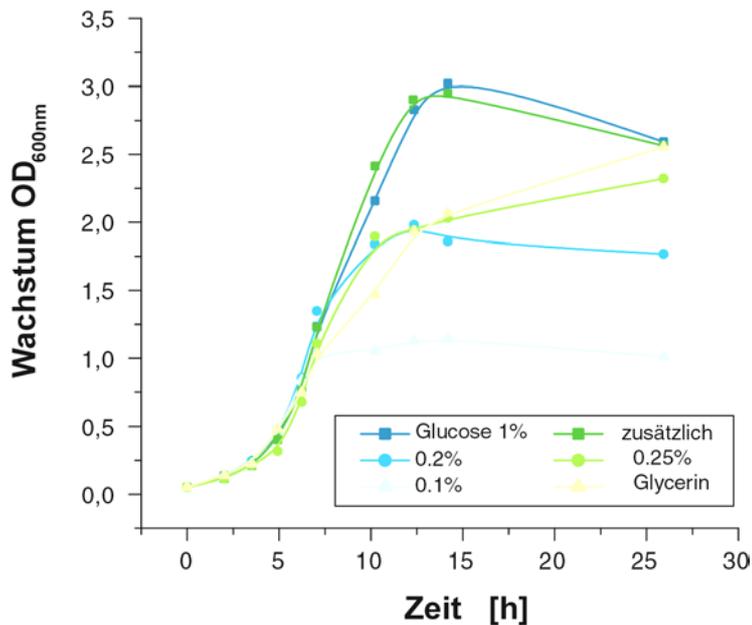
Näherungsweise kann man sagen, dass die Zelldichte (gemessen OD<sub>600nm</sub>) nach Induktion proportional zur exprimierten Menge an Xylanase ist.

#### Expression in einer Fermentationsanlage

Um Xylanase in präparativen Massstab herzustellen, wurde in 10 l LB-Medium mittels einer Braun Fermentationsanlage exprimiert. Sowohl Wachstum als auch Biosynthese des Zielproteins waren hier am besten, die Ausbeute konnte auf 200 mg Xylanase pro Liter Kultur gesteigert werden.

#### 4.1.2.3. Expression in [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]-Minimalmedium

Im semipräparativen Massstab wurden Testexpressionen in M9-Minimal-Medium durchgeführt. Um die Kosten für eine spätere [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]-Markierung zu senken, wurden die Konzentrationen der unmarkierten Kohlenstoffquelle schrittweise erniedrigt.



**Abb. 4-7: Wachstum  $\Leftrightarrow$  Expression Xylanase in M9-Minimal-Medium; Variation der Nährstoffkonzentrationen**

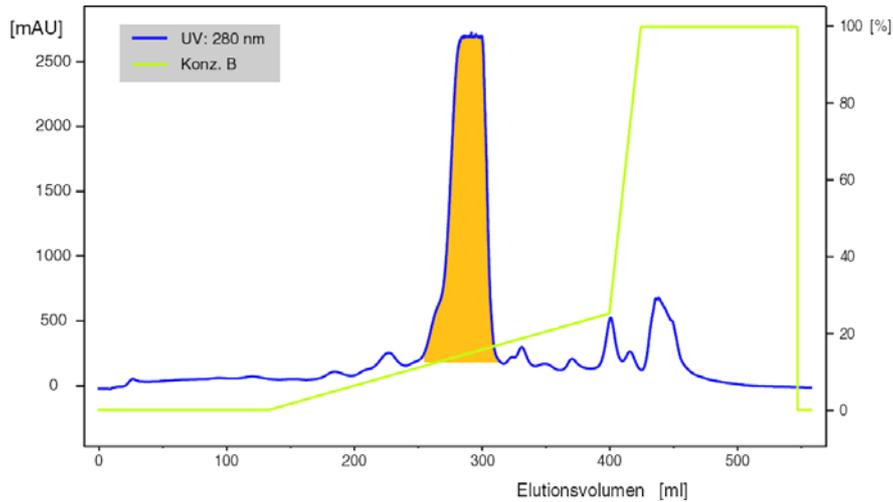
*Blau:* nur Glucose; *grün:* Kombination aus Glucose mit 0.25% Glycerin.

Wurde Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle verwendet, so ist die Zelldichte der stationären Phase stark von der Anfangskonzentration abhängig (siehe Abb. 4-7). Der Zusatz von 0.25% Glycerin erhöhte die Ausbeute, gleichzeitig konnte die Glucosekonzentration auf 0.1% erniedrigt werden. Dieses Nährstoffverhältnis war wirtschaftlich am günstigsten. Allerdings halbierte sich die Expressionsrate in M9-Minimal-Medium verglichen mit einer Expression in LB-Vollmedium.

#### 4.1.3. Aufreinigung der Xylanase

Die Präparation der Xylanase erfolgte mit klassischer Ionenaustauschchromatographie.

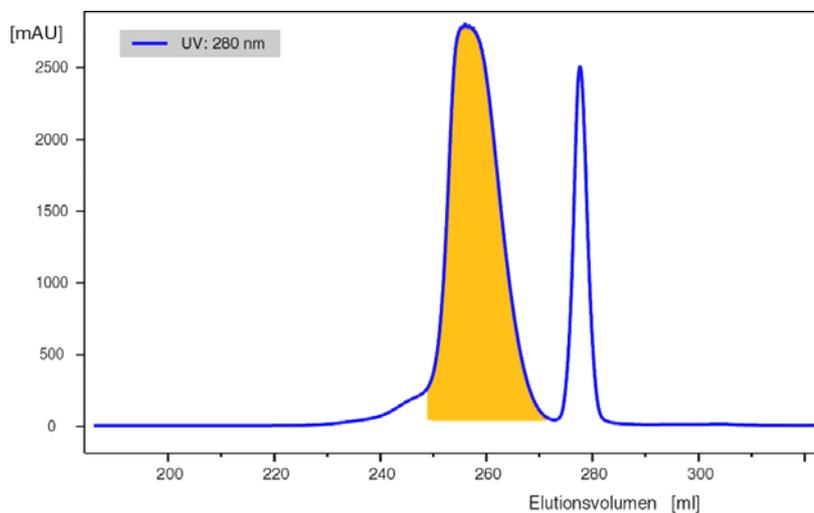
Die Zellen wurden mit einer Frenchpress aufgeschlossen und durch Zentrifugation wurden die unlöslichen Bestandteile abgetrennt. Die erhaltene, lösliche Fraktion wurde sterilfiltriert und mit dem Auftragspuffer verdünnt. Der Ansatz wurde auf das starke Kationenaustausch-Material aufgetragen und chromatographiert (siehe Abb. 4-8).



**Abb. 4-8: Kationenaustausch-Chromatographie der löslichen Proteinfraction**

Ca. 100 mg Xylanase in 150 ml Puffer A, erhalten aus 11 Medium. Zielfraktion *gelb* hervorgehoben. Säule: SP Sepharose XK16, Temperatur: RT; Puffer A: 10 mM NaOAc pH 5.2; Puffer B: 10 mM NaOAc pH 5.2, 600 mM NaCl; Gradientenvolumen: 30% B in 275 ml; Flussrate: 1.5 ml/min; Detektion UV: 280 nm.

Die Hauptfraktion (ca. 50 ml) eluierte bei ca. 100 mM Salzgehalt und wurde mit einer Amicon Druckfiltrations-Rührzelle bis auf 12 ml aufkonzentriert. Es wurde in drei Portionen über eine Gelfiltrationsäule entsalzt (siehe Abb. 4-9).



**Abb. 4-9: Gelfiltration der Xylanase**

Ca. 30 mg Xylanase, gelöst in 5 ml. Zielfraktion *gelb* hervorgehoben. Säule: Superdex 75 26/60, Temperatur: RT; Puffer: 10 mM NaOAc pH 5.2; Flussrate: 0.6 ml/min; Detektion UV: 280 nm.

Die Eluate wurden vereinigt und entsprechend den Versuchsbedingungen aufkonzentriert. Der Reinheitsgrad wurde mit SDS-PAGE auf mehr als 98% geschätzt. Die Ausbeute aus 1 l LB-Medium betrug bis zu 200 mg, für M9-Minimalmedium etwa 60-80mg.

## 4.2. Charakterisierung der enzymatischen Aktivität

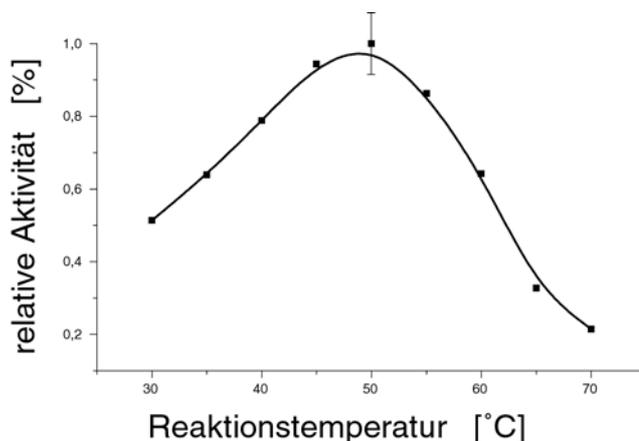
Die relative Aktivität der klonierten Xylanase wurde photometrisch durch die Freisetzung eines an Xylan gebundenen Farbstoffs Remazol Brilliant Blue R (RBB) getestet. Allerdings war es mit diesem Test nicht möglich, eine kinetische Messung vorzunehmen.

Um die enzymatische Aktivität zu charakterisieren, wurde je eine Bedingung variiert, unter Erhalt der restlichen Bedingungen wurden die Reaktionsansätze mit dem Enzym inkubiert. Durch Zugabe eines Überschusses an Ethanol wurde die Reaktion beendet und unlösliches RBB-Xylan präzipitierte. Aus dem Überstand wurde die Extinktion des freigesetzten Farbstoffes bei  $\lambda = 595$  nm gemessen.

Der Test erwies sich als nur eingeschränkt reproduzierbar. Jeder Messpunkt wurde fünfmal wiederholt und ein Mittelwert wurde gebildet. Der Einfluss des Puffers, der Ionenstärke, der Hintergrundmatrix (Summe aller Komponenten z.B. Zell-Lysat) und der Arbeitsweise liess sich auch durch Abzug eines Blindwertes nicht eliminieren (Biely *et al.*, 1988). Der Fehlerbereich eines Wertes wurde auf  $\pm 15\%$  geschätzt.

### 4.2.1. Temperatur-Abhängigkeit der relativen Xylanase-Aktivität

Die Temperatur-Abhängigkeit der Aktivität der klonierten Xylanase wurde getestet.



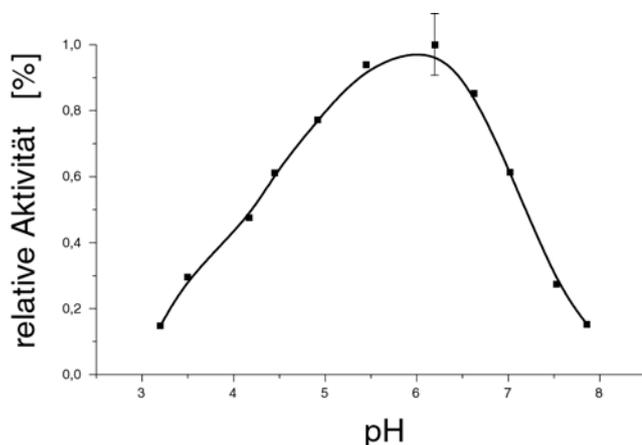
**Abb. 4-10: Temperaturabhängigkeit der Xylanase Aktivität**

Ca. 10 pmol Xylanase. RBB-xylan-Lösung (5.75 mg/ml in 10 mM NaOAc pH 5.2, 50 mM NaCl); Inkubation: 1h; Detektion Vis: 595 nm; Normierung der Messwerte, repräsentativer Fehlerbalken  $\pm 15\%$ .

Die Xylanase erwies sich als leicht thermophil, d.h. sie entwickelt ihre maximale Aktivität bei erhöhter Temperatur (Abb. 4-10). Bei den hier verwendeten Pufferbedingungen erreichte das Enzym das Maximum bei ca. 50°C, ab dann überwog die Wärmedenaturierung.

#### 4.2.2. pH-Abhängigkeit der relativen Xylanase-Aktivität

Analog wurde die pH-Abhängigkeit getestet. Dazu wurde der pH-Wert innerhalb dreier Puffer-Lösungen (pH 3-5 Bernsteinsäure/ pH 5-7 MES / pH 7-9 HEPES) variiert (Abb. 4-11).



**Abb. 4-11: pH-Abhängigkeit der Xylanase Aktivität**

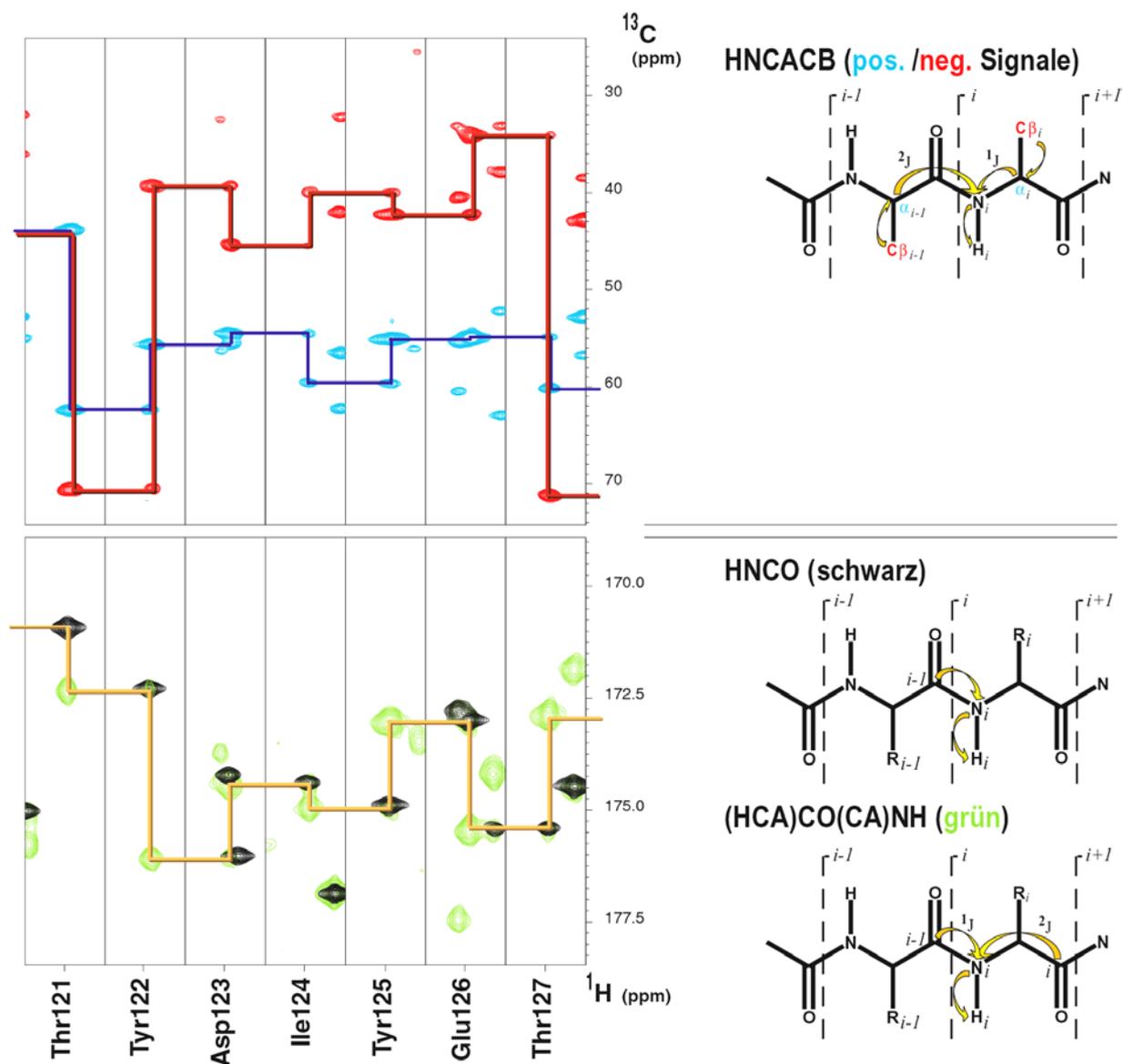
Ca. 10 pmol Xylanase. RBB-xylan-Lösung (5.75 mg/ml in 20 mM Puffer, 50 mM NaCl); Reaktionstemperatur: 50°C; Inkubation: 1h; Detektion Vis: 595 nm; Normierung der Messwerte; repräsentativer Fehlerbalken  $\pm 15\%$ .

Die klonierte Xylanase erreichte ihr Optimum an Aktivität um  $\text{pH} \approx 6$ . Aus den [ $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-TROSY-HSQC NMR-Experimenten konnte ersehen werden, dass Xylanase in dem verwendeten pH-Bereich eine globale, 'native' Struktur besitzt. Die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität muss somit auf die lokale Ladungsverteilung bzw. deren Einfluss auf die Mikroumgebung zurückzuführen sein.

### 4.3. Zuordnung der $^1\text{H}$ -, $^{13}\text{C}$ - und $^{15}\text{N}$ -Resonanzen der Xylanase

#### 4.3.1. Sequentielle Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrats

Standard-Zuordnungsexperimente wurden auf einem Bruker DMX 500 Spektrometer bei 301K aufgenommen. Für die Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrats wurde ein Ensemble von 3D Tripelresonanz-Experimenten - HNCOC, (HCA)CO(CA)NH, HNCACB – ausgewertet (Abb. 4-12).



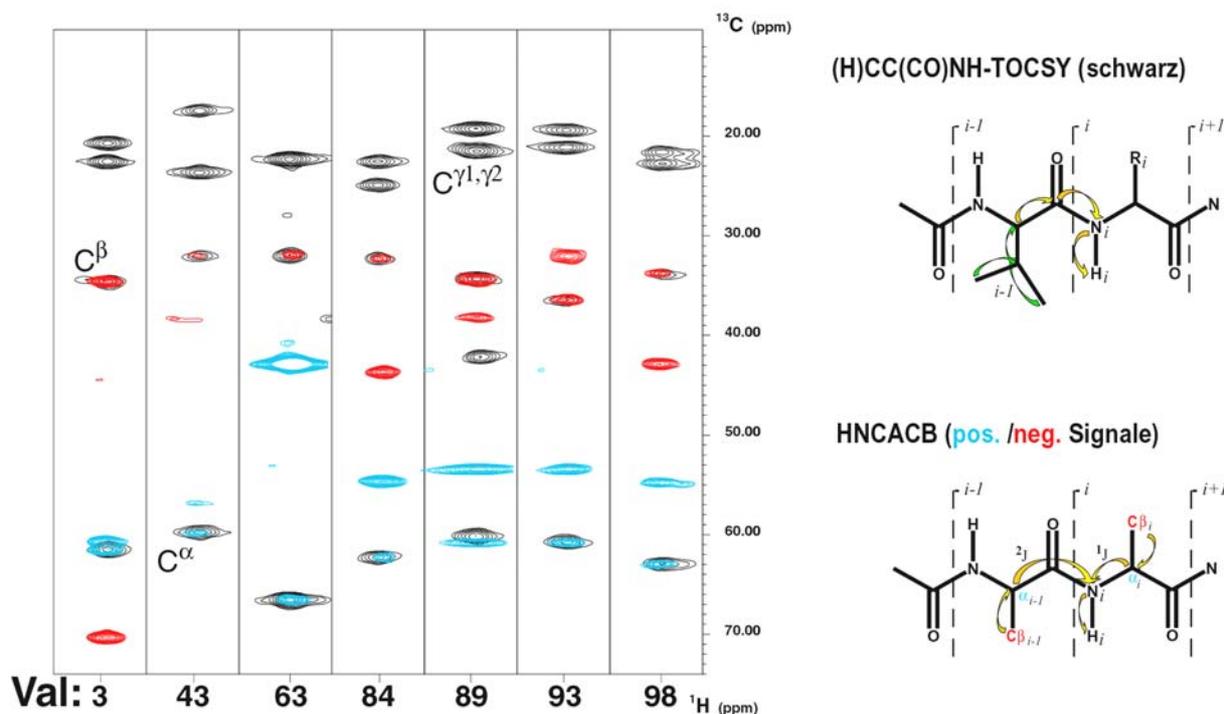
**Abb. 4-12 links:** Repräsentative Ausschnitte der 3D Spektren (Aminosäuren 121 – 127 in den korrespondierenden  $N_{bb}$ -Amid-Ebenen) zur Zuordnung des Proteinrückgrats; **rechts:** schematische Korrelationen

1.4 mM Xylanase in 90%  $\text{H}_2\text{O}/10\%$   $\text{D}_2\text{O}$  (10 mM  $\text{Na-d}_3\text{-OAc}$ , pH 5.2, 0.01% Pefabloc<sup>®</sup> SC, 0.05%  $\text{NaN}_3$ ); Bruker DMX 500; Temperatur: 301 K.

Alle Proteinrückgrat-Resonanzen der 200 Aminosäuren bis auf Met1 und Lys151 wurden zugeordnet (ausgenommen der Proline, die über keine detektierbaren Amidprotonen verfügen).

#### 4.3.2. Zuordnung der Resonanzen des aliphatischen Teils der Seitenketten

Das Ensemble der CC(CO)NH-TOCSY Spektren (für die  $^{13}\text{C}$  chemischen Verschiebungswerte: siehe Abb. 4-14, für die  $^1\text{H}$  chemischen Verschiebungswerte: Abb. 4-16) in Kombination mit den HNCACB- / HBHACONH-Experimenten erlaubte die Zuordnung der Seitenketten.



**Abb. 4-14 links:** Repräsentative Ausschnitte der 3D Spektren (nur Valinreste, in den korrespondierenden  $\text{N}_{bb}$ -Amid -Ebenen) zur Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen der Seitenketten; **rechts:** schematische Korrelationen

Parameter: siehe Text Abb. 4-12, S. 61.

Alle Seitenketten-Resonanzen wurden zugeordnet mit Ausnahme von Gln75, Thr110, Gln132, Ser150 und Ser 207, deren  $\text{H}^\beta$  und/oder  $\text{H}^\gamma/\text{C}^\gamma$  Resonanzen nicht zweifelsfrei identifiziert werden konnten.

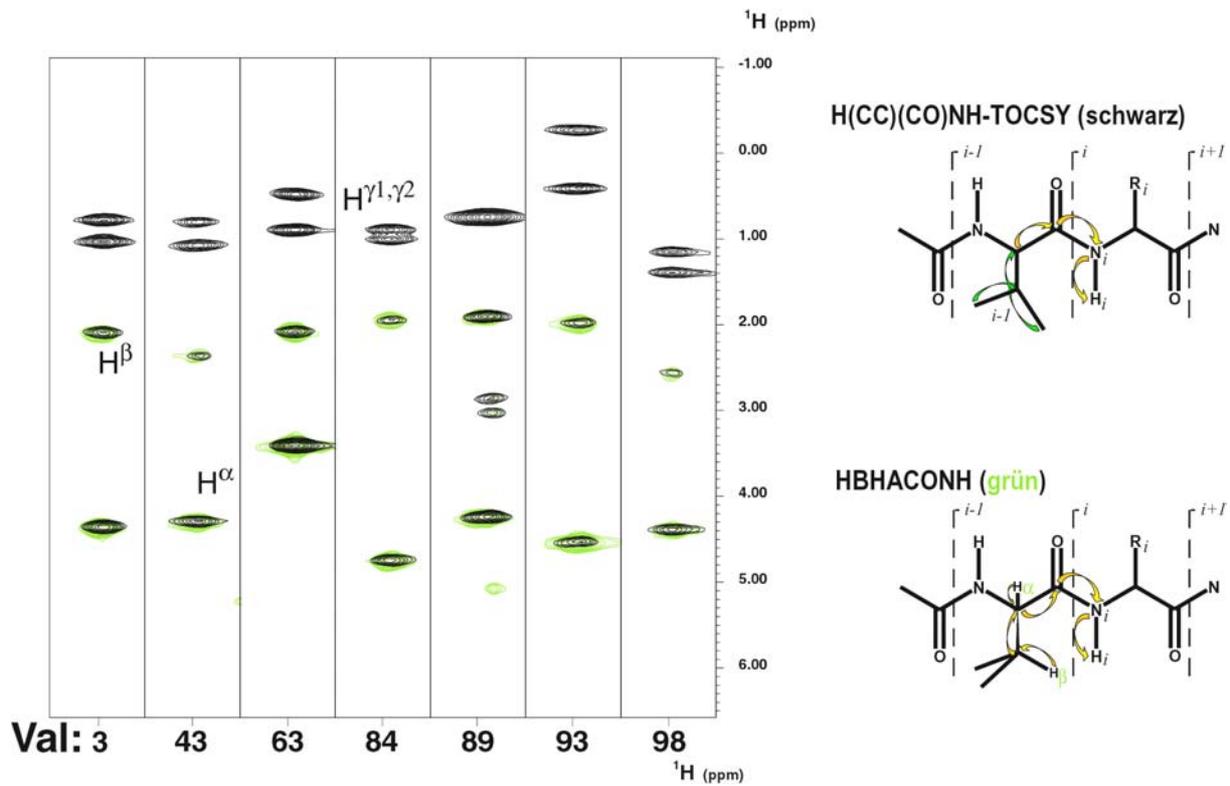
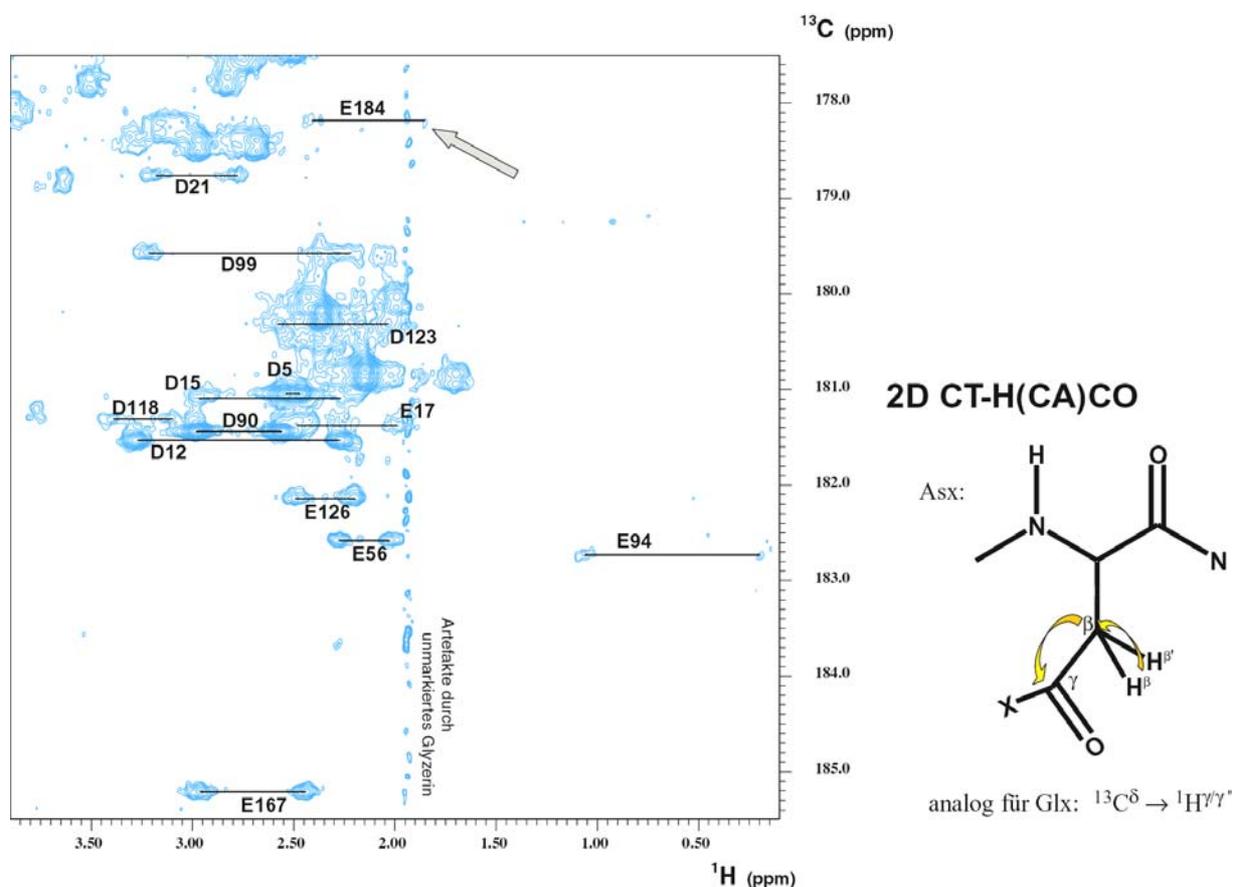


Abb. 4-16: *links*: Repräsentative Ausschnitte der 3D Spektren (nur Valinreste, in den korrespondierenden  $\text{N}_{bb}$ -Amid -Ebenen) zur Zuordnung der  $^1\text{H}$ -Resonanzen der Seitenketten; *rechts*: schematische Korrelationen

Parameter: siehe Text Abb. 4-12, S. 61.

### 4.3.3. Zuordnung Aspartat, Glutamat

Die aliphatischen  $H^{\beta/\beta'}$ -Protonen (bzw. bei Glu  $H^{\gamma/\gamma'}$ ) der sauren Aminosäuren wurden durch das HBHACONH- bzw. das entsprechende Seitenketten-TOCSY-Experiment (siehe Kap. 4.3.2, S. 62) zugeordnet. Durch Korrelation dieser Protonen mit dem benachbarten Carboxyl-C-Atom konnte dessen chemischer Verschiebungswert eindeutig zugeordnet werden.



**Abb. 4-18: links: 2D CT-H(CA)CO; rechts: schematische Korrelation**

*Beschriftung* der detektierbaren Carboxylat-Seitenketten. 0.5 mM Xylanase in 90%  $H_2O/10\%$   $D_2O$  (10 mM NaOAc, pH 5.28, 50 mM  $MgCl_2$ , 0.01% Pefabloc<sup>®</sup> SC, 0.05%  $NaN_3$ ); Bruker DMX 500; Temperatur: 301 K.

Es wurden alle  $^{13}C$ -Resonanzen der Seitenketten-Carboxylatgruppen zugeordnet mit Ausnahme von Glu178. Dessen  $^{13}C^{\delta}$  Resonanz war mit einem 2D CT-H(CA)CO -Experiment nicht messbar, da die Resonanzen von  $C^{\beta}$  (35.42 ppm) und  $C^{\gamma}$  (35.41 ppm) entartet sind. Dadurch kann kein gerichteter Magnetisierungstransfer von  $C^{\gamma}$  nach  $C^{\delta}$  aufgebaut werden und die Energie relaxiert unfokussiert über das  $C^{\beta/\gamma}$ -Spinsystem.

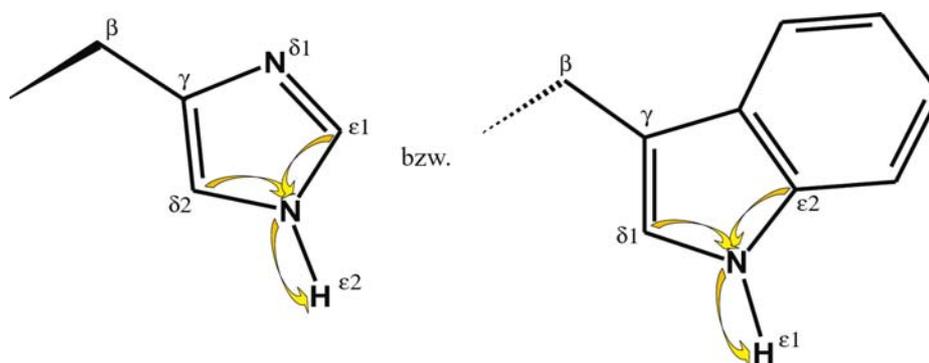
Die  $^{13}\text{C}^{\delta}$  Resonanz von Glu184 (siehe Pfeil, Abb. 4-18) - das Carboxylat, das die Säure-Base-Funktion während der Katalyse ausführt - ist ungewöhnlich weit zu hohem Feld verschoben und von sehr schwacher Intensität.

#### 4.3.4. Zuordnung der Histidin- bzw. Tryptophan-Resonanzen

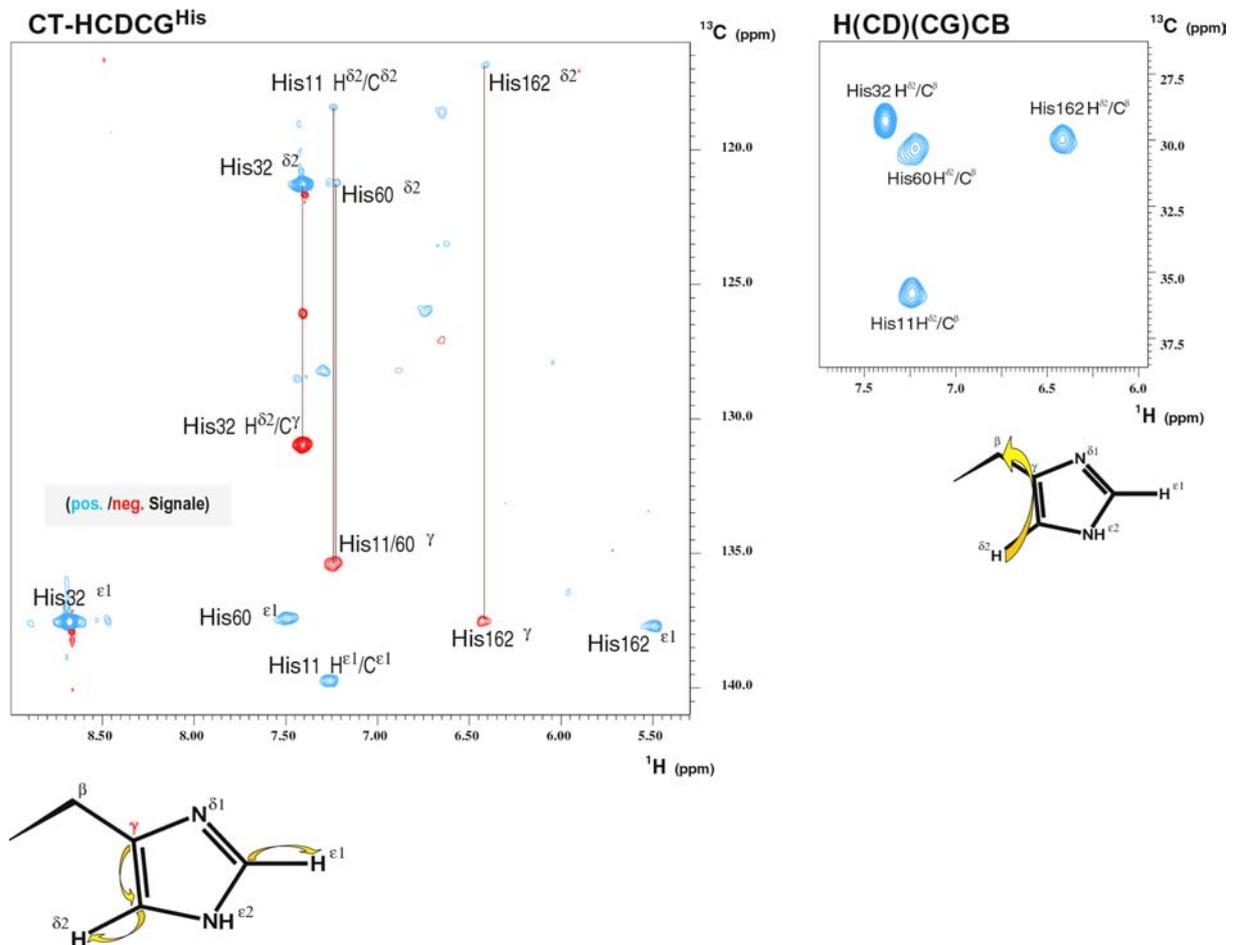
Fast alle Resonanzen der Histidine wurden zugeordnet. Die Ausnahme bildeten His11N $^{\epsilon 2}$  und His162N $^{\delta 1}$ , deren Resonanzen nicht detektiert werden konnten. Unter normalen Umständen können die an Stickstoff gebundenen H $^{\epsilon 2/\delta 1}$ -Protonen nicht gemessen werden, da sie einem chemischen Austausch mit den Protonen des Wassers unterliegen. Allerdings wurde His162H $^{\epsilon 2}$  detektiert, dessen chemischer Austausch bezüglich der NMR-Zeitskala wesentlich verlangsamt ist. Der gesamte Imidazolring von His162 ist im Proteininneren verborgen und dem Solvens nicht zugänglich (siehe Kap. 5.4, S. 86).

Durch Korrelation der H $^{\delta 2}$  mit den C $^{\beta}$  Resonanzen, die aus vorangegangenen Experimenten bekannt waren (siehe Kap. 4.3.2, S. 62), wurden alle vier Imidazolresonanzen eindeutig entsprechend der Aminosäuresequenz zugeordnet.

Die Resonanzen C $^{\gamma}$ , C $^{\epsilon 2}$ , H $^{\delta 1}/\text{C}^{\delta 1}$  und H $^{\epsilon 1}/\text{N}^{\epsilon 1}$  der sieben Tryptophan Indolringe wurden ebenfalls zugeordnet. Da einige Korrelationen analog zu denen im Imidazolring sind, konnten sie ebenfalls detektiert werden.



**Abb. 4-16: Analogie der Korrelation von Imidazol- und Indolresonanzen im [ $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-TROSY-H(N)C $^{\text{ar}}$ -Experiment**

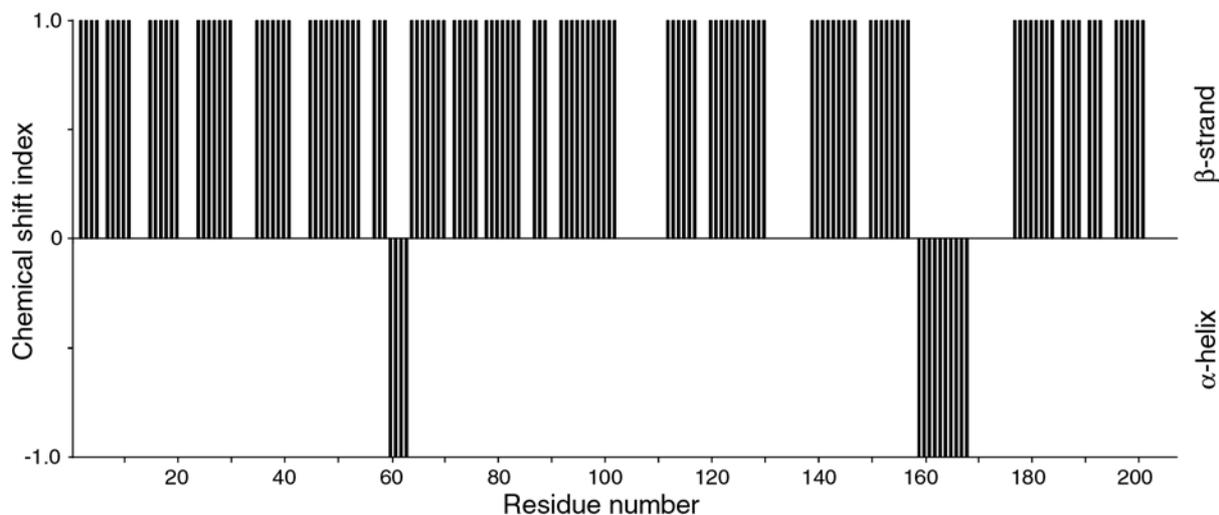


**Abb. 4-21: links: CT-HCDCG<sup>His</sup>; rechts: H(CD)(CG)CB; unterhalb: schematische Korrelationen des jeweiligen Experiments**

Parameter: siehe Abb. 4-12, S. 61.

#### 4.4. Validierung der Zuordnung: Lösungsstruktur der Xylanase

Eine Vorhersage der Sekundärstrukturelemente wurde durchgeführt, indem aus der Differenz der beobachteten chemischen Verschiebungswerte und tabellierter 'random coil' Werte ein Index errechnet wurde (Wishart & Sykes, 1994). Diese Vorgehensweise ermöglichte es,  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblattstrukturen vorherzusagen (Abb. 4-18).



**Abb. 4-18: Chemical shift index**

Berechnung des *Chemical shift index* (csi) mit den chemischen Verschiebungswerten der Resonanzen  $H^\alpha$ ,  $C^\alpha$ ,  $C^\beta$  and CO; csi = 0 deutet auf eine 'random coil' Struktur hin ; csi = 1 auf ein  $\beta$ -Faltblatt; csi = -1 auf eine  $\alpha$ -Helix.

Diese Vorhersage ist in guter Übereinstimmung mit den Sekundärstrukturelementen, die für die Kristallstruktur angegeben sind (Sabini *et al.*, 1999).

Die Plausibilität der Zuordnung wurde anhand mehrerer automatisierter Prozeduren überprüft, wobei die Kristallstruktur mit einbezogen wurde.

Mit Hilfe des Programms AURELIA (Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten) wurde eine Peaktabelle des 3D NOESY- $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -HSQC Spektrums generiert. Diese wurde zusammen mit der Zuordnungsliste der chemischen Verschiebungswerte und den Daten der Kristallstruktur dem Programm NMR2ST (Pristovšek *et al.*, 2000; Pristovšek *et al.*, 2002) als Parameter eingegeben. Der heuristische Algorithmus verglich die Peaktabelle der NOEs mit der Zuordnung und validierte das Ergebnis anhand der Abstände innerhalb der Kristallstruktur. Nach einem iterativen Prozess, in dem auch diastereotope Protonen bzw. Methylgruppen berücksichtigt wurden, gab das Programm 1932 Abstandbeschränkungen (*restraints*) als Ergebnis aus.

Das Datenbanksystem TALOS ergab auf ähnliche Weise 266 Winkelbeziehungen, indem es bekannte 3D Strukturen mit der Zuordnungstabelle der Xylanase verglich (Cornilescu *et al.*, 1999).

Darüber hinaus konnten noch weitere 156 Orientierungen aus *residual dipolar couplings* (Clare *et al.*, 1998), die freundlicherweise von Hans Wienk (2002, unpubliziert) zur Verfügung gestellt wurden, für eine Strukturrechnung verwendet werden (Tab. 4-2).

**Tab. 4-2: Parameter und Ergebnisse der Strukturrechnung**

Parameter	Auswertungsmethoden
1932 Abstandbeschränkungen	Programm NMR2ST
266 Winkelbeziehungen	Datenbanksystem TALOS
156 Orientierungen aus <i>Residual dipolar couplings</i>	Messungen Hans Wienk (2002, unpubliziert)
⇒ 30 strukturgefilterte Iterationen	Programm DYANA
<b>Ergebnis</b>	
<b>2.44 ± 0.29 Å<sup>2</sup> backbone RMSD</b>	

Die 20 besten Lösungsstrukturen wurden mit dem Programm MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996) gemittelt und zu einer Struktur mit variablem Radius zusammengefasst. Der Radius entspricht dann der Standardabweichung des Strukturensambles von der gemittelten Lösungsstruktur der Xylanase (siehe Abb. 5-1, S. 83).

Der *backbone* RMSD-Wert von 2.44 Å<sup>2</sup> deutet an, dass diese Struktur als vorläufig zu betrachten ist und noch weiter verfeinert werden muss.

## 4.5. Protonierungsverhalten der Xylanase

### 4.5.1. Durchführung der pH-Titration

#### 4.5.1.1. Optimierung der Pufferbedingungen

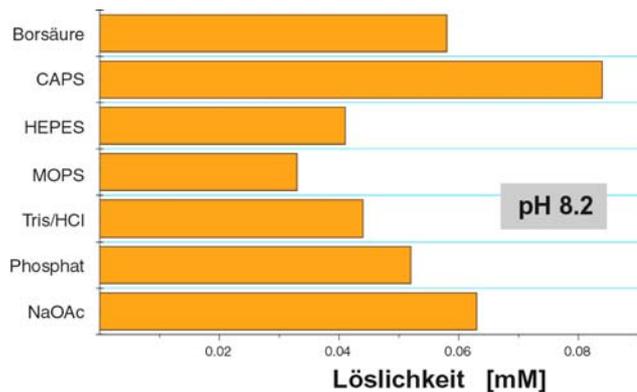
Die Löslichkeit der Xylanase ist pH-abhängig. Vortests ergaben, dass Xylanase ab einem pH > 5.6 bis auf eine geringe Restkonzentration *reversibel* präzipitiert. Resuspendiert man das Präzipitat in 10 mM NaOAc, pH 5.2 und inkubiert 5 min bei 40 °C, so erhält man wieder lösliche, native Xylanase. Identische [<sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H]-TROSY-HSQC Spektren, die vorher und nachher aufgenommen wurden, belegen dies.

Eine Konzentration von ca. 1.4 mM Xylanase in 10 mM Na-d<sub>3</sub>-OAc, pH 5.2, die während der Zuordnungsexperimente erreicht wurde, konnte für eine kontinuierliche pH-Titration jedoch nicht beibehalten werden.

Die Pufferbedingungen wurden optimiert, um eine möglichst hohe Konzentration an Enzym über den gesamten pH-Bereich von 3.0 bis 8.5 ermöglichen zu können. Xylanase (1 mM,

Endvolumen 50  $\mu$ l) wurde in unterschiedlichen Puffern und Zusätzen (jeweils 50 mM) angesetzt und über Nacht bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation wurde photometrisch die Konzentration im Überstand bestimmt.

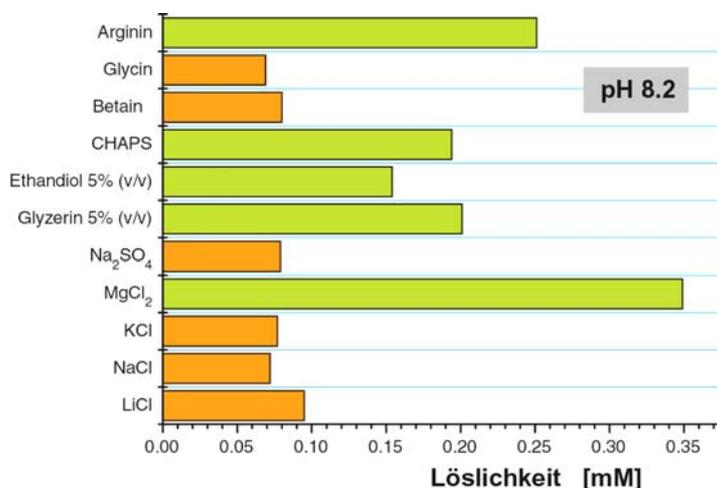
Bei den hier getesteten Substanzen (Abb. 4-19 und Abb. 4-20) stand nicht die Pufferkapazität um ihren jeweiligen  $pK_s$ -Wert im Vordergrund, sondern der Einfluss auf die Löslichkeit der Xylanase. Als Beispiel sei der zwitterionische Charakter von MOPS oder HEPES aufgeführt.



**Abb. 4-19: Löslichkeit der Xylanase bei pH 8.2; Variation der Puffersubstanzen**

1 mM Xylanase in 90 mM Puffer; Temperatur: RT; Inkubation ca. 16 h; Detektion UV: 280 nm.

Die Löslichkeit der Xylanase bei hohen pH-Werten wird nicht nennenswert durch die verwendete Puffersubstanz beeinflusst. Eine Ausnahme ist CAPS, dessen lipophiler Cyclohexylrest möglicherweise hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Xylanasemolekülen zu unterbinden vermag. Die Restkonzentration sank auf 35 – 80  $\mu$ M, was für ein gutes Verhältnis von Messzeit zu Signal-Rausch-Qualität unbrauchbar ist.



**Abb. 4-20: Löslichkeit der Xylanase bei pH 8.2; Variation der Zusätze (50 mM)**

Parameter: siehe oben, Abb. 4-19, S. 69.

Die Zusätze CHAPS (ein mildes Detergens, ein Gallensäure-Derivat), Ethandiol und Glycerin erhöhen deutlich die Löslichkeit der Xylanase. Ihr amphiphiler Charakter deutet darauf hin, dass die intermolekulare Protein-Protein Wechselwirkung bei der Präzipitierungsreaktion hydrophober Natur ist. Ein weiteres Indiz dafür ist die Reversibilität der Fällung.

Arginin stabilisiert indirekt native Proteinstrukturen durch seine Wirkung als Osmolyt (Bagby *et al.*, 2001). Eine korrekte Faltung des Proteins verringert die Oberfläche, wodurch thermodynamisch ungünstige Wechselwirkungen mit dem Osmolyten vermieden werden.

Alle Permutationen wurden unter schrittweiser Verringerung der Konzentration der Zusätze getestet und auf die Verwendbarkeit während eines NMR-Experiments geprüft.

Die Zusätze 25 mM Arginin und 25 mM CHAPS (cmc: 6.5 mM, Neugebauer, 1990) waren NMR-spektroskopisch ungeeignet, da eine enorme Linienverbreiterung der Resonanzen induziert wurde. Die Ursache hierfür kann eine Micellen-Bildung aus CHAPS und Xylanase-Molekülen gewesen sein. Dadurch wird Rotationsdiffusion erschwert bzw. die Korrelationszeit  $\tau_c$  nimmt zu. Dieser Befund bewirkt, dass die Relaxationseigenschaften ungünstiger werden und die Linien sich zunehmend verbreitern.

Da Glycerin auch perdeutert günstig erhältlich ist, wurde auf die Verwendung von Ethandiol verzichtet. 5 % (v/v)  $d_5$ -Glycerin und 50 mM Magnesiumchlorid wurden für die folgenden Experimente gewählt. Der Zusatz von 50 mM Magnesiumchlorid während einer pH-Titration hat den Vorteil, dass die Ionenstärke bei der Zugabe von 1 M NaOH bzw. HCl Aliquots ( $\approx 1 \mu\text{l}$  je Titrationsschritt) nicht wesentlich verändert wird. Da die Positionen der Resonanzen auch von der Ionenstärke beeinflusst werden, kann eine schrittweise Salzzugabe einen unwägbaren Effekt auf die Titrationskurven haben.

#### 4.5.1.2. pH-Titration

Die NMR-Probe (0.5 mM Xylanase, pH = 5.3) wurde auf die unter Kap. 4.5.1.1 besprochenen Pufferbedingungen eingestellt und in zwei Aliquots (jeweils ca. 600  $\mu\text{l}$ ) aufgeteilt. Ein Aliquot wurde mit 1 M HCl schrittweise bis pH = 3.81 titriert, das andere Aliquot mit 1 M NaOH bis pH = 8.65.

Für jeden pH-Schritt wurden vier NMR-Experimente aufgenommen: 1D  $^1\text{H}$ -Spektrum (Kalibrierung), [ $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-TROSY-HSQC (*backbone* Amid- und Tryptophan- $\text{N}^{\epsilon 1}$ -Resonanzen), CT-HCDCG<sup>His</sup> und CT-H(CA)CO (Seitenketten-Carboxylatgruppen). Der pH-Wert wurde vorher und nachher bestimmt.

Die Reversibilität der chemischen Verschiebungswerte konnte für den niedrigen pH-Bereich von 3.18 bis 5.28 nachgewiesen werden, da diese NMR-Titrations-Experimente umgekehrt wiederholt wurden. Dazu wurde eine NMR-Probe auf pH = 3.18 umgepuffert und dann schrittweise durch Zugabe von 1 M NaOH bis pH = 5.65 zurücktitriert.

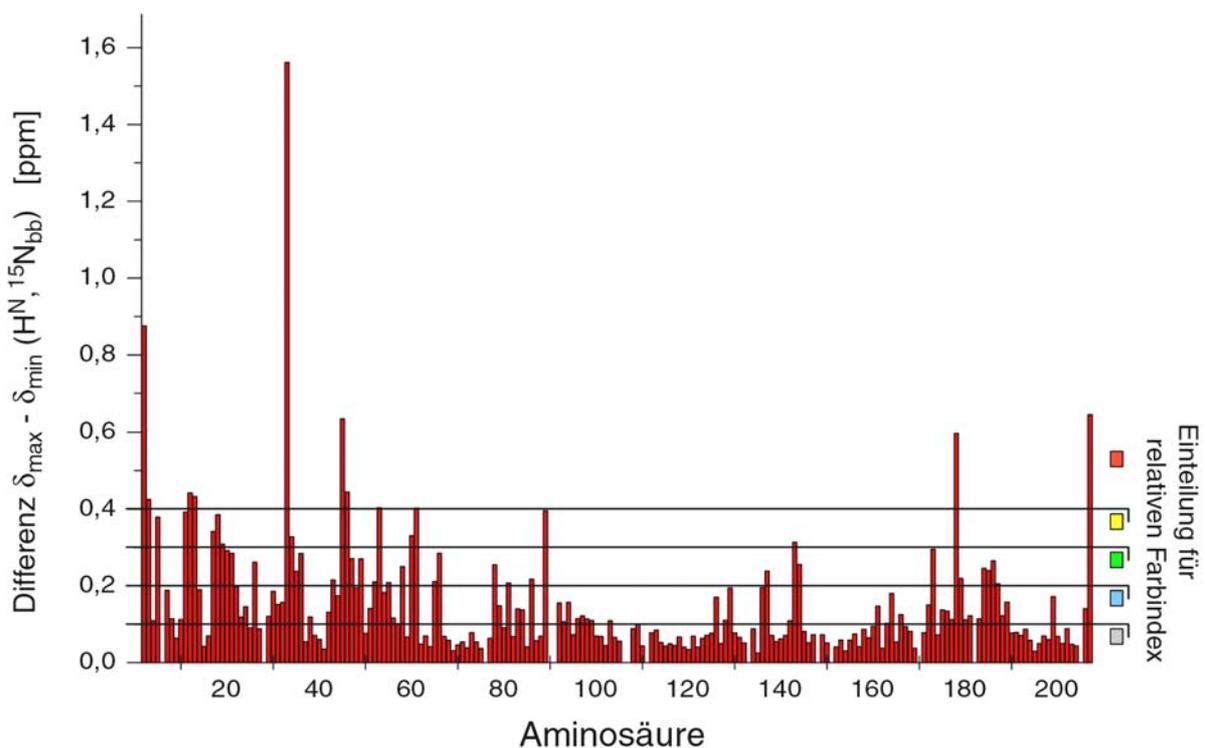


1991) wurden beide Dimensionen standardisiert (Ayed *et al.*, 2001) und über den Term (Gl. 15) zusammengefasst:

$$\Delta_{\delta} = \sqrt{\Delta(\delta_H)^2 + \Delta(\delta_N)^2 \cdot 0.154^2} \quad \text{Gl. 15}$$

Die Änderung der chemischen Verschiebungswerte im Intervall von [0, 0.1] liegt unterhalb der Signifikanzschwelle, wenn man den fünffachen Wert des Fehlers einer Zuordnung ( $\Delta^1\text{H}$ : 0.02 ppm,  $\Delta^{15}\text{N}$ : 0.1 ppm) zugrunde legt. Innerhalb dieses Intervalls wurde keine *signifikante* Änderung des chemischen Verschiebungswertes angenommen.

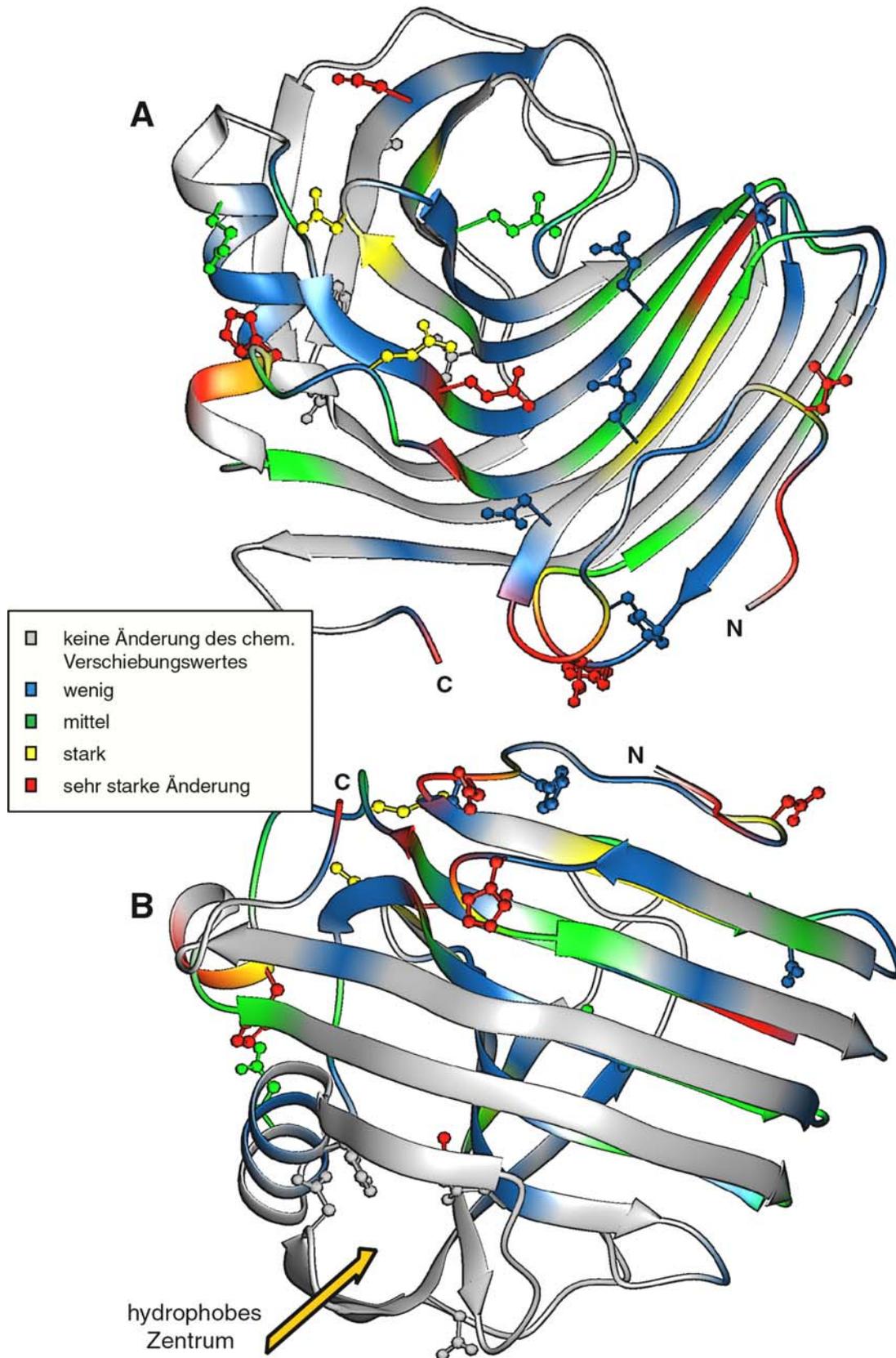
Zur Veranschaulichung wurden die Änderungen in Intervalle zu je 0.1 ppm eingeteilt, denen ein relativer Farbwert zugeordnet wurde (Abb. 4-22).



**Abb. 4-22: Die Änderung der Amid-Resonanzen des Proteinrückgrats; Einteilung in einen relativen Farbindex**

Standardisierte Differenz  $\delta_{\max} - \delta_{\min} (\text{H}^{\text{N}}, \text{N}_{\text{bb}})$  nach Gl. 15.

Dieser relative Farbindex wurde auf die Kristallstruktur der Xylanase übertragen, um zu verdeutlichen, wo im Protein die Veränderungen im Verlauf der pH-Titration erfolgen. Zusätzlich wurden der Darstellung der titrierbaren Seitenketten Asp, Glu und His eingefügt, die nach einem analogen Farbindex koloriert wurden (Abb. 4-23).



**Abb. 4-23: Relative pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebungswerte**

Auswertung der [ $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-TROSY-HSQC Spektren:  $\delta_{\text{max}} - \delta_{\text{min}}$  ergibt relativen Farbindex. **A:** Perspektive entlang der Bindungsspalte für die Xylanfaser. **B:** Xylanase  $90^\circ$  nach hinten gekippt, Blick auf die konvexe ‚Unterseite‘. Einteilung des relativen Farbindexes siehe Abb. 4-22.

Die Änderung des Ionisierungszustandes dieser Seitenketten beeinflusst das elektrostatische Feld im Protein. In einer vereinfachten Argumentation kann dies als die primäre Ursache der Veränderung der [ $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-Resonanzen im Proteinerückgrat betrachtet werden. Neben den Strukturparametern (z.B. Torsionswinkel  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\chi_1$ ), tragen das lokale elektrische Feld wie auch die Wasserstoffbrücken der Nachbargruppen zur Abschirmung der  $^{15}\text{N}$ -,  $^1\text{H}$ -Kerne bei (siehe Ausführungen in Kap. 3.5.3, S.48). Zwar berücksichtigt die Darstellung anhand der Kristallstruktur (kristallisiert bei pH 5.06) keine möglichen Konformationsänderungen, aber es gewährt einen Überblick.

Fast alle Asp- und Glu-Seitenketten ragen in die Bindungsspalte (siehe Abb. 4-23 A), um durch Wasserstoffbrücken mit den Hydroxylgruppen der Xylopyranose-Einheiten die Substratbindung zu stabilisieren. Deshalb ist das ‚innere‘  $\beta$ -Faltblatt A stärker von den Änderungen der Ionisierungszustände betroffen.

Eine Ausnahme bildet z.B. Asp12, das gruppiert mit His11 und His32 außerhalb auf der Schleife zum ersten  $\beta$ -Faltblattstrang A2 (A1 fehlt per definitionem) gelegen ist. Glu167 befindet sich ebenfalls auf der abgewandten Seite der Bindungsspalte; es ist auf der längeren  $\alpha$ -Helix 2 in Nachbarschaft zu His60 positioniert.

Die Amide der konvexen ‚Unterseite‘ (siehe Abb. 4-23 B) des Enzyms unterliegen keiner Veränderung der Resonanzen. Auf dem fünfsträngigen, ‚äußeren‘  $\beta$ -Faltblatt B, das einen Teil der ‚Unterseite‘ bildet, sind auch keine titrierbaren Seitenketten enthalten.

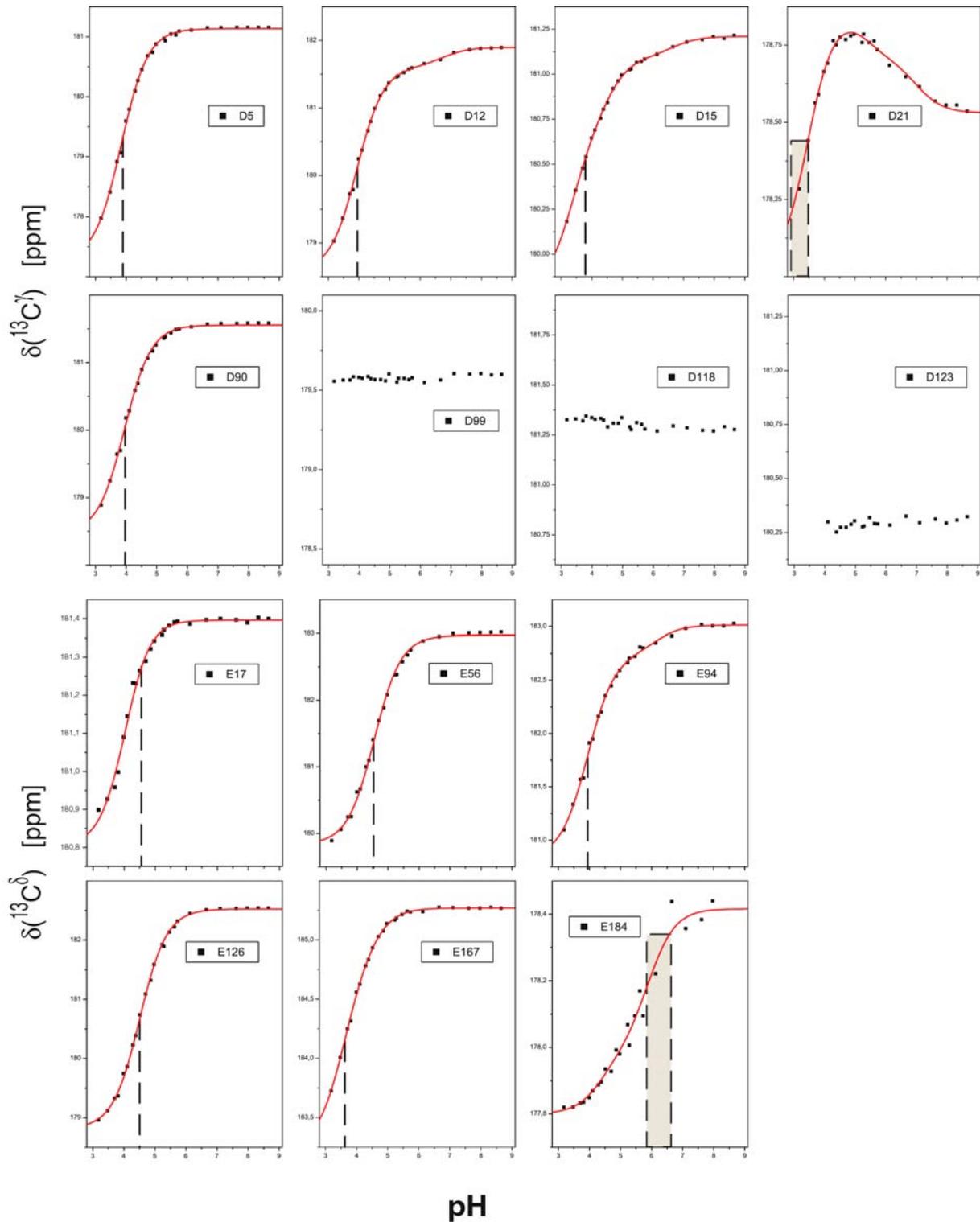
Andererseits begrenzen die gepaarten  $\beta$ -Stränge A8-A9 und die längere  $\alpha$ -Helix 2 die Unterseite. Zusammen mit dem inneren  $\beta$ -Faltblatt A wird hier ein hydrophobes Zentrum gebildet, das allerdings nicht dem Solvens zugänglich ist. Weder die Amide des Proteinerückgrats, noch die titrierbaren Seitenketten Asp99, Asp118, Asp123 und His162 ändern ihre chemischen Verschiebungswerte im Laufe der pH-Titration. Betrachtet man die Abhängigkeit der Amid-Resonanzen von der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur (siehe Kap. 3.5.3, S. 48), so ist der Umkehrschluss zulässig, dass die Konformation der Unterseite bzw. sämtliche Wechselwirkungen konstant geblieben sind (de Dios *et al.*, 1993; Übersichtsartikel: Szilagyi, 1995).

### 4.5.3. Protonierungsverhalten der Carboxylatgruppen

Die Resonanzen der Seitenketten-Carboxylatgruppen wurden für alle Titrationschritte zugeordnet. Ausnahmen bildeten Glu178C<sup>δ</sup>, das innerhalb des gesamten pH-Bereichs nicht detektierbar war, und Glu184C<sup>δ</sup>, dessen Signale im Verlauf der Titration verschwanden. Eine Erklärung hierfür ist, dass mit der Deprotonierung der Seitenketten-Carboxylatgruppe auch die aliphatische Resonanz von C<sup>γ</sup> (pH 5.28: 33.05 ppm) zu höherem Feld verschoben wird. Dadurch nähert sich diese der Resonanz des C<sup>β</sup>-Atoms (pH 5.28: 31.76 ppm). Die beiden Resonanzen entarten mit zunehmender Deprotonierung, so dass ab pH ≈ 6 keine *signifikanten* Signale überhalb des Rausch-Levels erhalten werden (siehe Kap. 4.3.3, S. 64).

An den gemessenen Titrationskurven wurde im Anschluss eine nichtlineare Regression durchgeführt, um die pK<sub>s</sub>-Werte zu bestimmen. Das zweite Modell, das voneinander *abhängige, mikroskopische* Konstanten beschreibt (siehe Kap. 3.5.1.2, S. 46), erwies sich als nicht praktikabel. Es verwendet eine höhere Anzahl an Parametern, die untereinander stark korrelieren. Ein eindeutiges Ensemble an Lösungen ließ sich nur schwer finden, da mehrere Versuche zu abweichenden Ergebnissen führten. Dennoch wurden diese Ergebnisse mit denen aus dem Modell der *unabhängigen, makroskopischen* Konstanten verglichen. Die Überprüfung durch den F-Test nach Gl. 13 (S. 48) zeigte, dass mikroskopische pK<sub>s</sub>-Werte mit mehr Parametern keine signifikante Verbesserung der Datenanpassung ergaben.

Im Folgenden wird nur das Modell der *unabhängigen, makroskopischen* Konstanten verwendet, das heißt, die Titrationskurven werden als eine Linearkombination aufeinander folgender Henderson-Hasselbalch-Kurven (Gl. 7) interpretiert (siehe Abb. 4-24 / Abb. 4-25 und Tab. 4-3 / Tab. 4-4).



**Abb. 4-24: pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebungswerte aller detektierbaren Seitenketten-Carboxylatgruppen.**

*Schwarze Quadrate:* experimentelle Datenpunkte; *rote Linie:* Repräsentation der nichtlinearen Regression nach Gl. 7 mit einem Tirationsschritt ( $j = 1$ : D5, D90, E56, E126), mit zwei Schritten ( $j = 2$ : D12, E17, E94, E167) oder drei Schritten ( $j = 3$ : D15, D21); *gestrichelte Linie:* Repräsentation des  $\text{pK}_s$ -Wertes; *grauer Bereich:* möglicher Bereich des  $\text{pK}_s$ -Wertes.

**Tab. 4-3:  $pK_s$ -Werte aller Carboxylatgruppen**

Aminosäure	Reporter- Nukleus	$pK_s$ -Wert
Asp5	C $^\gamma$	$3.84 \pm 0.02$
Asp12	C $^\gamma$	$3.94 \pm 0.14$
Asp15	C $^\gamma$	$3.35 \pm 0.14$
Asp21	C $^\gamma$	$3.46 \pm 0.13$
Asp90	C $^\gamma$	$3.88 \pm 0.07$
Asp99, 123, 118	C $^\gamma$	Kein Titrationsereignis
Glu17	C $^\delta$	$4.54 \pm 0.23$
Glu56	C $^\delta$	$4.55 \pm 0.02$
Glu94	C $^\delta$	$3.94 \pm 0.04$
Glu126	C $^\delta$	$4.51 \pm 0.02$
Glu167	C $^\delta$	$3.58 \pm 0.13$
Glu178	N $_{bb}$ Amide	$4.1 \pm 0.2$ (siehe Kap. 5.8, S. 101)
Glu184	N $_{bb}$ Amide	$6.5 \pm 0.2$ (siehe Kap. 5.9, S. 104)
Ser207COOH	H $^N$ u. N $_{bb}$	$3.9 \pm 0.1$

Nur die Seitenketten-Carboxylatgruppen von Asp5, Asp90, Glu56 und Glu126 zeigen ein ideales Ionisierungsverhalten (siehe Diskussion 5.3, S. 85), das aus Messungen an Modellsubstanzen bekannt ist (Keim *et al.*, 1973; Richarz & Wüthrich, 1978).

Die  $^{13}\text{C}^\gamma$  Resonanzen von Asp99, 123 und 118 erfahren im Verlauf der pH-Titration keine Veränderung ihrer chemischen Verschiebungswerte; es erfolgt keine Protonierung bzw. Deprotonierung (siehe Diskussion 5.4, S. 86).

Der  $pK_s$ -Wert des C-Terminus ( $3.9 \pm 0.1$  für Ser207COOH) konnte durch die Auswertung der Resonanzen der dazugehörigen  $\alpha$ -Aminogruppe abgeschätzt werden. Dieser Wert stimmt mit der Erwartung für das eher unstrukturierte C-terminale Ende der Xylanase überein (Richarz & Wüthrich, 1978).

Alle restlichen  $pK_s$ -Werte konnten durch Linearkombination von zwei Henderson-Hasselbalch-Kurven ausgewertet werden ( $j = 2$ , Gl. 7), ausgenommen Asp15 und Asp21, die mit drei Titrationsereignissen angepasst wurden ( $j = 3$ ). Für Asp15, Asp21 und Glu167 muss zusätzlich auf eine Unsicherheit bei der Bestimmung der  $pK_s$ -Werte hingewiesen werden. Da die Titrationskurven für den niedrigen pH-Bereich noch keine ausgeprägte Linkskrümmung zeigen, ist die untere Asymptote somit nicht eindeutig extrapolierbar. Dies führt zu einem größerem Fehlerintervall der  $pK_s$ -Werte.

Der erste  $pK_s$ -Wert, der mit der größten Änderung des chemischen Verschiebungswertes verbunden ist, wird als die eigentliche Ionisierungskonstante der betreffenden Seitenkette betrachtet. Weitere  $pK_s$ -Werte mit kleinerem Koeffizienten sind (in der Regel) als Wechselwirkungen mit benachbarten Seitenketten zu interpretieren, die ebenfalls ihren Ionisierungszustand ändern. Diese Wechselwirkungen können durch das veränderte elektrische Feld entstehen, das auch eine mögliche Konformationsänderung beinhalten kann. Des Weiteren kann eine Umorganisation der Wasserstoffbrücken ebenfalls Ursache für eine Änderung der Resonanz-Positionen sein.

#### **4.5.4. pH-Abhängigkeit der Imidazol- $^{13}\text{C}$ -Resonanzen**

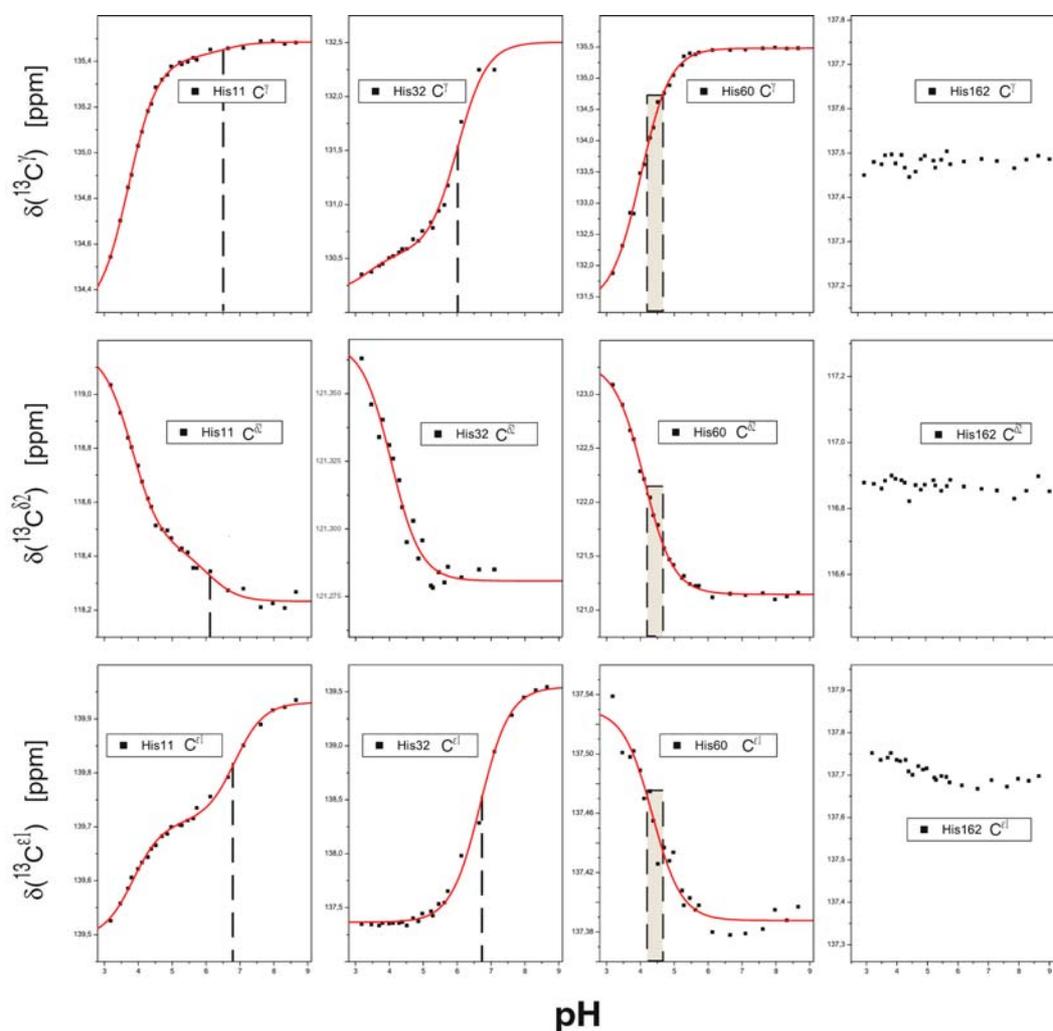
Für alle Titrationsschritte wurden die Imidazol-Resonanzen der Kohlenstoffatome  $C^\gamma/C^{\delta 2}/C^{\epsilon 1}$  zugeordnet. Allerdings zeigen die Resonanzen der Atome  $C^\gamma, \delta 2$  von His32 ab  $\text{pH} \approx 5.5$  eine zunehmende Linienverbreiterung, die eine Identifikation ab  $\text{pH} \approx 7.5$  verhinderte. Der Seitenkettenring von His162 änderte während der gesamten pH-Titration seinen Ionisierungszustand nicht (siehe Diskussion 5.4, S. 86).

Analog zu Kap. 4.5.3 wurde für die Titrationskurven von His11, His32 und His60 eine nichtlineare Regression durchgeführt. Die pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebungswerte von His32 $C^{\delta 2, \epsilon 1}$  und His60 $C^\gamma, \delta 2, \epsilon 1$  zeigte ein einfaches Titrationsverhalten ( $j = 1$ , Gl. 7, Diskussion siehe 5.6, S. 95).

Die Bestimmung des  $pK_s$ -Wertes von His60 war schwierig, da die Auswertung als Grenzfall zwischen einem ( $j = 1$ ,  $pK_s \sim 4.2$ ) bzw. zwei Titrationsschritten ( $j = 2$ ;  $pK_s \sim 4.4$ ) erfolgen kann. Die pH-Abhängigkeit der Resonanzen korrelierte sehr stark mit dem Ionisierungsverhalten von Glu167 $C^\gamma$ , das mit einem Abstand von 2.8 Å zu His60N $^{\epsilon 2}$  benachbart ist (Diskussion siehe 5.5, S. 90).

Die restlichen Resonanzen der Imidazol-Kohlenstoffatome zeigten ein Titrationsverhalten, das mit zwei Henderson–Hasselbalch-Kurven ( $j = 2$ ) ausgewertet werden musste. Für His32 $C^\gamma$  konnte der  $pK_s$ -Wert mit dem größeren Linearkoeffizienten dem eigenen Reporter-Nukleus zugeordnet werden; der zweite, niedrigere  $pK_s$ -Wert ist auf die Wechselwirkung mit einer benachbarten Seitenketten-Carboxylatgruppe (Asp12) zurückzuführen. Das Titrationsverhalten von His11 konnte erst durch parallele Auswertung des Ionisierungsverhalten von

Asp12 interpretiert werden. Der zweite  $pK_s$ -Wert, der im Falle von  $C^{\gamma, \delta^2}$  mit einem kleineren Linearkoeffizienten verbunden ist, wird His11 selbst zugeordnet (Diskussion siehe 5.6, S. 95). Die Auswertung der  $C^{\gamma}$ -Titrationsprofile ergab zusätzlich den Hinweis auf die bevorzugte Tautomerbildung der deprotonierten Imidazolringe. Mit zunehmendem pH-Wert wurden die Resonanzen zu tieferem Feld verschoben, d.h. alle Histidine bevorzugten im deprotoniertem Zustand überwiegend das  $N^{\epsilon^2}$ -H Tautomer (Blomberg *et al.*, 1977; Reynolds *et al.*, 1973). Im Falle eines  $N^{\delta^1}$ -H Tautomers wäre die  $C^{\gamma}$ -Resonanz zu höherem Feld verschoben worden. Die chemischen Verschiebungswerte  $\delta(\text{His162N}^{\epsilon^2}) = 169.5$  und  $\delta(\text{His162H}^{\epsilon^2}) = 12.4$  erlauben den Rückschluss, dass His162 deprotoniert ist und als  $N^{\epsilon^2}$ -H Tautomer vorliegt.



**Abb. 4-25: pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebungswerte der Imidazol-Kohlenstoffatome**

*Schwarze Quadrate:* experimentelle Datenpunkte; *rote Linie:* Repräsentation der nichtlinearen Regression nach Gl. 7 mit einem Titrationschritt ( $j = 1$ : His32C $^{\delta^2, \epsilon^1}$ , His60C $^{\gamma, \delta^2, \epsilon^1}$ ), mit zwei Schritten ( $j = 2$ : His11C $^{\gamma, \delta^2, \epsilon^1}$ , His32C $^{\gamma}$ ); *gestrichelte Linie:* Repräsentation des  $pK_s$ -Wertes; *grauer Bereich:* möglicher Bereich des  $pK_s$ -Wertes.

**Tab. 4-4:  $pK_s$ -Werte aller Imidazol-Kohlenstoffatome**

Aminosäure	Reporter- Nukleus	$pK_s$ -Wert	Tautomer
His11	$C^\gamma$	$6.52 \pm 0.26$	$N^{\epsilon 2}$ -H
	$C^{\delta 2}$	$6.09 \pm 0.18$	
	$C^{\epsilon 1}$	$6.84 \pm 0.05$	
His32	$C^\gamma$	$6.01 \pm 0.07$	$N^{\epsilon 2}$ -H für pH < 7.1 ab pH = 7.1: Gleichgewicht beider Tautomere
	$C^{\delta 2}$	–	
	$C^{\epsilon 1}$	$6.68 \pm 0.03$	
His60	$C^\gamma$	[4.1 – 4.7]	$N^{\epsilon 2}$ -H
	$C^{\delta 2}$	[4.1 – 4.7]	
	$C^{\epsilon 1}$	[4.1 – 4.7]	
His162	$C^\gamma$	Kein Titrationsereignis ( $pK_s < 2.7$ )	$N^{\epsilon 2}$ -H
	$C^{\delta 2}$		
	$C^{\epsilon 1}$		

## 5. Diskussion

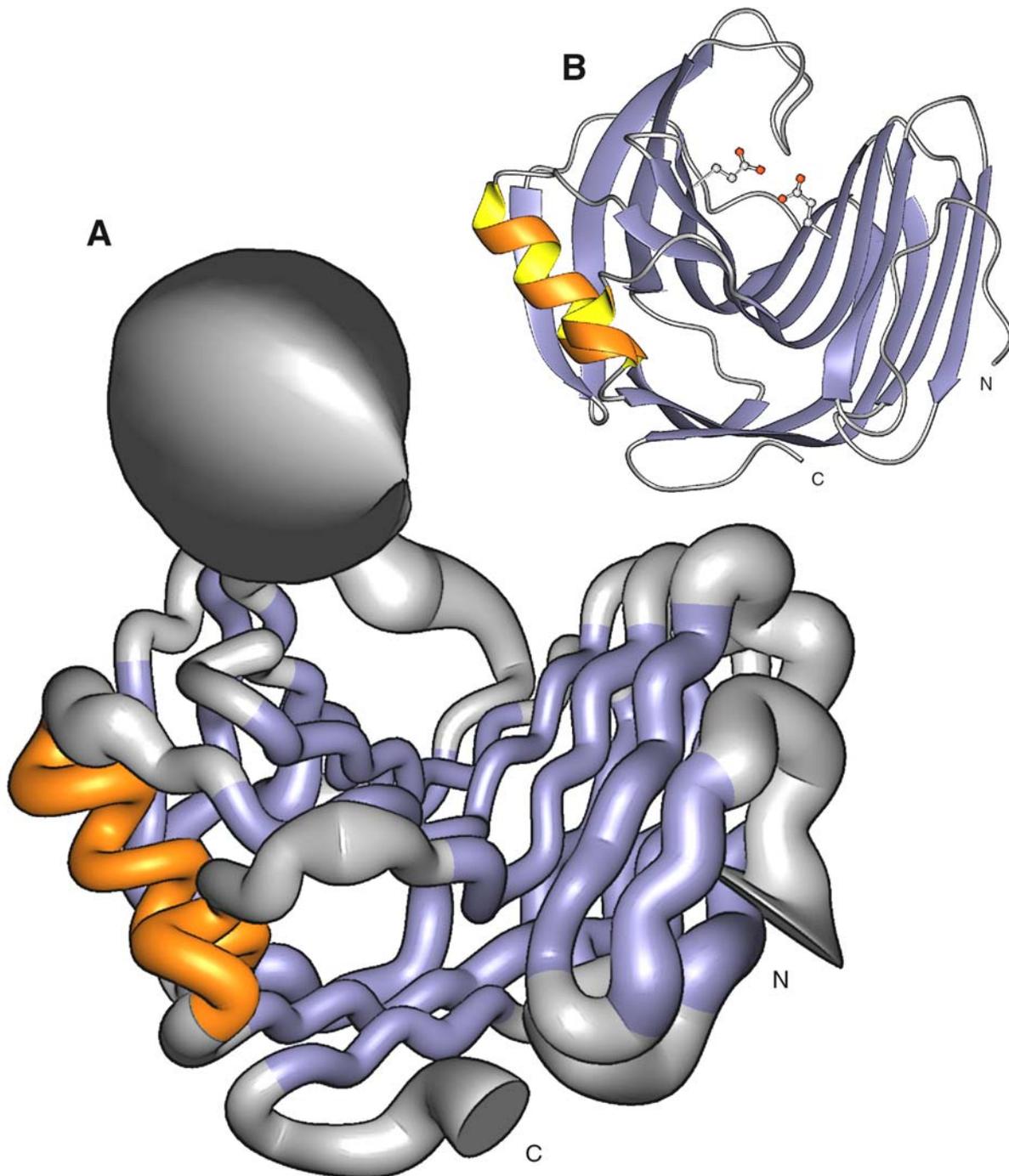
### 5.1. Lösungsstruktur der Xylanase

Die Lösungsstruktur ist mit einem *backbone* RMSD-Wert von  $2.44 \pm 0.29 \text{ \AA}^2$  als vorläufig zu betrachten. Es sind immer noch zuviele Verletzungen in den Abstandsbeschränkungen bzw. den Winkelbeziehungen enthalten. Besonders die Winkelbeziehungen müssen überprüft werden, verglichen mit den Ergebnissen des Programms NMR2ST ist ein prozentual hoher Anteil der Fehler durch TALOS generiert worden.

In jedem Fall belegt diese vorläufige Lösungsstruktur, dass die Zuordnung plausibel ist, und dass alle Strukturelemente, die bereits aus der Kristallstruktur bekannt sind, korrekt wiedergegeben werden (vgl. Abb. 5-1 A und B, S. 83).

Es deutet sich eine Tendenz an, dass die *gesamte Daumenregion*, die senkrecht über der Bindungsspalte gelegen ist, eine gewisse Flexibilität besitzt. Dies ist konsistent mit den Relaxationsuntersuchungen an der Xylanase aus *B. circulans*, die anhand der Ordnungsparameter  $S^2$  eine leichte Flexibilität vorhersagen (Connelly *et al.*, 2000). Allerdings ist die *Daumenregion* – relativ zu sich selbst betrachtet – eine sehr geordnete Struktur, die einer *Hairpin*-Konformation entspricht. Diese besteht aus einem  $\beta$ -Turn und mehreren internen Wasserstoffbrücken.

Die Orientierung der Seitenketten kann nur mit einem 3D NOESY- $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ ]-HSQC hinreichend gut bestimmt werden. Auf der Grundlage der vorliegenden Daten wurde davon abgesehen, die Lösungsstruktur zu verfeinern. Das Titrationsverhalten war Schwerpunkt dieser Untersuchung, und deshalb wurde im Folgenden die Kristallstruktur zur Bewertung der Distanzbeziehungen verwendet.

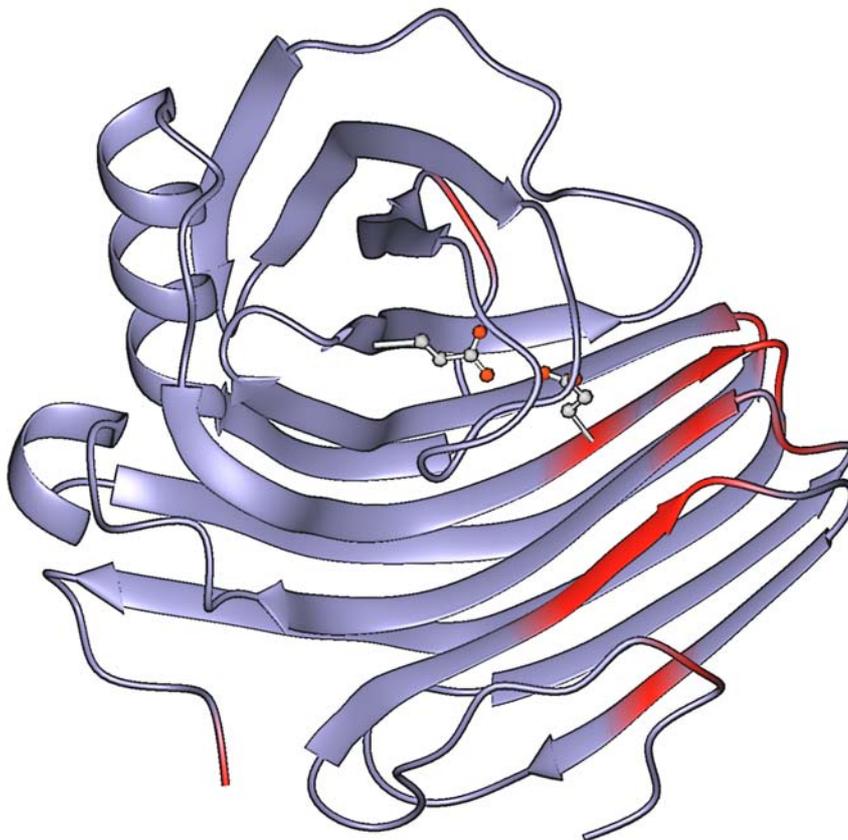


**Abb. 5-1: Vergleich der Lösungsstruktur der Xylanase mit der Kristallstruktur**

**A:** Schematische Darstellung der 20 besten Lösungsstrukturen als Mittelwert; der *variable Radius* repräsentiert die Standardabweichung des Strukturensambles vom Mittelwert; **B:** Kristallstruktur der Xylanase aus *B. agaradhaerens*: (Sabini *et al.*, 1999); *Kugel-Stab-Repräsentation* der beiden Glutamate der katalytischen Dyade; C und N bezeichnen die carboxy- bzw. aminoterminalen Enden der Peptidketten.

## **5.2. Optimierte Pufferbedingungen – Auswirkung auf die Resonanzen des Proteinrückgrats**

Das [ $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-TROSY-HSQC Spektrum der ursprünglichen Proteinprobe für die Zuordnung der Resonanzen (pH = 5.23) unterschied sich geringfügig von der Probe mit den optimierten Pufferbedingungen (pH = 5.28 mit den Zusätzen 5 % (v/v)  $d_5$ -Glyzerin / 50 mM  $\text{MgCl}_2$ ). Deshalb wurden die Differenzen der Resonanzpositionen bestimmt. Diejenigen Amid-Resonanzen des Proteinrückgrats, die signifikant voneinander abwichen, wurden auf die Kristallstruktur projiziert (Abb. 5-2).



**Abb. 5-2: Abweichungen der *backbone* Amid-Resonanzen bei Verwendung des optimierten Puffers**

Schematische Darstellung der Xylanase; *Perspektive* schräg auf die Bindungsspalte; *Kugel-Stab-Repräsentation*: Glu94, Glu184; *Differenz* der Amid-Resonanzpositionen in den [ $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-TROSY-HSQC Spektren bei zwei unterschiedlichen Pufferbedingungen: optimiert mit 5 % (v/v)  $d_5$ -Glyzerin / 50 mM  $\text{MgCl}_2$  bzw. ohne die Zusätze; *Kolorierung (rot)* erfolgte, falls die Differenz der entsprechenden Resonanzen das Fünffache des Standardfehlers überstieg.

Es ist bemerkenswert, dass die Veränderungen der chemischen Verschiebungswerte sich im Wesentlichen auf eine einzige Region beschränken: die Schleifen A2→B1, B2→A3, A4→B3

und B4→A5 mit den benachbarten Aminosäuren des inneren  $\beta$ -Faltblattes A. Möglicherweise vermittelt diese Region eine Kontaktfläche für eine Dimerisierung bzw. Polymerisierung, die ab einem pH-Wert größer als 5.6 und bei hohen Proteinkonzentrationen zu einer *reversiblen* Präzipitation führt.

Glyzerin vermittelt wahrscheinlich zwischen den hydrophoben, intermolekularen Anziehungskräften. Auf der Grundlage der Daten aus den beiden [ $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ]-TROSY-HSQC Spektren kann jedoch nicht entschieden werden, ob es ein Bindungsmotiv für Magnesiumionen gibt, oder ob es der Einfluss des zweiwertigen Ions auf die Ionenstärke des Lösungsmittels ist, das die monomere Form stabilisiert.

### 5.3. Ideales Titrationsverhalten

Nur vier der fünfzehn Seitenketten-Carboxylatgruppen (Asp5, Asp90, Glu56 und Glu126) zeigen ein ideales Ionisierungsverhalten, das durch einen einzigen Titrationschritt beschrieben werden kann. Ihre Seitenketten sind meist in Schleifen positioniert und dem Solvens zugewendet. Die zugehörigen *apparenten*  $\text{pK}_s$ -Werte stimmen mit den *intrinsischen* aus den Referenzsubstanzen überein (Keim *et al.*, 1973; Richarz & Wüthrich, 1978).

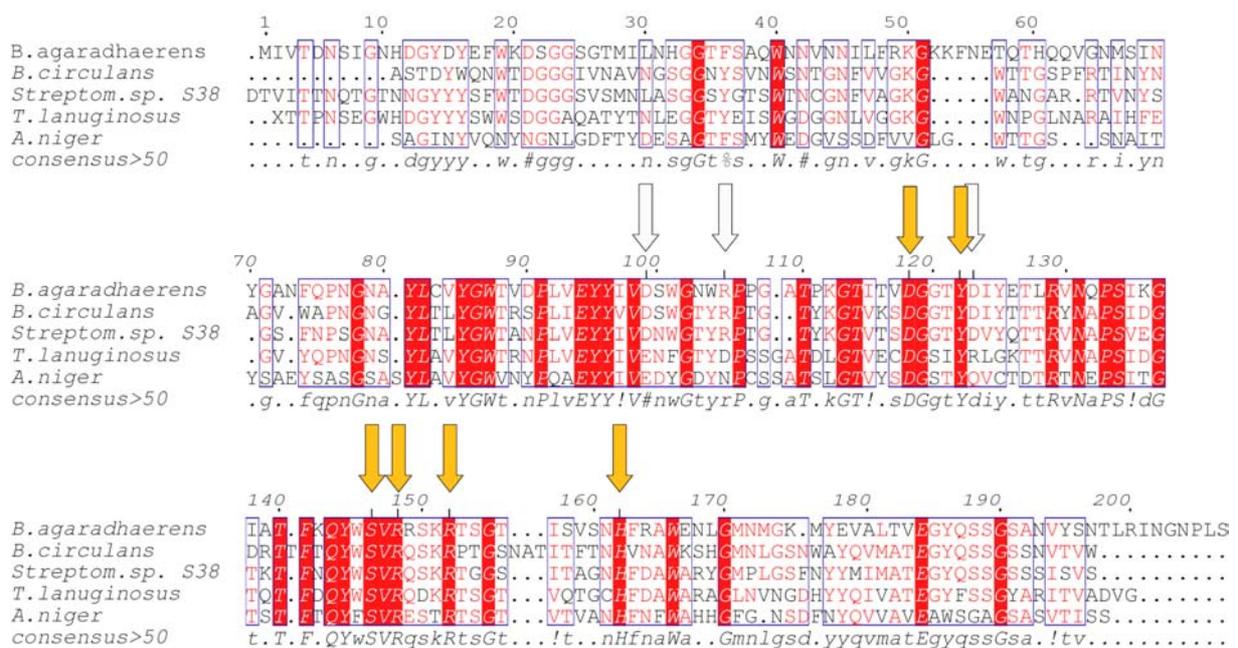
Die restlichen Seitenketten-Carboxylatgruppen zeigen ein komplexeres Verhalten, das Wechselwirkungen untereinander impliziert. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass die titrierbaren Gruppen nicht weiträumig über die ganze Proteinoberfläche verteilt sind, sondern sich überwiegend in der Substrat-Bindungsspalte befinden (siehe Abb. 4-23, S. 74).

Die Distanzbeziehungen wurden anhand der Kristallstruktur (Sabini *et al.*, 1999) ausgewertet, indem um jedes titrierbare Atom ein Radius von 7 Å gezogen wurde. Innerhalb dieses Abstandes wurde die Nachbarschaft zu weiteren titrierbaren Gruppen aufgelistet wie auch mögliche Atomgruppen, die Salz- bzw. Wasserstoffbrücken ausbilden können.

Diese Analyse enthüllte mehrere Gruppierungen, deren Wechselwirkungen im Folgenden diskutiert werden.

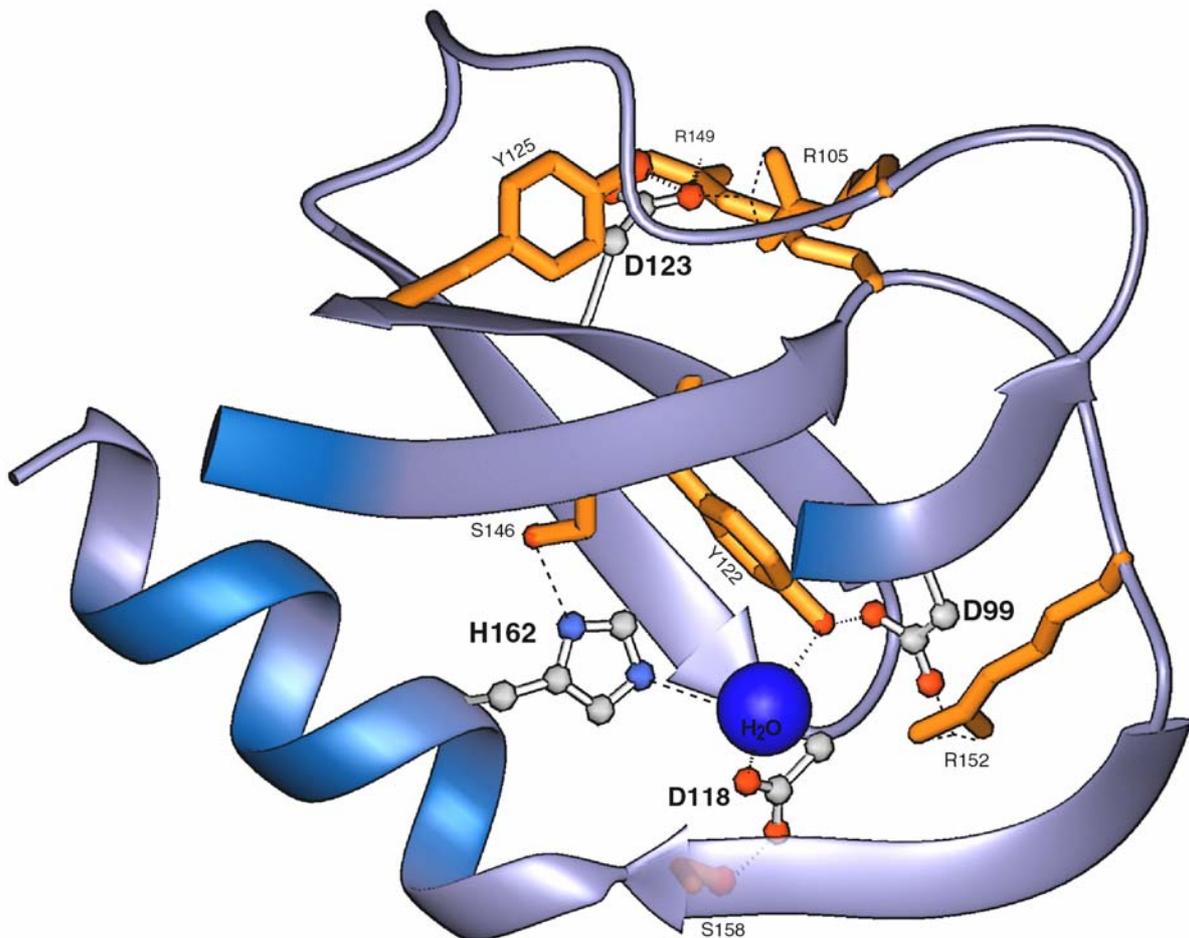
### 5.4. Kein Titrationschritt; hydrophobes Zentrum

Die Xylanase aus *B. agaradhaerens* enthält ein Histidin (His162) und drei Aspartate (Asp99, teilweise Asp118 und Asp123), die sich im hydrophoben Inneren des Enzyms befinden. Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen (Corpet *et al.*, 2000) verschiedener Familie 11 Xylanasen (siehe Abb. 5-3) ergibt, dass das hydrophobe Innere neben dem aktiven Zentrum das am besten konservierte Strukturmerkmal ist. Besonders die aromatischen Wechselwirkungen und die hydrophoben Kontakte sind stark konserviert (Georis *et al.*, 1999; Gruber *et al.*, 1998; Kregel & Dijkstra, 1996; Sabini *et al.*, 1999; Törrönen *et al.*, 1994; Törrönen & Rouvinen, 1995; Wakarchuk *et al.*, 1994a; Wouters *et al.*, 2001).



**Abb. 5-3: Sequenzvergleich ausgewählter Familie 11 Xylanasen**

Sequenzvergleich der Familie 11 Xylanasen aus *B. agaradhaerens* (Sabini *et al.*, 1999), *B. circulans* (Wakarchuk *et al.*, 1994b), *Streptomyces sp. S38* (Wouters *et al.*, 2001) *T. lanuginosus* (Gruber *et al.*, 1998) und *A. niger* (Kregel & Dijkstra, 1996); *Farbintensität* der Hervorhebungen repräsentiert das Maß der Übereinstimmung; *Pfeile* weisen auf die Darstellung der entsprechenden Aminosäure-Seitenketten in Abb. 5-4 hin, *graue Pfeile* für consensus > 50 %, *orange Pfeile* für consensus ≈ 100 %; MULTALIN Version 5.4.1 (Corpet *et al.*, 2000).



**Abb. 5-4: Ausschnitt aus der Kristallstruktur – das hydrophobe Zentrum**

Schematische Darstellung der Xylanase; *Perspektive*: aus dem Inneren heraus auf den Zentrum; *Kugel-Stab-Repräsentation*: Asp, His; *Kugel (blau)*: Sauerstoff des eingeschlossenen Kristallwassermoleküls mit 0.9-fachem Van-der-Waals-Radius; *Röhren-Repräsentation (orange)*: Arg, Ser, Tyr; *gestrichelte Linien* indizieren mögliche Salz- und Wasserstoffbrücken.

In Analogie zu den Ergebnissen von Joshi *et al.*, 1997 sind alle drei Aspartatreste innerhalb des betrachteten pH-Bereichs deprotoniert, ihre  $pK_s$ -Werte müssen also kleiner als 2.7 sein, wenn man vom Beginn eines einsetzenden Titrationsverhaltens bis zum  $pK_s$ -Wert mindestens 0.5 pH-Einheiten abschätzt. Die möglichen Salz- und Wasserstoffbrücken, die sich durch diesen ionisierten Zustand ergeben, tragen wahrscheinlich sehr stark zur nativen Proteinstruktur bei (Davoodi *et al.*, 1995; Plesniak *et al.*, 1996). Diese These wird durch den experimentellen Befund gestützt, dass das Enzym unter sehr sauren Bedingungen ( $pH < 3.1$ ) irreversibel denaturiert. Wird eines der drei Aspartate oder His162 protoniert (bzw. alle möglichen Permutationen), führt dies zum Verlust von strukturerhaltenden Wechselwirkungen und das Protein entfaltet sich.

Asp99 ist komplett im Inneren des Enzyms eingeschlossen und bildet Wasserstoffbrücken zur positiv geladenen Guanidinium-Gruppe von Arg152 und zum phenolischen Sauerstoff O<sup>n</sup> von Tyr122. Die Bedeutung der Salzbrücke wird aus der Tatsache ersichtlich, dass einerseits die negative Ladung an Position 99 durch Aspartat / Glutamat, andererseits die positive Ladung an Position 152 durch Arginin / Lysin innerhalb der Familie 11 Xylanasen konserviert ist. Der chemische Verschiebungswert des C<sup>γ</sup>-Carboxylatoms von Asp99 erscheint relativ weit zu hohem Feld verschoben für einen deprotonierten Zustand (siehe Abb. 4-18, S.64). Aber die hydrophobe Umgebung, der stark elektronenziehende Charakter der Wasserstoffbrücke zur Guanidinium-Gruppe von Arg152 und die Wechselwirkung zum benachbarten Tyr122 können eine solche Verschiebung zu höherem Feld bewirken (Batchelor *et al.*, 1973; Gu *et al.*, 1994).

Asp118 ist ebenfalls eine relativ starke Säure, aber die Carboxylatgruppe ist keiner positiven Ladung benachbart. Es ist weder vollständig im Inneren des Enzyms eingeschlossen, noch ist es völlig dem Solvens ausgesetzt. Die Ladung des Carboxylations von Asp118 scheint durch die Wasserstoffbrücken zu dem Amid-Proton von Ser158, zu der Hydroxygruppe von Ser158 und zu einem eingeschlossenen Wassermolekül stabilisiert zu sein. Die Wechselwirkung mit dem Amid-Proton von Ser158 wird durch dessen chemischen Verschiebungswert bestätigt, der zu sehr tiefem Feld verschoben ist ( $\delta(\text{Ser158N}_{bb}) = 131.5$  und  $\delta(\text{Ser158H}^N) = 11.22$ ). In der Xylanase aus *B. circulans* ist die Position von Ser158 mit einem Threonin besetzt, dessen Amidproton und dessen Hydroxygruppe die entsprechenden Wechselwirkungen ausüben (Joshi *et al.*, 1997). Dies ist ein Beleg dafür, dass nicht die Aminosäure konserviert ist, sondern die resultierenden Wechselwirkungen.

Asp123 ist, ähnlich wie Asp118, nur teilweise im hydrophoben Inneren des Enzyms angeordnet. Die negative Ladung der Carboxylatgruppe ist aber durch die unmittelbare Nachbarschaft zu den beiden positiv geladenen Guanidinium-Gruppen von Arg105 und Arg149 stabilisiert. Ausserdem ist noch eine weitere Wechselwirkung durch eine Wasserstoffbrücke mit dem phenolischen Sauerstoffatom O<sup>n</sup> von Tyr125 möglich.

Das neutrale His162 ( $pK_s < 2.7$ , in Analogie zu den Aspartaten) wird durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken mit dem eingeschlossenen Wassermolekül und der Hydroxygruppe des Ser146 stabilisiert. Eine Wasserstoffbrückenbindung wird von N<sup>δ1</sup> zum (OH)<sup>γ</sup> des Ser146 gebildet, die andere durch das Wasserstoffatom des N<sup>ε2</sup>-H Tautomers zu dem Wassermolekül.

Dass das Signal His162N<sup>ε2</sup>H in allen TROSY-HSQC Spektren über den gesamten pH-Bereich detektiert werden kann, ist ein Beleg dafür, dass der chemische Austausch über das eingeschlossene Wassermolekül mit dem restlichen Solvens stark eingeschränkt ist. Folglich muss His162 völlig im hydrophoben Zentrum des Enzyms eingebettet sein. Anderenfalls wäre eine starke Linienverbreiterung die Folge, die z.B. die Identifikation der anderen N<sup>ε2,δ1</sup>-Protonen in den Imidazolringen von His11 und His32, die beide dem Solvens zugewendet sind, in dem gleichen NMR-Experiment verhindert.

Da die Bindungsachse (C-H)<sup>ε1</sup> des His162 Rings fast senkrecht auf den Schwerpunkt des Phenylrings von Tyr122 zeigt, ist eine schwache aromatische  $\pi,\pi$ -Wechselwirkung anzunehmen. Die leicht positive Partialladung des Imidazol-Protons kann von dem eher negativ geladen Kohlenstoffring des Tyrosins angezogen werden (Armstrong *et al.*, 1993; Burley & Petsko, 1988). Auch der chemische Verschiebungswert  $\delta(\text{His162H}^{\epsilon1}) = 5.48$ , die gegenüber der Resonanz  $\delta(\text{His162H}^{\delta2}) = 6.42$  zu höheren Feld verschoben ist, deutet auf einen Ringstrom-Effekt der nahen Tyrosin-Seitenkette hin. Für unbeeinflusste Modellpeptide wird eigentlich eine umgekehrte Resonanzlage zwischen H<sup>ε1</sup> und H<sup>δ2</sup> erwartet (Bundi & Wüthrich, 1979).

Der ungewöhnlich niedrige pK<sub>s</sub>-Wert von His162 wird zweifellos dadurch hervorgerufen, dass der Imidazolring völlig in der hydrophoben Umgebung eingebettet ist. Abgesehen von den oben genannten polaren Seitenketten, die an den Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind, ist His162 ausschließlich von unpolaren Seitenketten der Aminosäuren Val98, Ile115, Tyr122 und Ile157 umgeben, die ebenfalls konserviert sind.

Ebenfalls ungewöhnlich niedrige pK<sub>s</sub>-Werte (< 2.8) von Histidin-Seitenketten wurden bereits für andere Enzyme wie Cyclophilin und das FK506 Bindungsprotein publiziert (Yu & Fesik, 1994). Auch auf der anderen Seite der pH-Skala existieren ungewöhnliche pK<sub>s</sub>-Werte für Histidinreste, wie sie z.B. für T4 Lysozym (pK<sub>s</sub> = 9.1, Anderson *et al.*, 1990) und für Superoxid Dismutase (pK<sub>s</sub> = 10.4, Stoesz *et al.*, 1979) gemessen wurden. Es ist bemerkenswert, dass die Säurekonstante des Imidazolrings in einem Bereich von 10<sup>8</sup> variieren kann.

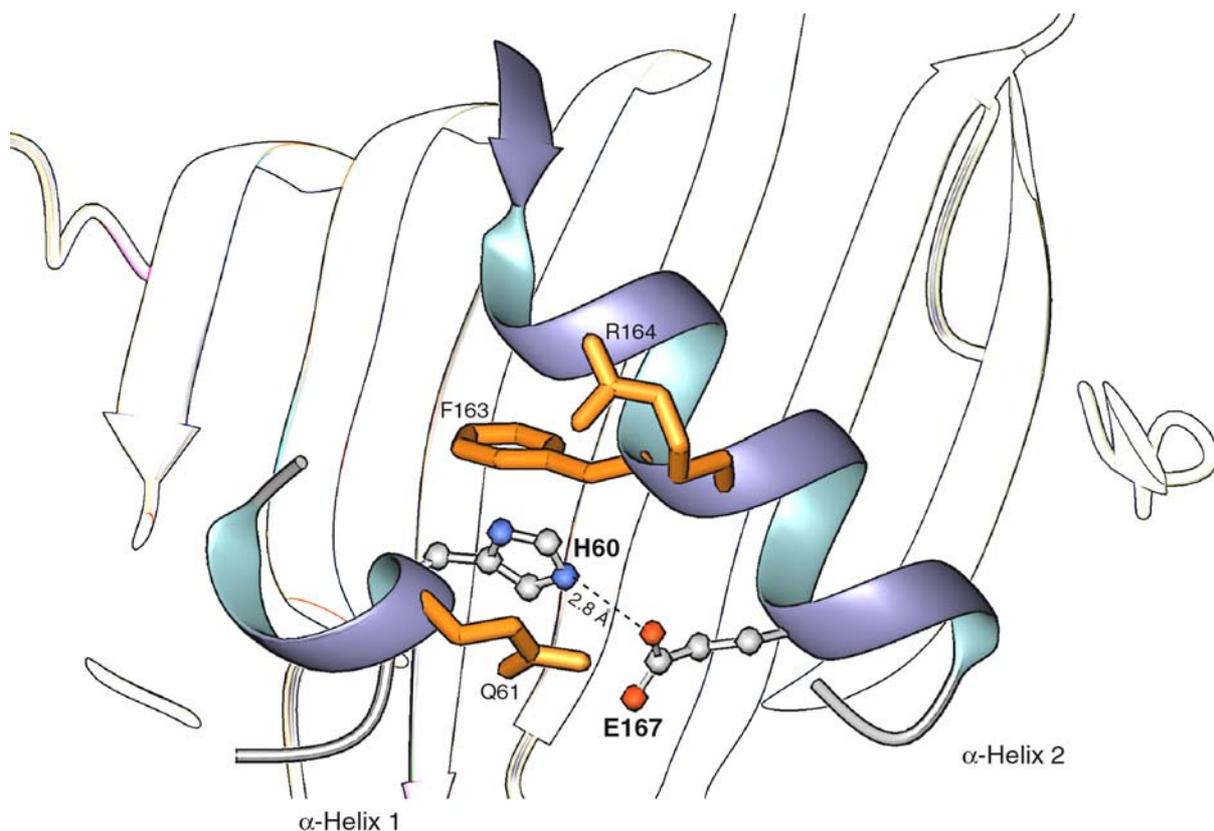
Insgesamt betrachtet sind die Aminosäuren His162, Ser146 und Tyr122 in allen Xylanasen der Familie 11 hoch konserviert. Aber auch die Wechselwirkungen des eingeschlossenen Wassermoleküls sowie das hydrophobe Zentrum selbst sind stark konserviert. Wie in Kap. 4.5.2 (S. 72) die Abhängigkeit der *backbone* Amid-Resonanzen vom pH-Wert beschrieben

wurde, erfahren die Amide der näheren Umgebung um His162 keine Veränderungen. Die Konformation der konvexen ‚Unterseite‘ bleibt im Verlauf der pH-Titration konstant (siehe auch Abb. 4-23 B, S. 74).

Dieser Befund deutet an, dass dieses Ensemble an konservierten Strukturmerkmalen vielleicht eine Voraussetzung für die Bildung der restlichen Proteinstruktur ist.

### 5.5. Gruppierung His60 – Glu167

Die Gruppierung His60 – Glu167 befindet sich auf der abgewandten Seite der Bindungsspalte. Beide Seitenketten füllen eine kleine Vertiefung auf der Außenseite des Proteins, dessen Boden durch das  $\beta$ -Faltblatt A gebildet wird. Die beiden  $\alpha$ -Helices 1 und 2 begrenzen die Seiten.



**Abb. 5-5: Ausschnitt aus der Kristallstruktur: die Gruppierung His60 – Glu167**

Schematische Darstellung der Xylanase; *Kugel-Stab-Repräsentation*: Glu, His; *Röhren-Repräsentation (orange)*: Asn, Arg, Phe; *gestrichelte Linie* indiziert mögliche Wasserstoffbrücke Glu167O<sup>ε</sup> zu His60N<sup>ε2</sup>; *Hintergrund*:  $\beta$ -Faltblatt A.

Die Auswertung der  $pK_s$ -Werte von His60C <sup>$\gamma$ ,  $\delta^2$ ,  $\epsilon^1$</sup>  ergab einen Grenzfall, bei dem entweder ein ( $j = 1$ ,  $pK_s \sim 4.2$ ) oder zwei Titrationschritte ( $j = 2$ ;  $pK_s \sim 4.4$ ) während der nichtlinearen Regression angewendet werden müssen. Durch die räumliche Nähe zu Glu167 (His60N <sup>$\epsilon^2$</sup>  - Glu167O <sup>$\epsilon$</sup> : 2.8 Å), bzw. durch die hieraus resultierende gemeinsame Wasserstoffbrücke, ist das Titrationsverhalten des Imidazolrings sehr stark vom Ionisierungszustand der Carboxylatgruppe bestimmt bzw. umgekehrt analog.

Der  $pK_s$ -Wert des His60 erscheint ungewöhnlich, da man eigentlich erwartet, dass der Abstand der  $pK_s$ -Werte sich vergrößern sollte: Die negative Ladung einer Carboxylatgruppe stabilisiert einen protonierten, positiv geladenen Imidazolring, dessen  $pK_s$ -Wert sollte sich gegenüber einer unbeeinflussten Referenzsubstanz erhöhen ( $pK_s > 7.0$ ). Analog sollte sich der  $pK_s$ -Wert der Carboxylatgruppe erniedrigen, wie es zumindest für Glu167 zutrifft.

Die Titrationskurven beider Seitenketten zeigen keine offensichtlichen Wendepunkte, die einzelne Titrationschritte voneinander trennen, d.h. ihre  $pK_s$ -Werte liegen dicht beieinander. Eine Annäherung an dieses Problem stellt die Auswertung mit einer modifizierten Hill-Gleichung dar (siehe Gl. 10, S. 46). Der Hill-Koeffizient  $n$  gibt einen ersten Hinweis auf die Kooperativität beider Titrationsverhalten.

**Tab. 5-1: Hill-Koeffizient  $n$  und  $pK_s$ -Werte der Gruppierung His60 – Glu167**

Aminosäure	Reporter-Nukleus	Hill-Koeffizient $n$	$pK_s$ -Wert
Glu167	C <sup><math>\delta</math></sup>	$0.85 \pm 0.03$	$3.66 \pm 0.04$
His60	C <sup><math>\gamma</math></sup>	$0.98 \pm 0.05$	$3.99 \pm 0.04$
	C <sup><math>\delta^2</math></sup>	$0.91 \pm 0.04$	$4.05 \pm 0.03$
	C <sup><math>\epsilon^1</math></sup>	$0.76 \pm 0.14$	$4.19 \pm 0.18$

Der Tabelle 5-1 ist zu entnehmen, dass die Ionisierungszustand bezüglich des Imidazolatoms C <sup>$\epsilon^1$</sup>  mit der Carboxylatgruppe C <sup>$\delta$</sup>  kooperativ verläuft. Ein Hill-Koeffizient kleiner als 1 bedeutet, dass der Protonierungs- bzw. Deprotonierungsvorgang verzögert ist, da eine weitere Gruppe in unmittelbarer Nachbarschaft protoniert bzw. deprotoniert werden muss (Markley, 1975).

Eine Auswertung mit zwei Titrationschritten nach Gl. 7 und eine anschließende Beurteilung durch einen F-Test ergab, dass die Fitparameter mit  $j = 2$  die Messwerte von Glu167 signifikant besser beschreiben als mit  $j = 1$ . Es ergibt sich ein  $pK_s$ -Wert von  $3.58 \pm 0.13$  für Glu167C<sup>δ</sup> und ein zweiter Wert von  $4.41 \pm 0.28 / c = 0.19$ , der das Ionisierungsverhalten von His60 reflektiert. Wahrscheinlich liegt der tatsächliche  $pK_s$ -Wert von Glu167 sogar noch tiefer, da die Titrationskurve noch keine signifikante Linkskrümmung zeigt.

Die Auswertung der Titrationskurven von His60 für  $j = 2$  mit mehr Parametern ist gemäss des F-Tests nicht zulässig, auch wenn die Ergebnisse mit denen für Glu167 durchaus übereinstimmen (siehe Tab. 5-2). Da Kooperativität jedoch offensichtlich ist, werden als Konsequenz die  $pK_s$ -Werte für His60 mit einem Intervall von  $[4.1 - 4.7]$  angegeben, wenn der Fehlerbereich noch hinzugerechnet wird. Der tatsächliche  $pK_s$ -Wert von His60 liegt wahrscheinlich an der oberen Grenze des gemessenen Intervalls, um 4.7 oder auch höher.

**Tab. 5-2:  $pK_s$ -Werte für makroskopische, apparente Konstanten nach Gl. 7 mit einem bzw. zwei Titrationschritten**

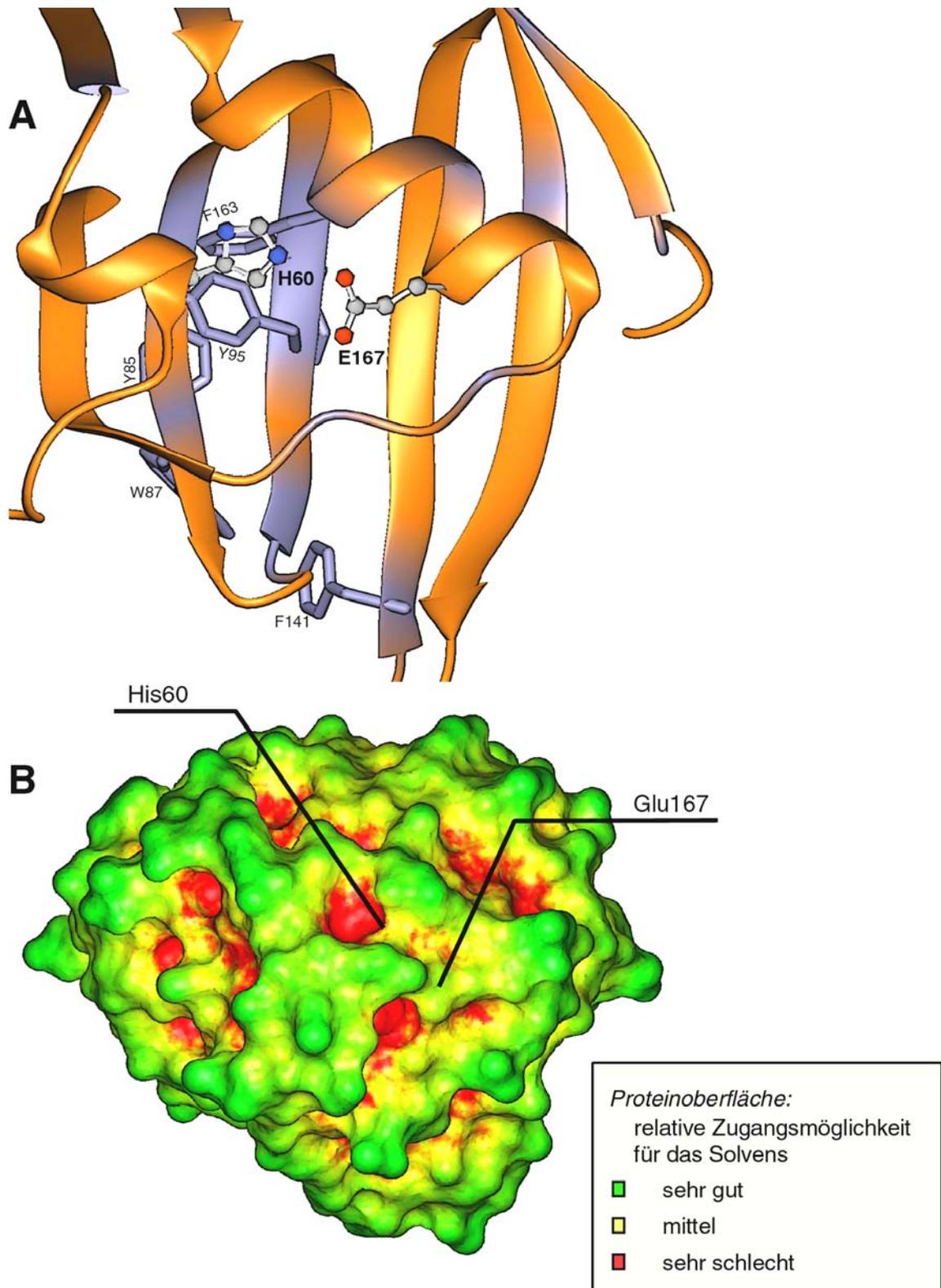
Aminosäure	Reporter-Nukleus	$pK_s$ -Wert	zusätzliches Titrationsereignis	F-Test	
Glu167	C <sup>δ</sup>	$3.58 \pm 0.13$	für $j = 2$ His60 ( $4.41 \pm 0.28 / c = 0.19$ )	erlaubt	
His60	C <sup>γ</sup>	$4.01 \pm 0.02$	für $j = 1$	erlaubt	
	C <sup>δ2</sup>	$4.11 \pm 0.02$			
	C <sup>ε1</sup>	$4.35 \pm 0.08$			
	C <sup>γ</sup>	$4.12 \pm 0.48$	für $j = 2$ Glu167 ( $3.73 \pm 0.28 / c = 0.37$ )	<i>nicht</i> erlaubt	
	C <sup>δ2</sup>	$4.41 \pm 0.33$			Glu167 ( $3.84 \pm 0.41 / c = 0.61$ )
	C <sup>ε1</sup>	$4.62 \pm 0.42$			Glu167 ( $3.29 \pm 0.58 / c = 0.45$ )

Der ungewöhnlich niedrige  $pK_s$ -Wert von His60, der im Gegensatz zu dem elektrostatischen Einfluss einer benachbarten Carboxylatgruppe steht, deutet auf eine ungewöhnliche Umgebung dieser Gruppierung hin. Wie anfangs schon beschrieben, liegen His60 und Glu167 in einer Vertiefung auf der Außenseite des Proteins, die von den zwei  $\alpha$ -Helices umrahmt wird.

Eine genauere Betrachtung ergibt, dass der Imidazolring sich am N-Terminus der kleinen  $\alpha$ -Helix 1 befindet. Aus experimentellen wie auch theoretischen Untersuchungen ist bekannt,

dass die Anordnung der planaren *backbone* Amidgruppen in einer  $\alpha$ -Helix zu einem makroskopischen Dipolmoment parallel zur Windungsachse führen (Hol *et al.*, 1978; Karshikoff *et al.*, 1993; Perutz *et al.*, 1985; Wada, 1976). Vielleicht könnte der Imidazolring von His60 unter einem schwachen Einfluss eines Pluspols stehen. Ein Imidazol-Kation zu bilden, sollte somit thermodynamisch mit einem zusätzlichen Energieaufwand verbunden sein.

Dass der Seitenkettenring von His60 den neutralen Zustand bevorzugt, lässt sich auch mit dem *Born*- bzw. dem *Desolvations*-Effekt begründen (Rashin & Honig, 1985). Der Vergleich der Aminosäuresequenz mit anderen Familie 11 Xylanasen enthüllt, dass His60 ‚wie ein Deckel auf einer konservierten, hydrophoben Nische‘ positioniert ist. Insgesamt betrachtet ist His60 nur sehr eingeschränkt dem Solvens zugänglich (siehe Abb. 5-6 B). Alle benachbarten Seitenketten stammen von neutralen Aminosäuren; die überwiegende Mehrheit ist darüber hinaus noch unpolar. Direkt unterhalb des Imidazolrings befinden sich die konservierten Aminosäuren Tyr95 und Phe163, die zueinander  $\pi, \pi$ -Wechselwirkungen ausbilden. Es ist energetisch ungünstig, eine einzelne Ladung aus der wässrigen Lösung mit hoher Polarität ( $\epsilon_{\text{Wasser}} = 78$ ) in eine Umgebung mit wesentlich niedriger Dielektrizitätskonstante zu verschieben (konträre Diskussion:  $\epsilon_{\text{Protein}} = 2 - 4$ , Bone & Pethig, 1985; Gilson & Honig, 1986; Harvey & Hoekstra, 1972; Löffler *et al.*, 1997; Simonson & Perahia, 1995 oder  $\epsilon_{\text{Protein}} \approx 12$ , Dwyer *et al.*, 2000; Warshel, 1981; Warshel *et al.*, 1984). Umgekehrt wird His60 in hydrophober Umgebung einen ungeladenen Ionisierungszustand bevorzugen.



**Abb. 5-6: Vertiefung des Bereichs mit His60: Umgebung aus konservierten, hydrophoben Aminosäuren und eingeschränkte Zugangsmöglichkeit für das Solvens**

**A:** Schematische Darstellung der Xylanase; *Kugel-Stab-Repräsentation*: His60, Glu167; *Röhren-Repräsentation*: Phe, Trp, Tyr; *graue Färbung*: konservierte, hydrophobe Aminosäuren. **B:** Darstellung der Proteinoberfläche; *relativer Farbindex* entspricht dem prozentualen Anteil der für das Solvens frei zugänglichen Oberfläche.

### 5.6. Gruppierung His11 – Asp12 – His32

Im Gegensatz zu His162 oder auch His60 sind die Seitenketten von His11 und His32 größtenteils dem Solvens ausgesetzt. His32 ist auf der Schleife B1→B2 positioniert, während His11 und Asp12 vor dem ersten  $\beta$ -Strang A2 gelegen sind (siehe Abb. 5-7).

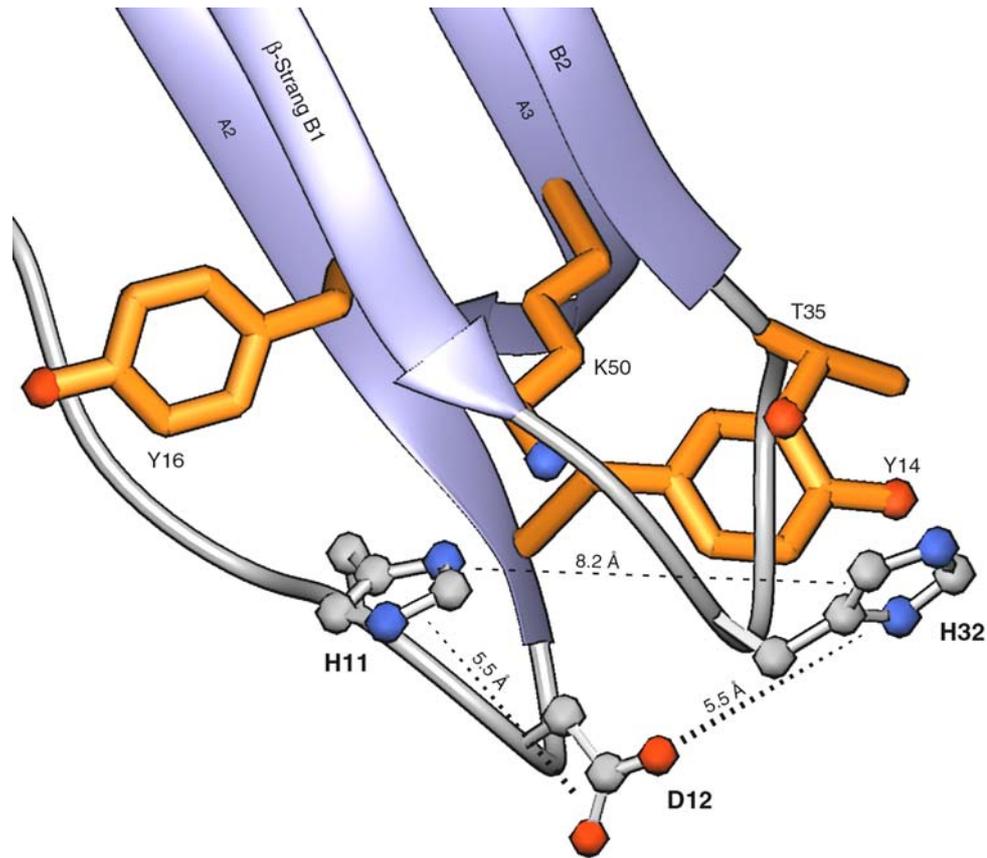
Bezüglich der Sequenzhomologie innerhalb der Familie 11 Xylanasen kann für die drei Aminosäuren selbst keine signifikante Aussage gemacht werden. Nach His11 und Asp12 folgen allerdings konservierte Positionen (14, 15 und 16), die mit mindestens zwei Tyrosinresten besetzt sind. Auch für His32 sind die nachfolgenden zwei Positionen konserviert: Mit hoher Wahrscheinlichkeit folgt ein Glycin, das auch durch ein Alanin ersetzt sein kann, und anschließend hoch konserviert ein weiteres Glycin auf Position 34. Die beiden Glycine sind somit als eine notwendige Voraussetzung konserviert, damit eine Schleife gebildet werden kann.

Die relative Anordnung der drei titrierbaren Gruppen kann vereinfacht wie folgt dargestellt werden:

His11, His32 und Asp12 bilden zueinander ein gleichschenkliges Dreieck, an dessen Spitze die Carboxylatgruppe von Asp12 sitzt. Die Schenkel haben eine Länge von ca. 5.5 Å, während die Grundlinie (Imidazolring His11 zu His32) ca. 8.2 Å lang ist (siehe Abb. 5-7).

Die Titrationsreihen von His11C <sup>$\gamma$ , $\delta^2$ , $\epsilon^1$</sup> , Asp12C <sup>$\gamma$</sup>  und His32C <sup>$\gamma$</sup>  zeigen einen biphasischen Kurvenverlauf; signifikante Flachpunkte markieren je zwei pK<sub>s</sub>-Werte, die mit nichtlinearer Regression ( $j = 2$ , Gl. 7) bestimmt wurden.

Die Resonanzen His32C <sup>$\gamma$ , $\delta^2$</sup>  wurden nur bis zu einem pH-Wert von 7.1 ausgewertet. Die starke Linienverbreiterung, die im weiteren Verlauf der pH-Titration erfolgte, ist wahrscheinlich auf ein dynamisches Gleichgewicht zwischen dem N <sup>$\epsilon^2$</sup> -H und N <sup>$\delta^1$</sup> -H Tautomer zurückzuführen. Darüber hinaus war die pH-abhängige Änderung der Resonanzen ( $\delta_a$ - $\delta_b$ ) von His32C <sup>$\delta^2$</sup>  so klein, dass nur ein pK<sub>s</sub>-Wert, der aus der Wechselwirkung mit Asp12 resultiert, zugeordnet werden konnte (siehe Tab. 5-3).



**Abb. 5-7: Schematische Darstellung der Gruppierung His11 – Asp12 – His32**

Schematische Darstellung der Xylanase; *Kugel-Stab-Repräsentation*: Asp, His; *Röhren-Repräsentation*: Lys, Thr, Tyr; *gestrichelte Linien* repräsentieren Abstände innerhalb der Kristallstruktur.

**Tab. 5-3: p*K<sub>s</sub>*-Werte für die Gruppierung His11 – Asp12 – His32**

Aminosäure	Reporter-Nukleus	p <i>K<sub>s</sub></i> -Wert	zusätzliches Titrationsereignis	Tautomer
Asp12	C <sup>δ</sup>	3.94 ± 0.02	His11 und/oder His32 (6.73 ± 0.16 / c = 0.08)	
His11	C <sup>γ</sup>	6.52 ± 0.26	Asp12 (3.71 ± 0.02 / c = 0.95)	N <sup>ε2</sup> -H
	C <sup>δ2</sup>	6.09 ± 0.18	Asp12 (3.82 ± 0.07 / c = 0.80)	
	C <sup>ε1</sup>	6.84 ± 0.05	Asp12 (3.85 ± 0.06 / c = 0.49)	
His32	C <sup>γ</sup>	6.01 ± 0.07	Asp12 (3.36 ± 0.84 / c = 0.15)	N <sup>ε2</sup> -H für pH < 7.1 ab pH > 7.1 Gleichgewicht
	C <sup>δ2</sup>	--	Asp12 (4.05 ± 0.09)	
	C <sup>ε1</sup>	6.68 ± 0.03		

Die Analyse der Kristallstruktur ergibt keine bevorzugte Wechselwirkung der Carboxylatgruppe des Asp12 mit einer der beiden Histidin-Seitenketten. Das zweite Titrationsereignis

wird somit innerhalb der Fehlergrenzen den Wechselwirkungen *beider* Imidazolringe zugeordnet.

Umgekehrt kann keine Interaktion zwischen den Histidinen selbst festgestellt werden; die zusätzlichen Titrationsereignisse mit dem  $pK_s$ -Werten unterhalb von 4.0 beziehen sich ausschliesslich auf Asp12.

### 5.7. Aspartat 21 - weitreichende Wechselwirkungen über 9 Ångström

Die Analyse der Titrationskurve von Asp21C<sup>Y</sup> (siehe Abb. 5-8 A1) ergibt ein außergewöhnliches Titrationsverhalten: Nach Erreichen eines Maximums fällt die Messkurve wieder ab, bevor sie einen horizontalen Kurvenverlauf einnimmt. Durch Verifizierung der Datenanalyse mit einer F-Test Statistik kann gezeigt werden, dass der Kurvenverlauf zusammen mit zwei zusätzlichen Titrationsereignissen ausgewertet werden muss ( $pK_s = 5.3$  bzw.  $6.9$ , siehe Tab. 5-4). Diese Beobachtung lässt sich nicht mit dem elektrostatischen Einfluss nahegelegener, titrierbarer Gruppen ( $pK_s \approx 5.0 - 7.2$ ) erklären, da sich innerhalb eines Radius von  $7 \text{ \AA}$  keine solche Nachbargruppen befinden.

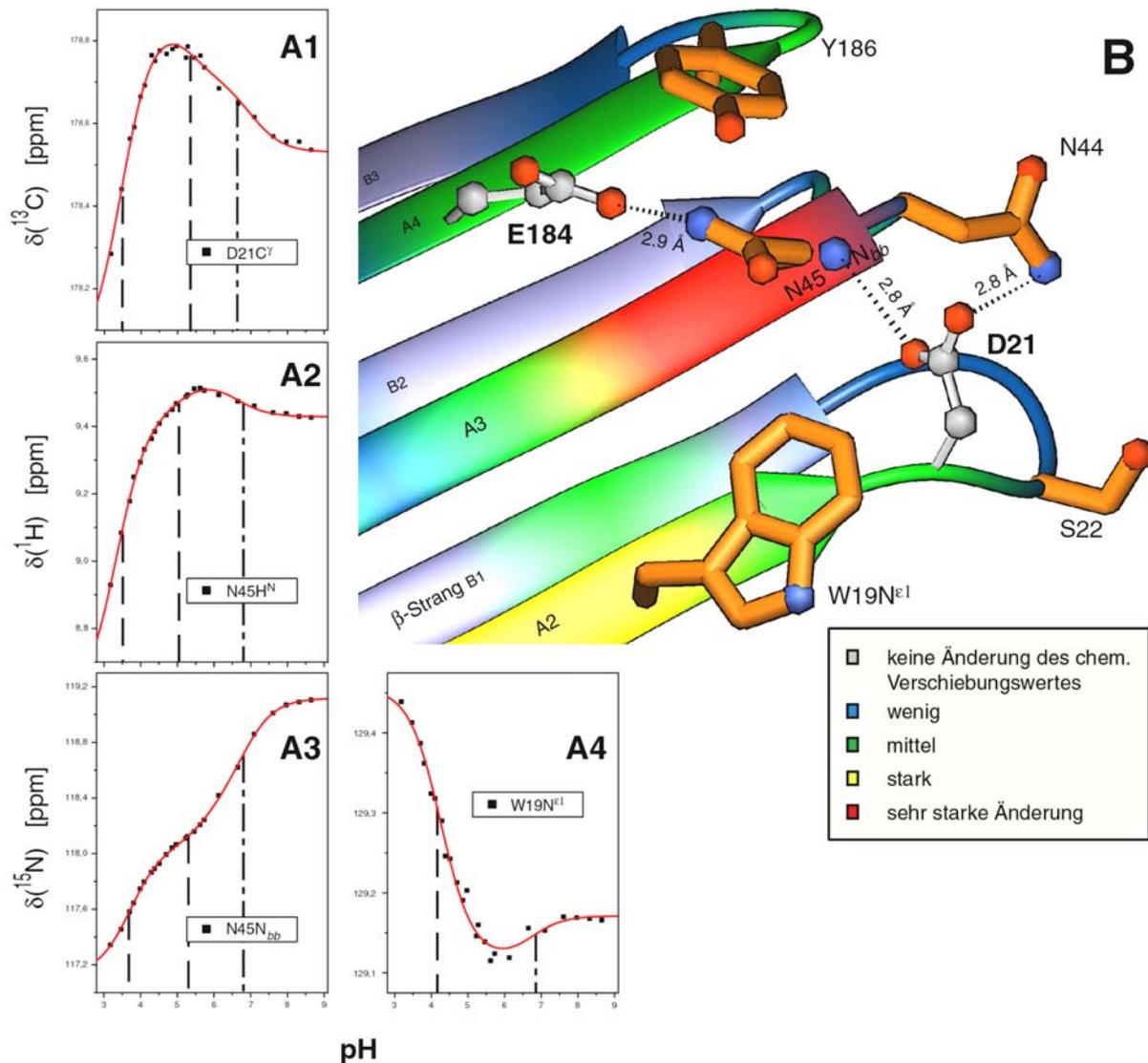
**Tab. 5-4:  $pK_s$ -Werte für Asp21**

Aminosäure	$pK_s$	Zusätzliche Titrationsereignisse
Asp21	$3.46 \pm 0.10$	$(5.3 \pm 0.3 / c_2 = -0.31)$ $(6.9 \pm 0.3 / c_3 = -0.33)$

Aus der Kristallstruktur ergibt sich (Abb. 5-8), dass die Carboxylatgruppe an zwei Wasserstoffbrücken beteiligt ist: Einerseits zu dem Seitenkettenamid Asn44N<sup>δ2</sup> ( $2.8 \text{ \AA}$ ) und andererseits zu dem *backbone* Amid von Asn45 ( $2.8 \text{ \AA}$ ). Wird die Titrationskurve von Asp21C<sup>Y</sup> mit denen von Asn45H<sup>N</sup>/N<sub>bb</sub> verglichen (siehe Abb. 5-8, A1 –A3), zeigt sich eine auffallende Ähnlichkeit:

Die Wendepunkte bzw. die Flachpunkte finden sich in allen drei Kurven, d.h. beide Atomgruppen korrelieren sehr stark. Aber Asn45 selbst hat eine hervorgehobene Bedeutung hinsichtlich des katalytischen Mechanismus. Im Wechselspiel mit Glu184 (Wasserstoffbrücke Asn45N<sup>δ2</sup> - Glu184O<sup>ε</sup>:  $2.9 \text{ \AA}$ ) ist es an der Brønsted Säure/Base-Funktion der Xylanase beteiligt. Asn45O<sup>δ1</sup> bereitet im Glycosyl-Enzym-Intermediat das eintretende Wassermolekül

auf den nukleophilen Angriff vor, indem eine gemeinsame Wasserstoffbrücke gebildet wird (vgl Abb. 5-11, S. 106).



**Abb. 5-8: Nachbarschaft des Aspartats 21 - Titrationskurven und Ausschnitt aus der Kristallstruktur**

**A:** Schwarze Quadrate: experimentelle Datenpunkte; rote Linie: Repräsentation der nichtlinearen Regression nach Gl. 7 mit zwei Schritten (A4,  $j = 2$ : Trp19N $^{\epsilon 1}$ ), mit drei Schritten (A1-A3,  $j = 3$ : Asp21C $^{\gamma}$ , Asn45H $^{\text{N}}$  u. N $_{bb}$ ); gestrichelte Linie: Repräsentation der  $pK_s$ -Werte. **B:** Schematische Darstellung: Kugel-Stab-Repräsentation: Asp21, Glu184; Röhren-Repräsentation (orange): Asn, Ser, Trp, Tyr; Kugel (blau): backbone Amid-Stickstoff Asn45; gestrichelte Linien indizieren den Abstand und mögliche Wasserstoffbrücken; Kolorierung des Proteinrückgrats entsprechend dem relativen Farbindex aus  $\delta_{\text{max}} - \delta_{\text{min}}$  (H $^{\text{N}}$ , N $_{bb}$ ) (siehe Kap. 4.5.2, S. 72).

Die Schlussfolgerung ist, dass Glu184 ( $pK_s = 6.5 \pm 0.2$ ) seinen Einfluss auf Asp21 über zwei Wasserstoffbrücken via Asn45 ausübt.

Das *backbone* Amid von Asn45 reflektiert somit die Einflüsse beider Seitenketten-Carboxylatgruppen. Einerseits wird mit den Wendepunkten um  $\text{pH} = 6.81 \pm 0.09$  ( $H^N$ ) bzw.  $\text{pH} = 6.57 \pm 0.17$  ( $N_{bb}$ ) die Abhängigkeit zu Glu184 wiedergeben, und andererseits mit den Punkten um  $\text{pH} = 3.72 \pm 0.04$  ( $N_{bb}$ ) bzw.  $\text{pH} = 3.33 \pm 0.34$  ( $H^N$ ) jene Abhängigkeit, die sich auf Asp21 bezieht.

Vor dem theoretischen Hintergrund der chemischen Verschiebungswerte (siehe Kap. 3.5.3, S. 48) wird das Problem der weitreichenden Wechselwirkung  $\text{Glu184} \rightarrow \text{Asn45} \rightarrow \text{Asp21}$  wie folgt gedeutet:

Wird Glu184 beim  $pK_s$ -Wert 6.5 deprotoniert, erhält die Wasserstoffbrücke zu  $\text{Asn45N}^{\delta 2}$  einen höheren ionischen Charakter und der Konformationsraum der Seitenkette wird in Richtung Glu184 eingeschränkt. In diesem Zusammenhang findet eine weitreichende Reorganisation der Seitenkettenkonformationen wie auch der lokalen Wasserstoffbrücken statt. Betrachtet man die Änderung der Amid-Resonanzen im Kontext des gesamten Proteins, so erkennt man, dass innerhalb der Nachbarschaft von Glu184 und Asp21 sehr starke Veränderungen stattfinden (vergleiche Abb. 4-23 A, rechts oben, S. 74 mit Abb. 5-8 B). Veränderungen der *backbone* Konformation sollten auszuschliessen sein, da einerseits die Kristallstrukturen des freien Enzyms und des Glycosyl-Enzym-Intermediats nahezu identisch sind. Andererseits ergaben Relaxationsstudien an der Holo- sowie der Apoform der homologen Xylanase aus *B. circulans* eine sehr starre, kompakt-globuläre Struktur (Connelly *et al.*, 2000).

Wahrscheinlich ordnen sich die Seitenketten in den drei betrachteten Schleifen neu; direkt angrenzende Seitenketten wie Trp19 sind scheinbar ebenfalls betroffen. Die pH-Titration der aromatischen Stickstoffresonanzen  $\text{Trp19N}^{\text{e}1}$  (siehe Abb. 5-8 A4) ergibt ebenfalls einen Wendepunkt um  $\text{pH} = 6.72 \pm 0.39$ . Der Term  $\sigma_{\text{nahe}}$  (siehe Gl. 14, Kap. 3.5.3) sollte für die Änderung der Resonanzpositionen keine Bedeutung haben, da sich in dem Heteroaromaten die Bindungsgeometrie nicht ändert. Für eine direkte elektrostatische Wechselwirkung sind die Seitenketten von Glu184 und Trp19 zu weit voneinander entfernt. Deshalb könnte ein neues Gleichgewicht der Seitenkettenkonformerer möglicherweise  $\text{Trp19N}^{\text{e}1}$  einem veränderten schwachen Ladungsfeld aussetzen, das von der neuen Mikroumgebung erzeugt wird. Dies wiederum könnte die Ursache für die Veränderung der chemischen Verschiebungswerte von  $\text{Trp19N}^{\text{e}1}$  sein.

Elektrostatik wie auch der *gauche*-Effekt der Seitenkettenkonformation beeinflussen den chemischen Verschiebungswert von Asn45N<sub>bb</sub>. Für das Wasserstoffatom des Amids bzw. für den Kohlenstoff Asp21C<sup>γ</sup> dominiert der Einfluss der Wasserstoffbrücke gegenüber der Elektrostatik, was man an der Umkehrung des Vorzeichens (Verschiebung zurück zu höherem Feld) ersehen kann. Wahrscheinlich erlaubt die Reorganisation bei pH ~ 6.5 der Seitenketten-Carboxylatgruppe Asp21, eine stärkere Wasserstoffbrückenbindung einzugehen.

In der Literatur wird dem Asn45 eine ‚Schlüsselposition‘ zugesprochen, weil es innerhalb von 82 untersuchten Familie 11 Xylanasen über das pH-Optimum entscheidet: Die Enzyme, die als ‚alkalophil‘ bezeichnet werden (pH-Optimum > 5), verfügen über ein Asparagin in Position 45. Bei ‚acidophilen‘ Xylanasen (pH-Optimum < 5) ist diese Position mit einem Aspartat besetzt. Ausserdem sind Trp19 und Asp21 hoch konserviert (Sapag *et al.*, 2002).

Vor diesem Hintergrund ließe sich eine Mutation Asn45 in Asp45 wie folgt deuten:

Auch die Carboxylgruppe eines Aspartats wäre zu einer Wasserstoffbrückenbindung mit Glu184 in der Lage. Um aber katalytisch aktiv zu sein, müssten beide Seitenketten-Carboxylatgruppen protoniert sein. Glu184 erfüllt die Funktion als Brønsted Säure, Asp45 stellt selbst ein Proton für die unterstützende Wasserstoffbrücke zur Verfügung. Insgesamt müsste sich das pH-Optimum in die Nähe des apparenten pK<sub>s</sub>-Wertes des hypothetischen Asp45 verschieben, damit auch diese Gruppe zu einem ausreichenden Anteil protoniert ist (Joshi *et al.*, 2000).

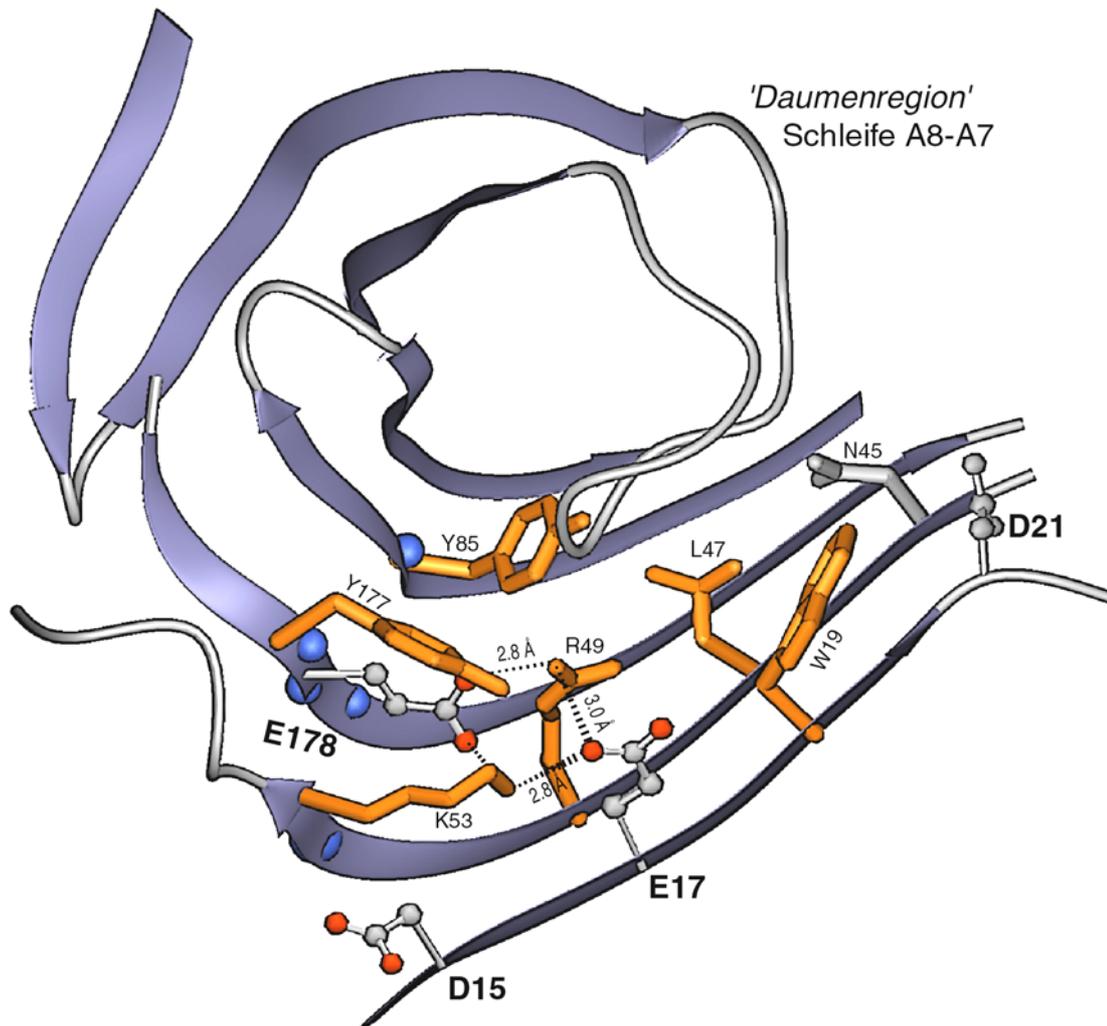
Auch wenn eine exakte Deutung der Vorgänge wegen der komplexen Zusammenhänge schwierig ist, die weitreichende Wechselwirkung zwischen Glu184 und Asp21 via Asn45 ist in jedem Fall belegt.

### 5.8. Gruppierung *subsite-2*: Asp15 - Glu17 – Glu178

Bindet die Xylanfaser an das Enzym, so lassen sich die Wechselwirkungen in vier untergeordnete Bindungsstellen einteilen. Jede Xylanopyranose-Einheit verfügt über eine Bindungsstelle (*subsite*), von -3, -2, -1 und +1 nummeriert (Davies *et al.*, 1997). In der Bindungsstelle – 1 sind die Glutamat-Seitenketten der katalytischen Dyade positioniert. Dort wird die glycosidische Bindung zwischen den Xylanopyranose-Ringen –1 und +1 hydrolysiert.

Die Seitenketten der Bindungsstelle –2 beteiligen sich an der Ausrichtung des Substrats im aktivem Zentrum (siehe Abb. 5-11, S. 106). Die Guanidinium-Gruppe von Arg49 ist an zwei Wasserstoffbrücken zu den O2- und O3-Hydroxygruppen der Xylanopyranose –2 beteiligt, die Seitenkette von Glu17 zur O3-Hydroxygruppe. Der Indolring von Trp19 hat hinsichtlich der Substratspezifität eine hervorgehobene Bedeutung: Einerseits wird die Bindung einer eher hydrophoben Xylanfaser durch Van-der-Waals-Kontakte bevorzugt, während eine Cellulose-Bindung benachteiligt ist. Andererseits verhindert die sterische Anordnung von Trp19 / Leu47, dass die C6-Hydroxygruppe der Glucose-Einheit einer Cellulosefaser in der *subsite* –1 stabilisierende Wechselwirkungen bilden kann.

Tyr85 grenzt die beiden *subsites* –2 und –1 voneinander ab und nimmt auch hinsichtlich der Wechselwirkungen zum Substrat eine Mittelstellung ein: Das phenolische Sauerstoffatom O<sup>n</sup> kann sich sowohl an einer Wasserstoffbrücke zur O2-Hydroxygruppe der Xylanopyranose –2 beteiligen als auch zu dem Ringatom O5 der Pyranose –1.



**Abb. 5-9: Schematische Darstellung der Gruppierung *subsite-2*: Asp15 - Glu17 – Glu178**

Schematische Darstellung der Xylanase; *Perspektive* entlang der Bindungsspalte auf die Bindungsstelle -2, *subsite* -1 beginnt hinter Tyr85; *Kugel-Stab-Repräsentation*: Asp, Glu; *Röhren-Repräsentation*: Asn, Leu, Lys, Trp, Tyr; *Kugel (blau)*: *backbone* Amid-Stickstoffe Lys52, Gly86, Glu178, Val179 und Ala180, korrespondierende Titrationsdaten wurden zur indirekten Bestimmung des  $pK_s$ -Wertes von Glu178C<sup>δ</sup> verwendet; *gestrichelte Linien* indizieren den Abstand und mögliche Wasserstoffbrücken.

Der  $pK_s$ -Wert von Glu178C<sup>δ</sup> ( $4.1 \pm 0.2$ ) wurde indirekt bestimmt, da diese Resonanz über den gesamten pH-Bereich nicht detektierbar war (siehe Kap. 4.5.3, S. 76). Dazu wurden die Titrationsdaten der räumlich benachbarten [<sup>15</sup>N]-*backbone* Amide ausgewertet (Tab. 5-5). Innerhalb eines gewissen Fehlerbereichs sollten die Wendepunkte dieser Fit-Funktionen den elektrostatischen Einfluss (bzw. auch die Änderung der Konformation etc.) der Seitenketten-Carboxylatgruppe reflektieren:

**Tab. 5-5: indirekte Bestimmung des  $pK_s$ -Wertes von Glu178C<sup>δ</sup> durch Auswertung der Titrationskurven benachbarter *backbone* Amide**

Glu178	Reporter-Nukleus	Abstand [Å]	$pK_s$ -Wert
-	Glu178C <sup>δ</sup>	-	-
O <sup>ε2</sup>	Lys52N <sub>bb</sub>	5.72	4.24
O <sup>ε1</sup>	Gly86N <sub>bb</sub>	5.63	4.32
O <sup>ε1</sup>	Glu178N <sub>bb</sub>	4.96	3.82
O <sup>ε2</sup>	Val179N <sub>bb</sub>	5.32	3.95
O <sup>ε2</sup>	Ala180N <sub>bb</sub>	5.60	3.96
Mittelwert:			4.1 ± 0.2

Das Ionisierungsverhalten von Glu178 konnte auch durch die Wechselwirkungen mit Glu17 verifiziert werden. Der Abstand zwischen beiden Carboxylatgruppen beträgt 4.9 Å. Zusätzlich sind paarweise Wasserstoffbrücken über Lys53N<sup>ς</sup> bzw. über die Guanidinium-Gruppe von Arg49 möglich (siehe Abb. 5-9). Die Validierung durch die F-Test Statistik ergab, dass die Titrationskurve von Glu17 zu einem größeren Anteil das Ionisierungsverhalten von Glu178 beinhaltet, während die Deprotonierung der titrierbaren Gruppe mit einem kleineren Koeffizienten wiedergegeben ist.

Der  $pK_s$ -Wert von Asp15C<sup>γ</sup> ( $3.35 \pm 0.14$ ) ist im Vergleich zu den Standardwerten einer Modellsubstanz um 0.6 Einheiten erniedrigt. Eine Wechselwirkung zu Glu17 erscheint plausibel, da sich im weiteren Verlauf der pH-Titration ein entsprechender  $pK_s$ -Wert wiederfindet (Überblick: Tab. 5-6). Ein drittes Titrationsereignis, dass in einem Flachpunkt um  $\text{pH} = 6.66 \pm 0.14$  zu erkennen ist, wäre mit einer weitreichenden Reorganisation der Seitenketten-Konformationen zu erklären (siehe Kap. 5.9, S. 104).

**Tab. 5-6:  $pK_s$ -Werte der Gruppierung *subsite-2*: Asp15 - Glu17 – Glu178**

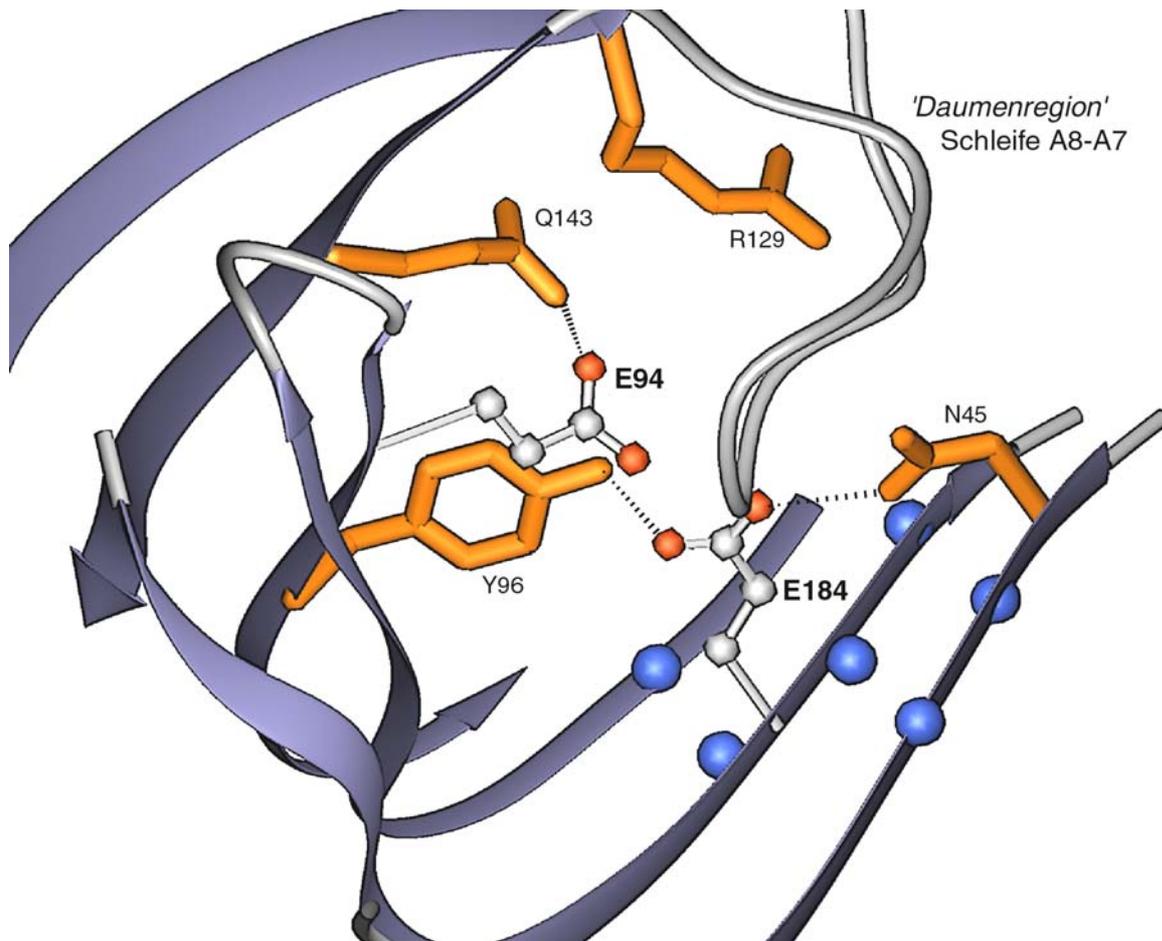
Aminosäure	Reporter-Nukleus	$pK_s$ -Wert	zusätzliches Titrationsereignis
Asp15	C <sup>δ</sup>	3.35 ± 0.14	Glu17 (4.47 ± 0.13 / c = 0.28) (6.66 ± 0.14 / c = 0.08)
Glu17	C <sup>γ</sup>	4.54 ± 0.23	Glu178 (4.12 ± 0.30 / c = 1.27)
Glu178	N <sub>bb</sub> Amide	4.1 ± 0.2	

Allerdings sind die Zahlenwerte der Datenanalyse von Glu17 und Asp15 mit einem großen Fehler behaftet. Die Titrationsereignisse finden innerhalb der Abfolge weniger Datenpunkte statt; signifikante Wendepunkte gehen in entsprechende Flachpunkte über. Die Wechselwirkungen sind sicherlich belegt, auch wenn die absoluten Zahlenwerte vorsichtig zu interpretieren sind.

### **5.9. Gruppierung *subsite-1*: Glu94 – E184 (katalytische Dyade)**

Sabini *et al.* (1999) untersuchten detailliert den katalytischen Mechanismus, indem sie freies Enzym mit einer Lösung aus 2-Deoxy-2-fluoro-xylobiosid versetzten. Nach dem ersten nukleophilen Angriff durch die Xylanase reichert sich das 2-Fluoro-xylobiosyl-Enzym-Intermediat an, da der zweite Schritt, die Hydrolyse durch ein eintretendes Wassermolekül, nur extrem langsam erfolgt (vgl. Abb. 1-3, S. 12). Einerseits fehlen nötige Wechselwirkungen mit der O2-Hydroxygruppe, und andererseits destabilisiert die Elektronegativität des vicinalen Fluoratoms die Übergangszustände der Oxo-carbenium-Ionen (Withers *et al.*, 1988; Withers *et al.*, 1987).

Der Vergleich der Kristallstrukturen aus freiem Enzym und Intermediat ergab, dass beide nahezu identisch sind (z.B. RMSD(C<sup>α</sup>) = 0.24 Å). Der einzige signifikante Unterschied besteht im Konformationsraum der Seitenkette von Tyr186, der in der nativen Struktur zwei Konformationen enthält, mit gebundenem Substrat hingegen nur eine.



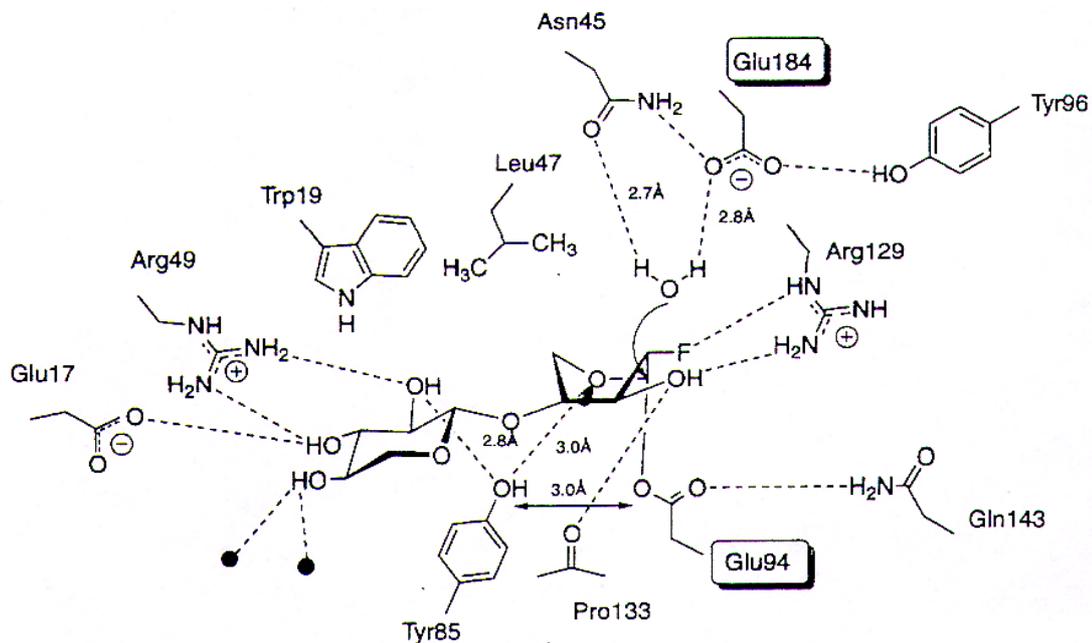
**Abb. 5-10: Schematische Darstellung der Gruppierung *subsite-1*: Nucleophil Glu94 - Brønsted Säure/Base Glu184**

Schematische Darstellung der Xylanase; *Perspektive* entlang der Bindungsspalte auf die Bindungsstelle -1, *subsite -2* wäre davor (vgl. Abb. 5-9); *Kugel-Stab-Repräsentation*: Glu94, Glu184; *Röhren-Repräsentation*: Arg, Asn, Gln, Tyr; *Kugel (blau)*: backbone Amid-Stickstoffe Ile46, Leu47, Tyr81, Glu184, Gly185 und Tyr186, korrespondierende Titrationsdaten wurden zur indirekten Bestimmung des  $pK_s$ -Wertes von Glu184C<sup>δ</sup> verwendet; *gestrichelte Linien* indizieren mögliche Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrücken.

Die Carboxylatgruppen der katalytischen Dyade sind an paarweisen Wasserstoffbrücken beteiligt: Das Nucleophil Glu94O<sup>e</sup> zu dem Amidstickstoff Gln143N<sup>e2</sup> und zu dem phenolischen Sauerstoffatom Tyr85O<sup>n</sup>, die Brønsted Säure/Base Glu184O<sup>e</sup> jeweils zu Asn45N<sup>δ2</sup> und zu Tyr96O<sup>n</sup>.

Die Wasserstoffbrücke zwischen Glu94O<sup>e</sup> und Tyr85O<sup>n</sup> wird auch als zusätzliches Argument herangezogen, dass die Xylanopyranose -1 im Glycosyl-Enzym-Intermediat eine ungewöhnliche <sup>2,5</sup>Boot-Konformation einnehmen kann (vgl. hierzu: Sabini *et al.*, 1999; Sidhu *et al.*, 1999). Die gleichzeitige Wechselwirkung zwischen der Hydroxygruppe des Tyrosins mit Glu94 und dem Ringsauerstoff O5 der Xylopyranose -1 unterstützt die <sup>2,5</sup>Boot-Konformation,

so dass die stereochemische Voraussetzung für den Übergangszustand via eines Oxocarbeniums gegeben ist (Abb. 5-11).



**Abb. 5-11: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen im 2-Fluoro-xylobiosyl-Enzym-Intermediat**

Abbildung entnommen aus: Sabini *et al.* (1999) *Chem. Biol.* 6, 487.

Die pH-Abhängigkeit der Resonanz von  $\text{Glu94C}^\delta$  zeigten einen ausgeprägt biphasischen Verlauf, so dass die Datenanalyse zwei  $\text{pK}_s$ -Werte ergab. Der Wert mit dem größeren Linear-koeffizienten lässt sich eindeutig Glu94 selbst zuordnen, entsprechend einer Ionisierungs-konstante von  $3.94 \pm 0.04$ . Die Xylanase entwickelt ihre maximale Aktivität um  $\text{pH} \approx 6$  (siehe Kap. 4.2.2, S. 60), d.h. die Seitenketten-Carboxylatgruppe ist dann zu 99% deprotoniert. Die Voraussetzung für einen nukleophilen Angriff auf das anomere C1-Kohlenstoffatom der glycosidischen Bindung wäre somit gewährleistet. Der zweite  $\text{pK}_s$ -Wert ( $6.14 \pm 0.21$ ) spiegelt den Einfluss der gegenüberliegenden Carboxylatgruppe Glu184 wider (Abstand  $\text{Glu94O}^{\text{e}2} - \text{Glu184O}^{\text{e}1}$  5.7 Å).

Die Titrationskurve für  $\text{Glu184C}^\delta$  wurde nur bis  $\text{pH} 5.5$  ausgewertet (Flachpunkt bei  $\text{pH} = 4.39 \pm 0.52$ , Einfluss durch Glu94), weitere Daten bei höheren pH-Werten ließen sich nicht eindeutig zuordnen (siehe Kap. 4.5.3, S. 76). Analog zu Glu178 wurden die Titrationsdaten benachbarter *backbone* Amide verwendet, um den eigentlichen  $\text{pK}_s$ -Wert von  $\text{Glu184C}^\delta$  indirekt zu bestimmen. Da auch diese Resonanzen biphasisches Verhalten zeigen, wurden die

$pK_s$ -Werte anhand einer vorsichtigen Extrapolation der Glu184C<sup>δ</sup>-Resonanzen (geschätzter  $pK_s$  zwischen 5.9 und 6.7, siehe Titrationskurve Abb. 4-24, S. 77) zugeordnet.

Der Durchschnitt der so ermittelten Werte ergibt einen  $pK_s$ -Wert für Glu184 von  $6.5 \pm 0.2$  (siehe Tab. 5-8). Auch diese Beobachtung ist mit dem vorhergesagten Reaktionsmechanismus konform. Die Seitenketten-Carboxylatgruppe wäre bei  $pH \approx 6$  zu 30% neutral geladen, d.h. es könnte den Beginn einer enzymatischen Reaktion einleiten, indem es das Brücken-Sauerstoffatom der glycosidischen Bindung protoniert.

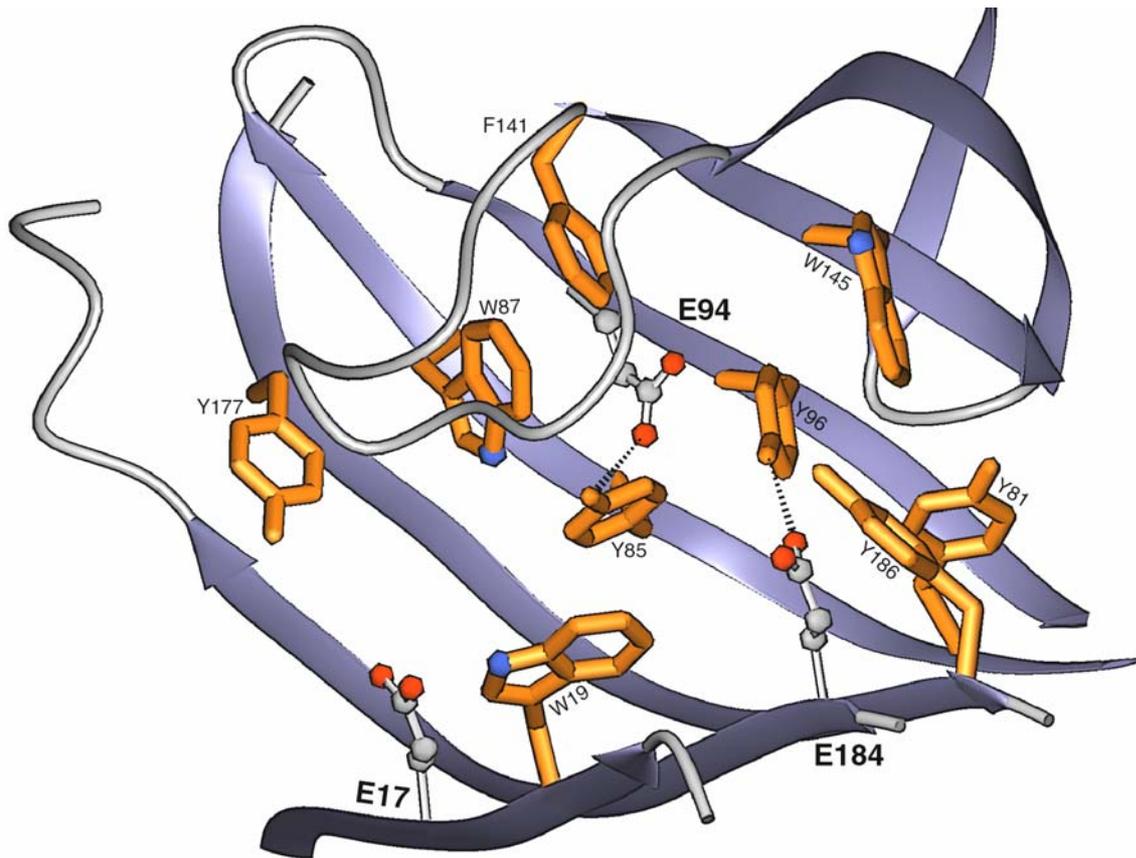
**Tab. 5-8:  $pK_s$ -Werte der katalytische Dyade**

Aminosäure	Reporter-Nukleus	$pK_s$ -Wert	zusätzliches Titrationsereignis
Glu94	C <sup>δ</sup>	$3.94 \pm 0.04$	Glu184 ( $6.14 \pm 0.21 / c_2 = 0.13$ )
Glu184	N <sub>bb</sub> Amide C <sup>δ</sup>	$6.5 \pm 0.2$ --	-- Glu94 ( $4.39 \pm 0.52 / c_1 = 0.29$ )

Die Schlussfolgerungen aus der Kristallstruktur können somit durch das Titrationsverhalten des freien Enzyms bestätigt werden.

Der  $pK_s$ -Wert von Glu94 ist gegenüber dem Standardwert einer Modellsubstanz um 0.4 Einheiten erniedrigt, während Glu184 mit +2 pH-Einheiten abweicht. Die große Differenz der  $pK_s$ -Werte bestätigt die Erwartung, dass zwei gleichionische Titrationsgruppen sich gegenseitig beeinflussen.

Eine Begründung für die starke Abweichung von den intrinsischen  $pK_s$ -Werten ist die aromatisch-hydrophobe Mikroumgebung der Carboxyl-Seitenketten. Abb. 5-12 verdeutlicht, dass die Bindungsspalte sehr dicht mit aromatischen Seitenketten besetzt ist. Hinsichtlich des Substrats erfüllt dies zwei Funktionen. Einerseits wird dadurch die Bindung der eher hydrophoben Xylanfaser gegenüber der Cellulose begünstigt. Andererseits werden die ionischen Seitenketten durch die vielfältigen Van-der-Waals-Kontakte in ihrem Konformationsraum eingeschränkt, so dass sie senkrecht in Richtung Substrat ausgerichtet sind.

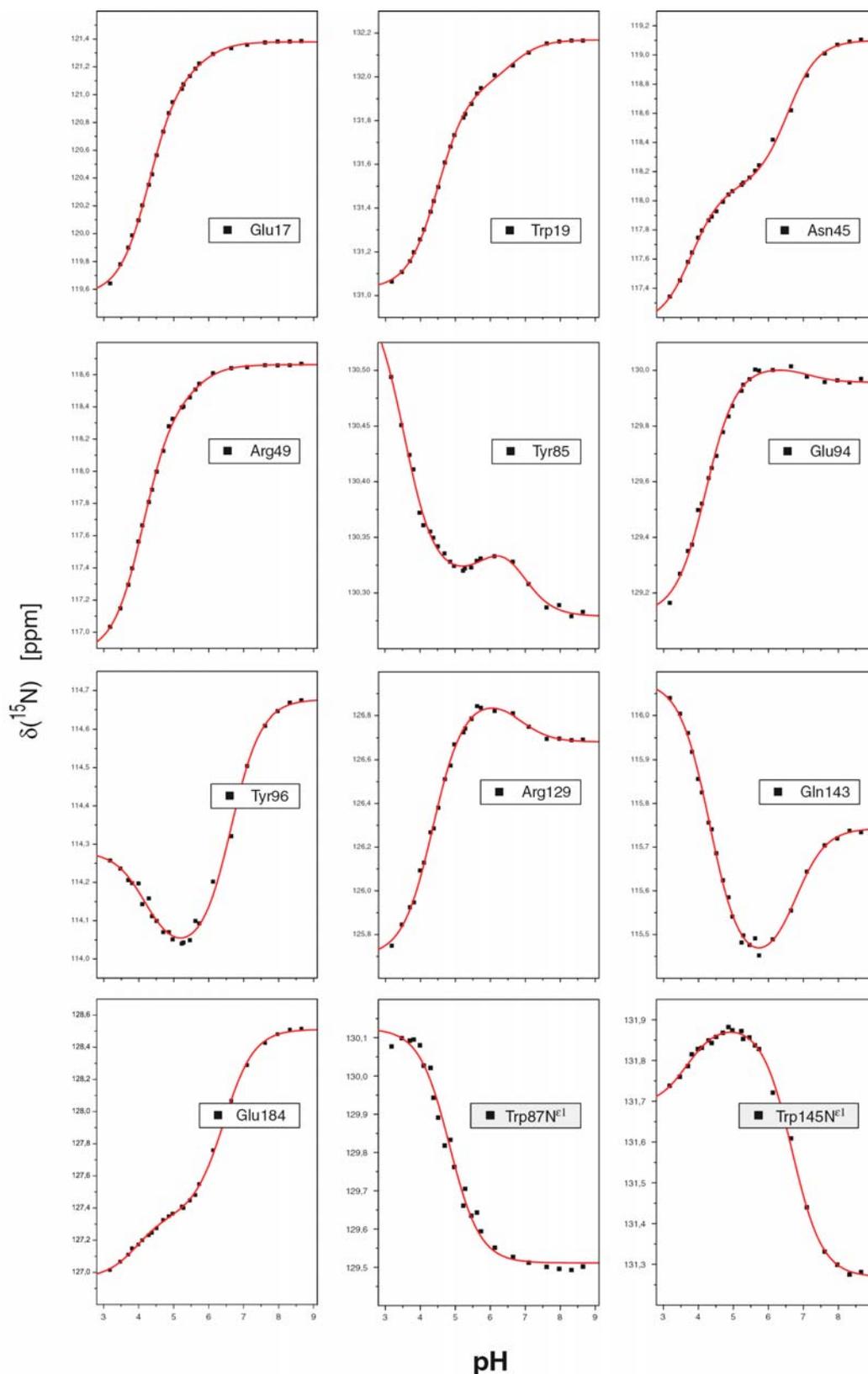


**Abb. 5-12: Aromatisch-hydrophobe Mikroumgebung des aktiven Zentrums**

Schematische Darstellung der Xylanase; *Perspektive* senkrecht auf die Bindungsspalte; *Kugel-Stab-Repräsentation*: Glu17, Glu94, Glu184; *Röhren-Repräsentation*: Phe, Trp, Tyr; *gestrichelte Linien* indizieren mögliche Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrücken.

Durch die dichte Packung der aromatisch-hydrophoben Seitenketten wird die Dielektrizitätskonstante der lokalen Mikroumgebung wesentlich erniedrigt. Somit sind die Kräfte, die die beiden Carboxylate aufeinander ausüben, vergleichsweise stärker, da sie nicht mehr im wässrigem Medium mit hoher Dielektrizitätskonstante stattfinden. Wahrscheinlich ist die Nähe der positiven Ladung der Guanidiniumgruppe von Arg129 zu Glu94 der Grund, dass das Seitenkettencarboxylat von Glu94 trotz der hydrophoben Umgebung einen erniedrigten  $pK_s$ -Wert hat, während der  $pK_s$ -Wert von Glu184 um zwei pH-Einheiten ansteigt.

Zwar kann diese vereinfachte Argumentation das komplexe Wechselspiel nicht vollständig erklären, aber es ist ersichtlich, dass unterschiedliche lokale elektrische Felder oder auch unterschiedliche Wasserstoffbrückenbindungen in dieser Umgebung eine umso stärkere Abweichung aufweisen.

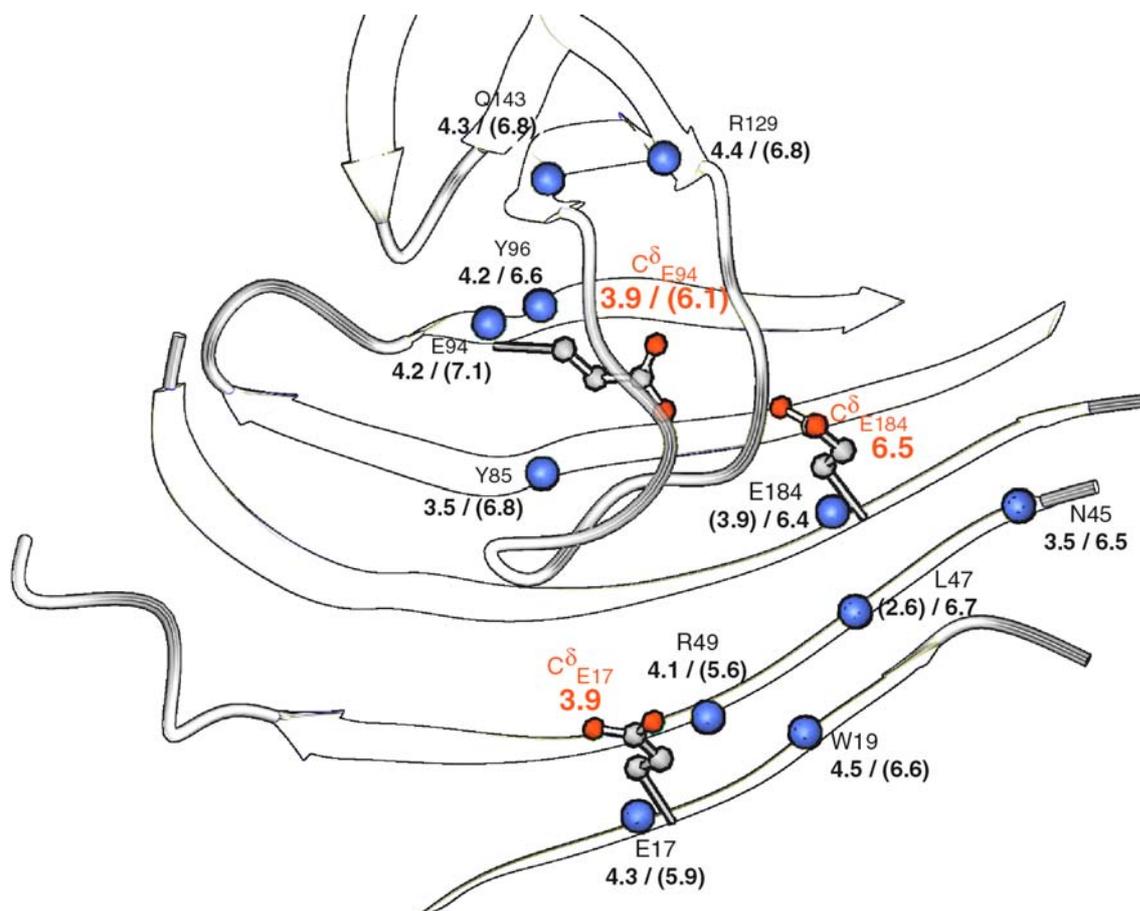


**Abb. 5-13: pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebungswerte der *backbone* Amide im aktiven Zentrum**

*Schwarze Quadrate*: experimentelle Datenpunkte; *rote Linie*: Repräsentation der nichtlinearen Regression nach Gl. 7 mit einem Titrationschritt ( $j = 1$ : W87N<sup>E1</sup>), mit zwei Schritten ( $j = 2$ : E17, W19, N45, R49, E94, Y96, R129, Q143, E184, W145N<sup>E1</sup>) oder mit drei Schritten ( $j = 3$ : Y85).

Ein weiteres Argument ist, dass eine weitreichende Reorganisation der Seitenketten-Konformationen wie auch der lokalen Wasserstoffbrückenbindungen stattfindet. Die pH-Abhängigkeit derjenigen *backbone* Amid-Resonanzen wurde ausgewertet, deren Seitenketten am katalytischen Mechanismus beteiligt sind. Es ergab sich in den meisten Fällen ein biphasisches Verhalten (siehe Abb. 5-13), das mit dem Ionisierungsverhalten der drei Glutamat-Seitenketten Glu17, Glu94 und Glu184 korreliert.

Nichtlineare Regression aller Datenreihen ergab ein Ensemble an Wendepunkten bzw. Flachpunkten, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen. Einerseits werden die  $pK_s$ -Werte für Glu17 und Glu94 bei einem  $pH\ 4.0 \pm 0.3$  widergespiegelt. Andererseits treten Wendepunkte bzw. Flachpunkte bei  $pH\ 6.5 \pm 0.2$  auf, die dem Einfluss von Glu184 zuzuordnen sind. Um die räumliche Anordnung der *backbone* Amide zu den Carboxylatresten zu verdeutlichen, wurden diese in Abb. 5-14 als Van-der-Waals-Kugeln hervorgehoben und die entsprechenden pH-Werte der Wendepunkte angefügt.



**Abb. 5-14: Titrationsverhalten der *backbone* Amide im aktiven Zentrum**

Schematische Darstellung der Xylanase; *Perspektive* senkrecht auf die Bindungsspalte; *Kugel-Stab-Repräsentation*: Glu17, Glu94, Glu184; *Kugel (blau)*: *backbone* Amid-Stickstoffe, die Zahlen geben die Wende- bzw. Flachpunkte der entsprechenden Titrationskurven an, die *Klammern* deuten auf den kleineren Linearkoeffizienten der mehrphasigen Regressionsanalyse ( $j = 2$  oder  $3$ ) hin.

Streng monoton steigende Regressionskurven, wie sie für die *backbone* Amide von Glu17, Trp19, Asn45, Arg49 und Glu184 beobachtet werden, würden sich allein mit dem Einfluss der Elektrostatik erklären lassen: Zunehmende Ionisierung bewirkt eine Entschirmung der benachbarten Amide.

Jedoch muss das wechselnde Monotonieverhalten der restlichen *backbone* Amide mit einem komplexeren Vorgang gedeutet werden.

Da eine Konformationsänderung des Proteinrückgrats eher unwahrscheinlich ist, wäre der *gauche*-Effekt über einen veränderten Torsionwinkel  $\chi_1$  der Seitenketten-Konformation eine Möglichkeit (de Dios *et al.*, 1993). Auch eine Reorganisation der Wasserstoffbrückenbindungen wäre möglich, da Amidresonanzen sehr empfindlich auf deren Veränderung reagieren (Übersichtsartikel: Szilagyi, 1995). Beide Effekte zusammen dominieren dann gegenüber dem Einfluss der Elektrostatik; es kommt zu einem Vorzeichenwechsel im Monotonieverhalten der entsprechenden Regressionskurve.

Unterstützt wird diese Vermutung durch die pH-Abhängigkeit der Resonanzen der aromatischen Stickstoffe Trp87N<sup>e1</sup> (Wendepunkt pH  $4.83 \pm 0.04$ ) und Trp145N<sup>e1</sup> (Wendepunkt pH  $6.68 \pm 0.03$ , siehe Abb. 5-13 unten). Die Carboxylatgruppe Glu94 hat zu beiden Tryptophan-Seitenketten etwa den gleichen Abstand (5.9 bis 6.2 Å), die Carboxylatgruppe des Glu184 ist zu Trp145 (5.7 Å) und zu Trp87 (6.5 Å) benachbart.

Die Ionisierung von Glu94 dominiert allerdings das Titrationsverhalten von Trp87N<sup>e1</sup>; Glu184 hingegen beeinflusst Trp145N<sup>e1</sup>.

Mit direkter Elektrostatik lassen sich diese Präferenzen nicht erklären, da die Abstandsverhältnisse paarweise ähnlich sind. Es ist allerdings sehr wahrscheinlich, dass die Wechselwirkungen über Wasserstoffbrücken vermittelt werden. Glu94O<sup>e</sup> bildet zu dem phenolischen Sauerstoffatom Tyr85O<sup>n</sup> eine Wasserstoffbrücke, wie auch Glu184O<sup>e</sup> zu Tyr96O<sup>n</sup> (siehe Abb. 5-12). Über eine  $\pi,\pi$ -Elektronenstapelung ist die Ebene von Trp87 senkrecht zu der Ringebene von Tyr85 angeordnet, während die Ebenen von Tyr96 und Trp145 zueinander parallel sind. Wird durch die Ionisierung der Carboxylatgruppe über eine Wasserstoffbrücke eine neue Gleichgewichtseinstellung im Konformationsraum des entsprechenden Tyrosins vermittelt, so überträgt sich diese sofort auf die benachbarten Aromaten. Die Ringebenen würden eine neue Gleichgewichtskonformation einnehmen, die wieder vorzugsweise parallel bzw. senkrecht zu den Tyrosinresten sind.

So könnte erklärt werden, dass die Ionisierung von Glu94 über Tyr85 das Titrationsverhalten von Trp87 dominiert, während Glu184 über Tyr96 Trp145 beeinflusst.

Das Monotonieverhalten der Titrationskurve Tyr85N<sub>bb</sub> zeigt eine Besonderheit: es wechselt zweimal sein Vorzeichen. Vielleicht spiegelt dies die Flexibilität von Tyr85 wider, das die Grenze zwischen subsite -1 und subsite -2 markiert. Bei einer Substratbindung ist es an Wechselwirkungen zu beiden Xylopyranose-Einheiten beteiligt (siehe Abb. 5-11).

Im gesamten Kontext betrachtet, kann so das Ionisierungsverhalten der einzelnen Carboxylatgruppen über Wasserstoffbrückenbindungen den Konformationsraum der nahen Tyrosin-Seitenketten beeinflussen. Dieser Effekt könnte sich dann auf die nächsten Aromaten übertragen, da in der Bindungsspalte eine sehr dichte Packung an aromatischen Seitenketten vorliegt. Eine veränderte Gleichgewichtseinstellung aller Seitenketten im aktiven Zentrum könnte die Folge sein. Dies würde voraussichtlich eine Umordnung des Wasserstoffbrücken-Netzwerkes bewirken, da sich zu einer veränderten Elektrostatik wie auch zu einem veränderten Konformationsraum neue Gleichgewichte einstellen müssen.

Natürlich lassen sich in dieser Argumentation Ursache und Wirkung nicht voneinander trennen, da die apparenten  $pK_s$ -Werte mit ihrer Elektrostatik, die Gleichgewichtskonformer und das Wasserstoffbrücken-Netzwerk wechselseitig voneinander abhängig sind.

In jedem Fall vermittelt das gesamte Ensemble an Titrationskurven - Carboxylatgruppen, Amide wie auch Seitenketten-Tryptophane – einen guten Einblick, wie der makroskopische pH-Wert die konzertierten Reaktionen einer lokalen Mikroumgebung beeinflusst.

## 6. Literatur

- Anderson, D. E., Becketl, W. J. & Dahlquist, F. W.** (1990). pH-induced denaturation of proteins: A single salt bridge contributes 3-5 kcal/mol to the free energy of folding of T4 lysozyme. *Biochemistry* **29**, 2403-2408.
- Archer, S. J., Ikura, M., Torchia, D. A. & Bax, A.** (1991). An Alternative 3D NMR Technique for Correlating Backbone  $^{15}\text{N}$  with Side Chain  $\text{H}^\beta$  Resonances in Larger Proteins. *J.Magn.Reson.* **95**, 636-641.
- Armstrong, K. M., Fairman, R. & Baldwin, R. L.** (1993). The (i, i + 4) Phe-His interaction studied in an alanine-based  $\alpha$ -helix. *J.Mol.Biol.* **230**, 284-291.
- Augsburger, J. D., Dykstra, C. E. & Oldfield, E.** (1991). Correlation of Carbon-13 and Oxygen-17 Chemical Shifts and the Vibrational Frequency of Electrically Perturbed Carbon Monoxide: A Possible Model for Distal Ligand Effects in Carbonmonoxyheme Proteins. *J.Am.Chem.Soc.* **113**, 2447-2451.
- Ayed, A., Mulder, F. A., Yi, G. S., Lu, Y. & Kay, L. E.** (2001). Latent and active p53 are identical in conformation. *Nature Structural Biology* **8**, 756-760.
- Bagby, S., Tong, K. I. & Ikura, M.** (2001). Optimaziation of Protein Solubility and Stability for Protein Nuclear Magnetic Resonance. *Methods Enzymol.* **2**, 20-41.
- Batchelor, J. G., Prestegard, J. H., Cushley, R. J. & Lipsky, S. R.** (1973). Electric field effects in the  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectra of unsaturated fatty acids. A potential tool for conformational analysis. *J.Am.Chem.Soc.* **95**, 6358-6364.
- Betz, M., Löhner, F., Wienk, H. & Rüterjans, H.** (2002). Letter to the Editor:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shift assignment of *Bacillus agaradhaerens* family 11 xylanase. *J.Biomol.NMR* **23**, 333-334.
- Biely, P.** (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**, 286-290.
- Biely, P., Mislovicova, D. & Toman, R.** (1988). Remazol Brilliant Blue-Xylan: A Soluble Chromogenic Substrate for Xylanases. *Methods Enzymol.* **160**, 537-541.
- Blomberg, F., Maurer, W. & Rüterjans, H.** (1977). Nuclear magnetic resonance investigation of  $^{15}\text{N}$ -labeled histidine in aqueous solution. *J.Am.Chem.Soc.* **99**, 1849-1859.
- Bone, S. & Pethig, R.** (1985). Dielectric studies of protein hydration and hydration-induced flexibility. *J.Mol.Biol.* **181**, 323-326.
- Buchert, J., Tenkanen, M., Kantelinen, A. & Viikari, L.** (1994). Application of xylanases in the pulp and paper industry. *Biosource Technol.* **50**, 65-72.
- Bundi, A. & Wüthrich, K.** (1979).  $^1\text{H}$ -NMR parameters of the common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L-Ala-OH. *Biopolymers* **18**, 285-297.

- Burley, S. K. & Petsko, G. A.** (1988). Weakly polar interactions in proteins. *Adv. Protein Chem.* **39**, 125-189.
- Caceci, M. S. & Cacheris, W. P.** (1984). Fitting curves to data. The simplex algorithm is the answer. *Byte* **9**, 340-362.
- Cavanagh, J. & Rance, M.** (1990). Sensitivity Improvement in Isotropic Mixing (TOCSY) Experiments. *J. Magn. Reson.* **88**, 72-85.
- Cavanagh, J. & Rance, M.** (1993). An Alternative 3D NMR Technique with Coherent Selective Magnetization Transfer as Sensitivity Improvement in Larger Proteins. *Ann. Rep. NMR. Spect.* **27**, 1-47.
- Clore, G. M., Gronenborn, A. M. & Tjandra, N.** (1998). Direct Structure Refinement against Residual Dipolar Couplings in the Presence of Rhombicity of Unknown Magnitude. *J. Magn. Reson.* **131**, 159-162.
- Clowes, R. T., Boucher, W., Hardmann, C. H., Domaille, P. D. & Kaue, E. D.** (1993). A 4D HCC(CO)NNH experiment for the correlation of aliphatic side-chain and backbone resonances in  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled proteins. *J. Biomol. NMR* **3**, 349-354.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 2110-2114.
- Connelly, G. P., Withers, S. G. & McIntosh, L. P.** (2000). Analysis of the dynamic properties of *Bacillus circulans* xylanase upon formation of a covalent glycosyl-enzyme intermediate. *Protein Sci.* **9**, 512-524.
- Cornilescu, G., Delaglio, F. & Bax, A.** (1999). Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR* **13**, 289-302.
- Corpet, F., Servant, F., Gouzy, J. & Kahn, D.** (2000). ProDom and ProDom-CG: tools for protein domain analysis and whole genome comparisons. *Nucleic Acids Res.* **28**, 267-269.
- Courtin, C. M., Roelants, A. & Delcour, J. A.** (1999). Fractionation-reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in food-making. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1870-1877.
- Cummins, G. B., Bacskey, G. B. & Hush, N. S.** (1987). The effects of intermolecular interactions on the electric field gradients in ice and liquid water. The role of electrostatics. *Mol. Phys.* **61**, 795-811.
- Davies, G. J., Wilson, K. S. & Henrissat, B.** (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **321**, 557-559.
- Davoodi, J., Wakarchuk, W. W., Campbell, R. L., Carey, P. R. & Surewicz, W. K.** (1995). Abnormally high  $\text{pK}_a$  of an active-site glutamic acid residue in *Bacillus circulans* xylanase. The role of electrostatic interactions. *Eur. J. Biochem.* **232**, 839-843.

- de Dios, A. C., Pearson, J. G. & Oldfield, E.** (1993). Secondary and Tertiary Structural Effects on Protein NMR Chemical Shifts: An ab Initio Approach. *Science* **260**, 1491-1496.
- Dwyer, J. J., Gittis, A. G., Karp, D. A., Lattman, E. E., Spencer, D. S., Stites, W. E. & Garcia-Moreno, B.** (2000). High apparent dielectric constants in the interior of a protein reflect water penetration. *Biophys.J.* **79**, 1610-1620.
- Eaton, H. L., Fesik, S. W., Glaser, S. J. & Drobny, G. P.** (1990). The Time Dependence of Coherence Transfer in Homonuclear Isotropic Mixing Experiments. *J.Magn.Reson.* **90**, 452-471.
- Edsall, J. T., Martin, R. B. & Hollingworth, B. R.** (1958). Ionization of Individual Groups in dibasic Acids, with Application to the Amino and Hydroxylgroups of Tyrosine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **44**, 505-518.
- Fesik, S. W. & Zuiderweg, E. R.** (1988). Heteronuclear Three-Dimensional NMR Spectroscopy. A strategy for the Simplification of Homonuclear Two-Dimensional NMR-Spectra. *J.Magn.Reson.* **78**, 588-593.
- Fogh, R. H., Schipper, D., Boelens, R. & Kaptein, R.** (1994). <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR backbone assignments of 269-residue serine protease PB92 from *Bacillus alcalophilus*. *J.Biomol.NMR* **4**, 123-128.
- Georis, J., de Lemos, E., Lamotte-Brasseur, J., Bougnet, V., Devreese, B., Giannotta, F., Granier, B. & Frere, J. M.** (1999). An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study. *Protein Sci.* **9**, 466-475.
- Gilson, M. K. & Honig, B. H.** (1986). The dielectric constant of a folded protein. *Biopolymers* **25**, 2097-2119.
- Griesinger, C., Sorensen, O. W. & Ernst, R. R.** (1987). Three- and Four-Dimensional NMR Experiments for Measurement of Spin-Spin Coupling Constants. *J.Magn.Reson.* **73**, 574-591.
- Griesinger, C., Sorensen, O. W. & Ernst, R. R.** (1989). Three-Dimensional Fourier Spectroscopy. Application to High-Resolution NMR. *J.Magn.Reson.* **84**, 14-63.
- Gruber, K., Klintschar, G., Hayn, M., Schlacher, A., Steiner, W. & Kratky, C.** (1998). Thermophilic xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: high-resolution X-ray structure and modeling studies. *Biochemistry* **37**, 13475-13485.
- Grzesiek, S. & Bax, A.** (1992). Improved 3D Triple-Resonance NMR Techniques Applied to a 31 kDa Protein. *J.Magn.Reson.* **96**, 432-440.
- Grzesiek, S. & Bax, A.** (1993a). Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-enriched proteins. *J.Biomol.NMR* **3**, 185-204.
- Grzesiek, S. & Bax, A.** (1993b). The Origin and Removal of Artifacts in 3D HCACO Spectra of Proteins Uniformly Enriched with <sup>13</sup>C. *J.Magn.Reson.B.* **102**, 103-106.

**Gu, Z., Zambrano, R. & McDermott, A.** (1994). Hydrogen bonding of carboxyl groups in solid-state amino acids and peptides: Comparison of carbon chemical shielding, infrared frequencies, and structures. *J.Am.Chem.Soc.* **116**, 6368-6372.

**Guan, C. D., Li, P., Riggs, P. D. & Inouye, H.** (1987). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**, 21-30.

**Hanahan, D.** (1985). DNA cloning. New York: IRL Press.

**Harris, G. W., Pickersgill, R. W., Connerton, I., Debeire, P., Touzel, J. P., Breton, C. & Perez, S.** (1997). Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase. *Proteins* **29**, 77-86.

**Haspel, J., Blanco, C., Jacob, J. & Grumet, M.** (2001). System for cleavable Fc fusion proteins using tobacco etch virus (TEV) protease. *Biotechniques* **30**, 60-66.

**Ikura, M., Kay, L. E. & Bax, A.** (1990). A Novel Approach for Sequential Assignment of <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N Spectra of Larger Proteins: Heteronuclear Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Spectroscopy. Application to Calmodulin. *Biochemistry* **29**, 4659-4667.

**Harvey, S. C. & Hoekstra, P.** (1972). Dielectric relaxation spectra of water absorbed on lysozyme. *J.Chem.Phys.* **76**, 2987-2994.

**Henrissat, B., Claeysens, M., Tomme, P., Lemesle, L. & Mornon, J. P.** (1989). Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene* **81**, 83-95.

**Henrissat, B. & Davies, G.** (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **7**, 637-644.

**Hol, W. G., van Duijnen, P. T. & Berendsen, H. J.** (1978). The  $\alpha$ -helix dipole and the properties of proteins. *Nature* **273**, 443-446.

**Jaman, A. I., Germann, T. C., Gutowsky, H. S., Augspurger, J. D. & Dykstra, C. E.** (1991). Rotational spectrum and structure of the linear HCN-HCCH dimer. *Chem.Phys.* **154**, 281-289.

**Joshi, M. D., Hedberg, A. & McIntosh, L. P.** (1997). Complete measurement of the pK<sub>a</sub> values of the carboxyl and imidazole groups in *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Sci.* **6**, 2667-2670.

**Joshi, M. D., Sidhu, G., Pot, I., Brayer, G. D., Withers, S. G. & McIntosh, L. P.** (2000). Hydrogen bonding and catalysis: a novel explanation for how a single amino acid substitution can change the pH optimum of a glycosidase. *J.Mol.Biol.* **299**, 255-279.

**Kapust, R. B. & Waugh, D. S.** (1999). *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* **8**, 1668-1674.

- Karshikoff, A. D., Engh, R., Bode, W. & Atanasov, B. P.** (1989). Electrostatic interactions in proteins: Calculations of the electrostatic term of free energy and the electrostatic potential field. *Eur.Biophys.J.* **17**, 287-297.
- Karshikoff, A. D., Reinemer, P., Huber, R. & Ladenstein, R.** (1993). Electrostatic evidence for the activation of the glutathione thiol by tyrosine 7 p class GSH transferases. *Eur.J.Biochem.* **215**, 663-670.
- Kay, L. E., Ikura, M. & Bax, A.** (1991). The Design and Optimazition of Complex NMR Experiments. Applications to a Triple-Resonance Pulse Scheme Correlation  $H^\alpha$ , NH, and  $^{15}N$  Chemical Shifts in  $^{15}N$ - $^{13}C$ -Labelled Proteins. *J.Magn.Reson.* **91**, 84-92.
- Kay, L. E., Ikura, M., Tschudin, R. & Bax, A.** (1990). Three-Dimensional Triple-Resonance NMR Spectroscopy of Isotopically Enriched Proteins. *J.Magn.Reson.* **89**, 496-514.
- Kay, L. E., Xu, G. Y. & Yamazaki, T.** (1994). Enhanced-Sensitivity Triple-Resonance Spectroscopy with Minimal  $H_2O$  Saturation. *J.Magn.Reson.* **109**, 129-133.
- Keim, P., Vigna, R. A., Morrow, J. S., Marshall, R. C. & Gurd, F. R.** (1973). Carbon 13 nuclear magnetic resonance of pentapeptides of glycine containing central residues of serine, threonine, aspartic and glutamic acids, asparagine, and glutamine. *J.Biol.Chem.* **248**, 7811-7818.
- Kjaer, M., Andersen, K. V. & Poulsen, F. M.** (1994). Automated and semiautomated analysis of homo- and heteronuclear multidimensional nuclear magnetic resonance spectra of proteins: the program Pronto. *Methods Enzymol.* **239**, 288-307.
- Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K.** (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J.Mol.Graphics* **14**, 51-55.
- Koumanov, A., Spitzner, N., Rüterjans, H. & Karshikoff, A. D.** (2001). Ionization properties of titrable groups in ribonuclease T1. II. Electrostatic analysis. *Eur.Biophys.J.* **30**, 198-206.
- Krengel, U. & Dijkstra, B. W.** (1996). Three-dimensional structure of Endo-1,4- $\beta$ -xylanase I from *Aspergillus niger*: molecular basis for its low pH optimum. *J.Mol.Biol.* **263**, 70-78.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laskowski, J. R. & Scheraga, H. A.** (1954). Thermodynamic considerations of protein reactions. I. Modified reactivity of polar groups. *J.Am.Chem.Soc.* **76**, 6305-6319.
- Lee, J.** (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J.Biotechnol.* **56**, 1-24.
- Löffler, G., Schreiber, H. & Steinhauser, O.** (1997). Calculation of the dielectric properties of a protein and its solvent: theory and a case study. *J.Mol.Biol.* **270**, 520-534.

- Logan, T. M., Olejniczak, E. T., Xu, R. X. & Fesik, S. W.** (1993). A general method for assigning NMR spectra of denatured proteins using 3D HC(CO)NH-TOCSY triple resonance experiments. *J.Biomol.NMR* **3**, 225-231.
- Löhr, F., Katsemi, V., Betz, M., Hartleib, J. & Rüterjans, H.** (2002). Sequence-specific assignment of histidine and tryptophan ring  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  resonances in  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ - and  $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled proteins. *J.Biomol.NMR* **22**, 153-164.
- Maina, C. V., Riggs, P. D., Grandea, A. G., Slatko, B. E., Moran, L. S., Tagliamonte, J. A., McReynolds, L. A. & Guan, C. D.** (1988). An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* **74**, 365-373.
- Marion, D., Kay, L. E., Sparks, S. W., Torchia, D. A. & Bax, A.** (1989). Three-Dimensional Heteronuclear NMR of  $^{15}\text{N}$ -Labeled Proteins. *J.Am.Chem.Soc.* **111**, 1515-1517.
- Markley, J. L.** (1975). Observation of histidine residues in proteins by means of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Acc.Chem.Res.* **8**, 70-80.
- Marquardt, D. W.** (1963). An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J.Soc.Ind.Appl.Math.* **11**, 431-444.
- Matthey, B., Engert, A., Klimka, A., Diehl, V. & Barth, S.** (1999). A new series of pET-derived vectors for high efficiency expression of Pseudomonas exotoxin-based fusion proteins. *Gene* **229**, 145-153.
- Melcher, K.** (2000). A modular set of prokaryotic and eukaryotic expression vectors. *Anal.Biochem.* **277**, 109-120.
- Montelione, G. T., Lyons, B. A., Emerson, S. D. & Tashiro, M.** (1992). An Efficient Triple Resonance Experiment using Carbon-13 Isotropic Mixing for Determining Sequence-Specific Resonance Assignments of Isotopically-Enriched Proteins. *J.Am.Chem.Soc.* **114**, 10974-10979.
- Motulsky, H. J. & Ransnas, L. A.** (1987). Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. *FASEB J.* **1**, 365-374.
- Muhandiram, D. R. & Kay, L. E.** (1994). Gradient-Enhanced Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity. *J.Magn.Reson.B.* **103**, 203-216.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Nakamura, H.** (1996). Roles of electrostatic interaction in proteins. *Q.Rev.Biophys.* **29**, 1-90.
- Neugebauer, J. M.** (1990). Detergents: an overview. *Methods Enzymol.* **182**, 239-253.
- Perutz, M. F., Gronenborn, A. M., Clore, G. M., Fogg, J. H. & Shih, D. T.** (1985). The  $\text{pK}_a$  values of two histidine residues in human haemoglobin, the Bohr effect, and the dipole moments of  $\alpha$ -helices. *J.Mol.Biol.* **183**, 491-498.

- Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. & Wuthrich, K.** (1997). Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 12366-12371.
- Plesniak, L. A., Connelly, G. P., Wakarchuk, W. W. & McIntosh, L. P.** (1996). Characterization of a buried neutral histidine residue in *Bacillus circulans* xylanase: NMR assignments, pH titration, and hydrogen exchange. *Protein Sci.* **5**, 2319-2328.
- Powers, R., Gronenborn, A. M., Clore, G. M. & Bax, A.** (1991). Three-Dimensional Triple-Resonance NMR of  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Enriched Proteins using Constant-Time Evolution. *J.Magn.Reson.* **94**, 209-213.
- Pristovšek, P., Lücke, C., Reincke, B., Ludwig, B. & Rüterjans, H.** (2000). Solution structure of the functional domain of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c552 in the reduced state. *Eur.J.Biochem.* **267**, 4205-4212.
- Pristovšek, P., Rüterjans, H. & Jerala, R.** (2002). Semiautomatic sequence-specific assignment of proteins based on the tertiary structure--the program ST2NMR. *J.Comput.Chem.* **23**, 335-340.
- Rashin, V. & Honig, B.** (1985). Reevaluation of the Born model of ion hydration. *J.Phys.Chem.* **89**, 5588-5593.
- Remeroski, M. L., Domke, T., Groenewegen, A., Pepermasn, H. A., Hilbers, C. W. & van de Ven, F. J.** (1994).  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR backbone assignments and secondary structure of the 269-residue protease subtilisin 309 from *Bacillus lentus*. *J.Biomol.NMR* **4**, 257-278.
- Reynolds, W. F., Peat, I. R., Freedman, M. H. & Lyerla, J. R., Jr.** (1973). Determination of the tautomeric form of the imidazole ring of L-histidine in basic solution by carbon-13 magnetic resonance spectroscopy. *J.Am.Chem.Soc.* **95**, 328-331.
- Richarz, R. & Wüthrich, K.** (1978). Carbon-13 NMR chemical shifts of the common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L-Ala-OH. *Biopolymers* **17**, 2133-2141.
- Sabini, E., Sulzenbacher, G., Dauter, M., Dauter, Z., Jorgensen, P. L., Schulein, M., Dupont, C., Davies, G. J. & Wilson, K. S.** (1999). Catalysis and specificity in enzymatic glycoside hydrolysis: a  $^{2,5}\text{B}$  conformation for the glycosyl-enzyme intermediate revealed by the structure of the *Bacillus agaradhaerens* family 11 xylanase. *Chem.Biol.* **6**, 483-492.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Sapag, A., Wouters, J., Lambert, C., de Ioannes, P., Eyzaguirre, J. & Depiereux, E.** (2002). The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. *J. Biotechnol.* **95**, 109-131.

- Sattler, M., Maurer, M., Schleucher, J. & Griesinger, C.** (1995). A simultaneous  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC with sensitivity enhancement and a heteronuclear gradient echo. *J.Biomol.NMR* **5**, 97-102.
- Schleucher, J., Sattler, M. & Griesinger, C.** (1993). Kohärenzselektion durch Gradienten ohne Empfindlichkeitsverlust; Anwendung auf 3D-HNCO-Experimente. *Angew.Chem.* **105**, 1518-1521.
- Seavey, B. R., Farr, E. A., Westler, W. M. & Markley, J. L.** (1991). A rational database for sequence-specific protein NMR data. *J.Biomol.NMR* **1**, 217-236.
- Shrager, R. I., Cohen, J. S., Heller, S. R., Sachs, D. H. & Schechter, A. N.** (1972). Mathematical models for interacting groups in nuclear magnetic resonance titration curves. *Biochemistry* **11**, 541-547.
- Sidhu, G., Withers, S. G., Nguyen, N. T., McIntosh, L. P., Ziser, L. & Brayer, G. D.** (1999). Sugar ring distortion in the glycosyl-enzyme intermediate of a family G/11 xylanase. *Biochemistry* **38**, 5346-5354.
- Simonson, T. & Perahia, D.** (1995). Internal and interfacial dielectric properties of cytochrome c from molecular dynamics in aqueous solution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**, 1082-1086.
- Stoesz, J. D., Malinowski, D. P. & Redfield, A. G.** (1979). Nuclear Magnetic resonance study of solvent exchange and nuclear Overhauser effect of the histidine protons of bovine superoxide dismutase. *Biochemistry* **18**, 4667-4675.
- Studier, F. W.** (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J.Mol.Biol.* **219**, 37-44.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Mol.Biol.* **189**, 113-130.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.
- Sudmeier, J. L., Ash, E. L., Gunther, U. L., Luo, X., Bullock, P. A. & Bachovchin, W. W.** (1996). HCN, a triple-resonance NMR technique for selective observation of histidine and tryptophan side chains in  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled proteins. *J.Magn.Reson.B.* **113**, 236-247.
- Szilagy, L.** (1995). Chemical shifts in proteins come of age. *Progress in Nuc.Magn.Res.Spect.* **27**, 325-443.
- Törrönen, A., Harkki, A. & Rouvinen, J.** (1994). Three-dimensional structure of endo-1,4- $\beta$ -xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in the active site. *EMBO J.* **13**, 2493-2501.
- Törrönen, A. & Rouvinen, J.** (1995). Structural comparison of two major endo-1,4-xylanases from *Trichoderma reesei*. *Biochemistry* **34**, 847-856.

**Tosell, J. A.** (1991). Ab initio Calculation of Ti NMR Shieldings for Titanium Oxides and Halides. *J.Magn.Reson.* **94**, 301-308.

**Ullmann, G. M. & Knapp, E. W.** (1999). Electrostatic models for computing protonation and redox equilibria in proteins. *Eur.Biophys.J.* **28**, 533-551.

**Vuister, G. W., Boelens, R. & Kaptein, R.** (1988). Nonselctive Three-Dimensional NMR Spectroscopy. The 3D NOE-HOHAHA Experiment. *J.Magn.Reson.* **80**, 176-185.

**Wada, A.** (1976). The  $\alpha$ -Helix as an electric macro-dipole. *Adv.Biophys.* **9**, 1-63.

**Wakarchuk, W. W., Campbell, R. L., Sung, W. L., Davoodi, J. & Yaguchi, M.** (1994a). Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Sci.* **3**, 467-475.

**Wakarchuk, W. W., Sung, W. L., Campbell, R. L., Cunningham, A., Watson, D. C. & Yaguchi, M.** (1994b). Thermostabilization of the *Bacillus circulans* xylanase by the introduction of disulfide bonds. *Protein Eng.* **7**, 1379-1386.

**Warshel, A.** (1981). Electrostatic basis of structure-function correlation in proteins. *Acc.Chem.Res.* **14**, 284-290.

**Warshel, A.** (1998). Electrostatic origin of the catalytic power of enzymes and the role of preorganized active sites. *J.Biol.Chem.* **273**, 27035-27038.

**Warshel, A., Russell, S. T. & Churg, A. K.** (1984). Macroscopic models for studies of electrostatic interactions in proteins: limitations and applicability. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **81**, 4785-4789.

**Wilrich, P. T.** (1987). Formeln und Tabellen der angewandten mathematischen Statistik. Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo: Springer Verlag.

**Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., Markley, J. L. & Sykes, B. D.** (1995). <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J.Biomol.NMR* **6**, 135-140.

**Wishart, D. S. & Sykes, B. D.** (1994). The <sup>13</sup>C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using <sup>13</sup>C chemical-shift data. *J.Biomol.NMR* **4**, 171-180.

**Withers, S. G., Rupitz, K. & Street, I. P.** (1988). 2-Deoxy-2-fluoro-D-glycosyl Fluorides. *J.Biol.Chem.* **263**, 7929-7932.

**Withers, S. G., Street, I. P., Bird, P. & Dolphin, D. H.** (1987). 2-Deoxy-2-fluoroglucosides: A Novel Class of Mechanism-Based Glucosidase Inhibitors. *J.Am.Chem.Soc.* **109**, 7531-7533.

**Wittekind, M. & Mueller, L.** (1993). HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the  $\alpha$ - and  $\beta$ -Carbon Resonances in Proteins. *J.Magn.Reson.B.* **101**, 201-205.

**Wouters, J., Georis, J., Engher, D., Vandenhaute, J., Dusart, J., Frere, J. M., Depiereux, E. & Charlier, P.** (2001). Crystallographic analysis of family 11 endo- $\beta$ -1,4-xylanase Xyl11 from *Streptomyces sp.* S38. *Acta Crystallogr.D.Biol. Crystallogr.* **57**, 1813-1819.

**Wüthrich, K., Billeter, M. & Braun, W.** (1983). Pseudo-Structures for the 20 Common Amino Acids for Use in Studies of Protein Conformations by Measurements of Intra-molecular Proton-Proton Distance Constraints with Nuclear Magnetic Resonance. *J.Mol.Biol.* **169**, 949-961.

**Yamazaki, T., Nicholson, L. K., Torchia, D. A., Wingfield, P., Stahl, S. J., Kaufmann, J. D., Eyermann, C. J., Hodge, C. N., Lam, P. Y., Ru, Y. et al.** (1994). NMR and X-ray evidence that the HIV protease catalytic aspartyl groups are protonated in the complex formed by the protease and a non-peptide cyclic urea-based inhibitor. *J.Am.Chem.Soc.* **116**, 10791-10792.

**Yu, L. & Fesik, S. W.** (1994). pH titration of the histidine residues of cyclophilin and FK506 binding protein in the absence and presence of immunosuppressant ligands. *Biochim.Biophys.Acta* **1209**, 24-32.

**Zuiderweg, E. R. & Fesik, S. W.** (1989). Heteronuclear Three-Dimensional NMR Spectroscopy of the Inflammatory Protein C5a. *Biochemistry* **28**, 2387-2391.

## 7. Anhang

### 7.1. Material

#### 7.1.1. Bakterienstämme

##### E. coli K12-Stämme

DH5 $\alpha$	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>U169</i> , <i>deoR</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_K^-$ , $m_K^+$ ), $\lambda^-$ , $F^-$ , $\phi 80$ , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) von Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenstein
BL21	$F^-$ , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_B^-$ , $m_B^-$ ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> von Stratagene GmbH, Heidelberg

##### E. coli(DE3)-lysogene Stämme

Der Bakteriophage DE3 ist ein Derivat des Phagen  $\lambda$  mit der Immunitätsregion des Phagen 21. Es enthält ein DNA-Fragment, auf dem das *lacI*-Gen, der *lacUV5*-Promotor, der Beginn des *lacZ*-Gens sowie das Strukturgen für die T7 RNA-Polymerase lokalisiert sind. Die Insertion dieses DNA-Fragments in das *int*-Gen des Bakteriums ermöglicht die stabile Integration des Bakteriophagen in das Wirtsgenom (Studier & Moffatt, 1986).

BL21(DE3)	$F^-$ , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_B^-$ , $m_B^-$ ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (Studier <i>et al.</i> , 1990)
BL21(DE3) pLysS	von Novagen Inc., Madison, USA. Die Expression von zusätzlichem Lysozym unterbindet basale T7 RNA Polymerase-Aktivität ohne Induktion.
BL21(DE3) CodonPlus	von Stratagene GmbH, Heidelberg. Zusätzlich werden tRNAs spezifisch für die seltenen Wobble-Codons AGA/AGG (Arg), AUA (Ile) und CUA (Leu) exprimiert.

### 7.1.2. Plasmide

#### pFab-pz1-Plasmid

Das Plasmid pFab-pz1 wurde von der Firma Novo-Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dänemark zur Verfügung gestellt. Es kodiert ein sekretorisches Expressionssystem für die Xylanase aus *B. agaradhaerens* und diente als Templat zur Umklonierung.

#### pET-Plasmide

pET-Plasmide wurden von Studier entwickelt (Studier, 1991; Studier & Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990). Sie dienen der Klonierung und Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*, wobei die Zielgene unter der stringenten Kontrolle des Bakteriophagen T7-Promotors stehen. pET-Plasmide werden in einen *E. coli*(DE3)-lysogenen Stamm transformiert, die Proteinexpression kann dann durch die Zugabe von IPTG induziert werden.

pET3a	von Novagen Inc., Madison, USA.
pET16b	von Novagen Inc., Madison, USA.
pET16-TEV	modifiziertes Plasmid pET16b; Schnittstelle für Protease Faktor Xa durch TEV Protease (Haspel <i>et al.</i> , 2001) ersetzt

#### pKM-Plasmide

Das Zielprotein ist im Plasmid pKM263 (Melcher, 2000) mit Glutathione S-Transferase (GST) fusioniert, um die Löslichkeit im Cytoplasma des Wirts-Bakteriums zu erhöhen. Die Schnittstelle zwischen dem beweglichen Linker und dem Hexahistidin-Tag ist für die TEV Protease entwickelt worden (Kapust & Waugh, 1999).

pKM263	von Hr. Dr. Melcher, Institut für Mikrobiologie, Universität Frankfurt
--------	--

#### pMAL-Plasmide

pMAL-Plasmide wurden von Guan *et al.* (1987) entwickelt. Das Zielprotein ist mit einem Maltose Bindungs Protein (MBP) fusioniert, um die Löslichkeit im Cytoplasma des Wirts-Bakteriums zu erhöhen. Maina *et al.* (1988) verbesserte die Möglichkeiten zur Aufreinigung der Zielproteine, eine Faktor Xa-Schnittstelle wurde eingeführt.

pMAL-TEV                    modifiziertes Plasmid pMAL von New England Biolabs, Inc.;  
Schnittstelle für Protease Faktor Xa durch TEV Protease ersetzt  
(Kapust & Waugh, 1999)

### 7.1.3. Oligodesoxyribonukleotide

Die Oligodesoxyribonukleotide für DNA-Synthese und –Sequenzierung wurden von der Firma BioSpring GmbH, Frankfurt im 0.05 µmol-Massstab synthetisiert.

#### Primer für die Generierung von pET3a-Xyl207

Prm 1 (*Nde* I – Xylanase): 5'-GGG GAA GGG GAA CAT ATG ATC GTC ACC GAC AAT TCC ATT G-3'

Prm 2 (Xylanase-*Bam*H I): 5'-GGG GAA GGG GGA TCC TTA TGA GAG AGG GTT ACC GTT AAT TC-3'

#### Primer für die Generierung von pET16b-Xyl207

Prm 1 (*Nde* I – Xylanase): siehe oben

Prm 2 (Xylanase-*Bam*H I): siehe oben

#### Primer für die Generierung von pET16TEV-Xyl207

Prm 1 (*Nde* I – Xylanase): siehe oben

Prm 2 (Xylanase-*Bam*H I): siehe oben

#### Primer für die Generierung von pKM263-Xyl207

Prm 3 (vor *Nco* I – Xylanase): 5'-GGC AGC CGC TGG ATT G-3'

Prm 2 (Xylanase-*Bam*H I): siehe oben

#### Primer für die Generierung von pMAL-TEV-Xyl207

Prm 4 (*Bam*H I – Xylanase): 5'-GGG GAA GGG GGA TCC ATC GTC ACC GAC AAT TCC ATT G -3'

Prm 5 (Xylanase-*Hind* III): 5'-GGG GAA GGG AAG CTT TTA TGA GAG AGG GTT ACC GTT AAT TC -3'

**7.1.4. Enzyme**

T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Roche, Mannheim
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene GmbH, Heidelberg
<i>Pfu</i> Turbo™ DNA-Polymerase	Stratagene GmbH, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim
	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
	Stratagene GmbH, Heidelberg

**7.1.5. Chemikalien**Feinchemikalien

Acrylamid-Fertiglösung für denaturierende Protein-Gele (Rotiphorese Gel 30)	Roth GmbH, Karlsruhe
Pefabloc® SC	Roche, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat	E. Merck GmbH, Darmstadt
Ampicillin	Roche, Mannheim
Arginin	Roth GmbH, Karlsruhe
Betain Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Borsäure	Roth GmbH, Karlsruhe
Calciumchlorid	E. Merck GmbH, Darmstadt
CAPS	Roth GmbH, Karlsruhe
CHAPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glyzerin	Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	E. Merck GmbH, Darmstadt
MOPS	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumsulfat	Roth GmbH, Karlsruhe
IPTG	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Luria Broth Base	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenst.
Natriumazid	Serva GmbH & Co., Heidelberg
SDS	Serva GmbH & Co., Heidelberg
Remazol Brilliant Blue R	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Rubidiumchlorid (RbCl)	E. Merck GmbH, Darmstadt
TEMED	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris	Roth GmbH, Karlsruhe

Isotopen-Materialien

<sup>15</sup> N-Ammoniumchlorid (99 % <sup>15</sup> N)	Martek Bioscience Corp., Columbia, MD, USA
D <sub>2</sub> O (99% D)	- “ -
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -D-Glucose (98 - 99 % <sup>13</sup> C)	- “ -
<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -Glyzerin (99% <sup>13</sup> C)	- “ -
d <sub>5</sub> -Glyzerin (98 - 99 % D)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

**7.1.6. Standards und Kits**DNA-Molekulargewichts-Marker und -Massenstandards

100 Basenpaar-Leiter	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
1000 Basenpaar-Leiter	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Low DNA Mass Ladder	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenst.

Protein-Molekulargewichts-Marker

Protein Molecular Weight Marker (116 kDa–14.4 kDa)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
---	----------------------------------

Kits

QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAfilter Plasmid Midi Kit	- “ -
QIAquick PCR Purification Kit	- “ -
Taq DyeDesoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

**7.1.7. Geräte**

Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Badthermostat C1-W5P	Haake Messtechnik GmbH & Co., Karlsruhe
Brutschrank BKE 40	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Chromatographieanlage: ÄktaBasic	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Dampfaufoklav FVS 1/2	Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz
Druckfiltrations-Rührzellen Amicon 8003, 8050, 8200 und 8400	Millipore GmbH, Eschborn
Elektroblotapparat Sartoblot II	Sartorius AG, Göttingen
Elektrophoreseapparat GNA-100	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Eppendorf Multipette Typ 4780	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
FrenchPress	SLM-Aminco, Urbana, Illinois, USA
Geltrockner Model 543	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Hochdrucksterilisator Getinge 44EN  
 Inkubationsschüttler Gyrotory<sup>®</sup> G76  
 Inkubationsschüttler Multitron<sup>®</sup>  
 Membranpumpe MZ 2 C Synchro  
 Mikrowellengerät R-3V11(W)  
 Minischüttler MS1

Netzgeräte

PowerPac 3000  
 Consort E554

NMR-Geräte

DMX500  
 DMX600

PCR-Gerät DNA Engine PTC-200  
 pH-Meter  
 pH-Mikroelektrode InLab 423  
 Pipetten Eppendorf Research  
 Schüttelgerät Promax 2020  
 Spektralphotometer U-1100  
 Spektralphotometer Cary 3  
 Sterilwerkbank Danlaf VFS 1206

Software

AURELIA 2.7.5  
 CSI, Version 1.0  
 NMR2VIEW 5.0.4  
 NMR2ST

PRONTO v.19990506  
 XWINNMR 2.1

Thermomixer 5436  
 Ultraschallhomogenisator Labsonic<sup>®</sup> U  
 mit Schwingsonden 5 T und 40 T  
 UV-Detektoren UV-M & UV-MII  
 UV-Transilluminator

Zentrifugen

Biofuge RS 28 mit Rotor 3746  
 RC-5B mit Rotoren SS34 und GS3  
 RC 28S mit Rotoren SS34, GSA  
 und GS3

Avanti J20 mit Rotor JLA 8.1000  
 Tischzentrifuge 5417C  
 Kühlzentrifuge 5417R

Getinge AB, Getinge, Schweden  
 New Brunswick Scientific Inc., Edison, NJ, USA  
 Infors AG, Bottmingen, Schweiz  
 Vacuubrand GmbH & Co., Wertheim  
 Sharp Electronics GmbH, Hamburg  
 Bender & Hobein AG, München

Bio-Rad Laboratories GmbH, München  
 Bachofer GmbH, Reutlingen

Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten

MJ Research Inc., Watertown, MA, USA  
 Radiometer, Kopenhagen, Dänemark  
 Mettler Toledo GmbH, Pforzheim  
 Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg  
 Heidolph-Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim  
 Hitachi Ltd., Tokyo, Japan  
 Varian Ltd., Mulgrave, Victoria, Australien  
 Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz

Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten  
 University of Alberta, Edmonton, Canada  
 Merck and Co., INC, New Jersey, USA  
 National Institute of Chemistry, Ljubljana,  
 Slovenien

Carlsberg Laboratory, Kopenhagen, Dänemark  
 Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten  
 Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg  
 B. Braun Biotech GmbH, Melsungen

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg  
 Renner GmbH, Dannstadt

Haereus Sepatech GmbH, Osterode  
 Sorvall Instruments, Bad Nauheim  
 Sorvall Instruments, Bad Nauheim

Beckman Coulter Inc., Fullerton, Kanada  
 Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg  
 Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

### 7.1.8. Säulen- und Chromatographiematerialien

Chromatographie-Leersäule XK16	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Superdex 75 HR 10/30	- " -
SP Sepharose	- " -

### 7.1.9. Sonstiges Material

Dialyseschlauch Spectra/Por 3, Ausschlussgrösse: 3,5 kDa	Spectrum Medical Industries Inc., L.A., CA, USA
Einmalspritzen, 1 ml, 5 ml, 20 ml & 50 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einwegkonzentratoren Vivaspin 16 und 4 ml (MWCO: 5 o. 10 kDa)	VivaScience, Lincoln, UK
Eppendorf-Reaktionsgefässe 3810, 0.5 ml, 1.5 ml und 2.0 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Falcon-Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner & Söhne GmbH & Co. KG, Nürtingen
Gefrier Röhrchen	Nalge Company, Rochester, NY, USA
Membranfilter, 0.2 µm und 0.45 µm	Sartorius AG, Göttingen
NMR-Probenröhrchen, Ø = 5 mm	Wilmad Glass, Buena, NY, USA
Petrischalen aus Polystyrol, Ø = 94 mm	Greiner & Söhne GmbH & Co. KG, Nürtingen
Pipetten-Spitzen gelb (5-200 µl), blau (200-1000 µl) weiss (0.5-10 µl)	Sarstedt GmbH, Nümbrecht Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Polypropylen-Röhrchen, 13 ml	Sarstedt GmbH, Nümbrecht
Shigemi-NMR-Röhrchen, Ø 4.2 mm	Shigemi Co., Tokyo, Japan
Sterilfilterhalter, 0.2 µm und 0.45 µm	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Ultrafiltrationsmembranen YM10	Millipore GmbH, Eschborn
Zentrifugenbecher aus Polypropylen für Sorvall-Rotoren SS34, GSA, GS3	Nalge Company, Rochester, NY, USA

### 7.1.10. Medien und Antibiotika

#### 7.1.10.1. Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin:	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>milli</sub> ; 1:1000 zum Medium
Chloramphenicol:	34 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>milli</sub> ; 1:1000 zum Medium

Die Stammlösungen wurden in Aliquots von 1ml bei -20 °C gelagert.

### 7.1.10.2. Medien für die Kultivierung von *E. coli*

#### S.O.C-Medium

20 g/l	Pepton aus Casein (Bacto Trypton)
5 g/l	Hefeextrakt (Bacto Yeast Extrakt)
10 mM	NaCl
2.5 mM	KCl

Medium 20 min autoklavieren und anschließend folgende sterile Lösungen zugeben:

10 ml/l	2 M Glucose
10 ml/l	1 M MgCl <sub>2</sub> / 1 M MgSO <sub>4</sub>

#### LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

10 g/l	Pepton aus Casein (Bacto Trypton)
5 g/l	Hefeextrakt (Bacto Yeast Extrakt)
10 g/l	NaCl

für LB-Agarplatten ausserdem zusetzen:

15 g/l	Agar-Agar
--------	-----------

pH-Wert mit NaOH auf 7.40 einstellen und anschließend 20 min autoklavieren

#### M9-Medium (Glucose-Minimalmedium)

##### Fünffach M9-Salze

7.1 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2.7 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.5 g/l	NaCl
1.0 g/l	NH <sub>4</sub> Cl

auf 200ml auffüllen und 20 min autoklavieren

##### Lösung 1

350 ml	steriles H <sub>2</sub> O <sub>milli</sub>
1 ml/l	1 M CaCl <sub>2</sub> , 0.1 M FeCl <sub>3</sub>

mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>milli</sub> auf auffüllen

##### Lösung 2

400 ml	steriles H <sub>2</sub> O <sub>milli</sub>
1 ml/l	1 M MgSO <sub>4</sub>
1 ml/l	100 mg/ml Ampicillin
1 ml/l	34 mg/ml Chloramphenicol
0.1 ml/l	20 mg/ml Thiaminhydrochlorid
200 ml	fünffach M9-Salze

Lösung 2 wurde langsam unter Rühren zu Lösung 1 gegeben. Anschließend wurden die Kohlenstoff-Quellen hinzugegeben:

5 ml/l	50% (v/v) Glycerin
1 g	Glucose

7.1.10.3. Medien für die Anreicherung mit  $^{13}\text{C}$  und/oder  $^{15}\text{N}$

Wie unter Kap. 7.1.10.2 beschrieben, wurden im M9-Medium die Stickstoff- / Kohlenstoff-Quellen durch die entsprechenden Isotope ersetzt:

Fünffach M9-Salze

7.1 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
2.7 g/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
0.5 g/l	$\text{NaCl}$
1.0 g/l	$^{15}\text{N}\text{-NH}_4\text{Cl}$
bzw.	
5 ml/l	50% (v/v) $^{13}\text{C}$ -Glycerin
1 g	$^{13}\text{C}$ -Glucose

7.2. Zuordnung der Xylanase *B. agaradhaerens*Tab. 7-1: Zuordnung der chemischen Verschiebungswerte (Betz *et al.*, 2002)

Fehler  $^1\text{H}$ : 0.02 ppm,  $^{13}\text{C}$ : 0.1 ppm,  $^{15}\text{N}$ : 0.1 ppm; '?' entspricht einer Mehrdeutigkeit (z. B. geminale Atome oder auch intraresidual durch vicinale Atome); Resonanzen, die mit einem '-' bezeichnet wurden, sind mit den verwendeten NMR-Experimenten nicht messbar.

AS	$\text{N}_{bb}$	$\text{H}^{\text{N}}$	$\text{C}^{\gamma}$	$\text{C}^{\alpha}$	$\text{H}^{\alpha}$	$\text{C}^{\beta}$	$\text{H}^{\beta}/(\text{H}^{\beta'})$	Sonstige
M1			171.4	55.5	4.08	34.2	2.10/1.80	31.4 ( $\text{C}^{\gamma}$ ), 2.50/2.27 ( $\text{H}^{\gamma\gamma'}$ )
I2	127.6	8.87	174.7	61.4	4.72	40.0	1.72	28.1/17.7 ( $\text{C}^{\gamma\gamma'2}$ ), 1.60/1.01/0.86 ( $\text{H}^{\gamma\gamma'\gamma'2}$ ), 13.6 ( $\text{C}^{\delta}$ ), 0.86 ( $\text{H}^{\delta}$ )
V3	128.0	9.31	175.3	61.6	4.38	34.9	2.12	22.8/21.0 ( $\text{C}^{\gamma\gamma'}$ ), 1.07/0.81 ( $\text{H}^{\gamma\gamma'}$ )
T4	114.1	8.68	172.5	60.9	4.80	70.4	4.68	21.9 ( $\text{C}^{\gamma}$ ), 1.22 ( $\text{H}^{\gamma}$ )
D5	120.0	7.04	173.9	52.5	4.53	44.3	2.57/2.49	181.1 ( $\text{CO}^{\gamma}$ )
N6	119.3	8.38	176.2	54.6	4.82	37.5	2.87/2.80	175.7 ( $\text{CO}^{\gamma}$ )
S7	117.8	8.69	171.6	58.6	4.82	66.3	4.03/4.03	
I8	121.3	8.15	174.9	59.8	4.51	42.3	1.67	27.3/17.6 ( $\text{C}^{\gamma\gamma'2}$ ), 1.53/0.92/0.84 ( $\text{H}^{\gamma\gamma'\gamma'2}$ ), 14.1 ( $\text{C}^{\delta}$ ), 0.84 ( $\text{H}^{\delta}$ )
G9	109.6	6.82	170.5	45.8	4.04/3.76			
N10	120.9	8.82	174.2	53.0	5.68	42.7	2.68/2.55	176.1 ( $\text{CO}^{\gamma}$ )
H11	127.9	9.99	173.7	57.7	4.87	35.9	3.17/2.86	135.4 ( $\text{C}^{\gamma}$ ), 166.6 ( $\text{N}^{\delta 1}$ ), - ( $\text{H}^{\delta 1}$ ), 117.6 ( $\text{C}^{\delta 2}$ ), 7.24 ( $\text{H}^{\delta 2}$ ), 138.8 ( $\text{C}^{\epsilon 1}$ ), 7.25 ( $\text{H}^{\epsilon 1}$ )
D12	127.5	8.91	174.9	54.7	4.24	39.8	3.29/2.32	181.6 ( $\text{CO}^{\gamma}$ )
G13	101.9	7.63	174.5	45.7	4.28/3.67			
Y14	121.2	8.19	176.0	57.5	4.59	40.5	3.31/2.77	
D15	124.2	8.95	175.6	55.5	5.35	41.6	2.94/2.23	181.1 ( $\text{CO}^{\gamma}$ )
Y16	125.0	9.44	174.3	54.7	5.91	44.1	3.14/2.60	
E17	121.1	8.53	173.8	56.6	5.02	32.8	1.91/1.55	35.69 ( $\text{C}^{\gamma}$ ), 2.47/2.03 ( $\text{H}^{\gamma\gamma'}$ ), 181.4 ( $\text{CO}^{\delta}$ )
F18	129.8	8.97	175.0	55.5	5.13	43.1	3.26/3.15	
W19	131.9	8.52	172.1	58.4	4.66	32.8	3.10/2.87	111.8 ( $\text{C}^{\gamma}$ ), 127.88 ( $\text{C}^{\delta 1}$ ), 7.40 ( $\text{H}^{\delta 1}$ ), 129.2 ( $\text{N}^{\epsilon 1}$ ), 9.90 ( $\text{H}^{\epsilon 1}$ ), 138.7 ( $\text{C}^{\epsilon 2}$ )
K20	126.2	8.51	174.8	54.7	4.57	34.6	1.85/1.29	20.0 ( $\text{C}^{\gamma}$ ), 1.55/? ( $\text{H}^{\gamma\gamma'}$ ), 28.6 ( $\text{C}^{\delta}$ ), ?/? ( $\text{H}^{\delta,\delta'}$ ), 40.2 ( $\text{C}^{\epsilon}$ ), ?/? ( $\text{H}^{\epsilon,\epsilon'}$ )
D21	120.6	7.56	175.7	51.4	4.38	40.2	3.20/2.80	178.8 ( $\text{CO}^{\gamma}$ )
S22	113.3	7.98	175.2	60.7	4.18	63.4	3.89/3.89	
G23	111.6	8.37	176.2	44.5	4.51/3.77			
G24	113.7	8.73	173.7	46.5	4.23/3.85			
S25	112.4	8.66	172.4	57.1	4.94	66.6	4.01/3.95	
G26	107.4	9.05	171.8	46.5	5.34/3.99			
T27	114.2	9.22	172.5	62.4	4.95	72.7	3.92	22.2 ( $\text{C}^{\gamma}$ ), 1.14 ( $\text{H}^{\gamma}$ )
M28	129.7	9.59	173.3	54.1	5.42	37.3	2.35/2.24	33.3 ( $\text{C}^{\gamma}$ ), 2.57/2.38 ( $\text{H}^{\gamma\gamma'}$ )
I29	127.9	9.16	175.9	60.7	4.95	38.3	1.97	27.8/17.5 ( $\text{C}^{\gamma\gamma'2}$ ), 1.53/1.00/0.78 ( $\text{H}^{\gamma\gamma'\gamma'2}$ ), 13.1 ( $\text{C}^{\delta}$ ), 0.78 ( $\text{H}^{\delta}$ )
L30	125.5	8.57	174.4	54.7	4.18	40.1	1.03/0.41	26.0 ( $\text{C}^{\gamma}$ ), 1.19 ( $\text{H}^{\gamma}$ ), 24.8/23.1 ( $\text{C}^{\delta,\delta 2}$ ), 0.09/0.09 ( $\text{H}^{\delta,\delta 2}$ )
N31	124.5	7.42	173.6	51.6	5.18	41.9	2.99/2.58	176.5 ( $\text{CO}^{\gamma}$ )
H32	112.1	7.86	177.7	56.6	4.61	29.4	3.30/3.30	131.0 ( $\text{C}^{\gamma}$ ), 180.2 ( $\text{N}^{\delta 1}$ ), - ( $\text{H}^{\delta 1}$ ), 120.3 ( $\text{C}^{\delta 2}$ ), 7.40 ( $\text{H}^{\delta 2}$ ), 136.6 ( $\text{C}^{\epsilon 1}$ ), 8.68 ( $\text{H}^{\epsilon 1}$ )
G33	116.6	10.88	174.0	46.9	3.90/3.90			
G34	117.5	9.07	175.8	45.0	3.49/2.98			
T35	111.8	7.98	175.1	63.4	4.81	70.3	4.19	21.8 ( $\text{C}^{\gamma}$ ), 1.02 ( $\text{H}^{\gamma}$ )
F36	113.8	8.00	171.9	57.2	5.43	40.1	3.44/3.01	
S37	114.8	9.57	172.6	56.8	5.21	65.9	4.07/3.93	

A38	125.9	9.43	175.9	51.3	5.20	21.3	0.38	
Q39	122.1	8.69	173.8	55.5	5.02	32.3	2.10/2.10	34.0 (C <sup>y</sup> ), 2.39/2.11 (H <sup>y,y</sup> ), 180.3 (CO <sup>δ</sup> )
W40	123.0	8.98	174.3	57.1	5.85	33.8	3.73/3.47	111.0 (C <sup>y</sup> ), 128.94 (C <sup>δ1</sup> ), 7.30 (H <sup>δ1</sup> ), 127.9 (N <sup>e1</sup> ), 9.58 (H <sup>e1</sup> ), 139.0 (C <sup>e2</sup> )
N41	120.0	9.24	172.6	53.2	5.16	42.2	2.66/2.55	176.1 (CO <sup>y</sup> )
N42	122.1	8.94	173.7	54.3	4.24	37.3	2.99/2.70	178.5 (CO <sup>y</sup> )
V43	107.3	7.49	176.5	60.0	4.31	32.3	2.39	23.9/17.7 (C <sup>y,y</sup> ), 1.10/0.83 (H <sup>y,y</sup> )
N44	121.5	9.85	174.5	57.0	4.90	38.7	3.52/2.87	177.8 (CO <sup>y</sup> )
N45	118.3	9.47	171.8	53.1	5.35	43.0	2.84/2.76	176.8 (CO <sup>y</sup> )
I46	120.2	8.16	171.6	59.2	5.09	42.6	1.14	27.3/17.8 (C <sup>y,y2</sup> ), ?/?/0.49 (H <sup>y,y,y2</sup> ), 16.2 (C <sup>δ</sup> ), 0.21 (H <sup>δ</sup> )
L47	125.5	9.19	174.2	55.7	4.91	47.3	1.34/1.11	28.7 (C <sup>y</sup> ), ? (H <sup>y</sup> ), 26.2/25.4 (C <sup>δ,δ2</sup> ), 0.62/0.18 (H <sup>δ,δ2</sup> )
F48	119.6	8.72	175.1	55.5	5.08	42.4	3.05/2.88	
R49	118.4	8.42	175.4	55.3	5.43	35.2	1.70/1.70	26.6 (C <sup>y</sup> ), 1.61/1.25 (H <sup>y,y</sup> ), 46.1 (C <sup>δ</sup> ), 2.90/2.65 (H <sup>δ,δ</sup> )
K50	120.3	8.23	176.8	57.3	5.16	39.5	1.90/1.84	29.9 (C <sup>y</sup> ), 1.68/1.52 (H <sup>y,y</sup> ), 31.5 (C <sup>δ</sup> ), ?/? (H <sup>δ,δ</sup> ), 42.1 (C <sup>e</sup> ), 3.22/2.90 (H <sup>e,e</sup> )
G51	114.3	9.43	169.2	47.1	4.60/4.33			
K52	128.3	9.36	173.7	54.1	4.99	36.8	1.45/1.34	24.8 (C <sup>y</sup> ), 0.42/0.29 (H <sup>y,y</sup> ), 28.4 (C <sup>δ</sup> ), 1.68/1.68 (H <sup>δ,δ</sup> ), 42.4 (C <sup>e</sup> ), 2.76/2.52 (H <sup>e,e</sup> )
K53	125.9	9.09	176.1	54.4	4.73	34.6	1.54/1.38	25.8 (C <sup>y</sup> ), 1.06/1.06 (H <sup>y,y</sup> ), 29.0 (C <sup>δ</sup> ), ?/? (H <sup>δ,δ</sup> ), 43.2 (C <sup>e</sup> ), 2.84/2.84 (H <sup>e,e</sup> )
F54	119.5	8.27	176.0	56.4	4.82	42.2	3.43/2.42	
N55	117.6	8.15	175.0	52.8	4.81	37.9	3.32/2.80	178.5 (CO <sup>y</sup> )
E56	109.3	7.41	174.8	57.9	3.52	26.6	2.41/2.16	36.86 (C <sup>y</sup> ), 2.30/2.05 (H <sup>y,y</sup> ), 182.7 (CO <sup>δ</sup> )
T57	105.5	8.27	175.8	62.3	6.67	72.1	4.25	20.8 (C <sup>y</sup> ), 1.13 (H <sup>y</sup> )
Q58	123.9	9.29	176.0	54.9	5.06	34.7	2.08/1.90	34.6 (C <sup>y</sup> ), 2.50/2.08 (H <sup>y,y</sup> ), 180.5 (CO <sup>δ</sup> )
T59	113.9	8.74	176.4	60.9	4.61	70.6	4.46	22.1 (C <sup>y</sup> ), 1.19 (H <sup>y</sup> )
H60	122.1	10.63	178.0	60.7	3.94	30.4	3.26/3.16	135.4 (C <sup>y</sup> ), 248.5 (N <sup>δ1</sup> ), - (H <sup>δ1</sup> ), 120.3 (C <sup>δ2</sup> ), 7.23 (H <sup>δ2</sup> ), 136.4 (C <sup>e1</sup> ), 7.47 (H <sup>e1</sup> )
Q61	120.3	7.97	178.9	59.8	3.65	27.4	1.72/1.72	34.2 (C <sup>y</sup> ), 2.44/2.01 (H <sup>y,y</sup> ), 180.1 (CO <sup>δ</sup> )
Q62	118.6	7.29	178.1	57.8	3.90	29.0	2.35/1.96	34.9 (C <sup>y</sup> ), 2.36/2.36 (H <sup>y,y</sup> ), 180.5 (CO <sup>δ</sup> )
V63	120.6	7.79	176.4	66.7	3.43	32.2	2.11	22.5/22.5 (C <sup>y,y</sup> ), 0.92/0.51 (H <sup>y,y</sup> )
G64	103.6	7.70	172.5	43.1	4.69/3.61			
N65	115.1	7.86	176.2	54.0	4.62	39.9	2.78/2.71	176.6 (CO <sup>y</sup> )
M66	127.2	9.53	175.4	55.0	5.32	38.0	1.93/1.55	33.5 (C <sup>y</sup> ), 2.56/2.56 (H <sup>y,y</sup> ),
S67	116.5	8.70	172.5	57.2	5.09	65.6	3.71/3.71	
I68	125.3	8.91	174.4	60.0	5.39	43.4	1.54	30.2/17.6 (C <sup>y,y2</sup> ), 1.20/?/1.02 (H <sup>y,y,y2</sup> ), 15.2 (C <sup>δ</sup> ), 1.02 (H <sup>δ</sup> )
N69	127.1	8.66	173.8	52.2	5.66	41.3	2.74/2.74	176.7 (CO <sup>y</sup> )
Y70	124.0	9.47	174.0	55.8	5.24	43.9	2.98/2.72	
G71	110.0	8.47	170.5	45.6	3.96/3.27			
A72	123.2	8.92	176.4	50.6	5.25	23.5	1.26	
N73	119.9	9.12	174.9	52.7	5.34	39.6	3.11/2.95	176.2 (CO <sup>y</sup> )
F74	129.2	9.52	172.1	56.9	5.08	42.3	3.30/2.88	
Q75	125.1	8.63	172.7	53.1	?	29.4	??/?	? (C <sup>y</sup> ), ?/? (H <sup>y,y</sup> ), ? (CO <sup>δ</sup> )
P76			175.5	63.2	4.37	33.4	2.15/1.66	26.9 (C <sup>y</sup> ), ?/1.37 (H <sup>y,y</sup> ), 49.0 (C <sup>δ</sup> ), 3.34/3.34 (H <sup>δ,δ</sup> )
N77	121.5	8.89	174.2	52.4	5.00	38.2	2.79/2.53	177.5 (CO <sup>y</sup> )
G78	110.3	8.22	173.4	44.5	4.56/3.87			
N79	123.6	8.91	175.5	54.6	5.15	38.6	3.85/3.25	176.9 (CO <sup>y</sup> )
A80	128.5	8.27	175.3	52.2	5.07	23.8	1.71	
Y81	115.2	9.36	174.1	53.8	5.95	42.8	3.66/3.19	
L82	124.4	8.14	175.7	54.0	4.96	42.7	1.29/0.42	27.4 (C <sup>y</sup> ), ? (H <sup>y</sup> ), 27.4/22.8 (C <sup>δ,δ2</sup> ), 0.83/0.57 (H <sup>δ,δ2</sup> )
C83	121.0	9.44	172.3	54.5	6.00	33.9	3.25/3.08	
V84	119.9	9.32	173.3	62.4	4.76	32.5	1.96	25.1/22.8 (C <sup>y,y</sup> ), 0.92/0.51 (H <sup>y,y</sup> )
Y85	130.4	8.93	173.2	54.8	5.22	43.9	2.85/2.71	
G86	109.3	5.66	169.4	44.8	3.79/2.93			

W 87	111.5	6.80	178.4	54.9	6.12	35.7	3.16/2.66	112.0 (C <sup>y</sup> ), 125.40 (C <sup>δ1</sup> ), 6.76 (H <sup>δ1</sup> ), 129.8 (N <sup>ε1</sup> ), 9.24 (H <sup>ε1</sup> ), 138.4 (C <sup>ε2</sup> )
T 88	112.6	9.68	172.4	60.6	5.32	71.6	3.97	21.4 (C <sup>y</sup> ), 1.09 (H <sup>y</sup> )
V 89	112.4	8.92	175.1	60.5	4.26	34.6	1.93	21.7/19.5 (C <sup>y/y</sup> ), 0.78/0.78 (H <sup>y/y</sup> )
D 90	118.5	8.42	173.6	55.1	4.26	40.1	3.00/2.58	181.5 (CO <sup>y</sup> )
P 91			175.2	62.7	4.43	35.1	2.25/1.91	24.1 (C <sup>y</sup> ), 1.70/1.54 (H <sup>y/y</sup> ), 51.0 (C <sup>δ</sup> ), 3.28/3.12 (H <sup>δ,δ1</sup> )
L 92	121.6	8.10	175.0	54.8	5.06	42.4	2.10/1.48	27.0 (C <sup>y</sup> ), ? (H <sup>y</sup> ), 26.2/24.5 (C <sup>δ,δ2</sup> ), 0.87/0.74 (H <sup>δ,δ2</sup> )
V 93	130.6	8.13	173.3	61.0	4.55	36.8	2.01	21.4/19.6 (C <sup>y/y</sup> ), 0.44/0.23 (H <sup>y/y</sup> )
E 94	130.0	7.99	174.0	53.6	6.31	32.4	3.41/1.52	35.97 (C <sup>y</sup> ), 1.08/0.22 (H <sup>y/y</sup> ), 182.8 (CO <sup>δ</sup> )
Y 95	123.4	7.65	171.0	54.8	5.54	42.8	3.39/1.94	
Y 96	114.1	8.30	176.8	57.2	5.25	46.1	2.47/2.19	
I 97	121.9	9.68	176.2	61.1	5.04	39.7	1.59	27.2/16.5 (C <sup>y/y2</sup> ), ?/?/0.42 (H <sup>y/y/y2</sup> ), 15.3 (C <sup>δ</sup> ), 0.12 (H <sup>δ</sup> )
V 98	125.9	9.95	174.4	63.1	4.41	34.1	2.58	23.0/21.9 (C <sup>y/y</sup> ), 1.42/1.18 (H <sup>y/y</sup> )
D 99	129.1	8.20	175.8	54.9	5.66	43.1	3.25/2.27	179.6 (CO <sup>y</sup> )
S 100	107.8	8.16	173.0	57.3	4.43	63.6	4.34/3.40	
W 101	120.3	7.62	175.0	56.4	6.54	30.1	3.93/3.75	110.4 (C <sup>y</sup> ), 127.53 (C <sup>δ1</sup> ), 6.87 (H <sup>δ1</sup> ), 131.4 (N <sup>ε1</sup> ), 10.39 (H <sup>ε1</sup> ), 138.1 (C <sup>ε2</sup> )
G 102	110.5	9.39	174.1	45.3	4.67/4.53			
N 103	124.2	8.23	175.6	54.2	4.78	38.0	3.18/2.95	176.6 (CO <sup>y</sup> )
W 104	122.2	8.42	173.5	57.5	4.86	30.7	3.20/3.01	111.0 (C <sup>y</sup> ), 127.58 (C <sup>δ1</sup> ), 7.29 (H <sup>δ1</sup> ), 130.1 (N <sup>ε1</sup> ), 9.89 (H <sup>ε1</sup> ), 138.7 (C <sup>ε2</sup> )
R 105	132.8	8.04	171.7	52.4	2.79	30.4	?/?	? (C <sup>y</sup> ), ?/? (H <sup>y/y</sup> ), ? (C <sup>δ</sup> ), ?/? (H <sup>δ,δ1</sup> )
P 106						-	-/-	-(C <sup>y</sup> ), -(H <sup>y/y</sup> ), -(C <sup>δ</sup> ), / (H <sup>δ,δ1</sup> )
P 107			175.9	62.9	3.34	31.0	0.98/1.07	23.0 (C <sup>y</sup> ), 0.02/0.33 (H <sup>y/y</sup> ), 46.4 (C <sup>δ</sup> ), 1.75/1.75 (H <sup>δ,δ1</sup> )
G 108	113.4	7.88	172.8	46.5	4.03/3.66			
A 109	120.3	6.19	175.3	50.5	4.72	22.0	1.25	
T 110	117.5	8.49	172.9	60.5	5.00	70.0	?	? (C <sup>y</sup> ), ? (H <sup>y</sup> )
P 111			177.3	63.3	4.09	32.5	1.84/1.65	27.1 (C <sup>y</sup> ), 2.04/? (H <sup>y/y</sup> ), 51.2 (C <sup>δ</sup> ), 3.84/3.84 (H <sup>δ,δ1</sup> )
K 112	119.7	9.26	175.9	55.4	4.48	34.3	1.76/1.61	24.1 (C <sup>y</sup> ), ?/? (H <sup>y/y</sup> ), 29.6 (C <sup>δ</sup> ), 2.23/1.96 (H <sup>δ,δ1</sup> ), 41.7 (C <sup>ε</sup> ), 3.00/3.00 (H <sup>ε,ε1</sup> )
G 113	104.5	7.35	171.2	45.1	4.15/4.15			
T 114	111.2	8.31	173.5	60.5	5.58	73.7	3.96	22.3 (C <sup>y</sup> ), 1.19 (H <sup>y</sup> )
I 115	118.2	9.06	173.4	59.9	4.69	41.0	1.75	28.0/16.6 (C <sup>y/y2</sup> ), 1.46/0.76/0.89 (H <sup>y/y/y2</sup> ), 13.6 (C <sup>δ</sup> ), 0.29 (H <sup>δ</sup> )
T 116	125.7	8.70	173.6	61.5	5.53	69.7	4.01	20.9 (C <sup>y</sup> ), 1.16 (H <sup>y</sup> )
V 117	127.7	9.15	172.8	60.7	4.39	33.3	1.88	21.4/19.2 (C <sup>y/y</sup> ), 0.89/0.53 (H <sup>y/y</sup> )
D 118	121.9	9.07	177.5	55.7	4.42	40.7	3.42/3.13	181.4 (CO <sup>y</sup> )
G 119	104.9	8.91	174.1	46.0	4.20/3.78			
G 120	109.1	8.14	171.0	44.1	4.74/3.61			
T 121	115.5	8.30	172.3	62.7	5.16	70.8	3.79	21.4 (C <sup>y</sup> ), 1.10 (H <sup>y</sup> )
Y 122	125.1	9.74	176.1	55.8	5.18	39.5	3.31/2.73	
D 123	121.2	8.48	174.4	54.8	5.16	45.6	2.62/2.04	180.3 (CO <sup>y</sup> )
I 124	122.5	8.23	174.9	59.9	5.59	40.2	1.07	27.8/18.8 (C <sup>y/y2</sup> ), 1.48/?/0.93 (H <sup>y/y/y2</sup> ), 14.7 (C <sup>δ</sup> ), 0.80 (H <sup>δ</sup> )
Y 125	122.7	9.39	173.0	55.3	4.91	42.5	2.67/2.41	
E 126	121.6	9.01	175.4	55.2	5.79	34.3	2.02/2.02	36.64 (C <sup>y</sup> ), 2.50/2.22 (H <sup>y/y</sup> ), 182.3 (CO <sup>δ</sup> )
T 127	118.1	9.59	172.9	60.4	4.85	71.5	4.53	22.2 (C <sup>y</sup> ), 1.00 (H <sup>y</sup> )
L 128	122.5	8.51	175.9	54.6	4.86	45.7	1.71/1.39	27.2 (C <sup>y</sup> ), 0.97 (H <sup>y</sup> ), 25.7/23.3 (C <sup>δ,δ2</sup> ), 0.79/0.79 (H <sup>δ,δ2</sup> )
R 129	127.0	8.72	173.5	53.0	4.38	30.0	0.67/0.29	25.6 (C <sup>y</sup> ), 1.36/1.13 (H <sup>y/y</sup> ), 42.3 (C <sup>δ</sup> ), 3.10/? (H <sup>δ,δ1</sup> )
V 130	122.3	8.43	175.7	61.5	4.33	33.0	1.89	21.0/21.0 (C <sup>y/y</sup> ), 0.88/0.88 (H <sup>y/y</sup> )
N 131	127.7	8.19	173.6	54.5	3.91	37.3	2.78/2.74	177.6 (CO <sup>y</sup> )
Q 132	117.4	8.86	173.4	52.4	5.02	30.5	?/?	? (C <sup>y</sup> ), ?/? (H <sup>y/y</sup> ), ? (CO <sup>δ</sup> )
P 133			175.0	64.5	4.16	32.3	2.33/1.85	28.1 (C <sup>y</sup> ), 2.25/1.99 (H <sup>y/y</sup> ), 51.0 (C <sup>δ</sup> ), 3.83/3.83 (H <sup>δ,δ1</sup> )
S 134	117.7	7.52	175.4	56.9	4.59	69.9	?/?	
I 135	109.3	4.23	175.8	63.1	3.55	36.6	0.84	24.6/16.2 (C <sup>y/y2</sup> ), 0.00/?/0.45 (H <sup>y/y/y2</sup> ), 12.2 (C <sup>δ</sup> ), 0.83 (H <sup>δ</sup> )

K 136	120.6	8.01	175.9	52.8	4.48	31.6	1.92/1.19	24.4 (C <sup>y</sup> ), 0.65/0.65 (H <sup>y,y</sup> ), 28.0 (C <sup>δ</sup> ), 1.41/1.30 (H <sup>δ,δ</sup> ), 42.4 (C <sup>ε</sup> ), 2.78/2.26 (H <sup>ε,ε</sup> )
G 137	108.9	7.13	174.7	43.9	4.28/3.77			
I 138	123.8	8.56	177.0	61.4	3.99	35.0	1.83	27.0/16.9 (C <sup>y,y<sup>2</sup></sup> ), 1.48/1.31/0.70 (H <sup>y,y<sup>2</sup></sup> ), 10.2 (C <sup>δ</sup> ), 0.59 (H <sup>δ</sup> )
A 139	132.4	9.19	175.2	51.8	4.84	23.1	1.29	
T 140	117.4	8.27	174.1	61.4	5.54	70.7	4.06	21.7 (C <sup>y</sup> ), 1.33 (H <sup>y</sup> )
F 141	123.9	8.83	172.8	55.4	5.11	40.2	3.18/3.08	
K 142	118.6	7.54	175.1	55.3	4.93	36.2	1.91/1.68	26.1 (C <sup>y</sup> ), 1.57/1.57 (H <sup>y,y</sup> ), 29.9 (C <sup>δ</sup> ), 1.57/? (H <sup>δ,δ</sup> ), 42.5 (C <sup>ε</sup> ), 3.05/3.05 (H <sup>ε,ε</sup> )
Q 143	115.5	8.49	175.8	53.0	5.86	32.2	2.45/1.47	34.5 (C <sup>y</sup> ), 2.39/1.99 (H <sup>y,y</sup> ), 181.4 (CO <sup>δ</sup> )
Y 144	123.1	7.73	174.0	51.8	5.19	37.8	1.83/1.20	
W 145	117.0	8.56	177.6	55.6	5.87	33.3	3.11/3.08	110.3 (C <sup>y</sup> ), 125.22 (C <sup>δ1</sup> ), 6.73 (H <sup>δ1</sup> ), 131.9 (N <sup>ε1</sup> ), 9.65 (H <sup>ε1</sup> ), 138.2 (C <sup>ε2</sup> )
S 146	119.7	9.48	175.3	58.2	5.95	67.2	3.98/3.98	
V 147	123.7	10.24	175.6	61.8	5.12	35.2	2.15	21.1/21.1 (C <sup>y,y</sup> ), 0.97/0.78 (H <sup>y,y</sup> )
R 148	104.4	9.18	177.5	58.7	3.60	30.7	2.20/2.07	31.9 (C <sup>y</sup> ), ?/? (H <sup>y,y</sup> ), 44.1 (C <sup>δ</sup> ), ?/? (H <sup>δ,δ</sup> )
R 149	120.8	8.51	176.5	58.7	4.22	30.7	1.95/1.95	29.7 (C <sup>y</sup> ), 1.76/7.63 (H <sup>y,y</sup> ), 43.8 (C <sup>δ</sup> ), 3.16/2.99 (H <sup>δ,δ</sup> )
S 150	111.7	7.65	173.2	56.5	4.87	65.2	/	
K 151			178.1	57.8	4.48	34.4	1.78/1.50	25.6 (C <sup>y</sup> ), 0.70/0.47 (H <sup>y,y</sup> ), 29.5 (C <sup>δ</sup> ), ?/? (H <sup>δ,δ</sup> ), 42.0 (C <sup>ε</sup> ), 2.54/2.54 (H <sup>ε,ε</sup> )
R 152	121.2	9.05	173.5	56.3	4.79	34.1	1.92/1.92	27.3 (C <sup>y</sup> ), ?/1.62 (H <sup>y,y</sup> ), 44.1 (C <sup>δ</sup> ), 3.72/3.01 (H <sup>δ,δ</sup> )
T 153	105.9	8.50	172.9	60.7	5.12	69.0	5.00	22.1 (C <sup>y</sup> ), 1.37 (H <sup>y</sup> )
S 154	112.1	7.17	172.4	57.6	3.99	64.8	3.85/3.69	
G 155	106.0	7.72	170.9	44.0	4.48/3.76			
T 156	117.9	8.48	174.4	61.5	5.50	71.5	4.01	21.8 (C <sup>y</sup> ), 1.14 (H <sup>y</sup> )
I 157	126.5	9.85	176.6	60.2	4.58	40.4	1.58	28.1/17.1 (C <sup>y,y<sup>2</sup></sup> ), 1.03/0.42/0.80 (H <sup>y,y<sup>2</sup></sup> ), 13.9 (C <sup>δ</sup> ), 0.58 (H <sup>δ</sup> )
S 158	131.5	11.22	175.1	57.0	4.46	59.4	4.09/3.95	
V 159	125.4	7.45	176.5	66.6	2.77	31.9	1.53	22.5/21.8 (C <sup>y,y</sup> ), 0.84/0.02 (H <sup>y,y</sup> )
S 160	111.2	7.50	174.3	64.2	3.93	62.1	3.55/3.55	
N 161	118.9	7.43	178.5	56.6	4.10	36.9	2.69/2.37	175.6 (CO <sup>y</sup> )
H 162	121.0	6.90	175.1	60.8	3.32	30.1	2.46/1.65	137.5 (C <sup>y</sup> ), ? (N <sup>δ1</sup> ), - (H <sup>δ1</sup> ), 116.0 (C <sup>δ2</sup> ), 6.42 (H <sup>δ2</sup> ), 136.8 (C <sup>ε1</sup> ), 5.48 (H <sup>ε1</sup> )
F 163	115.5	6.73	178.2	56.5	3.86	35.0	2.37/1.98	
R 164	115.3	7.81	178.8	59.2	4.26	30.9	1.80/1.80	28.6 (C <sup>y</sup> ), 1.93/? (H <sup>y,y</sup> ), 43.6 (C <sup>δ</sup> ), 3.36/3.20 (H <sup>δ,δ</sup> )
A 165	123.1	7.43	180.8	55.0	4.10	18.5	1.39	
W 166	120.5	8.58	180.0	57.8	4.69	27.2	3.57/3.16	112.4 (C <sup>y</sup> ), 122.84 (C <sup>δ1</sup> ), 6.64 (H <sup>δ1</sup> ), 125.6 (N <sup>ε1</sup> ), 9.67 (H <sup>ε1</sup> ), 139.7 (C <sup>ε2</sup> )
E 167	120.2	8.58	181.3	60.8	3.78	29.3	2.31/2.02	38.78 (C <sup>y</sup> ), 2.99/2.47 (H <sup>y,y</sup> ), 185.3 (CO <sup>δ</sup> )
N 168	119.8	8.32	176.5	55.7	4.60	38.7	2.94/2.94	176.4 (CO <sup>y</sup> )
L 169	119.5	7.58	177.1	54.6	4.48	42.6	2.05/1.64	26.8 (C <sup>y</sup> ), 1.89 (H <sup>y</sup> ), 26.8/22.9 (C <sup>δ,δ2</sup> ), 0.92/0.92 (H <sup>δ,δ2</sup> )
G 170	107.9	7.90	174.0	45.5	4.19/3.73			
M 171	123.6	7.80	172.6	54.2	4.08	30.7	1.48/0.35	28.6 (C <sup>y</sup> ), 2.12/1.61 (H <sup>y,y</sup> )
N 172	115.4	7.54	176.2	54.7	4.55	38.7	2.75/2.70	176.9 (CO <sup>y</sup> )
M 173	122.2	9.18	176.3	54.9	4.60	37.2	2.19/2.19	33.2 (C <sup>y</sup> ), 2.53/2.53 (H <sup>y,y</sup> )
G 174	106.4	7.25	173.4	43.9	4.52/3.72			
K 175	119.7	8.97	178.1	55.4	4.03	32.0	1.42/1.20	25.7 (C <sup>y</sup> ), ?/? (H <sup>y,y</sup> ), 28.5 (C <sup>δ</sup> ), 1.58/? (H <sup>δ,δ</sup> ), 42.3 (C <sup>ε</sup> ), 3.00/3.00 (H <sup>ε,ε</sup> )
M 176	118.1	9.10	177.1	55.7	4.30	30.4	1.47/1.47	31.3 (C <sup>y</sup> ), 2.33/2.06 (H <sup>y,y</sup> )
Y 177	120.9	8.67	175.2	58.9	4.95	41.2	2.97/2.67	
E 178	117.6	8.11	175.5	56.6	5.59	35.4	2.16/1.94	35.41 (C <sup>y</sup> ), 2.55/2.23 (H <sup>y,y</sup> ), ? (CO <sup>δ</sup> )
V 179	126.2	8.92	173.6	62.4	4.85	35.8	2.33	22.3/20.4 (C <sup>y,y</sup> ), 1.28/1.28 (H <sup>y,y</sup> )
A 180	127.6	9.44	176.8	53.1	4.89	22.4	1.35	
L 181	130.2	8.63	175.8	56.2	4.79	41.4	2.36/1.60	27.8 (C <sup>y</sup> ), ? (H <sup>y</sup> ), 25.8/22.8 (C <sup>δ,δ2</sup> ), 0.72/0.54 (H <sup>δ,δ2</sup> )
T 182	124.7	9.73	173.0	62.6	5.53	72.8	4.13	20.1 (C <sup>y</sup> ), 0.67 (H <sup>y</sup> )
V 183	124.6	9.05	174.3	60.9	4.98	34.9	1.99	21.4/21.4 (C <sup>y,y</sup> ), 0.94/0.72 (H <sup>y,y</sup> )

E 184	127.7	8.67	174.5	52.7	5.30	31.8	1.76/1.69	33.05 (C <sup>y</sup> ), 2.42/1.85 (H <sup>y:y'</sup> ), 178.22 (CO <sup>δ</sup> )
G 185	110.2	8.60	171.7	43.4	4.53/2.53			
Y 186	123.7	7.88	174.3	56.3	5.47	41.0	2.75/2.75	
Q 187	123.1	9.33	176.6	56.3	4.53	25.8	2.06/1.91	34.2 (C <sup>y</sup> ), 2.20/1.79 (H <sup>y:y'</sup> ), 181.0 (CO <sup>δ</sup> )
S 188	108.4	7.12	172.4	56.9	5.22	67.5	4.43/4.32	
S 189	111.4	7.76	171.4	56.5	4.73	66.8	4.12/3.57	
G 190	107.0	7.73	169.9	45.0	3.42/3.09			
S 191	110.9	6.87	172.7	57.1	4.96	66.4	3.79/3.79	
A 192	121.1	9.37	175.2	51.7	5.39	23.5	1.70	
N 193	120.8	9.17	174.6	52.9	5.04	40.1	3.14/2.97	176.2 (CO <sup>y</sup> )
V 194	128.8	8.95	173.9	62.4	4.03	29.8	1.45	22.4/19.7 (C <sup>y:y'</sup> ), 0.70/0.19 (H <sup>y:y'</sup> )
Y 195	123.5	7.11	175.6	56.8	4.60	37.7	3.38/2.65	
S 196	119.2	7.65	173.5	57.2	4.50	63.7	3.81/3.29	
N 197	125.9	8.85	173.3	54.6	5.02	38.8	2.88/2.02	175.4 (CO <sup>y</sup> )
T 198	122.6	9.26	173.5	61.6	5.08	71.3	4.08	21.5 (C <sup>y</sup> ), 1.33 (H <sup>y</sup> )
L 199	132.1	8.80	174.1	54.4	5.06	42.9	1.93/1.87	27.9 (C <sup>y</sup> ), 1.52 (H <sup>y</sup> ), 27.5/23.3 (C <sup>δ,δ2</sup> ), 0.95/0.95 (H <sup>δ,δ2</sup> )
R 200	124.8	9.23	175.5	54.6	4.93	33.4	1.68/1.13	29.3 (C <sup>y</sup> ), ?/1.01 (H <sup>y:y'</sup> ), 43.4 (C <sup>δ</sup> ), 3.12/2.97 (H <sup>δ,δ'</sup> )
I 201	121.0	8.16	177.4	60.5	4.70	39.3	1.82	27.9/18.4 (C <sup>y:y'2</sup> ), 1.57/?/0.95 (H <sup>y:y':y'2</sup> ), 13.2 (C <sup>δ</sup> ), 0.82 (H <sup>δ</sup> )
N 202	127.5	10.19	175.3	54.6	4.57	37.3	3.17/3.12	178.3 (CO <sup>y</sup> )
G 203	102.2	8.88	173.6	45.3	4.32/3.55			
N 204	120.7	7.85	173.4	50.4	5.41	39.6	2.93/2.85	176.3 (CO <sup>y</sup> )
P 205			176.9	62.5	4.96	32.5	2.19/2.19	27.3 (C <sup>y</sup> ), ?/1.97 (H <sup>y:y'</sup> ), 51.4 (C <sup>δ</sup> ), 4.12/3.95 (H <sup>δ,δ'</sup> )
L 206	122.8	8.11	176.8	56.8	4.15	42.2	1.44/1.32	26.8 (C <sup>y</sup> ), ? (H <sup>y</sup> ), 26.8/24.5 (C <sup>δ,δ2</sup> ), 0.61/0.39 (H <sup>δ,δ2</sup> )
S 207	121.5	7.83	177.7	59.7	4.34	65.5	?/?	

## 8. Abkürzungen und Symbole

### 8.1. Abkürzungen

<i>A.</i>	<i>Aspergillus</i>
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Amp <sup>R</sup>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
Betain Hydrochlorid	(Carboxymethyl)-trimethylammonium-chlorid
Bis-tris-propane	1,3-[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan-sulfonat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propan-sulfonat
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
g	Erdbeschleunigung
G150-Puffer	10mM Tris/HCl, 2mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7.5
GF	Gelfiltration
Gl.	Gleichung
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
H <sub>2</sub> O <sub>milli</sub>	über Millipore Filtrationsanlage gereinigtes Wasser
HAc	Essigsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.d.R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid
IUMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MCS	Multiple Cloning Site
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure

MW	Molekulargewicht
MWCO	Molecular weight cut off
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement, Abstands-Beziehung
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NTA	Nitrilotriessigsäure
ori	Origin of replication
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pefabloc <sup>®</sup> SC	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
pelB	Pektatlyase B
ppm	parts per million
RMSD	<i>root mean square deviation</i> – mittlere Standardabweichung
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	Sogenannt
<i>T.</i>	<i>Thermomyces</i>
Tab.	Tabelle
TB	Terrific-Broth
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-methylamin
TROSY	Transverse relaxation optimized spectroscopy
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

## 8.2. Symbole

$E_x$	Extinktion bei x nm
$\epsilon_x$	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
$\lambda_x$	gemessene Wellenlänge
$OD_x$	Optische Dichte bei x nm
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
Ø	Durchmesser

# Curriculum vitae

## Zur Person

---

Marco Betz  
geboren am 15. Dezember 1969 in München

## Schulbildung

---

1976 - 1980      Grundschule Krailling  
1980 - 1987      Gymnasium Planegg  
1987 - 1989      Gymnasium Gauting  
Mai 1989        Abitur; Leistungskurse: Mathematik und Biologie

## Studium

---

1990 - 1993      Grundstudium Chemie, Universität Bayreuth  
September 1993    Diplomvorprüfung in Chemie  
1993 - 1995      Hauptstudium Chemie  
1995 / 1996      Zusätzlich: Zwei Semester Geochemie und  
                         Ökotoxikologie  
Mai / Juni 1997    Diplomhauptprüfung in Chemie  
                         freiwilliges Nebenfach: Umweltchemie und  
                         Ökotoxikologie  
Juli 1997 - März  
1998              Diplomarbeit im Fachbereich Biochemie  
                         Prof. Dr. M. Sprinzl:  
                         *Präparation [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]markierter Nukleosid-5'-  
                         triphosphate*

## Promotionsstudium

---

Juni 1998 - April  
2003              Promotion im Arbeitskreis für Biophysikalische Chemie  
                         Prof. Dr. H. Rüterjans:  
                         *NMR-spektroskopische Untersuchungen an der Xylanase aus  
                         Bacillus agaradhaerens*

## Akademische Lehrer

---

Prof. Dr. Helmut Alt, Prof. Dr. Hans Braun, Prof. Dr. Hartmut Frank, Prof. Dr. Josef Friedrich, Prof. Dr. Hans Gerlach, Prof. Dr. Max Herberhold, Prof. Dr. Heinz Hoffmann, Prof. Dr. J. Kalus, Prof. Dr. Manfred Krämer, PD Dr. Roland Kreutzer, PD Dr. Stefan Limmer, Prof. Dr. Peter Morys, Prof. Dr. Wolfgang Müller, Prof. Dr. Gerhard Platz, Prof. Dr. Paul Rösch, Prof. Dr. Heinz Rüterjans, Prof. Dr. Franz Schmid, Prof. Dr. Hans-Werner Schmidt, Prof. Dr. Wolfgang Schnick, Prof. Dr. Karlheinz Seifert, Prof. Dr. Gerhard Spitzler, Prof. Dr. Mathias Sprinzl, Prof. Dr. Karin Weiss, Prof. Dr. Bernd Wrackmeyer, Prof. Dr. Wolfgang Zech.