

**Klonierung, Reinigung, Kristallisation und Strukturlösung
der 5-Aminolävulinsäuresynthase
und Untersuchung der Auswirkung und Behandelbarkeit
von XLSA-Mutationen**

**Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n**

von Isabel Astner
aus Erlangen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	4
1. Einleitung.....	7
1.1 Tetrapyrrole und ihre Biosynthese.....	7
1.1.1 Tetrapyrrole.....	7
1.1.2 Biosynthese der ALA.....	8
1.1.3 Biosynthese der Tetrapyrrole ausgehend von ALA.....	11
1.2 Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese.....	12
1.3 Eisenstoffwechsel und Tetrapyrrolbiosynthese.....	13
1.4 Häm und Bakterienpathogenität.....	14
1.5 Pyridoxal-5'-phosphat-abhängige Enzyme und Klassifikation.....	15
1.6 Porphyrin.....	17
1.7 X-chromosomal gebundene sideroblastische Anämie (XLSA).....	17
1.8 Strukturvorhersagen der ALAS.....	18
1.9 Ziel der Arbeit.....	19
2. Materialien und Methoden.....	20
2.1 Geräte.....	20
2.2 Chemikalien, Kits und Enzyme.....	21
2.2.1 Chemikalien.....	21
2.2.2 Kits.....	21
2.2.3 Enzyme.....	21
2.3 Lösungen und Medien.....	22
2.3.1 Lösungen.....	22
2.3.2 Medien.....	23
2.4 Bakterienstämme.....	24
2.5 Standards.....	24
2.6 Kristallisationsscreens.....	25
2.7 Antikörper.....	25
2.7.1 Primäre Antikörper.....	25
2.7.2 Sekundäre Antikörper.....	25
2.8 Primer und Vektoren.....	26
2.8.1 Oligodesoxyribonucleotide (Primer).....	26
2.8.2 Expressionsvektoren.....	27
2.9 Molekularbiologische Methoden.....	27
2.9.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
2.9.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	29
2.9.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	29
2.9.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen.....	30
2.9.5 Reinigung des Restriktionsverdau.....	30
2.9.6 Dephosphorylierung des Vektors.....	30
2.9.7 Ligation.....	30
2.9.8 Transformation CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
2.9.9 Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
2.9.10 Plasmidisolierung.....	31
2.9.11 Ortsgerichtete Mutagenese.....	31
2.9.12 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	33
2.9.13 DNA-Sequenzierung.....	34

2.9.14	Stammkulturen	34
2.10	Biochemische Methoden	34
2.10.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.10.2	Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie Blue™	35
2.10.3	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	36
2.10.4	Silberfärbung von IEF-Gelen	36
2.10.5	Semi-dry Western-Blotting	36
2.10.6	Immunfärbung	37
2.10.7	N-terminale Sequenzierung	37
2.10.8	Limitierte Proteolyse	37
2.10.9	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	38
2.10.10	Konzentrieren von Proteinlösungen	38
2.10.11	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	39
2.10.12	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	40
2.10.13	Gekoppelter Aktivitätstest	41
2.10.14	Messung des Absorptionsspektrums der ALAS	41
2.11	Proteinbiochemische Methoden	42
2.11.1	Expressionstest	42
2.11.2	Proteinproduktion im präparativen Maßstab	42
2.11.3	Zellernte und Zellaufschluss	43
2.11.4	Affinitätschromatographie	43
2.11.5	Ionenaustauschchromatographie (IEC)	44
2.11.6	Gelpermeationschromatographie (GPC)	45
2.11.7	Dialyse von Proteinlösungen	46
2.12	Proteinkristallisation	46
2.12.1	Kristallisationsmethoden	47
2.12.2	Screening nach Kristallisationsbedingungen	49
2.12.3	Kristallbeurteilung	49
2.12.4	Optimierung der Kristallisationsbedingungen	50
2.13	Röntgenstrukturanalyse	51
2.13.1	Kristallmontage	51
2.13.2	Datensammlung	51
2.13.3	Mess-Strategie	51
2.13.4	Molekularer Ersatz	52
2.13.5	Modellbau und Verfeinerung	53
2.13.6	Modellierung der ALAS2	55
2.13.7	Molekülbilder	55
3.	Ergebnisse	56
3.1	Klonierung der für die ALAS kodierenden Gene	56
3.1.1	ALAS aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (ALAS _{Rs})	57
3.1.2	ALAS aus <i>Rhodobacter capsulatus</i> (ALAS _{Rc})	57
3.1.3	Die humane trunkierte erythroide ALAS (hALAS _{ΔNC})	57
3.2	Test verschiedener Expressionsbedingungen	57
3.2.1	ALAS aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (ALAS _{Rs})	58
3.2.2	ALAS aus <i>Rhodobacter capsulatus</i> (ALAS _{Rc})	58
3.2.3	Die humane trunkierte erythroide ALAS (hALAS _{ΔNC})	59
3.3	Präparative Produktion der Zielproteine	60
3.3.1	Affinitätschromatographie für GST-Fusionsproteine	61
3.3.2	Affinitätschromatographie für His ₆ -Fusionsproteine	62
3.3.3	Ionenaustauschchromatographie (IEC)	62
3.3.4	Gelpermeationschromatographie (GPC)	64

3.4	Biochemische Charakterisierung der ALAS	67
3.4.1	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	67
3.4.2	Massenspektrometrie	67
3.4.3	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	69
3.4.4	Aktivitätstest	70
3.4.5	Stabilitätsuntersuchungen der ALAS _{R_s} und ALAS _{R_c}	72
3.5	Kristallisation von ALAS _{R_s} und ALAS _{R_c}	79
3.5.1	Kristallisation von ALAS _{R_s}	79
3.5.1	Kristallisation von ALAS _{R_c}	80
3.6	Röntgenkristallographische Untersuchungen	81
3.6.1	Datensammlung	81
3.6.2	Strukturlösung und Verfeinerung	82
3.7	Die Struktur der ALAS aus <i>Rhodobacter capsulatus</i>	85
3.8	Strukturmodell der humanen ALAS2	93
4.	Diskussion	95
4.1	Die Struktur der ALAS aus <i>Rhodobacter capsulatus</i>	95
4.1.1	Vergleich der Monomer	95
4.1.2	Dimer, aktives Zentrum und Zugangskanäle	99
4.1.3	Substratbindung	102
4.2	Strukturmodell der humanen ALAS2	104
4.2.1	XLSA-Mutationen	107
4.2.2	Einteilung und Beschreibung der XLSA-Mutationen	109
4.2.3	Strukturvergleich zwischen Enzymen der CoA-Familie	122
4.2.4	ALAS und mikrobielle Pathogenität	126
5.	Zusammenfassung und Ausblick	128
6.	Literaturverzeichnis	131