

**Untersuchungen zur Struktur, Funktion und Dynamik der
Anthranoilat-Phosphoribosyltransferase
aus *Sulfolobus solfataricus***

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Miriam Deuß aus Neuß
April 2006

Promotionsgesuch eingereicht am: 19. April 2006
Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. R. Sterner
Kolloquium am: 30. Mai 2006
Prüfungsausschuss:
Prof. Dr. G. Hauska
Prof. Dr. R. Sterner
Prof. Dr. E. Brunner
Prof. Dr. R. Wirth

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2002 bis Dezember 2004 am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln und von Januar 2005 bis April 2006 am Lehrstuhl Biochemie II des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg unter Leitung von Prof. Dr. Reinhard Sternen durchgeführt.

1.	Zusammenfassung	1
1.1	Einleitung	4
1.2	Leben nahe am Siedepunkt des Wasser	4
1.3	Die Tryptophanbiosynthese	6
1.4	Die Reaktion der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase	7
1.5	Strukturelle Klassen von Phosphoribosyltransferasen	8
1.6	Die Struktur der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	10
1.7	Zusammenhang zwischen Thermostabilität, konformationeller Flexibilität und katalytischer Aktivität	11
1.7	Zielsetzung der Arbeit	13
2.	Material	14
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.2	Bakterienstämme	17
2.3	Vektoren	17
2.3.1	pQE Vektoren	17
2.3.2	pREP4 (pDMI,1)	18
2.3.3	pET28a(+)	19
2.3.4	pUC19	20
2.4	Oligodesoxyribonukleotide	21
2.4.1	Sequenzierungsprimer für pQE Vektoren	21
2.4.2	Sequenzierungsprimer für pET-Vektoren	22
2.4.3	Sequenzierungsprimer für pUC-Vektoren	22
2.4.4	Klonierungsprimer für pQE40 Vektoren	22
2.4.5	Klonierungsprimer für pQE70 Vektoren	23
2.4.6	Klonierungsprimer für pUC19 Vektoren	23
2.4.7	Klonierungsprimer für pET28a(+) Vektoren	23
2.4.8	Mutationsprimer für sstrpD	24
2.4.9	Mutationsprimer für aatrpD-1	25
2.5	DNA-Längenstandard	25
2.6	Proteinlängenstandard	26
2.7	Enzyme	26
2.7.1	Restriktionsendokukleasen	26
2.7.2	DNA-Polymerasen	26
2.7.3	DNA-Ligasen	27
2.8	Chemikalien	27
2.9	Kits	27
2.10	Puffer und Lösungen	28
2.11	Nährmedien	33
2.12	Software	33
3.	Methoden	35
3.1	Mikrobiologische Methoden	35
3.1.1	Sterilisation von Geräten, Nährmedien und Lösungen	35
3.1.2	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> -Stämmen	35
3.1.3	Abtöten von <i>E. coli</i> -Stämmen	35
3.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> -Stämmen	36
3.1.4.1	Präparation hochkompetenter Zellen zur Elektrotransformation	36

Inhaltsverzeichnis	II
3.1.4.2 Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach Dower <i>et al.</i> (1988)	36
3.1.4.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	36
3.1.4.4 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach Inoue <i>et al.</i> (1990)	37
3.1.4.5 Bestimmung der Transformationseffizienz (T_E)	37
3.2 Molekularbiologische Methoden	38
3.2.1 Bestimmung der DNA-Konzentration	38
3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
3.2.3 <i>Insert-screening</i>	40
3.2.4 SOE-(<i>splicing by overlap extension</i>) PCR	40
3.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA zu präparativen Zwecken (Midi-Präparation AX100)	41
3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	42
3.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	42
3.2.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	42
3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten	43
3.2.10 DNA-Sequenzierung	43
3.3 Proteinchemische Methoden	44
3.3.1 Genexpression und Proteinanreicherung im analytischen Maßstab	44
3.3.2 Genexpression und Proteinanreicherung im präparativen Maßstab	45
3.3.3 Hitzeschritt	45
3.3.4 Affinitätschromatographie	46
3.3.4.1 Nickel-Chelat-Chromatographie	46
3.3.4.2 Strep-Tactin-Chromatographie	47
3.3.5 Abspaltung des N-terminalen His ₍₆₎ -Tags durch Trypsin	48
3.3.6 Präparative Gelfiltration	48
3.3.7 Dialyse von Proteinlösungen	49
3.3.8 Einkonzentrieren von Proteinlösungen	49
3.3.9 Lagerung von Proteinlösungen	49
3.4 Analytische Methoden	50
3.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
3.4.2 Färbung der SDS-Gele	50
3.4.2.1 mit Coomassie Brilliant Blue G250	50
3.4.2.2 durch Silberfärbung nach Nekeskovken (1988)	51
3.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	51
3.4.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch den Bradford-Test (1976)	51
3.4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Absorptionspektroskopie	52
3.4.4 Analytische Gelfiltration	54
3.4.5 Western-Blot	55
3.4.5.1 Immunologischer Nachweis des N-terminalen His ₍₆₎ -Tags	55
3.4.5.2 Immunologischer Nachweis des N-terminalen Strep-Tags	56
3.5 Biophysikalische Methoden zur Proteincharakterisierung	57
3.5.1 Circular-Dichroismus-Spektroskopie	57
3.5.2 Röntgenstrukturanalyse	58
3.5.3 Röntgenkleinwinkelstreuung (<i>small angle X-ray scattering</i>)	58

3.5.4	Einzmolekülspektroskopie	59
3.5.4.1	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)	60
3.5.4.2	Proteinmarkierung mit Alexa-488 und Alexa-594	63
3.5.5	<i>Steady-state</i> Enzymkinetik	63
3.5.6	Differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC)	65
3.5.7	Thermische Inaktivierung	66
3.5.8	Ermittlung der Bindungskonstante (K_d -Wert) von Anthranilsäure und Tryptophan an das ssTrpD-Wildtypenzym	67
3.5.8.1	Bindung von Anthranilsäure	68
3.5.8.2	Bindung von L-Tryptophan	68
3.5.8.3	Bindung von Anthranilsäure in Anwesenheit von L-Tryptophan	68
3.5.9	Bestimmung der Substratkonzentrationen	68
3.5.9.1	Bestimmung der Anthranilsäurekonzentration	68
3.5.9.2	Bestimmung der PRPP-Konzentration	69
4.	Ergebnisse und Diskussion	70
4.1	Strukturelle Charakterisierung von ssTrpD-wt	70
4.2	Bindetaschen für das Substrat Anthranilsäure	71
4.2.1	Charakterisierung der Anthranilatbindetasche	73
4.2.1.1	Untersuchung der Bindetaschen für Anthranilat mittels gerichteter Mutagenese	73
4.2.1.1.1	Klonierung, Expression und Reinigung der ssTrpD Varianten	73
4.2.1.1.2	<i>Steady-state</i> enzymkinetische Messungen	75
4.2.1.1.3	Analyse der Bindung von Anthranilsäure und/oder Tryptophan mittels Titration	77
4.2.1.1.3.1	Bindung von Anthranilsäure	77
4.2.1.1.3.2	Bindung von Tryptophan	79
4.2.1.1.3.3	Bindung von Anthranilsäure in Anwesenheit von Tryptophan	80
4.3	Bindetasche für das Substrat PRPP und Mg^{2+} Ionen	81
4.3.1	Untersuchung der Bindetasche für PRPP mittels gerichteter Mutagenese	84
4.3.1.1	Klonierung, Expression und Reinigung der ssTrpD Varianten	84
4.3.1.2	<i>Steady-state</i> enzymkinetische Messungen	86
4.4	Beeinflussung der Ergebnisse durch mit dem Enzym aufgereinigtes Mg^{2+}	88
4.5	Untersuchung der $MgCl_2$ Inhibition	89
4.6	Vergleich von TrpD Proteinen aus <i>Sulfolobus solfataricus</i> und anderen Hyperthermophilen	90
4.6.1	TrpD aus <i>Thermotoga maritima</i>	90
4.6.1.1	Klonierung und heterologe Expression von tmtrpD und Reinigung von tmTrpD	90
4.6.1.2	Analytische Gelfiltration	92
4.6.1.3	CD-Spektroskopische Untersuchungen der Sekundärstruktur von tmTrpD	93
4.6.2	TrpD aus <i>Aquifex aeolicus</i>	94
4.6.2.1	Klonierung und heterologe Expression von aatrpD1, und Reinigung von aaTrpD1	94
4.6.3	<i>Steady-state</i> enzymkinetische Charakterisierung von tmTrpD und aaTrpD1	95

4.7	Untersuchung der Scharnierbewegung in ssTrpD-wt	97
4.7.1	Röntgenkleinwinkelstreuung (<i>small-angle X-ray scattering</i>)	97
4.7.2	Einzelmolekülspektroskopie	102
4.7.2.1	Klonierung des Konstruktes pQE40-sstrpD-N162C+K280C zur Herstellung des Homodimers	102
4.7.2.2	Heterologe Expression und Reinigung von ssTrpD-N162C+K280C (Homodimer)	103
4.7.2.3	Einbringung von Fluoreszenzfarbstoffen in ssTrpD-N162C+K280C und Vermessung des markierten Homodimers	104
4.7.2.3.1	Fluoreszenzmarkierung von ssTrpD-N162C+K280C	104
4.7.2.3.2	Multiparameter Fluoreszenz Detektion (MFD) Messungen mit markiertem ssTrpD-N162C+K280C	106
4.7.2.4	Klonierung des Konstruktes pQE40-sstrpD-N162C+K280C/ssTrpD-wt zur Herstellung des Heterodimers	112
4.7.2.5	Fluoreszenzmarkierung des Heterodimers ssTrpD-N162C+K280C/ssTrpD-wt	117
4.8	Aktivierung einer ssTrpD Variante bei niedriger Temperatur	118
4.8.1	Heterologe Expression und Reinigung von ssTrpD-D83G+F149S, ssTrpD-D83G und ssTrpD-F149S	118
4.8.2	<i>Steady-state</i> enzymkinetische Messungen	119
4.8.3	Temperaturabhängigkeit der erhöhten Aktivität von ssTrpD-D83G+F149S	122
4.8.4	Untersuchungen der thermischen Stabilität von ssTrpD-D83G+F149S, ssTrpD-D83G und ssTrpD-F149S im Vergleich zu ssTrpD-wt	123
4.8.4.1	Differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC)	124
4.8.4.2	Irreversible thermische Inaktivierung	125
4.8.5	Untersuchung zum Reaktionsmechanismus von ssTrpD	127
4.8.6	Bestimmung der Produktinhibitionskonstante für PRA (K_p^{PRA})	129
5.	Abschließende Diskussion	131
5.1	Die Funktion der beiden Bindestellen für Anthranilsäure in ssTrpD	131
5.2	Inhibition von ssTrpD durch hohe Konzentrationen an $MgCl_2$	132
5.3	Überlegungen zum Reaktionsmechanismus von ssTrpD	133
5.3.1	Domänenbewegung zur Annäherung der Substrate	133
5.3.2	Geschwindigkeitsbestimmender Schritt	135
6.	Literatur	136
7.	Abkürzungsverzeichnis	145
8.	Anhang	148
9.	Danksagung	151

Abbildung	1	Einordnung von hyperthermophilen Mikroorganismen in den phylogenetischen Stammbaum	5
Abbildung	2	Reaktion der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (TrpD)	7
Abbildung	3	Struktur des ssTrpD Monomers (A) und des Homodimers (B) (nach Mayans <i>et al.</i> , 2002)	10
Abbildung	4	Schematische Darstellung der Expressionsvektoren pQE40 (A) und pQE70 (B)	18
Abbildung	5	Schematische Darstellung des Repressorplasmids pREP-4 (pDM)	19
Abbildung	6	Schematische Darstellung des Expressionsvektors pET28a(+)	20
Abbildung	7	Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pUC19	21
Abbildung	8	SOE (<i>Overlap-Extension</i>) PCR	41
Abbildung	9	Konfokales Mikroskop mit Vier-Kanal-Detektionseinheit (Kühnemuth und Seidel, 2001)	60
Abbildung	10	Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren der Farbstoffe Alexa-488 und Alexa 594	61
Abbildung	11	Schematische Darstellung von FRET anhand des Farbstoffpaars Alexa-488 (Donor) und Alexa-594 (Akzeptor)	62
Abbildung	12	Schema des Enzymassays für die Aktivitätsmessung der TrpD-Varianten	64
Abbildung	13	Mechanismus der irreversiblen thermischen Inaktivierung von Proteinen (Modifiziert nach Tomazic und Klibanov, 1988).	66
Abbildung	14	Struktur einer Untereinheit des Homodimers von ssTrpD-wt mit gebundenen Substraten.	71
Abbildung	15	Koordination von AA-I und AA-II durch ssTrpD-wt.	72
Abbildung	16	Anreicherung von ssTrpD-G177F, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).	74
Abbildung	17	Bindung von Anthranilsäure an ssTrpD-wt.	78
Abbildung	18	Bindung von Tryptophan an ssTrpD-wt.	79
Abbildung	19	Bindung von Anthranilsäure an ssTrpD-wt in Anwesenheit von Tryptophan.	80
Abbildung	20	Koordination von PRPP und Mg ²⁺ durch ssTrpD-wt.	82
Abbildung	21	Superpositionierung von an PRTasen gebundenen PRPP Molekülen und Mg ²⁺ Ionen.	83
Abbildung	22	Anreicherung von ssTrpD-S91A, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).	85
Abbildung	23	Bestimmung der optimalen Mg ²⁺ Konzentrationen für ssTrpD-wt (A) bei 37°C und ssTrpD D223N+E224Q (B) bei 60°C.	86
Abbildung	24	Umsatzkurven von ssTrpD-wt und ssTrpD-D223N+E224Q ohne externe Zugabe von Mg ²⁺ .	88
Abbildung	25	PRPP-Sättigungskurven von ssTrpD-wt in Gegenwart sättigender Konzentrationen an Anthranilsäure (>10 x K _M) durchgeführt.	89
Abbildung	26	Anreicherung von tmTrpD, dokumentiert über SDS-	91

	PAGE (12,5% Acrylamid).	
Abbildung	27 Elutionsprofil der analytischen Gelfiltration von tmTrpD.	92
Abbildung	28 Fern-UV Spektrum von tmTrpD.	93
Abbildung	29 Anreicherung von aaTrpD1, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).	95
Abbildung	30 Streukurven (A) und Abstandsverteilungsfunktionen (B) von ssTrpD-wt.	98
Abbildung	31 Superpositionierung der fünf besten Modelle für die offene-offene (A) und die offene-geschlossene (B) Konformation des homodimeren ssTrpD.	101
Abbildung	32 Anreicherung von ssTrpD-N162C+K280C, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid)	103
Abbildung	33 Absorptionsspektren der Farbstoffe Alexa-488 und Alexa-594 im Vergleich mit markiertem ssTrpD-N162C+K280C.	104
Abbildung	34 Fluoreszenzemissionsspektrum des markierten ssTrpD-N162C+K280C nach Anregung des Donors Alexa-488 bei 488 nm.	105
Abbildung	35 Strukturmodell von ssTrpD für die offene-offene (A) und die offene-geschlossene (B) Konformation des homodimeren Proteins (abgeleitet aus SAXS-Messungen, vgl. Abb. 30).	106
Abbildung	36 Schematische Darstellung der Kombinationsmöglichkeiten der Fluoreszenzfarbstoffe Alexa-488 und Alexa-594 im ssTrpD-N162C+K280C Homodimer.	107
Abbildung	37 2-D Histogramme der MFD Messungen mit markiertem ssTrpD-N162C+K280C in Puffer (A) und Puffer mit 2 mM PRPP (B).	108
Abbildung	38 Kombinierte 2-D Histogramme der MFD Messungen von markiertem ssTrpD-N162C+K280C unter 4 verschiedenen Pufferbedingungen.	110
Abbildung	39 Häufigkeitsverteilung der S_G/S_R Verhältnisse von ssTrpD-N162C+K280C bei 4 verschiedenen Pufferbedingungen (entspricht den Umhüllenden der orangen Diagramme in Abbildung 37A-D).	111
Abbildung	40 Schema für die Anreicherung des Heterodimers ssTrpD-N162C+K280C/ssTrpD-wt aus einer Proteinlösung, welche auch die beiden Homodimeren enthält.	114
Abbildung	41 Analyse der Elution von rekombinatem ssTrpD-N162C+K280C/ssTrpD-wt (und ssTrpD-N162C+K280C) bei der Metallchelat-Affinitätschromatographie, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).	115
Abbildung	42 Analyse der Elution von rekombinantem ssTrpD-N162C+K280C/ssTrpD-wt bei der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).	116
Abbildung	43 Westernblot zum Nachweis des Strep-Tag an	116

	ssTrpD-wt (links) und His ₍₆₎ -Tag an ssTrpD-N162C+K280C (rechts).	
Abbildung	44 Die letzten Anreicherungsschritte bei der Aufreinigung von ssTrpD-D83G+F149S, ssTrpD-D83G und ssTrpD-F149S, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).	119
Abbildung	45 Arrheniusdiagramme der Wechselzahlen für ssTrpD-wt und ssTrpD-D83G+F149S.	123
Abbildung	46 DSC Messungen für das ssTrpD wt Protein (A) und die Varianten ssTrpD-D83G+F149S (B), ssTrpD-D83G (C) und ssTrpD-F149S (D).	124
Abbildung	47 Irreversible thermische Inaktivierung von ssTrpD-wt und der aktivierte Varianten.	126
Abbildung	48 AA-Sättigungskurven in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an PRPP (doppelt reziproke Auftragung) von ssTrpD-wt .	128

Tabelle	1	Molekulargewichte, spezifische und molare Extinktionskoeffizienten der untersuchten wildtypischen TrpD Proteine und der ssTrpD Varianten.	53
Tabelle	2	Übersicht über die Ausbeuten und Konzentrationen der gereinigten ssTrpD-Varianten mit Aminosäureaustauschen an den Anthranilatbindetaschen.	75
Tabelle	3	<i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter für ssTrpD Varianten mit Aminosäureaustauschen an den Anthranilat Bindetaschen.	76
Tabelle	4	Übersicht über die Ausbeuten und Konzentrationen der gereinigten ssTrpD Varianten mit Aminosäureaustauschen an der PRPP Bindetasche.	86
Tabelle	5	<i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter für ssTrpD Varianten mit Aminosäureaustauschen an der PRPP Bindetasche.	87
Tabelle	6	<i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter für TrpD Varianten aus verschiedenen hyperthermophilen Organismen.	96
Tabelle	7	Experimentell ermittelte und aus Strukturmodellen berechnete Streuparameter von ssTrpD-wt mit und ohne Substrate.	99
Tabelle	8	Optimale Mg ²⁺ Konzentration für die katalytische Aktivität von ssTrpD-wt, ssTrpD-D83G+F149S, ssTrpD-D83G und ssTrpD-F149S.	120
Tabelle	9	Steady-state enzymkinetische Parameter von ssTrpD-wt, ssTrpD-D83G+F149S, ssTrpD-D83G und ssTrpD-F149S bei 37°C.	121
Tabelle	10	T _m _(app) Werte für ssTrpD-wt und die aktivierte Varianten.	125
Tabelle	11	t _{1/2} -Werte für ssTrpD-wt und die aktivierte Varianten.	126
Tabelle	12	Inhibitionskonstanten für das Produkt PRA (K_p^{PRA}) von ssTrpD-wt und ssTrpD-D83G+F149S.	129

Gleichung	1	Bestimmung der Transformationseffizienz (T_E)	37
Gleichung	2	Bestimmung der DNA-Konzentration	38
Gleichung	3	Berechnung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids	39
Gleichung	4	Berechnung der <i>Annealing</i> -Temperatur in einer PCR-Reaktion	39
Gleichung	5	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford, Geradengleichung	52
Gleichung	6	Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten nach Pace <i>et al.</i> (1995)	52
Gleichung	7	Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten nach Pace <i>et al.</i> (1995)	52
Gleichung	8	Berechnung der Proteinkonzentration nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz	53
Gleichung	9	Berechnung der durchschnittlichen Elliptizität pro Amino-säure	57
Gleichung	10	Berechnung der Halbwertszeit $t_{1/2}$	66
Gleichung	11	Berechnung des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor $R_{(DA)}$	112

Zusammenfassung

Zusammenfassung

Die Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (TrpD) katalysiert innerhalb der Biosynthese des Tryptophan die Mg^{2+} -abhängige Übertragung der Ribose-5-Phosphateinheit aus 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) auf Anthranilat, wodurch Phosphoribosylanthranilat (PRA) und Pyrophosphat (PP_i) entstehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Struktur, der katalytischen Aktivität und der Dynamik von TrpD am Beispiel des homodimeren Enzyms aus dem hyperthermophilen Archaeon *Sulfolobus solfataricus* (ssTrpD) untersucht.

Zunächst wurde in Kooperation mit Prof. Olga Mayans (Biozentrum der Universität Basel) die Röntgenstruktur des wildtypischen ssTrpD in Anwesenheit der beiden Substrate Anthranilsäure und PRPP gelöst. Es zeigte sich, dass pro Untereinheit im Grenzbereich der kleinen α helikalen und der großen α/β Domäne zwei Moleküle Anthranilsäure und ein Molekül PRPP binden. Zusätzlich zu dem ausschliesslich durch die Pyrophosphat- und die Riboseeinheiten von PRPP komplexierten „Standard“- Mg^{2+} -Ion (MG-1) fand sich in der Nähe der 5'-Phosphateinheit von PRPP ein zweites Mg^{2+} -Ion (MG-2), das hauptsächlich von konservierten sauren Seitenketten (Asp223, Glu224) des Proteins gebunden wird. Im Gegensatz zur bekannten apo-Struktur von ssTrpD ist im holo-Enzym die konservierte, Glycin-reiche Schleife $_{79}GTGGD_{83}$ in der Nähe der PRPP Bindetasche strukturiert.

Um die Bedeutung einzelner Aminosäuren der beiden Anthranilatbindetaschen I und II und der PRPP Bindetasche für die Substratbindung und die Katalyse zu überprüfen, wurde eine Reihe von Resten mittels gezielter Mutagenese ersetzt, in der Regel durch Alanin, im Fall von Asp223 und Glu224 durch die entsprechenden Amide. Die resultierenden ssTrpD Varianten wurden durch heterologe Genexpression in *Escherichia coli* hergestellt, gereinigt und durch *steady-state* enzymkinetische Messungen charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass keine der Substitutionen zu einer merklichen Verringerung der Wechselzahl (k_{cat}) führte und damit keiner der ausgetauschten Reste für die Reaktion essentiell ist. Dagegen hatten eine Reihe von Substitutionen an den beiden Anthranilatbindetaschen und, unerwarteter Weise, auch ein Teil der Substitutionen an der PRPP- Mg^{2+} Bindetasche einen Anstieg der Michaelis-Konstante für die Anthranilsäure (K_M^{AA}) zur Folge. Besonders stark wirkte sich der Austausch von Arg164 gegen Alanin

Zusammenfassung

aus, der zu einer mehr als 7000-fachen Erhöhung von K_M^{AA} führte. Wildtypisches ssTrpD wird durch hohe Konzentrationen an Mg^{2+} inhibiert, was sich in einer moderaten Reduktion des k_{cat} -Wertes und einer drastischen Erhöhung der Michaelis-Konstante für PRPP (K_M^{PRPP}) ausdrückt. Durch die Austausche Asp223Asn und Glu224Gln wird diese Inhibition aufgehoben. Dies deutet darauf hin, dass die Hemmung durch die Komplexierung von MG-2 verursacht wird. Die Anthranilat-Phosphoribosyltransferasen aus *Thermotoga maritima* und *Aquifex aeolicus* wurden ebenfalls in rekombinanter Form hergestellt und charakterisiert. Sie zeigen eine nur schwache Inhibition durch hohe Konzentrationen an Mg^{2+} -Ionen.

Die Entfernung zwischen den beiden gebundenen Molekülen Anthranilat, AA I und AA II, und dem gebundenen PRPP beträgt in der Röntgenstruktur von ssTrpD 14,6 Å bzw. 8,6 Å, was eine Reaktion unmöglich macht. In Kooperation mit Dr. Dimitri Svergun (EMBL Hamburg) wurden Röntgenkleinwinkelstreuungsmessungen (SAXS) in An- und Abwesenheit der Substrate durchgeführt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in ssTrpD durch die Bindung der Substrate eine Relativbewegung der beiden Domänen induziert wird, wodurch AA II und PRPP in einen reaktiven Abstand gebracht werden. Diese Bewegung wird in der Röntgenstruktur nicht beobachtet, vermutlich weil sie durch das Kristallgitter verhindert wird. Die Modellierung der aus den SAXS-Daten abgeleiteten Strukturen spricht dafür, dass die Domänenbewegung asymmetrisch erfolgt, d. h. nur jeweils in einer Untereinheit des Dimers stattfindet. Um weitere Einblicke in das Ausmaß und die Dynamik der Domänenbewegung zu erhalten, wurden in Kooperation mit Prof. Claus Seidel (Universität Düsseldorf) Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Messungen an Einzelmolekülen von ssTrpD durchgeführt. Dazu wurden die Reste Asn162 in der α helicalen Domäne und Lys280 in der α/β Domäne jeweils durch Cysteine ersetzt und diese mit den Fluoreszenz-Farbstoffen Alexa-488 als Donor und Alexa-594 als Akzeptor markiert. Erste Ergebnisse zeigten, dass in Abwesenheit der Substrate, nicht jedoch in Anwesenheit von AA und/oder PRPP das ssTrpD Dimer in Monomere dissoziiert. Außerdem wird durch die Substratbindung der Anteil mit Molekülen, in denen effizienter FRET stattfindet, deutlich erhöht, und die Beweglichkeit des Donors verringert. Wegen der Heterogenität der Probe war eine weitergehende Analyse der Daten schwierig. Deshalb wurde heterodimeres ssTrpD hergestellt, in

Zusammenfassung

dem nur eine der beiden Untereinheiten Cysteine enthielt und mit den Farbstoffen markiert wurde. Die Untersuchung dieser ssTrpD Variante mittels FRET steht noch aus.

Im letzten Teil der Arbeit wurde eine Variante von ssTrpD mit den Austauschen Asp83Gly und Phe149Ser analysiert, die eine im Vergleich zum wildtypischen Enzym erhöhte katalytische Aktivität aufweist und in früheren Experimenten durch eine Kombination aus Zufallsmutagenese und Selektion *in vivo* isoliert worden war. Die *steady-state* enzymkinetische Charakterisierung ergab, dass diese Variante unter jeweils optimalen Konzentrationen an Mg²⁺ eine im Vergleich zum wildtypischen Enzym 40-fach erhöhte Wechselzahl aufweist und durch hohe Konzentrationen an Mg²⁺ nicht inhibiert wird. Es zeigte sich weiterhin, dass der Einzelaustausch Asp83Gly einen 6-fachen Anstieg des k_{cat} Wertes zur Folge hat und für die Aufhebung der Hemmung durch Mg²⁺ verantwortlich ist, während durch den Einzelaustausch Phe149Ser eine 3,6-fache Erhöhung der Wechselzahl verursacht wird. Die Analyse der Produkthemmung im Rahmen *steady-state* enzymkinetischer Messungen deutet darauf hin, dass die Freisetzung von PRA die Umsatzrate von ssTrpD limitiert, und dass dieser Schritt durch die beiden Austausche Asp83Gly und Phe149Ser beschleunigt wird. Differentielle *Scanning* Kalorimetrie (DSC) und Messungen der irreversiblen thermischen Inaktivierung ergaben, dass die beiden Austausche zu einer nur moderaten Reduzierung der Thermostabilität von ssTrpD führen. Dies unterstützt die Annahme, wonach die Erhöhung der katalytischen Aktivität eines Enzyms nicht zwangsläufig zu einer Herabsetzung seiner konformationellen Stabilität führt.

1. Einleitung

1.1 Leben nahe am Siedepunkt des Wassers

Anhand ihrer optimalen Wachstumstemperatur können Mikroorganismen in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Psychophile Organismen leben in Habitaten mit Temperaturen unter 15°C. Mesophile haben ihr Temperaturoptimum bei 35-40°C, Thermophile zwischen 60°C und 80°C. Hyperthermophile Organismen besiedeln Lebensräume mit einer optimalen Temperatur (T_{opt}) über 80°C, wobei die Grenzen zwischen den Temperaturbereichen fliessend sind. Bei dem Organismus mit der bisher bekannten höchsten Wachstumstemperatur handelt es sich um den Pyrodictium- und Pyrobaculum verwandten Stamm „strain 121“ aus der Domäne der *Archaea*, der bis zu einer Temperatur von 130°C wächst (Cowan *et al.*, 2004). Die physikalisch mögliche Obergrenze des Lebens wird durch die Stabilität der zellulären Metabolite und Makromoleküle (Lipide, Nukleinsäuren, Proteine) festgelegt und dürfte bei etwa 120°C liegen (Jaenicke und Sterner, 2002).

Der auf den Sequenzen der 16S rRNA basierende phylogenetische Stammbaum ordnet hyperthermophile und extrem thermophile Mikroorganismen nahe am postulierten letzten gemeinsamen Vorfahren (LCA) aller *Bacteria*, *Archaea* und *Eukarya* ein (Abbildung 1). Dies deutet darauf hin, dass das Leben in heißer Umgebung entstanden ist (Pace, 1997).

Einleitung

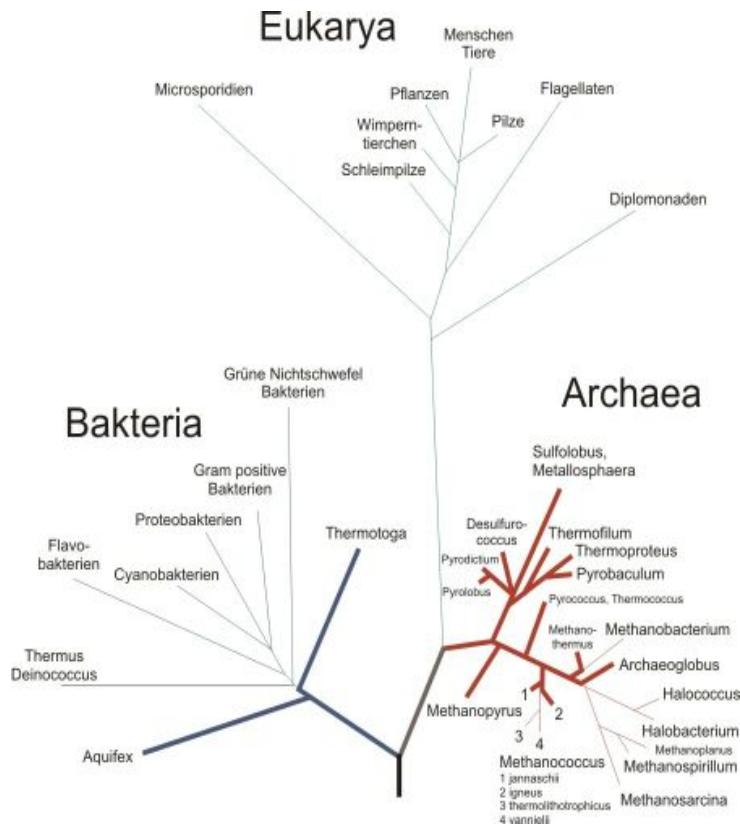


Abbildung 1: Einordnung von hyperthermophilen Mikroorganismen in den phylogenetischen Stammbaum.

Verzweigungsgrad und Verzweigungslängen basieren auf 16S rRNA Sequenzvergleichen (schematisch nach Woese *et al.* 1990; Stetter, 1996). Hyperthermophile Organismen der Domäne Bakteria sind durch blaue Linien und die der Domäne Archaea durch rote Linien dargestellt.

Wegen ihrer extremen Lebensweise und ihrer exponierten phylogenetischen Stellung, werden hyperthermophile Organismen und ihre Makromoleküle seit einigen Jahren intensiv untersucht (Daniel und Cowan, 2000; Sterner und Liebl, 2001). Dabei haben sich einige Modellorganismen herauskristallisiert, zu denen auch *Sulfolobus solfataricus*, *Thermotoga maritima* und *Aquifex aeolicus* gehören. Wie die meisten Hyperthermophilen, zählt *Sulfolobus solfataricus* zur Domäne der Archaea (Brock *et al.*, 1972; Grogan, 1989) und besiedelt schwefelreiche, heiße Quellen mit pH-Werten zwischen 1 und 5. Er wächst unter aeroben und anaeroben Bedingungen in einem Temperaturbereich zwischen 55 und 90°C, mit einem Optimum bei 85°C (Zillig *et al.*, 1981). Die vollständige Sequenz des Genoms von *S. solfataricus* wurde vor fünf Jahren veröffentlicht (She *et al.*, 2001). *Thermotoga maritima* wird den strikt anaeroben, gram-negativen Bakterien zugeordnet und wurde in der Umgebung von unterseeischen hydrothermalen Quellen in Italien und den Azoren isoliert (Huber *et al.*, 1986). Das Bakterium ist in

Einleitung

der Lage in einem Temperaturbereich zwischen 55°C und 90°C zu leben und hat seine optimale Wachstumstemperatur bei 80°C. *Aquifex aeolicus* wird ebenfalls der Domäne der *Bacteria* zugeordnet und wurde erstmals in heißen Quellen des *Yellowstone National Park* entdeckt. Dieser hyperthermophile Organismus kann bis zu einer Temperatur von 95°C wachsen (Deckert und Swanson, 1998). Auch die Genome von *T. maritima* und *A. aeolicus* wurden vollständig sequenziert (Nelson *et al.*, 1999; Deckert *et al.*, 1998).

1.2 Die Tryptophanbiosynthese

Die Aminosäure Tryptophan ist für Säuger essentiell, wohingegen die meisten Bakterien, Archaeen und viele Pflanzen Tryptophan in einer siebenstufigen Reaktion aus Chorismat *de novo* synthetisieren können (Yanofsky *et al.*, 1999).

Der erste Reaktionsschritt, bestehend aus der Umwandlung von Chorismat zu Anthranilat, wird durch die Anthranilat-Synthase katalysiert. Hierbei handelt es sich um einen Enzymkomplex aus der Synthase (TrpE) und der Glutaminase (TrpG). Im Anschluss wird durch die Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (TrpD) Anthranilat mit 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) unter Abspaltung von Pyrophosphat (PP_i) zu Phosphoribosylanthranilat (PRA) verknüpft. Im nächsten Schritt erfolgt durch die Phosphoribosylanthranilat-Isomerase (TrpF) die Isomerisierung von PRA zu 1-(*o*-Carboxyphenylamino)-1-Deoxyribulose-5-Phosphat (CdRP), woraus in einer durch die Indolglycerinphosphat-Synthase (TrpC) katalysierten Ringschlussreaktion unter Abspaltung von Wasser und Kohlendioxid Indol-3-Glycerinphosphat (IGP) entsteht. An der α -Untereinheit der Tryptophan-Synthase (TrpA) kommt es schließlich zur Abspaltung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Das dabei entstehende Indol wandert durch einen hydrophoben Kanal zur β -Untereinheit (TrpB), wo es mit L-Serin unter Abspaltung von Wasser zu L-Tryptophan kondensiert.

Die Biosynthese des Tryptophan ist eine der am besten untersuchten Stoffwechselwege (Yanofsky, 2001), dessen Regulation auf Ebene der Transkription und Translation sehr genau verstanden ist. Seit einigen Jahren sind die Röntgenstrukturen aller beteiligten Enzyme in hoher Auflösung bekannt (Mayans *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002). Diese strukturellen Informationen, in

Einleitung

Kombination mit Mutationsanalysen der aktiven Zentren, ermöglichen detaillierte Einblicke in die Reaktionsmechanismen der Anthranilat-Synthase (Morollo und Bauerle, 1993; Romero *et al.*, 1995; Byrnes *et al.*, 2000), der PRA-Isomerase (Henn-Sax *et al.*, 2002), der IGP-Synthase (Hennig *et al.*, 2002) und vor allem der Tryptophan-Synthase (Kulik *et al.*, 2005). Das zu Beginn dieser Arbeit vorhandene, deutlich limitierte Wissen über den Mechanismus der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase wird im folgenden Absatz zusammengefasst.

1.3 Die Reaktion der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase

Ein Komplex aus 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat und zweiwertigen Magnesiumionen ($\text{PRPP}-\text{Mg}^{2+}$) fungiert innerhalb des Nukleotid- und Aminosäuremetabolismus als aktiviertes Intermediat zur Bildung *N*-glykosidischer Bindungen. Die entsprechenden Reaktionen werden von Phosphoribosyltransferasen (PRTasen) katalysiert. Diese übertragen die Ribose-5-Phosphateinheit aus PRPP unter Abspaltung von Pyrophosphat auf verschiedene Akzeptormoleküle wie Adenin, ATP, Xanthin, Orotat oder Uracil, die ein stickstoffhaltiges Nukleophil enthalten (Sinha und Smith, 2001). Im Fall von TrpD stellt Anthranilsäure das Akzeptormolekül dar (Abbildung 2).

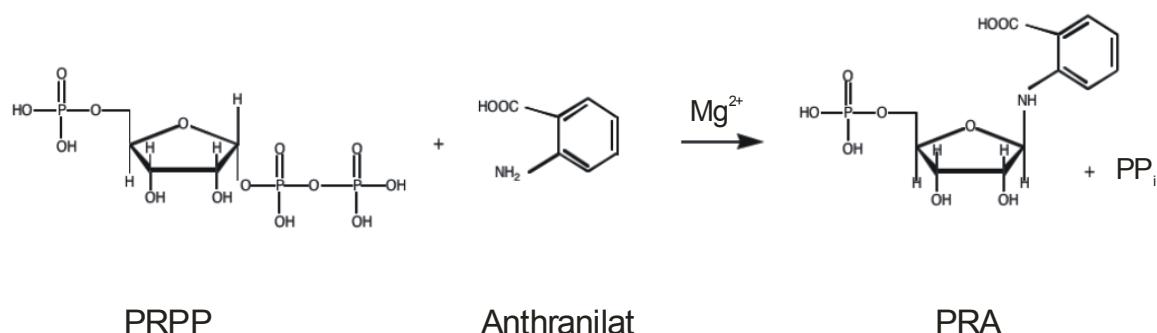


Abbildung 2: Reaktion der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (TrpD).
PRPP: 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat, PRA: Phosphoribosylanthranilate, PP_i : Pyrophosphat

Steady-state enzymkinetische Untersuchungen an TrpD aus *Saccharomyces cerevisiae* zeigten, dass es sich um einen sequentiellen Mechanismus mit zufälliger Bindungsreihenfolge der beiden Substrate handelt (Hommel *et al.*, 1989).

Einleitung

Ob die anschließende Reaktion der Aminogruppe des Anthranilat mit dem C1-Atom des PRPP eine nukleophile Substitution erster (S_N1) oder zweiter Ordnung (S_N2) darstellt, ist jedoch unklar und wird im Falle anderer PRTasen kontrovers diskutiert (Hommel *et al.*, 1989; Craig und Eakin, 2000; Pugmire und Ealick, 2002).

1.4 Strukturelle Klassen von Phosphoribosyltransferasen

Aufgrund ihrer Struktur lassen sich PRTasen in verschiedene Klassen unterteilen. Die grösste Klasse bilden I-PRTasen, die eine Zwei-Domänen-Struktur aufweisen. Von einer kleinen N-terminalen *hood*-Domäne wird eine grössere C-terminale Domäne, die sogenannte *core*-Domäne, unterschieden. Diese besteht aus einem zentralen, fünfsträngigen, parallelen β -Faltblatt, das von vier α -Helices umgeben ist. Typisches Merkmal für die Klasse I-PRTasen ist ein konserviertes Motiv aus 13 Resten, das für die Bindung des PRPP und die Katalyse essentiell ist (Scapin *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1994; Schumacher *et al.*, 1996). Ein Bestandteil dieses Motivs ist ein flexibler Loop in der *core*-Domäne, der bei Bindung des Substrates PRPP-Mg²⁺ eine Konformationsänderung durchläuft und damit das aktive Zentrum vervollständigt. Die C-terminale *hood*-Domäne dient der Bindung des Nukleophils (Sinha und Smith, 2001). Vertreter der Klasse I-PRTasen sind unter anderem die Purin-PRTasen, welche Ribose-5-Phosphat auf die Purinbasen Adenin, Guanin, Hypoxanthin und Xanthin übertragen (Craig und Eakin, 2000), sowie die ebenfalls gut untersuchte Orotat-PRTase, die am Aufbau und Recycling von Pyrimidinen beteiligt ist (Ozturk *et al.*, 1995; Scapin *et al.* 1995).

Den einzigen, bisher bekannten Vertreter der Klasse II-PRTasen stellt die Quinolat-Phosphoribosyltranserase dar (Eads *et al.*, 1997, Cao *et al.*, 2002), welche essentiell für die *de novo* Synthese von NAD⁺ ist (Foster und Moat, 1980). Dieses Enzym besteht, wie die Vertreter der Klasse I, aus zwei Domänen. Die N-terminale Domäne bildet eine offene *sandwich*-Struktur, bestehend aus einem viersträngigen antiparallelen β -Faltblatt und vier darüber liegenden α -Helices, während die C-terminale Domäne aus einem siebensträngigen α/β -Barrel gebildet wird.

Die ATP-Phosphoribosyltranserasen (ATP-PRTase) bilden eine weitere unabhängige Klasse von PRTasen. Sie kataylsieren den ersten Schritt in der

Einleitung

Biosynthese von Histidin und lassen sich strukturell in homo- und heteromere Vertreter unterteilen (Sissler *et al.*, 1999; Bovee *et al.*, 2002). Homomere ATP-PRTasen bestehen ausschließlich aus Untereinheiten des HisG Proteins (HisG_L). Es besteht ein Gleichgewicht zwischen einem Dimer und einem Hexamer bzw. höheren Oligomerisationszuständen, wobei im Allgemeinen das Dimer die aktive Form darstellt und durch das Substrat PRPP stabilisiert wird (Tebar *et al.*, 1973). Höhere Konzentrationen an Andeninmonophosphat (AMP), an dem Reaktionsprodukt Phosphoribosyl-ATP (PR-ATP) und an Histidin fördern die Zusammenlagerung zu Hexameren (Klungsoyr und Kryvi, 1971). Homomere ATP-PRTasen sind ausschließlich bei Vertretern der Domäne der *Bacteria* wie *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* zu finden. Heteromere ATP-PRTasen enthalten verkürzte HisG Proteine (HisG_S), die mit HisZ Proteinen assoziiert sind. Entsprechend finden sich die Gene für HisG_S und HisZ in Mikroorganismen nur gemeinsam. Sowohl die Struktur der homomeren, als auch die der heteromeren ATP-PRTasen sind bekannt (Cho *et al.*, 2003, Vega *et al.*, 2005). Die HisG_L Untereinheiten in homomeren ATP-PRTasen lassen sich in drei Domänen unterteilen, wobei die Domäne I aus einem siebensträngigen β -Faltblatt besteht, das von fünf α -Helices umgeben ist. Die Domäne II besteht aus einem fünfsträngigen β -Faltblatt und zwei α -Helices, während die Domäne III die histidinbindende Domäne darstellt.

Die heteromere ATP-PRTase aus *T. maritima* besteht aus jeweils vier Untereinheiten HisG_S und HisZ. Im Vergleich zu HisG_L fehlt der HisG_S Untereinheit die histidinbindende Domäne III am C-Terminus (Sissler *et al.*, 1999). Die aktiven Zentren befinden sich sowohl bei HisG_S als auch bei HisG_L in einem Spalt zwischen den Domänen I und II. HisZ wird in eine core-Domäne und 2 Subdomänen unterteilt. Das core wird aus einem achtsträngigen β -Faltblatt gebildet und ist von einer proximalen und einer distalen Subdomäne flankiert.

1.5 Die Struktur der Anthranilate-Phosphoribosyltransferase aus *Sulfolobus solfataricus*

Nachdem im Jahre 2002 mit TrpD aus *Sulfolobus solfataricus* (ssTrpD) die erste Struktur einer Anthranilate-Phosphoribosyltransferase gelöst wurde (Mayans *et al.*, 2002), sind inzwischen auch die Röntgenstrukturen von TrpD aus *Pectobacterium carotovorum* und *Mycobacterium tuberculosis* bekannt (Kim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006). Diese drei Enzyme bilden jeweils ein Homodimer, dessen Aufbau im Folgenden am Beispiel von ssTrpD beschrieben wird.

Das ssTrpD-Monomer besteht aus einer N-terminalen α -helikalen Domäne, welche sich aus den Helices α_1 - α_4 und α_8 - α_9 zusammensetzt, sowie einer C-terminalen α/β -Domäne. Diese wird von einem zentralen β -Faltblatt (β_1 - β_7) und einem Cluster von α -Helices (α_5 - α_7 , α_{10} - α_{15}) gebildet (Abbildung 3A). Zwischen den beiden Domänen befindet sich eine Scharnierregion, in der das aktive Zentrum lokalisiert ist. Die Dimerisierung der Protomere erfolgt über die N-terminalen α -helicalen Domäne in einer Kopf-zu-Kopf Anordnung (Abbildung 3B).

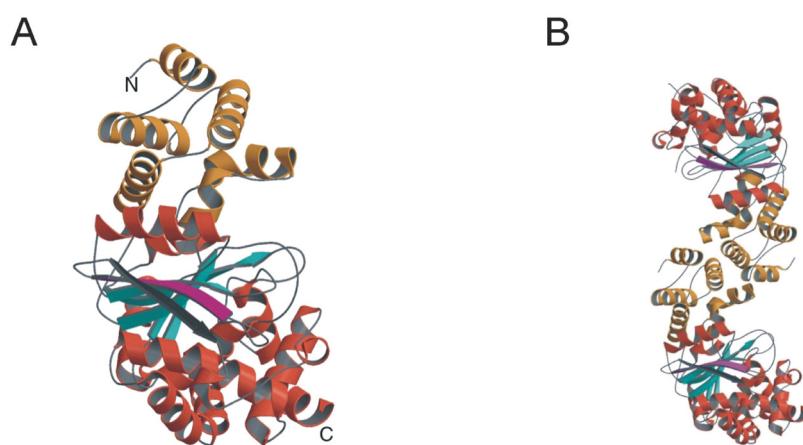


Abbildung 3: Struktur des ssTrpD Monomers (A) und des Homodimers (B) (nach Mayans *et al.*, 2002).

A: Die N-terminalen α -helicalen Domäne ist in gelb, die C-terminalen α/β -Domäne ist in rot (α -Helices) bzw. cyan (β -Stränge) dargestellt. Der einzige antiparallele β -Strang des β -Faltblattes ist lila eingefärbt.

B: Die Dimerisierung der beiden Untereinheiten erfolgt über die α -helikale Domäne in einer Kopf-zu-Kopf Anordnung.

Einleitung

Interessanterweise zeigen die beiden Protomere des ssTrpD-Dimers leicht unterschiedliche Strukturen, die als „offene“ bzw. „geschlossene“ Konformation bezeichnet werden (Mayans *et al.*, 2002). Durch eine Rotation der α -helikalnen Domäne gegen die α/β -Domäne um 8° können die beiden Konformationen ineinander übergeführt werden. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass konformationelle Umlagerungen der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase eine wichtige Rolle im Reaktionsmechanismus spielen (Mayans *et al.*, 2002).

Die Faltung von TrpD ähnelt stark der Faltung der ebenfalls dimeren Klasse II Nukleosidphosphorylasen (NPs), was eine evolutionäre Verwandtschaft beider Enzymklassen wahrscheinlich macht (Mayans *et al.*, 2002). Diese Verwandtschaft wurde bereits früher aufgrund eines Sequenzvergleichs dreier ausgewählter Segmentabschnitte in NPs der Klasse II und Anthranilat-Phosphoribosyltransferasen postuliert (Mushegian und Koonin, 1994).

1.6 Zusammenhang zwischen Thermostabilität, konformationeller Flexibilität und katalytischer Aktivität

In seiner natürlichen Umgebung muß ein Enzym einerseits stabil genug sein, um seine strukturelle Integrität zu wahren, andererseits muss es auch eine gewisse Flexibilität aufweisen, um Konformationsänderungen während der Katalyse durchführen zu können. Tatsächlich belegen zahlreiche Arbeiten die Notwendigkeit struktureller Dynamik für die Enzymfunktion (Volkman *et al.*, 2001; Codreanu *et al.*, 2002; Eisenmesser *et al.*, 2002, 2005; Schotte *et al.*, 2003; Wolf-Watz *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2005; Antikainen *et al.*, 2005; Agarwal, 2005), jedoch ist der Zusammenhang zwischen der für die Katalyse notwendigen konformationellen Flexibilität eines Enzyms und seiner (Thermo-)Stabilität weitestgehend unklar (LeMaster *et al.*, 2005).

Enzyme aus Hyperthermophilen eignen sich gut, um dieses Problem zu untersuchen. Sie sind in der Regel deutlich stabiler als die homologen Enzyme aus Mesophilen, was im Einzelfall eine Reihe verschiedener struktureller Ursachen haben kann. Zu diesen zählen unter anderem eine erhöhte Anzahl von Salzbrücken, eine dichtere Packung des hydrophoben Kerns, zusätzliche

Einleitung

Disulfidbrücken, sowie ein erhöhter Oligomerisierungsgrad (Sterner und Liebl, 2001; Jaenicke und Sterner, 2002). Dagegen sind Enzyme aus Hyperthermophilen in der Regel bei Raumtemperatur sehr viel weniger aktiv als Enzyme aus Mesophilen, wofür eine eingeschränkte konformationelle Flexibilität verantwortlich gemacht wurde (Merz *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005). Diese Annahme wird zum Beispiel durch die Beobachtung gestützt, dass die Isopropylmalat-Dehydrogenase aus *Thermus thermophilus* bei 25°C eine langsamere Austauschrate von Wasserstoffatomen zeigt als das homologe Enzym aus *E. coli*. Dagegen erfolgt der Wasserstoffaustausch in der Nähe der optimalen Wachstumstemperaturen vergleichbar schnell (Závodszky *et al.*, 1998). Dies deutet darauf hin, dass die bei gleicher Temperatur höhere Aktivität des Enzyms aus *E. coli* auf eine erhöhte intrinsische konformationelle Flexibilität zurückgeht, was im Falle des Enzyms aus *T. thermophilus* durch die höheren physiologischen Temperaturen ausgeglichen wird. Entsprechend sind Enzyme aus Hyperthermophilen und Mesophilen bei ihren jeweiligen optimalen Wachstumstemperaturen katalytisch vergleichbar aktiv (Jaenicke, 2000).

Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass sich hohe Thermostabilität von Enzymen und hohe Aktivität bei niedrigen Temperaturen gegenseitig ausschliessen. Dagegen spricht jedoch, dass einige extrem thermostabile Enzyme aus Hyperthermophilen auch bei niedrigen Temperaturen katalytisch hoch aktiv sind (Sterner *et al.*, 1996; Henn-Sax *et al.*, 2002). Auch deuten Messungen mit dem Rubredoxin aus *Pyrococcus furiosus* darauf hin, dass dieses Protein bei 28°C nicht weniger flexibel ist als eine Reihe von Proteinen aus mesophilen Mikroorganismen (Hernandez *et al.*, 2000).

Die vergleichenden Untersuchungen an Enzymen aus hyperthermophilen und mesophilen Mikroorganismen werden generell durch die großen Sequenzunterschiede erschwert. Selbst bei 50% Sequenzidentität und der Betrachtung vergleichsweise kleiner Proteine aus beispielsweise 200 Aminosäuren müssen 100 Reste in die Analyse einbezogen werden. Dieses Problem kann durch gelenkte Evolution umgangen werden (Brouns *et al.*, 2005). Mit Hilfe dieser Technik, kann die katalytische Aktivität eines Enzyms durch den Austausch einiger weniger Aminosäuren verbessert werden, vorausgesetzt es steht ein geeignetes Screening- oder Selektionssystem zur Verfügung. Die

Einleitung

verbesserten Varianten können dann gereinigt und der Einfluss der veränderten Aktivität auf die Thermostabilität *in vitro* quantifiziert werden (Arnold *et al.*, 2001).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten am Beispiel des Enzyms aus *Sulfolobus solfataricus* genauere Einblicke in den Katalysemechanismus der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase gewonnen werden. Dazu sollte zunächst in Kooperation mit Prof. Olga Mayans (Biozentrum der Universität Basel) die Röntgenstruktur des Enzyms in Gegenwart beider Substrate aufgeklärt werden. Dadurch sollten mutmaßlich an der Bindung von Anthranilsäure und PRPP-Mg²⁺ beteiligte Reste identifiziert und danach ihre Bedeutung für die Reaktion mittels Mutationsanalyse überprüft werden. Das Ausmaß und die Dynamik der bei der Katalyse auftretenden konformationellen Umlagerungen sollte in Zusammenarbeit mit Dr. Dimitri Svergun (EMBL Hamburg) und Prof. Claus Seidel (Universität Düsseldorf) mittels Röntgenkleinwinkelstreuung und Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer an Einzelmolekülen charakterisiert werden. Schliesslich sollten durch die Analyse von mittels gelenkter Evolution aktivierter ssTrpD Varianten Einblicke in den Zusammenhang zwischen katalytischer Aktivität, konformationeller Flexibilität und Thermostabilität bei Anthranilat-Phosphoribosyltransferasen erhalten werden.

2. Material

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Chromatographie-Anlagen:

Biocad-Sprint PERSEPTIVE BIO-SYSTEMS, Weiterstadt

Äkta basic 10 better GE Healthcare, Freiburg

Benutzte Säulen:

Affinitätssäule POROS MC/20, SV 7,9 ml, Applied Biosystems, Foster City, USA

MonoQ, SV 1 ml, GE Healthcare, Freiburg

Analytische Gelfiltration Superdex 75, SV 24 ml, GE Healthcare, Freiburg

Präparative Gelfiltration Superdex 75, SV 320 ml, GE Healthcare, Freiburg

Brutschränke:

Heraeus B6060: KENDRO, Hanau

Binder: BINDER GmbH, Tuttlingen

Cell density meter Ultrospec 10: AMERSHAM Biosciences, Cambridge UK

Concentrator 5301: EPPENDORF, Hamburg

Dialyseschläuche: SERVA, Heidelberg

Einwegspritzen 2 ml, 50 ml: HENKE-SASS, WOLF, Tuttingen

Elektroporationsküvetten mit 2 mm Elektrodenabstand: MOLECULAR BIOPRODUCTS, San Diego, USA

Elektroporator 2510: EPPENDORF, Hamburg

Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse: VARIAN, Darmstadt

Gefrierschränke -80°C:

Heraeus Hera freeze: KENDRO, Hanau

MDF-U72V: SANYO, Tokyo, Japan

Gefrierschränke -20°C: LIEBHERR, Nussbaumen

Gelelektrophorese-Kammern:

Agarose-Elektrophorese-Apparatur: hauseigene Werkstatt des Instituts für Biochemie der Universität zu Köln

SDS-Elektrophoresekammer: Mighty Small II mit Multi Gel Caster Gelgießstand: AMERSHAM Pharmacia Biotech, Freiburg

Polyacrylamid-Elektrophorese-Apparatur: HOEFER Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA

Material

Glaswaren und Glaspipetten: SCHOTT, Mainz; FISHER SCIENTIFIC, Schwerte; NOVOGLAS, Bern, Schweiz

Hamilton Mikroliterspritze: HAMILTON, Bansduz, Schweiz

Heizblock-Thermostat HBT-2131: HCL, Bovenden

Imager:

Gel Doc 1000 mit Gel Doc 1000 White Light Source und Single Wavelength Mini Transilluminator: BioRAD, Hercules, USA

Multi-Doc-It Digital Imaging System: UVP Inc., Upland, USA

Inkubationsschüttler:

Innova 4000, 4400, 4430: NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC GmbH, Nürtingen

Certomat SII: B. BRAUN Biotech, Melsungen

Küvettenschleuder Roto-Vette 310: HELLMA, Mülheim

Kunststoffküvetten, ½ Mikroküvetten: RATIOLAB, Dreieich

Latexhandschuhe Gentle Skin: KIMBERLY-CLARK, Roswell, USA

Magnetrührer:

IKAMAG RCT *basic*: IKA-LABORTECHNIK, Staufen

MR 3001: HEIDOLPH, Kelheim

Membranfilter ME24, 0,2 µm: Schleicher & Schüll, Dassel

Mikroliterpipetten:

PIPETMAN P20, P200, P1000: ABIMED ANALYSE TECHNIK, Langenfeld

Research 2, 10, 100, 1000: EPPENDORF, Hamburg

Mikrowellen:

Micromat 15, 600 W: AEG, Nürnberg

HMT 842C: BOSCH, Nürnberg

NAP-Säulen, Nap-5, 10 und 25: AMERSHAM Biosciences, Mannheim

Nitriluntersuchungshandschuhe: Kimberly-Clark, Zaventem, Belgien

Nitrocellulosemembran, Filtertyp 0,0025 µm, weiß, 13 mm Ø: MILLIPORE, Eschborn

Parafilm: AMERICAN NATIONAL CAN, Chicago, USA

Pasteurpipetten: HIRSCHMANN, Eberstadt

PCR-Geräte:

Mastercycler personal: EPPENDORF, Hamburg

Material

Mastercycler gradients: EPPENDORF, Hamburg

T3 Thermocycler: BIOMETRA; Göttingen

Petrischalen: GREINER, Nürtingen

pH-Meter: INOLAB WTW, Weilheim

Pipettenspitzen, 200 µl, 1000 µl: ROTH, Karlsruhe

Power Supply EPS 301: AMERSHAM Pharmacia Biotech, Freiburg

Quarzküvetten, 2 ml, 1 cm Schichtdicke: VARIAN, Darmstadt, STARNA, Pfungstadt

Reaktionsgefässe, 1,5 ml, 2 ml: FISCHER SCIENTIFIC, Schwerte

T3 Rocking Platform: BIOMETRA, Göttingen

Ultraschallgerät Branson Sonifier 250D: HEINEMANN, Schwäbisch Gmünd

UV-Leuchttische:

N90 MW 310 nm: Konrad Benda, Wiesloch

Reprostar: CAMAG Chemie Erzeugnisse, Berlin

Vakuumpumpe ME 2C: VACUUBRAND, Wertheim

Varioklav Dampfsterilisator Typ 500: H&P Labortechnik, München

Vortex Reax Top: HEIDOLPH Instruments GmbH, Kelheim

Waagen:

SBA 33 und 52: SCALTECH, Heiligenstadt

H54AR und H20T: METTLER, Giessen

PI 1200: METTLER, Giessen

Wasserbad 1012: GFL, Burgwedel

Wasserfiltrationsanlagen:

Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage: MILLIPORE, Eschborn

SG Reinstwasser-System UF 60: SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation, Hamburg

Zentrifugen:

HERAEUS Biofuge pico: SCHÜTT LABORTECHNIK, Göttingen

HERAEUS Biofuge fresco: SCHÜTT LABORTECHNIK, Göttingen

Centrifuge 5415 D, 5415 R, 5810 R: EPPENDORF, Hamburg

Varifuge 20 RS: HERAEUS SEPATECH, Hanau

Sorvall RC-5B, RC2-B: Sorvall, Langenselbold

Zentrifugenröhren, 15 ml, 50 ml: FISCHER SCIENTIFIC, Schwerte

Zentrifugenröhren, High speed, 500 ml: Beranek, Weinheim

Zweistrahlg-UV/VIS-Spektralphotometer Cary Bio100: VARIAN, Darmstadt

2.2 Bakterienstämme

***E. coli* DH5 α** (Hanahan, 1983)

[F $^-$, *endA1*, *hsdR17* ($r_k^-m_k^-$), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA* (Nal r), *relA1*, $\Delta(lacZYA-argF)U169$, $\Phi 80lacZ\Delta M15$]

***E. coli* JM109** (Yanish-Perron *et al.*, 1985)

[*e14-* (*McrA-*), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* ($r_k^-m_k^-$), *supE44* *relA1(lac-proAB) F'*, *traD36*, *proAB*, *lacI q Z_M15*]

***E. coli* KK8 = W3110trpEA2** (Schneider *et al.*, 1981)

[*trpR*, *tna2*, $\Delta trpEA2$]

***E. coli* JMB9** ($\Delta trpEGD$)

[$r^m^+leu^-b^-$, $\Delta trpLD102$]

***E. coli* BL21** (DE3) (Studier & Moffat, 1986)

[*hsdS,gal*, (*cl*, *ts857*, *cnd1*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96,thi1,relA1*)]

***E. coli* XL 1 Blue MRF'**

recA1, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac[F'*, *proAB*, *lacI q* , $Z\Delta M15$, Tn 10, (Tet r)]

2.3 Vektoren

2.3.1 pQE Vektoren

Bei den pQE Vektoren handelt es sich um zur Familie der pDS Vektoren gehörige Expressionsvektoren (Bujard *et al.*, 1987; Stüber *et al.*, 1990), die kommerziell von der Firma QIAGEN erhältlich sind. Sie besitzen einen T5-Promotor, der durch zwei *lac*-Operatorsequenzen reguliert wird, einen Col E1 Replikationsursprung und eine synthetische Ribosomenbindestelle, die eine effiziente Translation ermöglicht. Die Selektion erfolgt über eine Ampicillin-Resistenz, die durch Expression des β -

Material

Lactamase-Gens (*bla*) ausgeprägt wird. In Abbildung 4 sind die beiden in dieser Arbeit verwendeten pQE Vektoren dargestellt, pQE40 und pQE70. Ein in den pQE Vektor kloniertes Gen kann im Fall von pQE40 mit einem N-terminalen und im Fall von pQE70 mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag ($(His)_6$ -Tag) versehen werden.

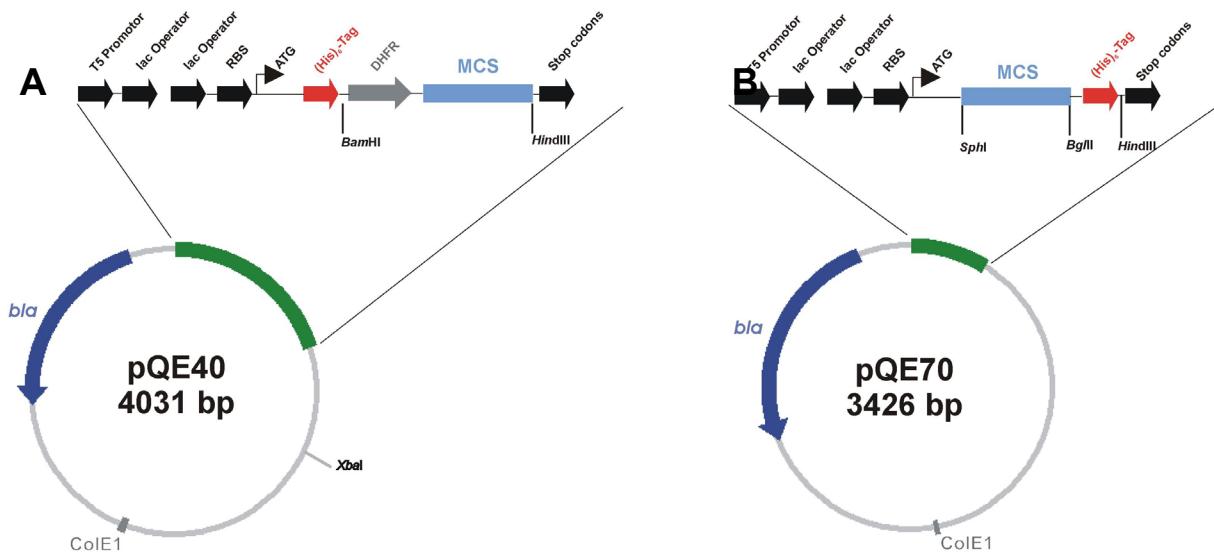


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Expressionsvektoren pQE40 (A) und pQE70 (B).
bla: β -Lactamase-Gen; ColE1: Replikationsursprung; RBS: Ribosomenbindestelle; $(His)_6$ -Tag: Hexahistidin-Tag; DHFR: Dihydrofolatreduktasegen; MCS: multiple Klonierungsstelle; *Bam*H I, *Bgl*II, *Hind* III, *Sph*I, *Xba*I: Restriktionsschnittstellen.

2.3.2 pREP4 (pDMI,1)

Das Plasmid pDMI,1 (Certa *et al.*, 1986) ist ebenfalls kommerziell von der Firma QIAGEN erhältlich. Es exprimiert das lac-Repressorgen konstitutiv und unterdrückt somit die Expression eines in den Vektor pQE klonierten Gens durch Bindung des Repressors an den *lacZ* Promotor-/Operator. Durch Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 1 mM kann die Expression gezielt induziert werden. Das Plasmid besitzt einen p15A-Replikationsursprung und das Kanamycin-Resistenz-Gen (*neo*) als Selektionsmarker (Abbildung 5).

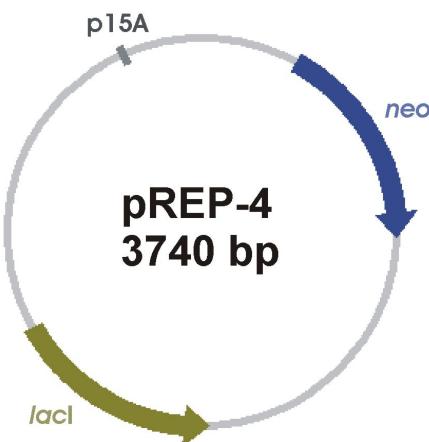


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Repressorplasmids pREP-4 (pDM).
neo: Kanamycin-Resistenzgen; lacI: lac-Repressor-Gen; p15A: Replikationsursprung.

2.3.3 pET 28a(+) (Novagen)

In pET Vektoren klonierte Gene werden von der T7-RNA-Polymerase transkribiert (Studier *et al.*, 1990). Sie können deshalb nur in *E. coli* Stämmen exprimiert werden, die eine chromosomal Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens besitzen. Die Expression der Polymerase erfolgt unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotor/Operators und wird durch Zugabe von IPTG induziert. Die über den T7-Promotor erfolgende Expression ist über einen *lac*-Operator reguliert. Das *lac*-Repressor-Gen ist vektorcodiert und wird konstitutiv exprimiert. Der Vektor besitzt einen pBR322 Replikationsursprung, als Selektionsmarker für die Plasmidaufnahme dient das Kanamycin-cinnucleotidyltransferase-Gen (*neo*). Ein in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors pET 28a(+) kloniertes Gen kann 5'- oder 3'-seitig mit einem Hexahistidin-Tag ($\text{His}_{(6)}$ -Tag) versehen werden. Der N-terminale Tag kann über eine Thrombinschnittstelle vollständig abgespalten werden, während der C-terminale Tag aufgrund einer fehlenden Proteaseschnittstelle posttranslational nicht entfernt werden kann.

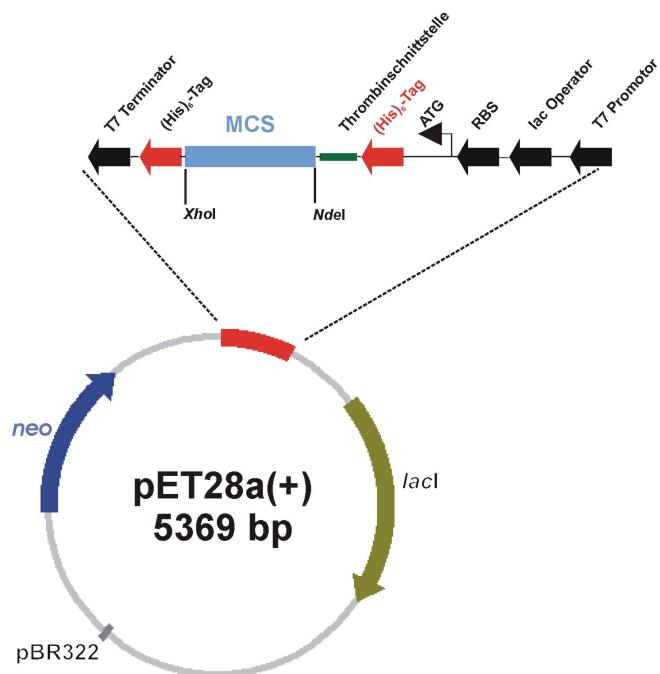


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pET28a(+).

lacI: lac-Repressor-Gen; pBR322: Replikationsursprung; *neo*: Kanamycin-Resistenzgen; RBS: Ribosomenbindestelle; (His)₆-Tag: Hexahistidin-Tag; MCS: multiple Klonierungsstelle; *NdeI*, *Xhol*: Restriktionsschnittstellen.

2.3.4 pUC19 (Fermentas)

Der pUC19 Vektor ist ein Klonierungsplasmid mit Bestandteilen der pBR322- und M13mp19-Vektoren (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Als Replikationsursprung besitzt das Plasmid einen abgewandelten pMB1 Replikationsursprung von pBR322. Die Selektion auf Plasmidaufnahme erfolgt über eine Ampicillin Resistenz, die durch die Expression des β -Lactamase-Gens (*bla*) ausgeprägt wird. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors liegt im Genfragment der β -Galactosidase (*lacZ*), so dass bei Klonierung eines Gens die Expression des β -Galactosidase-Gens durch Verschiebung des Leserasters verhindert wird. Bakterien mit pUC Vektor ohne Insert produzieren eine funktionsfähige β -Galactosidase, die X-GAL als Substratanalogon nutzt und daraus den blauen Farbstoff Indigoblau produziert, der die Kolonien anfärbt. Bei zerstörtem Leseraster wird keine aktive β -Galactosidase gebildet und die Kolonien bleiben weiß.

Material

Für das blau/weiß *screening* ist die Zugabe von IPTG und X-GAL auf der Platte notwendig.

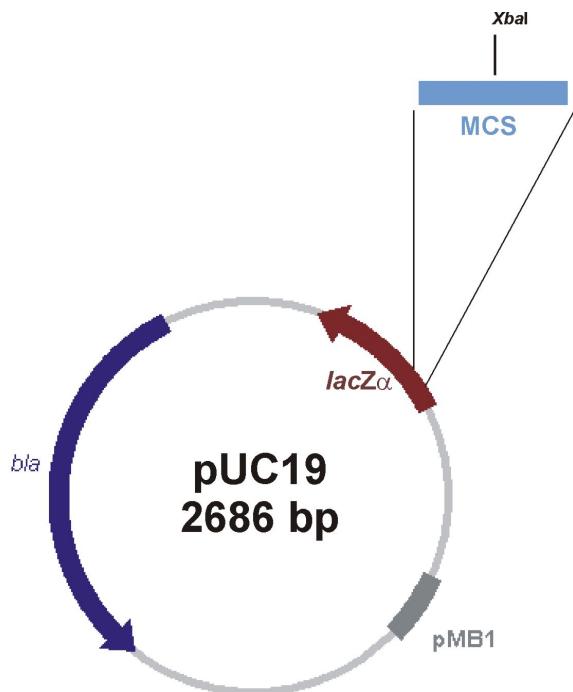


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pUC19.

bla: β-Lactamase-Gen; pMB1: Replikationsursprung; *lacZα*: β-Galactosidase-Gen; MCS: multiple Klonierungsstelle, *XbaI*: Schnittstelle für das in dieser Arbeit verwendete Restriktionsenzym.

2.4 Oligodesoxyribonukleotide

Alle aufgeführten Oligodesoxyribonukleotide wurden bei der Firma Metabion international AG, Martinsried bezogen.

2.4.1 Sequenzierungsprimer für pQE Vektoren

CyRI

5'- TCA CGA GGC CCT TTC GTC TT-3'

CyPstI

5'- TCG CCA AGC TAG CTT GGA TTC T-3'

Material

2.4.2 Sequenzierungsprimer für pET Vektoren

T7 Promotor

5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

T7 Terminator

5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'

2.4.3 Sequenzierungsprimer für pUC Vektoren

pUC5_Seq

5'- AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'

pUC3_Seq

5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3'

2.4.4 Klonierungsprimer für pQE40 Vektoren

trpD aus *Sulfolobus solfataricus*

5'-Primer mit **BamHI Schnittstelle** (fettgedruckt)

5'-TTA CGC **GGA TCC** CTG GTT CCG CGT GGC AGC ATG-3'

3'-Primer mit **HindIII Schnittstelle** (fettgedruckt)

5'- CCA CAA **AGC TTT** AGT TTA ACC ACT ACT TTT CA-3'

Material

2.4.5 Klonierungsprimer für pQE70 Vektoren

trpD aus Sulfolobus solfataricus

5'-Primer mit **SphI** Schnittstelle (fettgedruckt) und **Strep-tag** (Sequenz unterstrichen)

5'- ACA **TGC ATG CTG TGG** AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA AAC ATT AAC-3'

3'-Primer mit **HindIII** Schnittstelle (fettgedruckt)

5'- CCA CAA **AGC TTT** AGT TTA ACC ACT ACT TTT CA-3'

2.4.6 Klonierungsprimer für pUC19 Vektor

5'-Primer mit **XbaI** Schnittstelle (fettgedruckt)

5'- CTA **GTC TAG AAA ATC ATA AAA AAT TTA T-** 3'

3'-Primer mit **XbaI** Schnittstelle (fettgedruckt)

5'- GGC AGC **TCT AGA GGG CGG ATT TGT CCT**-3'

2.4.7 Klonierungsprimer für pET28a(+) Vektoren

trpD aus Aquifex aeolicus

5'-Primer mit **NdeI** Schnittstelle (fettgedruckt)

5'- CTC TTT **CAT ATG GAA CTG GTA AGG GAA**-3'

3'-Primer mit **XhoI** Schnittstelle (fettgedruckt) und Austausch L330S (unterstrichen) zur Wiederherstellung der wt Sequenz

5'- TAA TTA **CTC GAG TCA TAT TTT ATT TGA TAA TTC CAC ATA CTT CTC CAA** TAC CTC CAG-3'

Material

trpD aus Thermotoga maritima

5'-Primer mit *NdeI* Schnittstelle (fettgedruckt)

5'- GGG AAT **TCC ATA TGA** AAG TTT CCG AAG AA-3'

3'-Primer mit *XbaI* Schnittstelle (fettgedruckt)

5'- CCG **CTC GAG** TCA ACT ATT TCC CAG-3'

2.4.8 Mutationsprimer für *sstrpD*

(Das jeweils neue Codon von *sstrpD* ist unterstrichen; die komplementären 3' Primer sind nicht aufgelistet.)

G79F5'

5'- ATA GAC ACA GCT ACA GGT GGC GAC-3'

D83G5'

5'- ACA GGT GGC GGC GGA TTA GGG-3'

S91A5'

5'- ACA GTA AAC GTT GCT ACC GCA TCA GCT-3'

N109A5'

5'- AAA CAT GGT GCT AGG GCA GTA-3'

H154A5'

5'- GCA CAA TAC TAT GCT CCT GCA ATG AAG -3'

N162C5'

5'- AAG AAC GTT GCC TGT GTA AGA AAA ACT -3'

R170A5'

5'- TTG GGG ATC GCG ACT ATT TTC -3'

G177F5'

5'- TTC AAT ATT CTA TTC CCA TTG ACT AAT-3'

P178A5'

5'- AAT ATT CTA GGT GCA TTG ACT AAT CCA-3'

F193W5'

5'- TTA ATG GGA GTA TGG TCG AAA GAT CAC-3'

Material

D223N/E224Q5'

5'- GAG CCG GGT ATA AAC CAG GTA AGT CCA ATA-3'

K280C5'

5'- GCA TTT CTG GGT TGT GAT GAA CAC GTG-3'

2.4.9 Mutationsprimer für aatrpD

N86D5' (Das zur Wiederherstellung der Wildtypsequenz von aatrpD eingefügte Codon ist unterstrichen.)

5'- ACG GGA GGA GAT AAA AGT TC-3'

2.5 DNA-Längenstandard

Smart Ladder: EUROGENETEC, Seraing, Belgien

Bandengröße (bp)	ng/Bande*
10000	100
8000	80
6000	60
5000	50
4000	40
3000	30
2500	25
2000	20
1500	15
1000	100
800	80
600	60
400	40
200	20

bp: Basenpaare, *bei Auftrag von 5 µl Standard

Material

2.6 Proteinlängenstandard

Low Molecular Weight-Marker: Amersham Biosciences, Mannheim

Protein	M _R [g/mol]	µg/Bande*
Phosphorylase b	97000	67
Albumin	66000	83
Ovalbumin	45000	147
Carboanhydrase	30000	83
Trypsininhibitor	20100	80
α-Lactalbumin	14400	116

M_R: relatives Molekulargewicht; *bei Auftrag von 3 µl Standard

2.7 Enzyme

2.7.1 Restriktionsendonukleasen

NEW ENGLAND BIOLABS GmbH, Frankfurt am Main; www.neb-online.de

Benzonase: MERCK Eurolabs, Lohmar

2.7.2 DNA-Polymerasen

Pwo-Polymerase: ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim; www.roche.de

Taq-Polymerase: SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen; www.sigmaaldrich.de

ReadyMix REDTaq PCR Reaction Mix: SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen; www.sigmaaldrich.de

Phusion High-Fidelity Polymerase: NEW ENGLAND BIOLABS GmbH, Frankfurt am Main; www.neb-online.de

2.7.3 DNA-Ligasen

T4-DNA-Ligase: ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim; www.roche.de

T4-DNA-Ligase: FERMENTAS GmbH, St. Leon-Rot; www.fermentas.de

2.8 Chemikalien

Alle für molekularbiologische Arbeiten benötigten Chemikalien besaßen den größtmöglichen Reinheitsgrad. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von Becton Dickinson GmbH (Heidelberg; www.bd.com), Bio-Rad Laboratories (München; www.biorad.com), Biozym Scientific GmbH (Hess; www.biozym.com), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe; www.carl-roth.de), GE Healthcare (Freiburg; www.amershambiosciences.com), Gerbu Biochemicals (Gaiberg; www.gerbu.de), KMF Laborchemie Handels GmbH (Lohmar; www.kmf-laborchemie.de), Merck KgaA (Darmstadt; www.merck.de), MP Biomedicals (Eschwege; www.mpbio.com), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim; www.roche.de), Serva (Heidelberg; www.serva.de) oder Sigma Aldrich (Steinheim; www.sigmadralich.de) bezogen.

2.9 Kits

QIAquick Gel Extraction Kit: QIAGEN, Hilden; www.qiagen.com

QIAquick PCR-Purification Kit: QIAGEN, Hilden; www.qiagen.com

NucleoBond AX DNA-Extraction Kit: MACHEREY-NAGEL, Düren; www.macherey-nagel.com

NucleoSpin Gel-Extraction Kit: MACHEREY-NAGEL, Düren; www.macherey-nagel.com

NucleoSpin PCR-Purification Kit I+II: MACHEREY-NAGEL, Düren; www.macherey-nagel.com

HMW und LMW Gel Filtration Calibration Kit: GE Healthcare, Freiburg; www.amershambiosciences.com

Material

2.10 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Lösungen und Puffer sterilfiltriert und bei RT gelagert. Es wurde MILLIPORE-Wasser oder bidestilliertes Wasser verwendet.

Agarose 1%

1% (w/v) in 0,5% TBE (v/v) aufgekocht und bei 60°C gelagert

Ampicillin-Stammlösung

150 mg/ml Na⁺-Ampicillinsalz in H₂O gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert

Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Stammlösung (10%)

10% (w/v) APS in H₂O gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert

Anthraniolsäure-Stammlösung

5 mg/ml in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert

AX 100 Kit- Puffer

S1-Puffer (Resuspendierungspuffer)

50 mM Tris-HCl 8,0

10 mM EDTA

100 µg RNase A

Lagerung bei 4°C

S2-Puffer (Zellaufschlusspuffer)

200 mM NaOH

1% SDS

S3-Puffer (Neutralisationspuffer)

2,8 M KAc, pH 5,1

N2-Puffer (Äquilibrierungspuffer)

100 mM Tris-H₃PO₄, pH 6,3

15% Ethanol

900 mM KCl

Material

N3-Puffer (Waschpuffer)

100 mM Tris-H₃PO₄, pH 6,3

15% Ethanol

1150 mM KCl

N5-Puffer (Elutionspuffer)

100 mM Tris-H₃PO₄, pH 8,5

15% Ethanol

1000 mM KCl

Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung

50% (v/v) Ethanol (96%)

10% (v/v) Essigsäure (100%)

0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250

Die aufgeführten Chemikalien wurden in H₂O gelöst, filtriert und lichtgeschützt aufbewahrt.

Dialysepuffer

10 mM KP, pH 7,5 oder

100 mM KP, pH 7,5

DNA-Probenpuffer

50% (v/v) Glycerin

0,1% (w/v) Bromphenolblau

in 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 gelöst.

dNTP-Stammlösung

Die einzelnen dNTPs wurden ausgehend von einer 100 mM Stammlösung in 1 mM Tris-HCl, pH 8,5 auf 10 mM verdünnt und bei -20°C gelagert.

Ethidiumbromid-Stammlösung

10mg/ml Ethidiumbromid in H₂O gelöst

Glycerin (87%) in H₂O

Material

IPTG-Stammlösung

1M IPTG in H₂O gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert

IPTG-Stammlösung für blau-weiß Screening

0,1 M IPTG in H₂O gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert

Kaliumphosphatpuffer

1 M K₂HPO₄, 1 M KH₂PO₄

Der gewünschte pH-Wert wurde über das Mischverhältnis der beiden Lösungen eingestellt.

Kanamycin-Stammlösung

75 mg/ml Kanamycinsulfat in H₂O gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert

Protogel™

30% (v/v) Acrylamid

0,8% (v/v) Bisacrylamid

Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Puffer für Kinetikmessungen

60°C: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 [bei 25°C auf pH 8,5 eingestellt unter der Annahme, dass $d\text{pK}_a/\text{°C} = -0,028$ (Stoll und Blanchard, 1990)]

37°C: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 [bei 25°C auf pH 7,85 eingestellt unter der Annahme, dass $d\text{pK}_a/\text{°C} = -0,028$ (Stoll und Blanchard, 1990)]

25°C: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

Die Konzentration an MgCl₂ wurde variiert.

Puffer für Markierung von ssTrpD-Varianten mit Fluoreszenzfarbstoffen

150 mM Hepes pH 7,5, 300 mM NaCl, 0,5 mM TCEP, 0,065% (v/v) Tween 20

Puffer für Titration von ssTrpD-wt mit Anthranilsäure und Tryptophan

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

Die Konzentration an MgCl₂ wurde variiert.

Material

1 x SDS-PAGE Laufpuffer

0,025 M Tris
0,1% (w/v) SDS
0,2 M Glycin

2 x SDS-PAGE Auftragspuffer

10% (w/v) Glycerin
5% (v/v) β -Mercaptoethanol
2% (v/v) SDS
0,01% (w/v) Bromphenolblau
1,25 M Tris-HCl, pH 6,8

SDS-PAGE Sammelgelpuffer

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

SDS-PAGE Trenngelpuffer

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

SDS-PAGE Trenn- und Sammelgel (12,5%)

Die Angaben gelten für 13 Gele

	Trenngel	Sammelgel
SDS-Trenngelpuffer	16,5 ml	
SDS-Sammelgelpuffer		6,25 ml
Acrylamidstammlösung (30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid) Protogel	27,4 ml	5 ml
H ₂ O	20,8 ml	13,25 ml
TEMED	0,075 ml	0,025 ml
APS-Stammlösung (10%)	0,165 ml	0,075 ml

Material

5 x TBE-Puffer

445 mM	Tris
445 mM	Borsäure
12,5 mM	EDTA

TFB I

100 mM	KCl
50 mM	MnCl ₂
30 mM	KOAc
10 mM	CaCl ₂
15% (v/v)	Glycerin (87%)

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von Essigsäure auf 5,8 eingestellt.

TFB II

10 mM	Tris-HCl
10 mM	KCl
75 mM	CaCl ₂
15% (v/v)	Glycerin

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von KOH auf 7,0 eingestellt.

TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin)

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

Thiamin-Stammlösung

1 mg/ml in H₂O gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert

X-GAL (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-B-D-Galaktopyranosid)

50 mg/ml in H₂O gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert

2.11 Nährmedien

Zur Sterilisation wurden die Medien 20 min bei 121°C autoklaviert. Bei Selektivmedien wurden die entsprechenden Antibiotika nachträglich in Form von sterilfiltrierten 1000-fach konzentrierten Stammlösungen zugegeben.

Luria-Bertani-(LB)-Medium

0,5% (w/v) Hefeextrakt
1% (w/v) Trypton
1% (w/v) NaCl

SOB-Medium

0,5% (w/v) Hefeextrakt
2% (w/v) Trypton
0,05% (w/v) NaCl

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂ und 2,5 mM KCl (Endkonzentrationen).

Agarplatten

Den entsprechenden Nährmedien wurde 1,5% (w/v) Bacto-Agar vor dem Autoklavieren und Antibiotika in einer 1:1000 Verdünnung nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.12 Software

BioCAD Perfusion Chromatography Workstation, Version 3.01: Perceptive Biosystems

Bioedit, Version 7.0.0, IBIS Therapeutics, 2004

Cary Eclipse, Version 1.0 (75): Varian Australia Pty Ltd. 1999/2000

Cary Eclipse, Version 1.1 (132): Varian Australia Pty Ltd. 2002

Cary Win UV, Version 2.0 (25): Varian Australia Pty Ltd. 1999

Cary Win UV, Version 3.0 (182): Varian Australia Pty Ltd. 2002

Chromas, Version 1.45: Conor Mc Carthy 1996-1998

Material

Corel draw, Version 11: Corel Corporation 2002

COSY, Version 5.5: (Eberhard, 1990)

ISIS DRAW, Version 5.5: public version 19.04.1994

Molecular Analyst, Version 1.5: BioRAD 1992-1996

Wisconsin Package, Version 10.2-UNIX: Genetics Computer group (GCG), Madison, Wisconsin, USA 1982-2001

Sigma Plot, Version 8.0: SPSS inc.2002

Smart FTP, Version 1.0: Mike Walter, 1998-2001

Swiss PDB Viewer, Version 3.7 b: N. Guex, 1995-1999

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Sterilisation von Geräten, Nährmedien und Lösungen

Hitzestabile Glaswaren und Lösungen wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden in Stammlösungen angesetzt und je nach Volumen durch einen Membranfilter der Porengröße 0,2 µm oder durch einen Spritzenfilter der Porengröße 0,22 µm filtriert.

3.1.2 Anzucht und Lagerung von *E. coli*-Stämmen

E. coli-Stämme wurden bei 37°C unter Schütteln bei 110 bzw. 230 rpm in LB-Medium oder Minimalmedium inkubiert. Bei plasmidcodierten Antibiotikaresistenzen wurde das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin 150 µg/ml, Kanamycin 75 µg/ml) aus einer tausendfach konzentrierten Stammlösung zugesetzt. Durch Ausplattieren der Zellsuspension auf Agarplatten und Inkubation üN im Brutschrank bei 37°C wurden Einzelkolonien angezogen.

Für eine dauerhafte Lagerung wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurde ein Aliquot einer üN-Kultur im Verhältnis 1:1 mit 87% Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

3.1.3 Abtöten von *E. coli*-Stämmen

Nicht mehr benötigte *E. coli*-Kulturen, sowie mit Bakterien in Kontakt gekommene Lösungen wurden vor der Entsorgung autoklaviert.

Methoden

3.1.4 Transformation von *E. coli*-Stämmen

3.1.4.1 Präparation hochkompetenter Zellen zur Elektrotransformation

Zur Präparation hochkompetenter Zellen wurden 400 ml LB-Medium mit einer 50 ml üN-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und im Schüttler bei 37°C und 230 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5–0,7 wurden die Zellen für 30 min bei 4°C abgekühlt, in 50 ml Aliquots aufgeteilt und für 15 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Die Pellets wurden sukzessive mit 50 ml, 20 ml und 10 ml H₂O gewaschen und danach in 400 µl 10% (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Zellen wurden in 50 µl Aliquots aufgeteilt und entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

3.1.4.2 Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen nach Dower et al. (1988)

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit maximal 20 µl salzfreier Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2500 V, 25 µF und 200 Ω. Die Zellen wurden im Anschluss in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen, für 1 h bei 37°C gekult, in verschiedenen Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert.

3.1.4.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde 1 l SOB-Medium mit einer 50 ml üN-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und im Schüttler bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4–0,6 wurden die Zellen für 15 min auf Eis gestellt. Nach der Ernte durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 15 min, 4°C) wurden die Zellen in 100 ml eiskaltem TFBII Puffer resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml eiskaltem TFBII Puffer resuspendiert und in 100 µl

Methoden

Aliquots aufgeteilt. Entweder wurden die Zellen sofort zur Transformation eingesetzt oder bei –80°C gelagert.

3.1.4.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen nach Inoue et al. (1990)

Zur chemischen Transformation wurde ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und 2-10 µl Plasmid-DNA hinzugegeben. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 45 s bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden 800 µl LB-Medium ohne Antibiotikum zugegeben und die Zellen bei 37°C für 1 h gekult. Anschließend wurden 100 µl der Zellsuspension in verschiedenen Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert.

3.1.4.5 Bestimmung der Transformationseffizienz (T_E)

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde ein Aliquot kompetenter Zellen wie oben beschrieben mit 50 ng Plasmid-DNA transformiert und nach einer einstündigen Kur je 100 µl einer Verdünnungsreihe auf LB-Medium ausplattiert (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000). Die Transformationseffizienz (T_E) wurde folgendermaßen berechnet:

$$T_E = \frac{(\text{Anzahl Kolonien} \cdot \text{Verdünnungsfaktor})}{\text{eingesetzte Menge DNA [\mu g]}} = \text{Anzahl Kolonien pro } \mu\text{g DNA (Gl. 1)}$$

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in einer wässrigen Lösung wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz entspricht eine Absorption bei 260 nm von 1 mit $^{0,1\%}A_{260} = 20 \text{ cm}^2\text{mg}^{-1}$ und einer Schichtdicke von 1 cm einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml dsDNA (35 µg/ml RNA oder 33 µg/ml ssDNA).

Hiernach berechnet sich die Konzentration wie folgt:

$$c_{\text{dsDNA}} = \frac{(A_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor})}{1000} \quad (\text{Gl. 2})$$

c = Konzentration [µg/µl]

Die Reinheit der DNA wurde durch die Aufnahme eines Absorptionsspektrums von 220-340 nm überprüft. Der Quotient A_{260}/A_{280} sollte mindestens 1,8 betragen. Über 300 nm sollte keine Absorption detektierbar sein, um eine Verfälschung der Messergebnisse durch Lichtstreuung ausschließen zu können.

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR Methode dient dazu, definierte DNA-Fragmente zu amplifizieren. Zunächst wird in einem ersten Schritt der DNA-Doppelstrang (Matrize) durch Erhitzen getrennt (Denaturierung). Im zweiten Schritt können nun zwei Oligonukleotide, die Primer, an die DNA-Einzelstränge komplementär binden (*Annealing*). Die hierdurch entstehenden 3'-OH-Enden werden in einem dritten Schritt von der thermostabilen DNA-Polymerase verlängert (*Extension*). Die so

Methoden

neu synthetisierten Doppelstränge stehen für den zweiten Zyklus ebenfalls als Matrize zur Verfügung stehen.

Im Allgemeinen wurde der REDTaq RCR Reaction Mix plus 1 µl Pwo-DNA-Polymerase mit einer 3'-5' Exonukleaseaktivität (*Proofreading*-Aktivität) verwendet.

In einem typischen 50 µl Ansatz wurden 10-50 ng Matrize, je 50 pmol Primer und 25 µl REDTaq RCR Reaction Mix mit 1 µl Pwo-DNA-Polymerase eingesetzt. Nach Zugabe aller Substanzen wurde die Probe in einem PCR-Block (Deckeltemperatur 110°C) wie folgt inkubiert:

1. Denaturierung	95 °C	2 min
2. Denaturierung	95 °C	30 s
3. <i>Annealing</i>	T _A °C	30 s
4. <i>Extension</i>	72 °C	2 min
5. abschließende Extension	72°C	10 min
6. Abkühlung	4 °C	∞

Die Schritte 2-4 wurden 40 x als Zyklus wiederholt.

Die *Annealing*-Temperatur der Primer lässt sich unter Berücksichtigung des GC-Gehaltes sowie der Länge folgendermaßen berechnen:

$$T_M = [69,3 + 0,41 \cdot (\%GC)] - \frac{650}{n} \quad (\text{Gl. 3})$$

$$T_A = \left[\frac{(T_{M1} + T_{M2})}{2} \right] - 3 \quad (\text{Gl. 4})$$

T_M : Schmelztemperatur des Primers [°C]

%GC : GC-Gehalt des Oligonukleotids [%]

n : Anzahl der Nukleotide des Primers

T_A : *Annealing*-Temperatur [°C]

Das Ergebnis der PCR wurde auf einem Agarosegel (0,5-1%) analysiert.

3.2.3 *Insert-screening*

Diese analytische Methode diente der schnellen Überprüfung von Klonierungen in die entsprechenden Vektoren. Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR wurden hier ganze Zellen aus Einzelkolonien dem PCR-Ansatz hinzugefügt, welche durch den Denaturierungsschritt von 95°C aufgeschlossen wurden. Hierzu wurden die Zellen mit einer sterilen Pipettierspitze von der Platte gepickt und in einem vorbereiteten PCR-Ansatz suspendiert. Die freigesetzte DNA diente in den folgenden Amplifikationsrunden als Matrize. Als Oligonukleotide dienten i.d.R. Primer, die 5'- und 3'-seitig der multiplen Klonierungsstelle (MCS) des Plasmids lagen.

3.2.4 *SOE-(splicing by overlap extension) PCR*

Die *Overlap Extension* PCR ist eine *in vitro*-Mutagenesetechnik, die in zwei Schritten zu einem gezielten Austausch eines oder mehrerer Nukleotide führt (Ho *et al.*, 1989; Horton *et al.*, 1989).

Es wurden zwei zueinander komplementäre Mutationsprimer von etwa 21 bp definiert, die im zentralen Bereich den gewünschten Nukleotidaustausch trugen. Im ersten Schritt wurden in zwei getrennten Ansätzen zwei Fragmente, jeweils mit dem klonierten, wildtypischen Gens als Matrize, amplifiziert. Dazu wurde jeweils ein Mutationsprimer und ein entsprechender 5'- bzw. 3'-seitig des Gens liegender Primer in die Reaktion eingesetzt. Die beide resultierenden Amplifikationsprodukte teilten eine kurze überlappende Region, die den eingeführten Austausch enthielt. Diese Fragmente („Megaprimer“) dienten im zweiten Schritt als Matrize, um mit Hilfe des 5'-seitig und des 3'-seitig liegenden Primers das komplette Gen zu amplifizieren (Abbildung 8).

Die amplifizierten Megaprimer wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten und extrahiert. Je 2 µl dienten im zweiten Schritt als Matrize, in welchem die *Annealing*-Temperatur grundsätzlich 40°C betrug.

Methoden

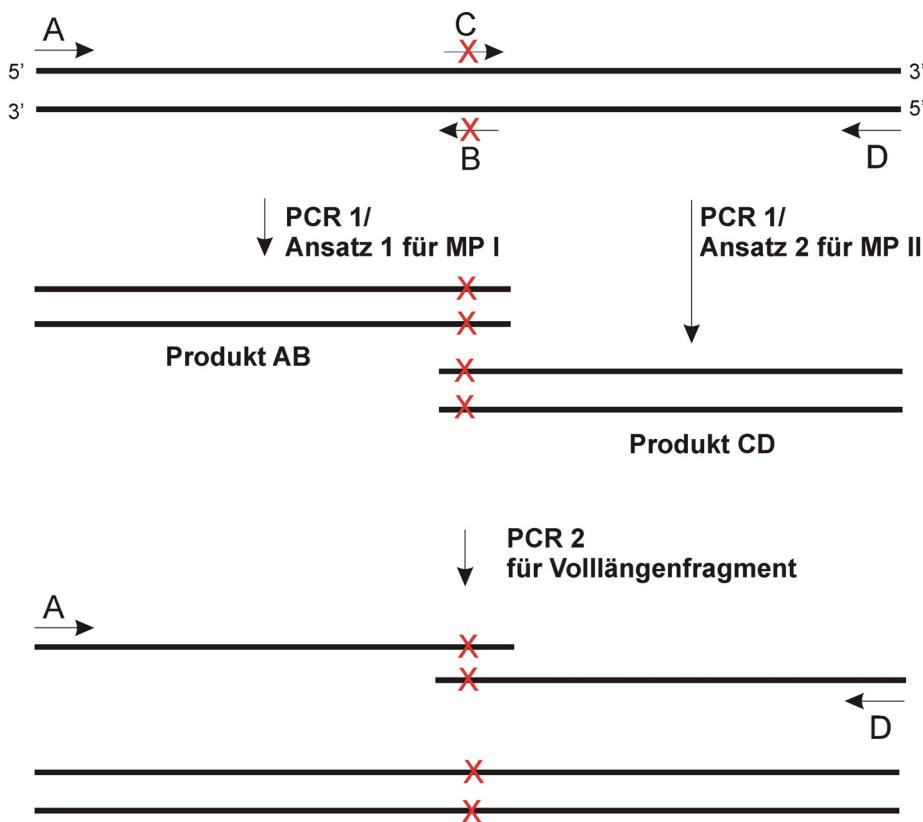


Abbildung 8: SOE (*Splicing by Overlap-Extension*) PCR.

In einer ersten PCR werden in zwei getrennten Ansätzen die Megaprimer MP I (Produkt der Primer A und B) und MP II (Produkt der Primer C und D) hergestellt. Die komplementären Mutationsprimer B und C tragen jeweils die gewünschten Nukleotidaustausche. Die Megaprimer dienten dann in einer zweiten PCR als Matrize, so dass nach Vervollständigung der Stränge (nicht gezeigt) mit den außenständigen Primern A und D das gesamte Gen amplifiziert werden kann.

3.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA zu präparativen Zwecken (Midi-Präparation AX100)

Die Isolierung von Plasmid-DNA zu präparativen Zwecken erfolgte mit Hilfe des NucleoBond AX DNA-Extraction Kit von Macherey Nagel nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für eine Isolierung aus einer 50 ml üN-Kultur wurden AX 100 Säulen verwendet. Die von der Säule eluierte DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und zentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico* bzw. Eppendorf 5415 D, 13000 rpm, 4°C, 1h). Anschließend wurde die DNA in 30 µl Wasser aufgenommen und bei –20°C gelagert.

Methoden

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode dient der Trennung und Analyse unterschiedlich langer DNA-Fragmente nach Mutagenese oder Restriktionsverdau. Zur Präparation eines Agarosegels wurde 1% (w/v) Agarose in 0,5% TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und bei einer Temperatur von ca. 60°C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Lösung wurde in eine Gelkammer mit Kamm gegossen und nach dem Aushärten mit 0,5% TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit mindestens 1/5 Vol DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 190 V (220 mA) für etwa 20 min durchgeführt und die DNA Fragmente unter UV-Licht der Wellenlänge 203 nm sichtbar gemacht und ggf. extrahiert.

3.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung aus einem Agarosegel wurden die Banden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und entweder mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) oder dem Nucleo spin Extract Kit (Nucleobond) nach Angabe des Herstellers aufgereinigt.

3.2.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die spezifische Spaltung von dsDNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet (Sambrook *et al.*, 1989, Wilson & Murray, 1991), die in der Ziel-DNA innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz schneiden und einzelsträngige Überhänge, sogenannte *sticky-ends* mit 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden, erzeugen. Für analytische Zwecke wurde etwa 0,5 µg DNA mit 2 U Enzym für 2-3 h, für präparative Zwecke 3-10 µg DNA mit 20 U Enzym üN bei 37°C inkubiert. Der Anteil der Restriktionsenzyme im Reaktionsansatz betrug nicht mehr als 10% des Volumens. Die Reaktionen wurden in dem jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Der Erfolg der Spaltung wurde mittels

Methoden

Agarosegelektrophorese überprüft. Bei einem präparativen Verdau erfolgte die Isolierung aus dem Gel durch Gelextraktion.

3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation von DNA Fragmenten wurde das Insertfragment in einem abgeschätzten 3-5 fachen Gewichtsüberschuss zum Vektorfragment zugesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 2 U T4-DNA-Ligase und dem entsprechenden Puffer für 1 h bei RT oder für 16 h bei 16°C.

3.2.10 DNA-Sequenzierung

Die Verifizierung von Nukleotidsequenzen mutagenisierter und klonierter Gene erfolgte über Auftragssequenzierung im Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin an der Universität Köln, bei der Firma GENterprise an der Johannes Gutenberg Universität Mainz und bei der Firma GENEArt im BioPark Regensburg nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit BigDye Farbstoffen.

Die abgegebenen Proben mit einem Gesamtvolumen von 6 bzw. 8 µl enthielten 0,3-1 µg DNA und jeweils 10 pmol eines Sequenzierungsprimers, wodurch die DNA linear amplifiziert wurde. Die Analyse der im ABI Format erhaltenen Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software Chromas bzw. GCG.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Genexpression und Proteinanreicherung im analytischen Maßstab

Die Expression der verschiedenen *trpD* Gene erfolgte heterolog in *E.coli* Zellen. Entsprechend der verwendeten Plasmide (pDS bzw. pET Vektoren) wurde zur Expression entweder das pDS-pDM Expressionssystem mit KK8 Zellen oder das pET System mit BL21 (DE3) Zellen verwendet. Ausgehend von einer 5 ml Vorkultur wurde eine 50 ml Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inkkuliert und bei 37°C und 230 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 wurde die Kultur in zwei Aliquots aufgeteilt und in einer Hälfte die Genexpression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert.

Nach Inkubation üN bei 37°C und 230 rpm wurden 10 ml der Kultur abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810R, 4000 rpm, 15 min, 4°C) und das Zellpellet in 1 ml 100 mM KP-Puffer, pH 7,5 aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen unter Eiskühlung mittels Ultraschall aufgeschlossen (Branson Digital Sonifier, Model 250 D oder W-250D, Amplitude 20%, 1 min).

Von der Zellsuspension wurden 100 µl abgenommen, abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico* oder Eppendorf 5415 D, 13000 rpm, 5 min, RT) und das Pellet in 100 µl 100 mM KP-Puffer, pH 7,5 resuspendiert (Probe P = Pellet). Die restlichen 900 µl wurden ebenfalls abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico* oder Eppendorf 5415 D, 13000 rpm, 5 min, RT) und 100 µl des Überstandes entnommen (Probe C = *crude extract*). Weitere 100 µl des Überstandes wurden einem Hitzeschritt unterzogen (ssTrpD-wt: 75°C, 15 min; ssTrpD-Varianten: 65°C, 15 min; tmTrpD-wt: 75°C, 15 min; aaTrpD-wt: 80°C, 20 min) und erneut abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico* oder Eppendorf 5415 D, 13000 rpm, 5 min). Der Überstand (Probe H = *heat step*) wurde aufbewahrt.

Sämtliche Aliquots wurden 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C erhitzt und kurz abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico* oder Eppendorf 5415 D, 13000 rpm, 2 min). Die Analyse der Proben P, C und H erfolgte mittels SDS-PAGE.

Methoden

3.3.2 Genexpression und Proteinanreicherung im präparativen Maßstab

Ein auf der Basis der analytischen Proteinherstellung ausgewählter Klon wurde, ausgehend von einer 50 ml üN-Kultur, in einer 1 l Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inkokuliert und bei 37°C und 110 rpm inkubiert. Bei Verwendung des pDS/pDM Systems wurde die Genexpression bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Bei Verwendung des pET-Systems wurde meist auf eine Induktion mit IPTG verzichtet, da in der Mehrzahl der Fälle aus unbekannten Gründen kein Unterschied zwischen induzierter und nicht induzierter Probe festzustellen war. Die Zellen wurden weitere 12 h bei 37°C und 110 rpm inkubiert.

Im Falle von ssTrpD und seiner Varianten wurde nach der Zellernte (Sorvall RC-5B, GS3 Rotor, 4000 rpm, 15 min, 4°C) das Pellet in 30 ml 100 mM KP-Puffer, pH 7,5 aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte unter Eiskühlung mittels Sonifikation (Branson Digital Sonifier, Model D-250 oder W-250 D, Amplitude 50%, 2 x 2 min). Zum Abtrennen der Zellreste erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (Sorvall RC-5B oder RC2-B, Rotor HFA 22500, 13000 rpm, 30 min, 4°C), dessen Überstand den löslichen Zellextrakt bildete.

Im Falle von tmTrpD und aaTrpD wurde das Zellpellet nach der Ernte in 10 mM KP Puffer, pH 7,5 aufgenommen und nach dem Zellaufschluss dem löslichen Extrakt 10 µl Benzonase-Stammlösung [25U/µl] zum Abbau von Nukleinsäuren zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1 h.

3.3.3 Hitzeschritt

Der lösliche Zellextrakt wurde, gegebenenfalls nach dem Benzonaseverdau, erhitzt, wodurch ein großer Anteil der thermolabilen Wirtsproteine ausfiel. Abhängig von der Stabilität der Protein-Varianten wurde der Hitzeschritt bei 65-80°C für 15-20 min durchgeführt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (Sorvall RC-5C oder RC2-B, Rotor HFA 22500, 13000 rpm, 30 min, 4°C) wurden die aggregierten Wirtsproteine abgetrennt. Der lösliche Überstand mit dem

Methoden

jeweiligen TrpD Protein konnte nun einer Affinitätschromatographie unterzogen werden.

3.3.4 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie basiert auf der spezifischen, reversiblen Wechselwirkung von Proteinen mit an der Säulenmatrix gebundenen Liganden. Die Elution des Proteins von der Säulenmatrix erfolgt durch die kompetitive Verdrängung des Proteins vom immobilisierten Liganden.

Die Chromatographie erfolgte an einer Biocad Sprint Perfusions-Chromatographie-Anlage (Perkin Elmer) oder einem Äkta Basic 10 better System (GE Healthcare).

3.3.4.1 Nickel-Chelat-Chromatographie

Bei der verwendeten Poros MC/20 Säule (Applied Biosystems, SV 7,9 ml) stellen an die Säulenmatrix gebundene Nickel-Ionen Koordinationsstellen für den N- oder C-terminal angefügten His₍₆₎-Tag eines Proteins zur Verfügung (2.3.1, 2.3.3). Die Elution erfolgt durch einen Imidazolgradienten, wobei das Imidazol um die vom Protein besetzten Bindestellen der Säule konkurriert. Die verwendete Säule kann mit einem Druck von maximal 170 bar betrieben werden. In dem Auftragspuffer darf sich weder EDTA noch DTT befinden. EDTA komplexiert die gebundenen Nickel-Ionen und entfernt sie somit von der Säule, während DTT diese zu elementarem Nickel reduziert.

Vor jedem Lauf bzw. bei Reinigung der gleichen Protein-Variante nach zweimaliger Benutzung wurde die Säule nach folgendem Schema mit Nickel-Ionen beladen:

1. 10-20 SV 50 mM EDTA, 1 M KCl
2. 5-10 SV H₂O
3. 10-15 ml 150 mM NiCl₂ (pH 4,5-5)
4. 5-10 SV H₂O

Methoden

5. 5-10 SV 0,1 M KCl
6. 5-10 SV 100 mM KP pH 7,5, 300 mM KCl

Die Flussrate betrug 10 ml/min.

Die Reinigung erfolgte nach folgender Methode:

Äquilibrieren	4 SV 100 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl Flussrate 10 ml/min
Beladen über den Superloop	x ml Zellextrakt nach Hitzeschritt Flussrate 2-5 ml/min
Waschen	20 SV 100 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl Flussrate 10 ml/min
Eluieren	20 SV Gradient von 0-600 mM Imidazol in 100 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl Flussrate 10 ml/min Es wurden 1,5 ml Fraktionen gesammelt.
Äquilibrieren	2 SV 100 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl Flussrate 10 ml/min

Die Elution der TrpD-Varianten wurde über die Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE.

3.3.4.2 Strep-Tactin-Chromatographie

Das Strep-Tag Reinigungssystem basiert auf der selektiven Bindung eines N- oder C-terminal an einem Protein angefügten Strep-tag II an ein moduliertes und immobilisiertes Streptavidin (Strep-Tactin). Die Elution erfolgt mit Hilfe von Desthiobiotin, welches mit dem Strep-Tag II um die Bindung an der Säule konkurriert. Die verwendete Säule der Firma Iba GmbH (SV 1 ml, Strep-Tactin Macro Prep) wurde an eine Peristaltikpumpe angeschlossen. Die Reinigung verlief nach folgendem Schema:

Äquilibrieren	4 SV 100 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Beladen	1-10 ml Proteinlösung

Methoden

Waschen	5 SV 100 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Elution	6 SV 100 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin Es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt.
Regenerierung	15 SV 100 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA (Hydroxyazophenyl-Benzol-Säure)
Waschen	4 SV 100 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

3.3.5 Abspaltung des N-terminalen His₍₆₎-Tags durch Trypsin

Bei Trypsin handelt es sich um eine Serinprotease, die C-terminal von Arginin und Lysin spaltet. In der vorliegenden Arbeit diente der Trypsinverdau der Abspaltung des N-terminalen His₍₆₎-Tags von ssTrpD Varianten und tmTrpD nach der Reinigung über eine Nickel-Chelat-Säule. Die Verwendung von Trypsin anstelle von Thrombin war möglich, weil ssTrpD und tmTrpD selbst durch Trypsin nicht gespalten werden (A. Ivens, 1998, Doktorarbeit).

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradfordtest ermittelt (3.4.3.1) und Trypsin in einem molaren Verhältnis von 1:100 gegenüber dem Protein zugegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei RT inkubiert und der vollständige Verdau über SDS-PAGE kontrolliert.

3.3.6 Präparative Gelfiltration

Das Trennprinzip der Gelfiltration wird unter 3.4.4 erläutert. Zur Durchführung einer präparativen Gelfiltration im Kühlraum bei 4°C wurde eine HiLoad 26/60 Superdex 75 Säule (Amersham Pharmacia) mit einem SV von 120 ml an einer FPLC-Anlage (LCC-501 Plus, Amersham Pharmacia) verwendet. Vor dem Lauf wurde die Säule mit mindestens 1 SV 100 mM KP-Puffer, pH 7,5, 300 mM KCl äquilibriert. Die Proteinprobe wurde über den Superloop in einem Volumen von höchstens 7 ml aufgetragen. Bei einer Flussrate von 1 ml/min erfolgte die Elution mit dem Äquilibrierungspuffer und wurde mittels Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt.

3.3.7 Dialyse von Proteinlösungen

Um die vereinigten Säulenfraktionen nach der jeweiligen Chromatographie von niedermolekularen Substanzen zu befreien und das Protein umzupuffern, wurde die Lösung gegen ein mindestens 100 faches Volumen an gewünschtem Puffer unter Rühren für 4-6 Stunden bei 4°C dialysiert. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch (SERVA) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 14 kDa verwendet, welcher das gereinigte Protein zurückhält, während niedermolekulare Substanzen die Membran passieren können. Die Schläuche wurden zuvor in Wasser eingeweicht.

3.3.8 Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Die Proteinlösungen wurden mit Hilfe der Amicon MW-30 Zentrifugenröhrchen über eine semipermeable Membran nach Herstellerangaben (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4°C) einkonzentriert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach dem Ausgangsvolumen der einzukonzentrierenden Proteinlösung und dem gewünschten Endvolumen.

3.3.9 Lagerung von Proteinlösungen

Die einkonzentrierten Proteinlösungen wurden in kleinen Volumina (10-20 µl) in flüssigen Stickstoff eingetropft und als feste Kügelchen bei –80°C gelagert.

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (denaturierende PAGE) werden Proteine nach Ihrer Größe aufgetrennt (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert und negative Ladungen eingebracht. Hierbei bindet etwa 1,4 g SDS pro 1 g Protein, was einem SDS Molekül pro zwei AS entspricht. Im Vergleich eines nativen Proteins zu einem mit SDS komplexierten Protein kann die Eigenladung im SDS-Protein-Komplex vernachlässigt werden, so dass das Verhältnis von Masse zu Ladung identisch ist und die Auftrennung nach der Größe entsprechend einem Siebeffekt erfolgt. Das Molekulargewicht der Proteine wurde durch Vergleich mit einem Proteinlängenstandard (Marker) abgeschätzt.

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Zur Analyse und Abschätzung des Reinheitsgrades wurden 12,5%ige Gele mit Trenn- und Sammelgelen verwendet (Fling & Gregerson, 1986). Die Elektrophorese wurde bei 250 V (45 mA) für etwa 40 min durchgeführt.

3.4.2 Färbung der SDS-Gele

3.4.2.1 mit Coomassie Brilliant Blue G250

Mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 können Proteine bis zu einer Nachweisgrenze von 0,2-0,5 µg/mm² detektiert werden. Hierzu wurden die Gele 15 min in der Färbelösung geschwenkt und im Anschluss unspezifische Färbung durch Aufkochen in Wasser (Mikrowelle, 3 x 2 min) entfernt. Die Dokumentation erfolgte über den Durchlicht-Tisch des GelDoc Systems.

Methoden

3.4.2.2 durch Silberfärbung nach Nekeskoven (1988)

Im Vergleich zur Coomassie Färbung ist die Silberfärbung 100- 1000 fach sensitiver, wobei 0,1-1,0 ng/mm² eines Proteins in einer einzelnen Bande nachgewiesen werden können. Der Färbungsprozess beruht auf der Änderung des Oxidationszustandes von Silberionen ($\text{Ag}^{1+} \rightarrow \text{Ag}^0$), wenn sie an Seitenketten von Aminosäuren binden (Merril *et al.*, 1984). Die Färbung wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Fixierung I 2 x 15 min in 30%EtOH, 10% HAc

Fixierung II 30 min in 30% EtOH, 0,5% NaAc pH 6,0, 0,2% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,5% Glutaraldehyd

Waschen 3 x 10 min in H_2O

Färben 15 min in 0,1% AgNO_3 , 0,02% Formaldehyd

Entwickeln 5-10 min in 2,5% Na_2CO_3 , 0,01% Formaldehyd (pH 11,3-11,8)

Stoppen 0,05 M EDTA, pH 7,3

Waschen 3 x 10 min in H_2O

3.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.4.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch den Bradford-Test (1976)

Der Bradford-Test dient der quantitativen Bestimmung des Proteingehalts von wässrigen Lösungen. Der in der Färbelösung enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 bindet an Proteine, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt (Bradford, 1976). Die Bindung erfolgt weitgehend unspezifisch, jedoch vorwiegend an kationische, nichtpolare und hydrophobe Reste. In einem Bereich von 0,2-1,4 mg Protein pro ml Lösung ist die Absorption annähernd linear.

Für den Test wurden 800 µl verdünnte Proteinlösung mit 200 µl Biorad-Reagenz versetzt und nach 5 min Inkubation die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Referenz diente die gleiche Menge Reagenz mit Puffer versetzt.

Methoden

Anhand einer Kalibrierungskurve mit Rinderserumalbumin wurde die Proteinmenge nach folgender Geradengleichung bestimmt:

$$c = \frac{(A_{595} - b)}{m} \quad (\text{Gl. 5})$$

- c : Proteinkonzentration [mg/ml]
A₅₉₅ : Absorption bei 595 nm
b : y-Achsenabschnitt der Kalibrierungsgeraden
m : Steigung der Kalibrierungsgeraden

3.4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Absorptionspektroskopie

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie Cystine (Disulfidbrücken) absorbieren UV-Licht im Bereich von 250-300 nm.

Nach Pace *et al.* (1995) kann aus der Aminosäuresequenz der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ϵ_{280}) und daraus, bei bekanntem Molekulargewicht, der spezifische Extinktionskoeffizient (${}^{0,1\%}A_{280}$) berechnet werden:

$$\epsilon_{280} = \sum \text{Trp} \times 5500 + \sum \text{Tyr} \times 1490 + \sum \text{Cystine} \times 125 \quad (\text{Gl. 6})$$

$${}^{0,1\%}A_{280} = \frac{\epsilon_{280}}{M_r} \quad (\text{Gl. 7})$$

- ϵ_{280} : molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$M^{-1}cm^{-1}$]
 ${}^{0,1\%}A_{280}$: spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [cm^2mg^{-1}]
M_r : Molekulargewicht [g/mol]

Methoden

Durch Einsetzen in das Lambert-Beersche-Gesetz kann somit die Proteinkonzentration berechnet werden:

$$c = \frac{A_{280}}{d \cdot 0,1\% A_{280}} \quad (\text{Gl. 8})$$

c : Konzentration [mg/ml]

A_{280} : Absorption bei 280 nm

d : Schichtdicke der Küvette [cm]

$0,1\% A_{280}$: spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$]

Es wurde ein Spektrum von 240-340 nm aufgenommen, wobei sich das Absorptionsmaximum des Proteins bei 280 nm befinden sollte. Der Quotient A_{280}/A_{250} sollte mindestens 1,8 betragen und es sollte keine Absorption oberhalb von 300 nm detektiert werden, da diese auf eine durch Aggregatbildung hervorgerufene Lichtstreuung hindeutet.

In Tabelle 1 sind die molaren und spezifischen Extinktionskoeffizienten, sowie die Molekulargewichte der untersuchten TrpD-Varianten aufgelistet.

Tabelle 1: Molekulargewichte, spezifische und molare Extinktionskoeffizienten der untersuchten wildtypischen TrpD Proteine und der ssTrpD Varianten.

TrpD	molarer Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	Molekulargewicht [g/mol]	spezifischer Extinktionskoeffizient [cm^2/mg]
ssTrpD wt	11920	37532	0,32
ssTrpD G79F	11920	37622	0,32
ssTrpD D83G	11920	37474	0,32
ssTrpD S91A	11920	37516	0,32
ssTrpD H107A	11920	37466	0,32
ssTrpD N109A	11920	37489	0,32
ssTrpD F149S	11920	37472	0,32
ssTrpD R164A	11920	37447	0,32

Methoden

ssTrpD R170A	11920	37447	0,32
ssTrpD G177F	11920	37622	0,32
ssTrpD F193W	17420	37589	0,46
ssTrpD D83G+F149S	11920	37414	0,32
ssTrpD D83G+D223N+E224Q	11920	37472	0,32
ssTrpD H107A+P178A	11920	37440	0,32
ssTrpD H154A+R164A	11920	37381	0,32
ssTrpD N162C+K280C	11920	37496	0,32
ssTrpD D223N+E224Q	11920	37530	0,32
tmTrpD wt	12950	37858	0,34
aaTrpD1 wt	7450	36986	0,2
aaTrpD2 wt	25520	35228	0,72

3.4.4 Analytische Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltration werden Proteine aufgrund ihrer Größe voneinander getrennt. Das Säulenmaterial besteht aus Dextransmolekülen, die ein Netzwerk aus porösen Teilchen mit Zwischenräumen bilden. Große Moleküle passieren die Säule schneller, da sie nicht in die Poren der Matrix eindringen können, während kleine Moleküle längere Zeit zum Passieren der Säule benötigen. Durch analytische Gelfiltration lässt sich das apparente Molekulargewicht eines Proteins und damit, bei bekanntem Molekulargewicht des Monomers, auch sein Oligomerisierungsgrad abschätzen. Weist das aufgetragene Protein jedoch keine globuläre Form auf, können sich erhebliche Differenzen zum tatsächlichen Molekulargewicht ergeben. Außerdem lässt das Elutionsprofil Aussagen über die Homogenität der Proteinlösung zu. Je symmetrischer ein Peak, desto homogener ist die Proteinlösung.

Es wurde eine Superdex 75 Säule der Firma GE Healthcare mit einem SV von 24 ml verwendet. Zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden wurde die Säule mit 1 SV des Gelfiltrationspuffers äquilibriert und anschließend die Proteine des LMW-Gelfiltrationskalibrierungskits nacheinander nach Herstelleranleitung auf die Säule gegeben. Durch Auftragung des Logarithmus des theoretischen

Methoden

Molekulargewichts gegen die Elutionszeit wurde die Kalibrierungsgerade erstellt (Anhang).

Es wurden jeweils 100 µl einer Proteinlösung der Konzentration 1 mg/ml über einen Auftragsloop auf die zuvor äquilibrierte Säule injiziert. Die Elution erfolgte mit 50 mM KP Puffer, pH 7,5 bei RT mit einer Flussrate von 0,5 ml/min und wurde über die Messungen der Absorption bei 260 nm und 280 nm verfolgt.

3.4.5 Western-Blot

Unter einem Western-Blot versteht man den (Elektro-)Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Membran mit anschließendem immunologischem Nachweis (Towbin *et al.*, 1979).

Zunächst wurde das SDS-Gel nach erfolgter Elektrophorese ca. 15 min in PBS Puffer geschwenkt und die Membran einige Sekunden in 100% Methanol (PVDF) oder in H₂O (Nitrocellulose) aktiviert. Für den Blot wurde, von oben nach unten folgender Aufbau verwendet: Anode, 3 Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes und in PBS getränktes Whatman-Papier, PVDF oder Nitrocellulose Membran, SDS-Gel, 3 Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes und in PBS getränktes Whatman-Papier, Kathode. Der Blot wurde bei 2,5 mA/cm² (hier 300 V, 120 mA) für 30 Minuten in Transfer-Puffer (20 mM Tris, 200 mM Glycin, 20 % Methanol) im *semi-dry* Verfahren durchgeführt. Die Membran wurde anschließend in Ponceau S Lösung angefärbt, um dem Proteintransfer zu überprüfen und die Banden des Größenstandards mit einem Stift markieren zu können. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei RT.

3.4.5.1 Immunologischer Nachweis des N-terminalen His₍₆₎-Tags

Zum Nachweis des N-terminalen His₍₆₎-Tags wurde die Membran wie folgt behandelt:

Entfärben	2 x 10 min in je 20 ml 1 x PBS, 0,05% Tween 20-Puffer
	1 x 10 min in 20 ml 1 x PBS-Puffer

Methoden

Blockieren freier Bindestellen auf der Membran

1 h in 20 ml 7% (w/v) Magermilchpulver in 1 x PBS, 0.05%
Tween 20-Puffer

Inkubation mit Anti-His₍₆₎ Peroxidase (ROCHE): 100 mU/ml

1 h in 20 ml 7% (w/v) Magermilchpulver

Waschen 2 x 10 min in je 20 ml 1 x PBS, 0,05% Tween 20-Puffer

1 x 10 min in 20 ml 1 x PBS-Puffer

Anfärben x min in 5 ml TMB Membrane Peroxidase Substrat (KPL Inc.,
Gaithersburg, Maryland, USA, www.kpl.com)

Stoppen in ca. 50 ml H₂O

3.4.5.2 Immunologischer Nachweis des N-terminalen Strep-Tags

Zum Nachweis des N-terminalen Strep-Tags wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

Entfärbung 2 x 10 min in je 20 ml 1 x PBS, 0,05% Tween 20-Puffer
1 x 10 min in 20 ml 1 x PBS-Puffer

Blockieren freier Bindestellen auf der Membran

1 h in 20 ml 3% (w/v) BSA, 1 x PBS, 0,05% Tween 20-Puffer

Inkubation mit Anti-Strep-Tactin Alkalische Phosphatase (Iba GmbH): 65 mU/ml
1 h in 10 ml 1 x PBS, 0,05% Tween 20-Puffer

Waschen 2 x 10 min in je 20 ml 1 x PBS, 0,05% Tween 20-Puffer
1 x 10 min in 20 ml 1 x PBS-Puffer

Anfärben 1 Tablette NBT/BCIP (Roche) in 10 ml H₂O

Stoppen in ca. 50 ml H₂O

Durch die katalytische Aktivität des Enzyms wird die Phosphatgruppe des BCIP abgespalten. Gleichzeitig wird durch die Alkalische Phosphatase NBT reduziert. In dephosphorylierter Form erscheint BCIP blau, die reduzierte Form von NBT bildet einen violetten schwerlöslichen Niederschlag, gemeinsam ergeben beide Farbstoffe ein blauviolettes Präzipitat.

3.5 ***Biophysikalische Methoden zur Proteincharakterisierung***

3.5.1 **Circular-Dichroismus-Spektroskopie**

Die CD-Spektroskopie ist eine Form der Absorptionsspektroskopie im UV/VIS-Bereich und beruht auf der unterschiedlichen Absorption von rechts und links circular polarisiertem Licht durch eine optisch aktive Substanz. Hierbei sind entweder die Chromophore selbst chiral oder sie liegen in einer asymmetrischen Umgebung vor.

Die CD-Spektroskopie ist eine geeignete Methode zur Untersuchung der Proteinstruktur, bei der man zwischen zwei spektralen Regionen unterscheidet. In fern-UV-Spektren (185-250 nm) wird hauptsächlich die Absorption der Peptidbindungen gemessen, wobei das benachbarte C_α-Atom das chirale Zentrum darstellt. Durch diese Messungen können Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur eines Proteins gezogen werden. In Nah-UV-Spektren (250-310 nm) wird vorwiegend die Absorption der in der asymmetrischen Proteinumgebung lokalisierten aromatischen Aminosäuren detektiert. Da bereits kleinste Änderungen in der Umgebung der Chromophore sichtbar werden, wird diese Methode zur Untersuchung der Tertiärstruktur von Proteinen verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden lediglich fern-UV CD-Spektren aufgenommen.

Die Differenz der Absorptionskoeffizienten von rechts und links circular polarisiertem Licht wird als Elliptizität (Θ) gemessen und nach folgender Formel auf die Zahl der Aminosäuren des Proteins normiert (Schmidt, 1997):

$$\Theta_{\text{MRW}} = \frac{\Theta_{\text{obs}} \cdot \text{MRW}}{c \cdot d} = \frac{\Theta_{\text{obs}} \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_a} \quad (\text{Gl. 9})$$

Θ_{MRW} : durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure
[Grad · cm²/dmol]

Θ_{obs} : gemessene Elliptizität [mGrad]

MRW : mittleres Molekulargewicht der Aminosäuren [g/mol]

Methoden

c	: Konzentration der Proteinlösung [mg/ml]
d	: Schichtdicke der Küvette [cm]
N _a	: Anzahl der Aminosäuren
M _r	: Molekulargewicht des Proteins [g/mol]

Alle Messungen wurden an einem JASCO J700 Spektralpolarimeter in einer 0,1 cm Küvette mit einem Volumen von 200 µl bei 20°C durchgeführt. Aus je 10 Messungen wurde der Mittelwert des CD-Signals gebildet und nach Gleichung (9) in Θ_{MRW} umgerechnet.

3.5.2 Röntgenstrukturanalyse

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Olga Mayans (Biozentrum der Universität Basel) erfolgte die Auflösung der Kristallstruktur des komplexierten ssTrpD-wt Proteins mittels *soaking* der Substrate. Hierzu wurden Kristalle des Apoenzyms, die nach Ivens *et al.* (2001) hergestellt wurden, in eine auf 4°C gekühlte Lösung getaucht, die aus 10 mM Hepes pH 8,0 versetzt mit 22% (v/v) Glyzerin und den Substraten bestand. Es wurden in drei Einzelansätzen die Substrate einzeln (10 mM Anthranilsäure, 1 min, 20°C; 10 mM PRPP/ 5 mM MgCl₂, 2 min, 4°C) und in Kombination (10 min, 4°C) eingesetzt. Für die Datenanalyse wurde das Programm APRV auf den Servern XDS und CNS herangezogen (Kabsch, 1993; Brunger *et al.*, 1998; Kroemer *et al.*, 2004).

3.5.3 Röntgenkleinwinkelstreuung (*small angle X-ray scattering*)

Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Dimitri Svergun (EMBL Hamburg) wurde die postulierte Domänenbewegung innerhalb des ssTrpD-wt mittels Röntgenkleinwinkelstreuung analysiert. Bei der Wechselwirkung von Röntgenstrahlen mit Makromolekülen werden die Elektronen der Atome angeregt mit der Frequenz der eingestrahlten Wellen zu schwingen, wobei ein diffuses Streubild (Streukurve) entsteht. Aus diesem können Informationen über die Größe und Form der Moleküle abgeleitet werden. Die Streukurven werden bei kleinen Beobachtungswinkeln aufgenommen, da für alle Streueffekte folgendes

Methoden

Reziprozitätsgesetz gilt: je größer, im Vergleich zur Wellenlänge, das beobachtete Objekt ist, desto kleiner sind die Winkel, bei denen Streuintensität beobachtet wird.

Die Streukurve kann nach einer Fourier-Transformation als Abstandsverteilungsfunktion dargestellt werden, d.h. es werden die Abstände aller Streuzentren voneinander gegen die Häufigkeit, mit der die Abstände vorkommen, aufgetragen.

Die Messungen wurden am DESY in Hamburg mit einer X33 Kamera (DORIS III) mit einem linearen Gasdetektor durchgeführt. Es wurden Proteinkonzentrationen zwischen 1,8 – 15 mg/ml in 10 mM Hepes pH 8,0 eingesetzt und Streukurven bei 4°C bei $0,15 < s < 3,2 \text{ nm}^{-1}$ ($s = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$, mit $2\theta = \text{Streuwinkel}$ und $\lambda = 0,15 \text{ nm} = \text{Wellenlänge}$) aufgenommen. Die Analyse der Daten erfolgte mit den Programmen PRIMUS (Konarev *et al.*, 2003) und GNOM (Svergun, 1992). Die Molekulargewichte von ssTrpD-wt wurden durch Vergleiche mit Referenzlösungen von Rinderserumalbumin ($M_R = 66 \text{ kDa}$) ermittelt.

3.5.4 Einzelmolekülspektroskopie

Ebenfalls im Rahmen einer Kooperation wurde mit der Arbeitsgruppe von Prof. Claus Seidel (Lehrstuhl für Molekulare Physikalische Chemie der Universität Düsseldorf) ssTrpD mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie untersucht. Diese Methode erlaubt es, frei in Lösung diffundierende Moleküle in einem heterogenen System zu untersuchen (Kühnemuth und Seidel, 2001). Hierzu wurde die Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) verwendet, mit der, nach Anregung der Fluoreszenz durch einen Argon-Ionen-Laser, die gesamte Emissionsinformation eines einzelnen Fluorophors erfasst werden kann. Hierzu zählen Fluoreszenzlebensdauer, Fluoreszenzanisotropie und Intensität in den zwei spektralen Bereichen G (grün) und R (rot). Hierbei drückt S_G/S_R das Verhältnis der Donoremission zur Emission des Akzeptors aus. Der Aufbau der Messapparatur ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

Es wurde die Signalspitzen-orientierte Auswertung (*burstwise analysis*) verwendet, wobei alle Photonen eines Einzelmoleküldurchtritts durch das Beobachtungsvolumen gemeinsam analysiert werden.

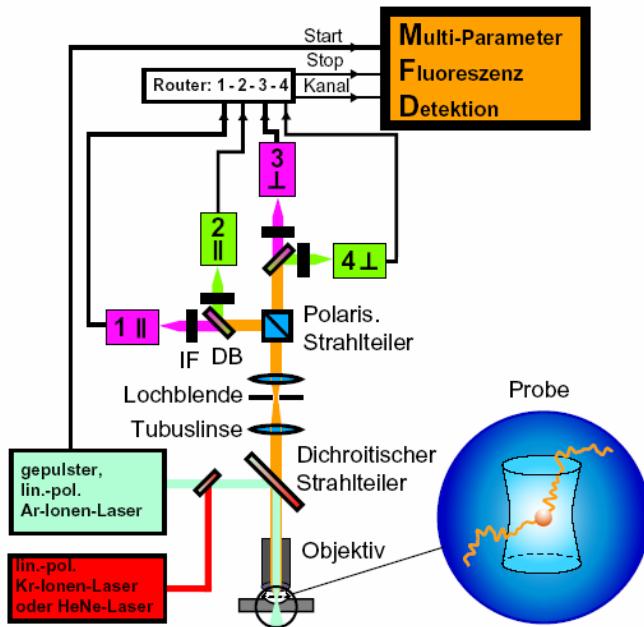


Abbildung 9: Konfokales Mikroskop mit Vier-Kanal-Detektionseinheit (Kühnemuth und Seidel, 2001).

Die Probe wird mittels Laser angeregt, die emittierte Fluoreszenz passiert den dichroitischen Strahlteiler und wird auf eine Lochblende fokussiert. Im Anschluss wird die Fluoreszenz durch einen polarisierenden Strahlteiler und zwei Langpaßfilter (DB) in vier verschiedene Fraktionen aufgeteilt. Bevor die Fluoreszenz auf die vier Detektoren gelangt, wird für jede Fraktion das verbliebene Streulicht durch Interferenzfilter (IF) herausgerechnet.

3.5.4.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

FRET ist ein Prozess, bei dem ein Donor-Fluorophor nach Anregung einen Teil seiner Elektronenanregungsenergie strahlungslos, in Form einer weitreichenden intermolekularen Dipol-Dipol Kopplung auf einen geeigneten Akzeptor überträgt (Förster, 1946). Handelt es sich bei dem Akzeptor ebenfalls um ein fluoreszierendes Molekül, wird bei vorliegendem FRET nach Anregung des Donors der Akzeptor-Chromophor Fluoreszenzlicht emittieren und die Donor-Fluoreszenz abschwächen (Förster, 1948). Um einen effizienten Energietransfer zwischen beiden Chromophoren zu gewährleisten, sollte der Abstand zwischen Donor und Akzeptor weniger als 100 Å betragen, da die FRET-Effizienz proportional zu $1/r^6$ (r =Abstand zwischen den beiden Chromophoren) abnimmt (Clegg, 1995). Für einen Transfer über große Distanzen sollte die Überlappung des Donoremissions- und des Akzeptoranregungsspektrums ausreichend groß sein. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Donor-Akzeptorpaar bestand aus

Methoden

den Farbstoffen Alexa-488 und Alexa-594 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Diese Verbindungen gehören zur Klasse der Rhodaminfarbstoffe und weisen neben ihrer Wasserlöslichkeit eine hohe Stabilität über einen großen pH-Bereich, Photostabilität sowie eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute auf. In Abbildung 10 sind die Strukturformeln, sowie die Absorptions- und Fluoreszenzspektren beider Farbstoffe gezeigt.

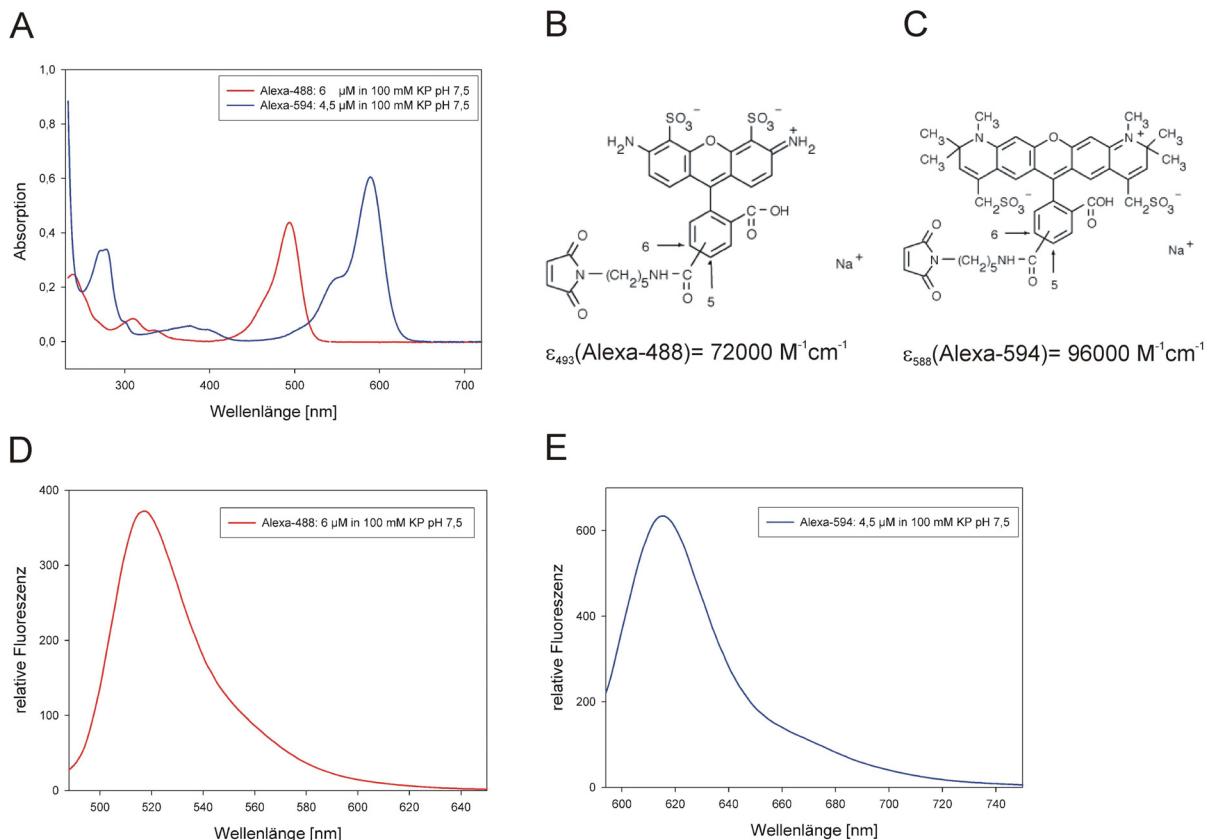


Abbildung 10: Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren der Farbstoffe Alexa-488 und Alexa 594.

- A: Absorptionsspektren der Farbstoffe Alexa-488 (rot) und Alexa-594(blau)
- B: Strukturformel und molarer Extinktionskoeffizient von Alexa-488
- C: Strukturformel und molarer Extinktionskoeffizient von Alexa-594
- D: Fluoreszenzemissionsspektrum von Alexa-488 nach Anregung bei 488 nm
- E: Fluoreszenzemissionsspektrum von Alexa-594 nach Anregung bei 594 nm

Liegen Alexa-488 und Alexa-594 zu weit von einander entfernt, kommt es nach Anregung des Donors bei einer Wellenlänge von 488 nm lediglich zu einer Donoremmission bei 518 nm, jedoch zu keinem bzw. nur uneffizientem FRET (Abbildung 11A). Ist die Entfernung von Donor und Akzeptor geringer, dann ist nach Anregung des Donors neben der Donoremmission auch ein Emissionssignal des Akzeptors bei 620 nm zu verzeichnen (Abbildung 11B). Der „Fürsterradius“,

Methoden

also der Abstand, bei der die Energieübertragung mit einer Effizienz von 50% erfolgt, liegt für das Paar Alexa-488 und Alexa-594 bei etwa 50 Å (Abbildung 11C).

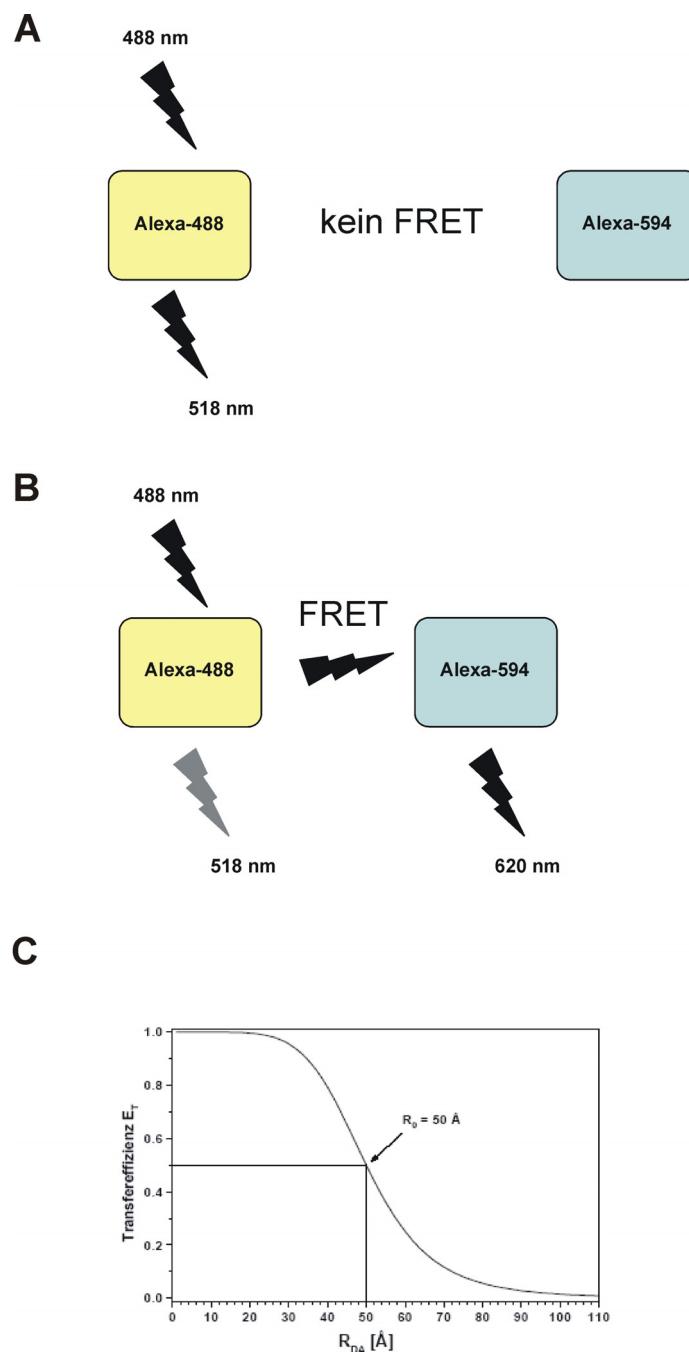


Abbildung 11: Schematische Darstellung von FRET anhand des Farbstoffpaars Alexa-488 (Donor) und Alexa-594 (Akzeptor).

Nach Anregung des Donors bei 488 nm emittiert er Licht der Wellenlänge 518 nm (A). Ist der Abstand beider Chromophore gering (B), kommt es zur strahlungslosen Energieübertragung auf den Akzeptor, der seinerseits Licht der Wellenlänge 620 nm emittiert.

C: Abhängigkeit der Transfereffizienz E_T von dem Abstand der Chromophore R_{DA} , R_0 : Förster-Radius.

Methoden

3.5.4.2 Proteinmarkierung mit Alexa-488 und Alexa-594

Die Markierung von ssTrpD-wt mit den Farbstoffen erfolgte über ihre Kopplung an zuvor durch gezielte Mutagenese eingebrachte Cysteinreste. Hierbei bildet der Fluorophor-Maleimid (Abbildung 10B, C) der Farbstoffe eine kovalente Bindung mit der Thiolgruppe des Cysteins aus.

Zunächst wurde das Protein mittels einer NAP 5 Säule in Markierungspuffer umgepuffert und die Farbstoffe eingewogen und gelöst, Alexa-488 in Markierungspuffer, Alexa-594 in DMF. Anschließend wurden in einem Gesamtansatz von 1 ml 2-4 μ M ssTrpD Protein mit einem jeweils 30-fachen molaren Überschuss der Farbstoffe Alexa 488 und 594 in Markierungspuffer für 5,5 h bei RT im Dunkeln inkubiert.

Überschüssiger Farbstoff wurde mit Hilfe von Amicon MW 30 Konzentratoren durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4°C) schrittweise aus der Proteinlösung ausgewaschen und der Fortgang des Trennprozesses über die Messung der Absorption des Durchlaufes verfolgt. Sobald kein freier Farbstoff mehr detektiert werden konnte, wurde ein Spektrum des markierten Proteins aufgenommen und das Verhältnis von Protein zu gebundenem Farbstoff bestimmt. Dabei wurden die Farbstoffkonzentrationen direkt aus dem Spektrum über ihre molaren Extinktionskoeffizienten bei 493 bzw. 588 nm bestimmt (Abbildung 10A). Zur Abschätzung der Proteinkonzentration wurde die Absorption der Lösung bei 280 nm (Tabelle 1) herangezogen, von der die Absorption der Farbstoffe bei dieser Wellenlänge abgezogen wurde. Der Farbstoffanteil wurde über die Absorption von Alexa-488 und Alexa-594 bei 493 nm bzw. 588 nm und das bekannte Verhältnis A_{493}/A_{280} bzw. A_{588}/A_{280} ermittelt.

3.5.5 Steady-state Enzymkinetik

Die Wechselzahlen k_{cat} und die Michaelis-Konstanten K_M wurden für die TrpD Proteine aus *Sulfolobus solfataricus*, *Thermotoga maritima* und *Aquifex aeolicus* unter Fließgleichgewichtsbedingungen (*steady state*) bestimmt.

In den Messungen wurde der enzymatische Umsatz von Anthranilsäure und PRPP zu PRA und PP_i (Abbildung 12) an einem Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary

Methoden

Eclipse (VARIAN, Darmstadt) bei verschiedenen Temperaturen über die Abnahme der Fluoreszenz verfolgt. Die Anregung (*Excitation*) erfolgte abhängig von der eingesetzten Konzentration an Anthranilsäure bei einer Wellenlänge von 310 (0,1-30 µM) oder 330 nm (> 30 µM), während die Emission bei einer Wellenlänge von 400 nm gemessen wurde.

Zur Vermeidung einer Produktinhibition durch das entstehende PRA wurden die Hilfsenzyme Phosphoribosylanthranilat-Isomerase (TrpF) und Indolglycerinphosphat-Synthase (TrpC) aus *Thermotoga maritima* in molarem Überschuss zugegeben, wodurch PRA weiter zu 1-o-Carboxyphenylamino-1-desoxyribulose-5-phosphat (CdRP) und Indol-3-Glycerinphosphat umgesetzt wurde (Abbildung 12).

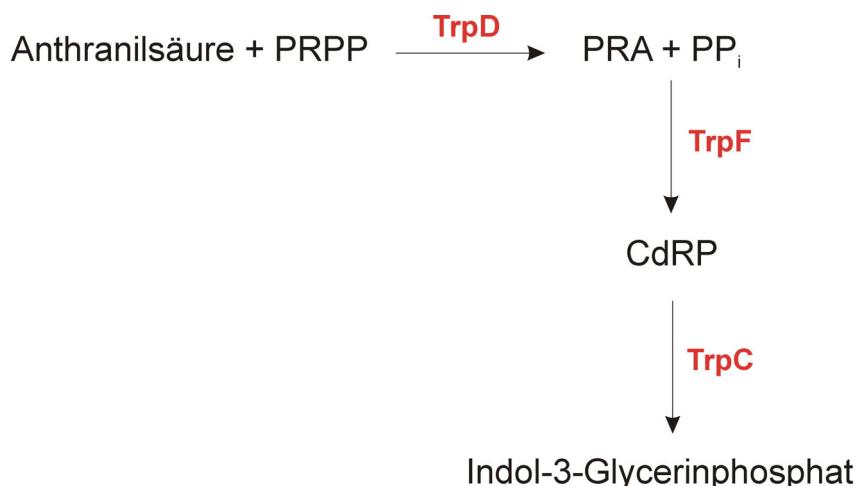


Abbildung 12: Schema des Enzymassays für die Aktivitätsmessung der TrpD-Varianten.
TrpD: Anthranilatephosphoribosyl-Transferase, TrpF: Phosphoribosylanthranilat-Isomerase, TrpC: Indolglycerinphosphat-Synthase

Die Messungen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1 ml mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 als Puffer und in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an MgCl₂. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TrpD gestartet. Entweder wurde die Reaktion bis zum vollständigen Umsatz der Anthranilsäure verfolgt oder - bei geringer Aktivität einer vermessenen ssTrpD Variante - nach einigen Minuten durch Zugabe eines Überschusses des ssTrpD-Wildtypenzyms zum Abschluss gebracht. Dies war nötig, um den Endwert der Fluoreszenz zu ermitteln, der für die Normierung der Umsatzkurve benötigt wird.

Methoden

Die Anfangsgeschwindigkeit v_i der Reaktion wurde für verschiedene Konzentrationen an Anthranilsäure oder PRPP graphisch aus den Anfangssteigungen der Umsatzkurve ermittelt, wobei das jeweilige zweite Substrat in sättigender Konzentration eingesetzt wurde. Aus den resultierenden Sättigungskurven wurden die maximale Umsatzrate (V_{max}) und K_M durch einen Fit mit einer hyperbolischen Funktion (Programm Sigma Plot 8.0) ermittelt. Aus V_{max} und der Gesamtkonzentration an aktiven Zentren ($[E_0]$) wurde die Wechselzahl berechnet: $k_{cat} = V_{max}/[E_0]$.

3.5.6 Differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC)

Bei der differentiellen Scanning Kalorimetrie werden Proben elektrisch mit einer vorgegebenen Heizrate schrittweise erwärmt. Dabei werden eine Probenzelle (Protein in Puffer) und eine Referenzzelle (Puffer) simultan aufgeheizt. Infolge einer temperaturinduzierten Reaktion in der Messzelle kommt es zu einer minimalen Temperaturdifferenz ΔT , welche von dem Gerät erkannt und durch Variation des Heizstroms (ΔI) ausgeglichen wird. Durch Registrierung von ΔI lässt sich auf die Wärmekapazität C_p (kcal/mol/K) bei der jeweiligen Temperatur schliessen. Hierbei handelt es sich um die Energie, die zur Erwärmung einer Proteinlösung um 1 K bei konstantem Druck notwendig ist.

Diese Methode kann Aufschluss geben über den Schmelzpunkt T_m von Proteinen (Temperatur, bei der jeweils die Hälfte des Proteins in gefaltetem und umgefaltetem Zustand vorliegt), sowie, im Falle der Reversibilität der Auffaltung, über die Enthalpieänderung während der thermischen Denaturierung, die freie Energie der Auffaltung ΔG_{NU} und die Anreicherung von Auffaltungsintermediaten (Pace *et al.*, 1998).

Die Messungen mit ssTrpD-wt und einigen ssTrpD Varianten wurden an einem VP-DSC Microcalorimeter mit einer Scanrate von 1 °C/min durchgeführt und C_p in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet. In der Messzelle befand sich etwa 1 mg/ml Protein in 10 mM KP pH 7,5. In der Referenzzelle befand sich der identische Puffer ohne Protein.

3.5.7 Thermische Inaktivierung

Die irreversible thermische Inaktivierung eines Proteins kann vom nativ gefalteten Protein (N) direkt zu I' erfolgen oder über den reversibel aufgefalteten Zustand (U) zu I (Abbildung 13). Die irreversible Inaktivierung beruht im einfachsten Fall auf der chemischen Modifikation katalytisch essentieller Reste. Eine andere mögliche Ursache ist die Aggregation denaturierter Proteinketten.

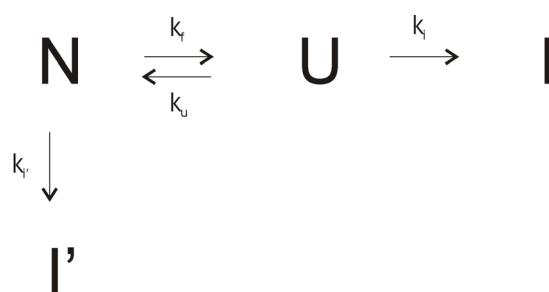


Abbildung 13: Mechanismus der irreversiblen thermischen Inaktivierung von Proteinen (Modifiziert nach Tomazic und Klibanov, 1988).

N: nativ gefaltetes, aktives Enzym, U: reversibel aufgefaltetes, inaktives Enzym, I bzw. I': irreversibel inaktiviertes Enzym, k: Geschwindigkeitskonstanten für die reversible Auffaltung (k_f) und Rückfaltung (k_u), sowie für die irreversible Inaktivierung, ausgehend von U (k_i) bzw. N ($k_{i'}$).

Es wurden Enzymaliquots bei 80°C im PCR-Block inkubiert und zu definierten Zeitpunkten entnommen. Nach der Entnahme wurden die Proben auf Eis gestellt, für 3 min abzentrifugiert und anschließend Aktivitätsmessungen bei 37°C unter Sättigung mit Anthranilsäure und PRPP durchgeführt. Aus den Anfangssteigungen wurden die jeweiligen V_{max} -Werte bestimmt, die graphisch als Logarithmus der Restaktivität $\ln(V_{max}^{(t)} / V_{max}^{(t=0)})$ gegen die Inkubationszeit t aufgetragen wurden. Die Steigung der Graphik entspricht der Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung (k_{obs}), woraus sich die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) berechnen lässt:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{obs} \quad (\text{GI. 10})$$

Methoden

Erfolgt die Inaktivierung von N über U zu I, dann ergibt sich:

für $k_i \gg k_f \Rightarrow k_{obs} = k_f$; für $k_i \ll k_f \Rightarrow k_{obs} = (k_f/k_u) \cdot k_i$.

Erfolgt die Inaktivierung direkt von N zu I', dann ergibt sich:

$$k_{obs} = k_i'$$

3.5.8 Ermittlung der Bindungskonstante (K_d -Wert) von Anthranilsäure und Tryptophan an das ssTrpD Wildtypenzym

Durch Titration eines Enzyms mit seinem Liganden kann die Stärke der Bindung in Form der thermodynamischen Dissoziationskonstante K_d und die Anzahl der Bindungsstellen für den Liganden am Protein bestimmt werden.

Um die Bindung von Anthranilsäure und Tryptophan an ssTrpD-wt zu verfolgen, wurde in einem Volumen von 1 ml eine bestimmte Konzentration des jeweiligen Liganden in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an MgCl₂ vorgelegt, und schrittweise Enzym zutitriert. Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt und über die Veränderung der Fluoreszenz des Liganden verfolgt. Nach jedem Titrationsschritt wurde ein Emissionsspektrum innerhalb eines bestimmten Wellenlängenbereiches aufgenommen und die Fluoreszenzintensität bei derjenigen Wellenlänge, bei der der grösste Intensitätsunterschied zu verzeichnen war, über eine Minute gemittelt. Das Fluoreszenzsignals wurde graphisch gegen die zutitrierte Enzymkonzentration aufgetragen und durch einen Computerfit der resultierenden hyperbolischen Kurve der K_d Wert für die Bildung des Enzym-Liganden Komplexes bestimmt.

Methoden

3.5.8.1 Bindung von Anthranilsäure

Es wurde 1 μM Anthranilsäure vorgelegt und nach jedem Titrationsschritt mit ssTrpD-wt nach Anregung bei 310 nm ein Spektrum von 350-500 nm aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität bei 370 nm wurde über 1 min gemittelt.

3.5.8.2 Bindung von L-Tryptophan

Es wurden 10 μM Tryptophan vorgelegt und nach jedem Titrationsschritt nach Anregung bei 295 nm ein Spektrum von 300 bis 500 nm gemessen. Die Fluoreszenzintensität bei 350 nm wurde über 1 min gemittelt.

3.5.8.3 Bindung von Anthranilsäure in Anwesenheit von L-Tryptophan

Um den Einfluss von Tryptophan auf die Bindung von Anthranilsäure zu untersuchen, wurde eine Bindungsstudie mit Anthranilsäure in Anwesenheit von Tryptophan durchgeführt. Hierzu wurden 1 μM Anthranilsäure und 60 μM Tryptophan vorgelegt und nach jeder Zugabe von Enzym nach Anregung bei 330 nm ein Spektrum von 350-500 nm aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität bei 370 nm wurde über 1 min gemittelt.

3.5.9 Bestimmung der Substratkonzentrationen

3.5.9.1 Bestimmung der Anthranilsäurekonzentration

Die Konzentrationsbestimmung der Anthranilsäure erfolgte photometrisch. Hierzu wurde ein Absorptionsspektrum von 220-370 nm aufgenommen. Die verwendeten molaren Extinktionskoeffizienten lauten (Andreas Ivens, Doktorarbeit 1998):

$$\epsilon_{310} = 2,98 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{240} = 7,17 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Methoden

3.5.9.2 Bestimmung der PRPP-Konzentration

Die PRPP-Konzentration wurde indirekt über den Abbau von Anthranilsäure photometrisch bei 25°C bestimmt. Eingewogenes und gelöstes PRPP wurde dazu mit einem molaren Überschuss an Anthranilsäure bekannter Konzentration enzymatisch durch TrpD aus *Saccharomyces cerevisiae* in PRA und PP_i umgesetzt, wobei TrpF und TrpC aus *Thermotoga maritima* als Hilfsenzyme verwendet wurden (3.5.5). Die Reaktion erfolgte in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM MgCl₂.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Strukturelle Charakterisierung von ssTrpD-wt

Um Einblicke in den Reaktionsmechanismus zu erhalten, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Olga Mayans (Biozentrum der Universität Basel) die Röntgenstruktur von ssTrpD-wt mit gebundenen Substraten (AA, PRPP-Mg²⁺) aufgeklärt. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit das ssTrpD-wt Protein durch heterologe Genexpression in *E. coli* unter Verwendung des Plasmides pQE40-sstrpD-wt (2.3.1) im präparativen Maßstab hergestellt (3.3.2) und aus dem löslichen Teil des Zellextraktes mittels Hitzefällung der Wirtsproteine (3.3.3), Metallchelat-Affinitätschromatographie (3.3.4.1), proteolytischer Abspaltung des N-terminalen His₍₆₎-Tags (3.3.5) und anschließender präparativer Gelfiltration (3.3.6) zur Abtrennung des Trypsins gereinigt. Die Kristallisation und die Strukturaufklärung wurden in Basel durchgeführt, während die Interpretation der erhaltenen Strukturdaten sowohl in Basel als auch in Regensburg erfolgte. Einzelheiten zur Aufnahme und Prozessierung der Daten finden sich in Kapitel 3.5.2.

Nachdem bereits früher die Struktur des Apoenzyms gelöst wurde (Mayans *et al.*, 2002), wurden jetzt drei ssTrpD-wt Strukturen mit gebundenem AA, mit gebundenem PRPP-Mg²⁺ und mit beiden gebundenen Substraten in einer Auflösung von 2,4 – 2,67 Å erhalten (PDB codes: 1XFM, 1ZXY und 1ZYK). Es zeigte sich, dass das Proteingerüst für alle drei Strukturen im Wesentlichen identisch ist. Deshalb wird im Folgenden nur die Struktur mit beiden gebundenen Substraten besprochen.

Wie bereits in Abbildung 3 gezeigt, handelt es sich bei ssTrpD um ein Homodimer, wobei jede Untereinheit aus einer kleinen α-helikalen und einer größeren α/β-Domäne besteht. Die Abbildung 14 zeigt, dass pro Untereinheit zwei Moleküle AA und ein Molekül PRPP vorliegen. AA-I findet sich in der α-helikalen Domäne, AA-II zwischen den beiden Domänen und PRPP in der α/β-Domäne.

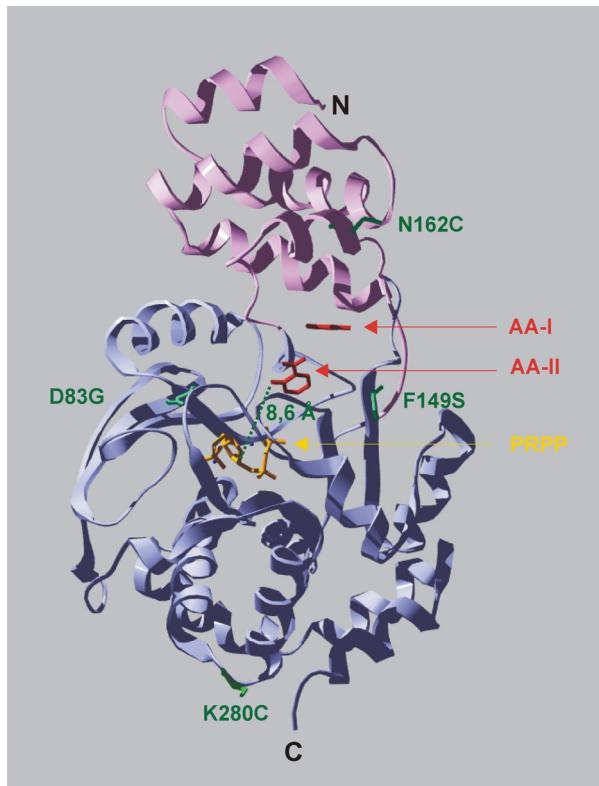


Abbildung 14: Struktur einer Untereinheit des Homodimers von ssTrpD-wt mit gebundenen Substraten.

Pro Untereinheit finden sich zwei Moleküle AA (AA-I und AA-II) und ein Molekül PRPP. Der Abstand zwischen dem C1-Atom der Riboseeinheit von PRPP und den N-Atomen von AA-II und AA-I beträgt 8,6 Å bzw. 14,6 Å (nicht gezeigt). Auf die Austausche N162C und K280C wird in Kapitel 4.7.2.1, auf die Reste D83G und F149S wird in Kapitel 4.8 eingegangen.

4.2 Bindetaschen für das Substrat Anthranilsäure

In Abbildung 15 sind die Bindetaschen für AA-I und AA-II im Detail dargestellt. Während die Aminosäurereste N109, A150, H154, M157 und R164 die Bindestelle I bilden, formen die Reste A78, G79, H107, G108, N109, G177 und P178 die Bindestelle II. Die Interaktionen zwischen dem Proteingerüst und beiden Anthranilsäuremolekülen sind hauptsächlich hydrophober Natur. Die Orientierung von AA-I erfolgt größtenteils durch Wasserstoffbrücken zwischen seiner Carboxylgruppe und den Seitenketten von R164 und N109. AA-II geht über seine Carboxylgruppe ebenfalls eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Seitenkette von N109 ein, seine Aminogruppe wird jedoch durch eine Wasserstoffbrücke mit der Hauptketten-Carbonylgruppe des Restes G79 zum PRPP hin ausgerichtet

Ergebnisse und Diskussion

(Abbildung 14). Auffällig ist, dass sowohl an der Bindestelle I als auch an der Bindestelle II jeweils ein Histidinrest (H154 bzw. H107) in vergleichbarer Orientierung zum Anthranilsäuremolekül vorliegt (Abbildung 15 B) und so als π -Akzeptor für die aromatischen CH-Gruppen fungiert. Eine solche Interaktion wird als schwache Wasserstoffbrückenbindung bezeichnet (Brandl *et al.*, 2001; Steiner *et al.*, 2001). Zwischen beiden Anthranilsäuremolekülen kommt es zu einer direkten Interaktion in Form einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen der Aminogruppe von AA-I und der Carboxylgruppe von AA-II, welche für die Orientierung beider Moleküle zueinander wichtig zu sein scheint.

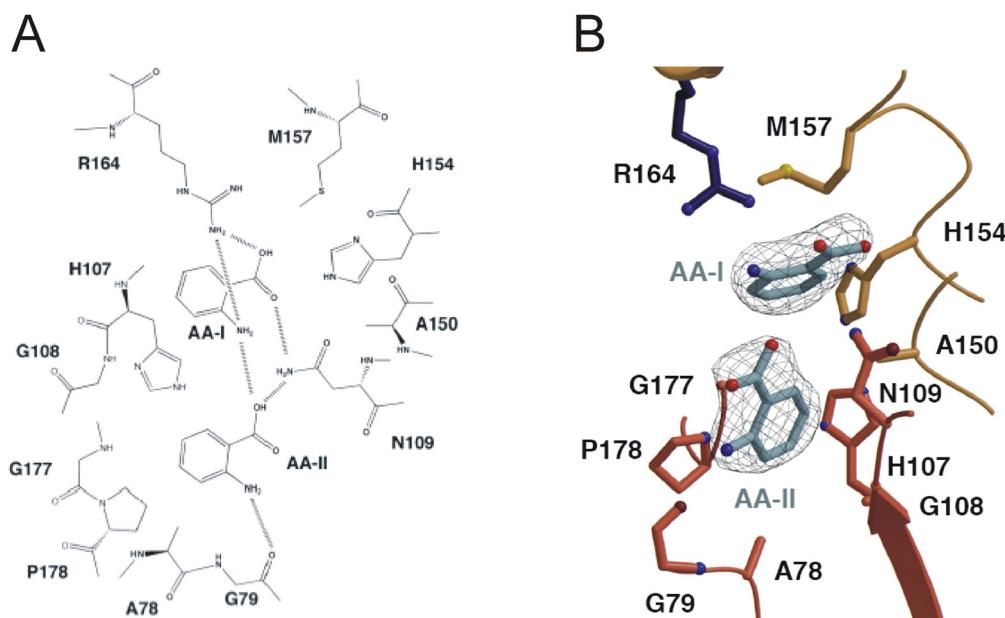


Abbildung 15: Koordination von AA-I und AA-II durch ssTrpD-wt.

A: Strukturformeln der Reste der Bindetaschen I (N109, A150, H154, M157 und R164) und II (A78, G79, H107, G108, N109, G177 und P178). Elektrostatische Interaktionen zwischen AA-I, AA-II und ssTrpD-wt sind als gestrichelte Linien dargestellt.

B: Räumliche Darstellung der Reste der Bindetaschen I und II. Reste der α -helikalen Domäne sind in gold (R 164 in blau), Reste der α/β -Domäne sind in braun dargestellt. Ein Teil der Stickstoffatome ist blau, ein Teil der Sauerstoffatome rot markiert. Zusätzlich sind die Elektronendichten von AA-I und AA-II gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

4.2.1 Charakterisierung der Anthranilatebindetasche

Zur Identifizierung der für die Katalyse der TrpD Reaktion essentiellen Reste wurde die Bindung von Anthranilsäure mittels gerichteter Mutagenese und *steady-state* Enzymkinetik, sowie durch Titrationsexperimente näher charakterisiert.

4.2.1.1 Untersuchung der Bindetaschen für Anthranilate mittels gerichteter Mutagenese

Eine Reihe von Aminosäuren der Anthranilsäure Bindetaschen I und II (Abbildung 15) wurden einzeln oder in Kombination gegen Alanin ausgetauscht. Der Rest Gly177, durch dessen fehlende Seitenkette der Zugang zur Anthranilate Bindetasche II offen gehalten zu werden scheint, wurde dagegen durch das voluminöse Phenylalanin ersetzt.

4.2.1.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung der ssTrpD Varianten

Die Einbringung gezielter Aminosäureaustausche in ssTrpD erfolgte durch SOE-PCR (3.2.4) mit pQE40-sstrpD-wt als Templat. Im Fall der Doppelvariante ssTrpD-R164A+H154A diente der Vektor pQE40-sstrpD-R164, im Falle der Doppelvariante ssTrpD-H107A+P178A der Vektor pQE40-sstrpD-H107A als Ausgangsplasmid. In der ersten PCR-Runde wurden in zwei getrennten Ansätzen die jeweiligen 5' Mutationsprimer (2.4.8) in Kombination mit dem 3'CyPstI Primer (2.4.1) und der 5'CyRI Primer (2.4.1) in Kombination mit den jeweiligen 3' Mutationsprimern (2.4.8) eingesetzt. Die zweite PCR erfolgte mit den beiden Cy Primern und den beiden im Mutationsbereich überlappenden Megaprimer als Matrize. Nach Amplifikation der Vollängenprodukte wurden die Gene über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III in den Vektor pQE40 kloniert. Nach Bestätigung der beabsichtigten Basenabfolge durch DNA-Sequenzierung wurden *E. coli* KK8 Zellen mit den verschiedenen pQE40-sstrpD Konstrukten transformiert und die Genexpression und Proteinreicherung zunächst im analytischen (3.3.1) und danach im präparativen Maßstab (3.3.2) durchgeführt. Anschliessend erfolgte

Ergebnisse und Diskussion

die Anreicherung der ssTrpD Varianten wie unter 4.1 für wildtypisches ssTrpD beschrieben und in Abbildung 16 exemplarisch für ssTrpD-G177F dokumentiert.

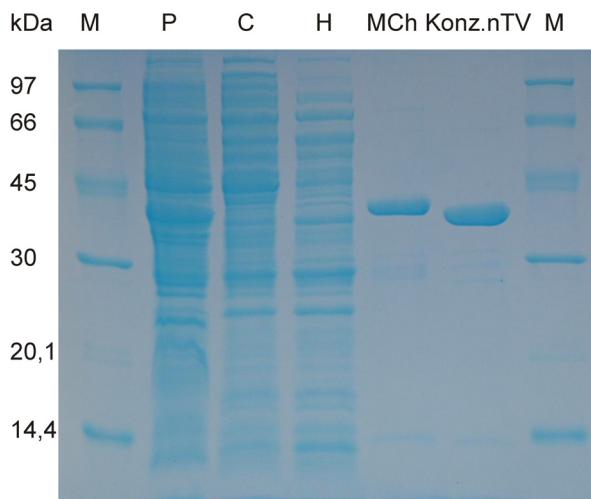


Abbildung 16: Anreicherung von ssTrpD-G177F, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).

kDa: Molekulargewicht der in M aufgetragenen Markerproteine (*Low Molecular Weight Marker*), P: unlösliche Fraktion des Zellextraktes, C: lösliche Fraktion des Zellextraktes, H: Überstand des Hitzeschrittes (65°C, 15 min), MCh: vereinigtes Protein nach der Metallchelat-Affinitätschromatographie, Konz.nTV: einkonzentriertes Protein nach der proteolytischen Abtrennung des N-terminalen His₍₆₎-Tags und der Entfernung des dazu verwendeten Trypsins durch Gelfiltration.

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, fanden sich über 80% des rekombinannten Proteins in der unlöslichen Fraktion des Zellextraktes (P). Da Rückfaltungsversuche nach der Auflösung der *inclusion bodies* mittels Guanidiniumchlorid erfolglos blieben (Ergebnisse nicht gezeigt), wurden jedoch alle ssTrpD Varianten ebenso wie das wildtypische Protein aus der löslichen Fraktion des Zellextraktes (C) gewonnen. Eine erste Anreicherung erfolgte durch einen Hitzeschritt (H), der für ssTrpD-wt bei 70°C und für die ssTrpD Varianten bei 65°C für 15 min durchgeführt wurde. Nach anschließender Metallchelat-Affinitätschromatographie und proteolytischer Abspaltung des His₍₆₎-Tags wurde das Trypsin durch eine präparative Gelfiltration (3.3.6) abgetrennt und die Proteinlösungen mittels Dialyse gegen 100 mM KP pH 7,5 umgepuffert. Die Varianten lagen nach Einkonzentrierung zu etwa 95% sauber vor. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -80°C.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Ausbeuten bei der Reinigung der verschiedenen ssTrpD-Varianten und die erreichten Konzentrationen.

Tabelle 2: Übersicht über die Ausbeuten und Konzentrationen der gereinigten ssTrpD-Varianten mit Aminosäureaustauschen an den Anthranilatbindetaschen.

ssTrpD-	Ausbeute [mg] pro 1 l Bakterienkultur	Proteinkonzentration nach dem Einkonzentrieren [mg/ml]
G177A	0,36	0,36
H107A	1,5	1,4
H107A+P178A	2,2	1,7
N109A	1,6	1,6
R164A	0,6	1,4
R164A+H154A	1,9	1,9

4.2.1.1.2 Steady-state enzymkinetische Messungen

Um die Auswirkungen der einzelnen Aminosäuresubstitutionen in den ssTrpD Varianten auf die katalytische Aktivität zu ermitteln, wurden enzymkinetische Messungen unter Fließgleichgewichtsbedingungen durchgeführt. Da die durch TrpD katalysierte Reaktion zum einen Mg^{2+} -abhängig ist (Hommel *et al.*, 1989), es zum anderen bei hohen Konzentrationen des Metallions jedoch zu einer Hemmung der katalytischen Aktivität kommen kann (4.4), wurde zunächst für wildtypisches ssTrpD und die gereinigten ssTrpD Varianten unter Sättigung mit AA und PRPP jeweils diejenige Magnesiumkonzentration ermittelt, bei der die Umsatzrate maximal war. Diese optimale Magnesiumkonzentration differierte zwischen den Varianten (Tabelle 3). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde jedoch in allen Fällen 50 μM $MgCl_2$ zugegeben und die enzymkinetischen Parameter k_{cat} , K_M^{PRPP} und K_M^{AA} unter Fließgleichgewichtsbedingungen bei 60°C fluorimetrisch über den Umsatz von Anthranilsäure und PRPP zu PRA und PP_i bestimmt (3.5.5). Dabei wurden zur Bestimmung von K_M^{PRPP} bzw. K_M^{AA} jeweils sättigende Konzentrationen des zweiten Substrates ($>10 \times K_M$) eingesetzt.

Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 3 sind die Werte aufgelistet, die aus den Fits der entsprechenden Sättigungskurven mit einer hyperbolischen Funktion (Programm Sigma Plot 8.0) erhalten wurden.

Tabelle 3: Steady-state enzymkinetische Parameter für ssTrpD Varianten mit Aminosäureaustauschen an den Anthranilat Bindetaschen.

K_M^{AA} : Michaelis-Konstante für Anthranilsäure, K_M^{PRPP} : Michaelis-Konstante für PRPP, k_{cat} : Wechselzahl, k_{cat}/K_M : katalytischer Effizienzparameter.

Die Messungen erfolgten bei 60°C in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 µM MgCl₂. Bei der Bestimmung von K_M^{PRPP} und K_M^{AA} lag das jeweils zweite Substrat in sättigender Konzentration ($>10 \times K_M$) vor.

ssTrpD-	MgCl ₂ [µM] Optimum	MgCl ₂ [µM] Zugabe	K_M^{PRPP} [µM]	K_M^{AA} [µM]	$k_{cat}(s^{-1})$	k_{cat}/K_M^{PRPP} [µM ⁻¹ s ⁻¹]	k_{cat}/K_M^{AA} [µM ⁻¹ s ⁻¹]
wt	25-50	50	156	0,04	4,2	$2,7 \times 10^{-2}$	105
H107A	50	50	297	0,5	5,1	$1,7 \times 10^{-2}$	9,6
H107A+P178A	50	50	n.d.	12,5	2	n.d.	0,16
N109A	25	50	144	0,9	2,9	2×10^{-2}	3,2
R164A	1000	50	170	297	0,6	$3,6 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$
R164A+H154A	750	50	n.d.	149	0,7	n.d.	$4,9 \times 10^{-3}$
G177F	500	50	n.d.	21	1,1	n.d.	$5,2 \times 10^{-2}$

Es fällt auf, dass keiner der Austausche zu einer merklichen Herabsetzung des k_{cat} -Wertes führt. Die stärksten Reduktionen (4-7 fach) weisen die Varianten ssTrpD-G177A, ssTrpD-R164A+H154A und ssTrpD-R164A auf, deren Wechselzahlen jedoch bei den jeweiligen optimalen Magnesiumkonzentrationen denen des wildtypischen Enzyms nahe kommen (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass keiner der ausgetauschten Reste für die Katalyse der Reaktion essentiell ist.

Auch die K_M^{PRPP} Werte liegen bei allen ssTrpD Varianten in der gleichen Größenordnung wie beim wildtypischen Enzym, während die K_M^{AA} Werte deutlich erhöht sind. Dies legt nahe, dass die vorgenommenen Austausche keinen Einfluss auf die Bindung von PRPP haben, während sie - wie erwartet - zu einer Abschwächung der Bindung der Anthranilsäure führen. Der K_M^{AA} von ssTrpD-N109A ist 23-fach, der von ssTrpD-H107A 13-fach und der von ssTrpD-H107A+P178A 313-fach erhöht. Dies deutet darauf hin, dass die drei ausgetauschten Reste für die Komplexierung der AA eine etwa gleich starke, jedoch nur relativ moderate Bedeutung haben. Dagegen deutet die Erhöhung von

Ergebnisse und Diskussion

K_M^{AA} um den Faktor 7425 fach im Falle der Variante ssTrpD-R164A auf eine wesentliche Beteiligung von Arg164 an der Bindung der AA hin. Der zusätzliche Austausch von His154 gegen Alanin scheint dagegen keinen weiteren Einfluss zu haben. Das Glycin an Position 177 stellt, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, den Zugang zur Anthranilsäurebindetasche II sicher. Deshalb schien die Annahme plausibel, dass sein Austausch gegen einen voluminösen Rest wie beispielsweise Phenylalanin die Bindung der Anthranilsäure erschwert. Tatsächlich zeigt die Variante ssTrpD-G177F einen 525-fach erhöhten Wert für K_M^{AA} .

4.2.1.1.3 Analyse der Bindung von Anthranilsäure und/oder Tryptophan mittels Titration

4.2.1.1.3.1 Bindung von Anthranilsäure

In der Röntgenstruktur von ssTrpD finden sich pro Untereinheit zwei Moleküle AA (Abbildung 15). Um zu untersuchen, ob AA an diese zwei Bindestellen mit unterschiedlicher Affinität bindet, wurden Titrationsstudien durchgeführt (3.5.8). Hierzu wurde 1 μM Anthranilsäure vorgelegt, schrittweise Enzym zutitriert und die Änderung der Substratfluoreszenz nach Anregung bei 310 nm als Funktion der Enzymkonzentration gemessen. Abbildung 17A zeigt, dass die Emissionsspektren einen isoemissiven Punkt bei 382 nm aufweisen. In Abbildung 17B ist die aus der Intensitätsänderung bei 400 nm ermittelte Bindungskurve gezeigt, aus der sich durch den Fit mit einer hyperbolischen Funktion (Programm Sigma Plot 8.0) eine thermodynamische Dissoziationskonstante K_d^{AA} von 5,1 μM ergab. Da bei ansonsten identischen Bedingungen der K_M^{AA} bei 0,04 μM liegt (Tabelle 3), scheint die Affinität von ssTrpD für Anthranilsäure durch die Anwesenheit von PRPP etwa 100-fach erhöht zu werden. Eine alternative Erklärung für die Diskrepanz der beiden Werte ist, dass die Michaelis-Konstante für die Anthranilsäure kein zuverlässiges Mass für die Stärke der Bindung darstellt. Dies wäre der Fall, wenn in K_M^{AA} neben den Ratenkonstanten für die Bindung und die Abdissoziation von ssTrpD zusätzliche Ratenkonstanten der Reaktion in komplexer Weise mit eingehen (Fersht, 1999). Ob dies tatsächlich der Fall ist, kann momentan nicht entschieden werden.

Ergebnisse und Diskussion

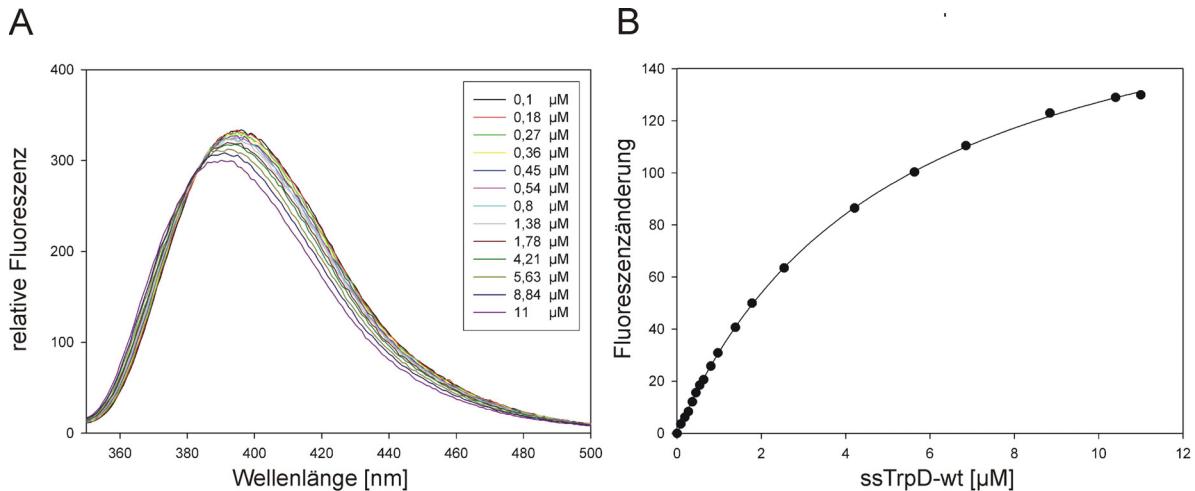


Abbildung 17: Bindung von Anthranilsäure an ssTrpD-wt.

Die Messungen erfolgten bei 25°C in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 μM MgCl₂. Es wurde 1 μM Anthranilsäure vorgelegt und schrittweise mit Enzym titriert.

A: Emissionsspektren der Anthranilsäurefluoreszenz nach Anregung bei 310 nm. Im Insert ist die nach jedem Titrationsschritt vorhandene Konzentration an ssTrpD angegeben.

B: Die Fluoreszenzänderung bei 400 nm ist aufgetragen gegen die Enzymkonzentration. Aus der Kurve wurde mittels Computerfit ein K_d-Wert von 5,1 μM ermittelt.

Auffällig ist, dass die Emissionsspektren in Abbildung 17A etwas von früher gewonnenen Spektren abweichen, wo der isoemissive Punkt statt bei 382 nm bei 395 nm lag (Deuss, 2002). Da die damaligen Messungen in 50 mM Hepes pH 8,0 aufgenommen wurden, die aktuellen jedoch in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, könnten die unterschiedlichen Puffersysteme und/oder der leicht veränderte pH-Wert für die Abweichungen verantwortlich sein. Die ermittelten K_d Werte liegen mit 5,1 μM (Abbildung 17) und 1,7 μM (Deuss, 2002) jedoch im gleichen Rahmen. In jedem Fall deuten die Existenz eines isoemissiven Punktes und der hyperbolische Verlauf der Bindungskurve darauf hin, dass nur zwei Spezies, gebundenes und ungebundenes Substrat, vorliegen und nur eine Art von Bindestelle existiert. Wie diese Befunde mit den Ergebnissen der Röntgenstrukturanalyse in Einklang gebracht werden könnten und welche der beiden gebundenen Anthranilsäuremoleküle vermutlich mit PRPP reagiert, wird in der anschließenden Diskussion (5.1) erörtert.

4.2.1.1.3.2 Bindung von Tryptophan

Obwohl es sich bei der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase nicht um das erste Enzym im Biosyntheseweg des Tryptophan handelt, wurde für TrpD aus *Corynebacterium glutamicum* eine *feedback* Inhibition durch Tryptophan nachgewiesen (O’Gara und Duncanson, 1995). Daraus liesse sich schliessen, dass die „eigentliche“ Funktion einer der beiden Anthranilsäure Bindetaschen die Komplexierung von Tryptophan ist und AA sich dort unspezifisch angelagert hat. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Bindung von Tryptophan an ssTrpD durch Titrationsversuche untersucht (3.5.8.2). Dazu wurden 10 µM Tryptophan vorgelegt, Enzym schrittweise zutitriert und die Änderung der Ligandenfluoreszenz nach Anregung bei 295 nm als Funktion der Enzymkonzentration gemessen. Abbildung 18A zeigt, dass sich die Emissionsspektren in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration ändern und einen isoemissiven Punkt bei 330 nm aufweisen. In Abbildung 18B ist die aus der Intensitätsänderung bei 360 nm ermittelte Bindungskurve gezeigt, aus der sich durch den Fit mit einer hyperbolischen Funktion (Programm Sigma Plot 8.0) eine thermodynamische Dissoziationskonstante K_d^{Trp} von 6 µM ergab.

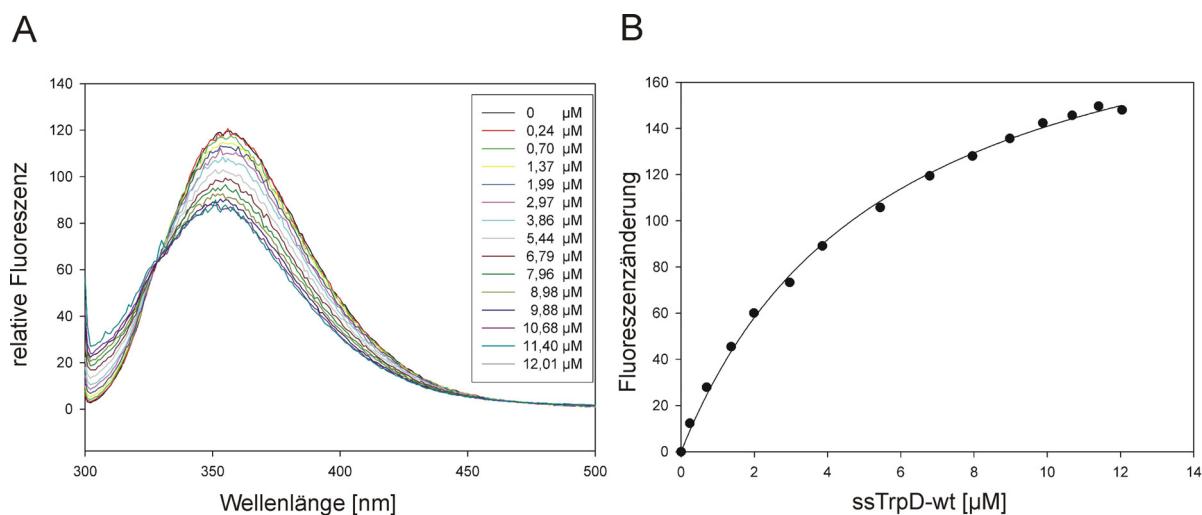


Abbildung 18: Bindung von Tryptophan an ssTrpD-wt.

Die Messungen erfolgten bei 25°C in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 µM MgCl₂. Es wurden 10 µM Tryptophan vorgelegt und schrittweise mit Enzym titriert.

A: Emissionsspektren der Tryptophanfluoreszenz nach Anregung bei 295 nm. Im Insert ist die nach jedem Titrationsschritt vorhandene Konzentration an ssTrpD angegeben.

B: Die Fluoreszenzintensität bei 360 nm ist aufgetragen gegen die Enzymkonzentration. Aus der Kurve wurde mittels Computerfit ein K_d -Wert von 6 µM ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Existenz eines isoemissiven Punktes und der hyperbolische Verlauf der Bindungskurve deuten darauf hin, dass nur zwei Spezies, gebundenes und ungebundenes Tryptophan, vorliegen und nur eine Art von Bindestelle existiert. Das Ergebnis legt eine spezifische Bindung von Tryptophan nahe. Es erlaubt jedoch nicht zu entscheiden, ob Tryptophan an die gleiche(n) Bindestelle(n) bindet wie AA. Um dies herauszufinden, wurde im Weiteren untersucht, ob Trp die Bindung von AA an ssTrpD erschwert.

4.2.1.1.3.3 Bindung von Anthranilsäure in Anwesenheit von Tryptophan

Es wurden 1 μM Anthranilsäure und 60 μM Tryptophan vorgelegt und schrittweise ssTrpD zutitriert. Die Bindung von AA wurde wiederum über die Fluoreszenzemission nach Anregung bei 330 nm verfolgt. Das Ergebnis ist in Abbildung 19A dargestellt.

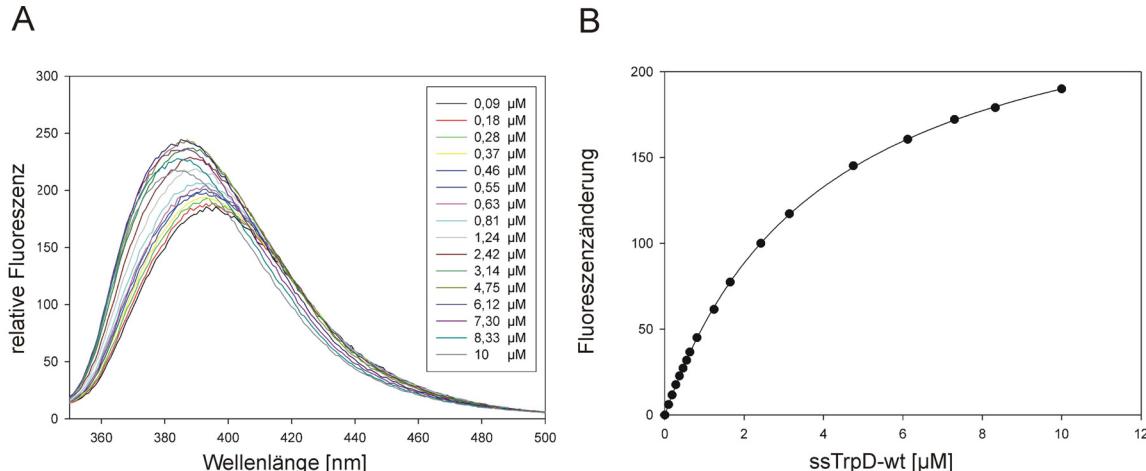


Abbildung 19: Bindung von Anthranilsäure an ssTrpD-wt in Anwesenheit von Tryptophan.
Die Messungen erfolgten bei 25°C in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 μM MgCl₂. Es wurden 1 μM Anthranilsäure und 60 μM Tryptophan vorgelegt und schrittweise mit Enzym titriert.
A: Emissionsspektren der Tryptophanfluoreszenz nach Anregung bei 330 nm.
B: Die Fluoreszenzintensität bei 380 nm ist aufgetragen gegen die Enzymkonzentration.

Im Gegensatz zur Titration in Abwesenheit von Trp, ist kein isoemissiver Punkt zu beobachten. Die Verschiebung des Emissionsmaximums zu kleineren Wellenlängen deutet jedoch auf eine Bindung von AA an ssTrpD hin.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 19B ist die aus der Intensitätsänderung bei 380 nm ermittelte Bindungskurve gezeigt, aus der sich durch den Fit mit einer hyperbolischen Funktion ein apparterer K_d^{AA} - Wert von 4 μM ergab, der annähernd dem gemessenen K_d^{AA} von 5,1 μM in Abwesenheit von Tryptophan entspricht (Abbildung 17B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass AA und Trp verschiedene Bindestellen von ssTrpD besetzen. Sie stützen damit die Hypothese, dass eines der beiden in der Röntgenstruktur von ssTrpD identifizierten Anthranilatmoleküle unspezifisch an die Trp-Bindestelle gebunden hat. Die Aktivität von ssTrpD wird durch die Anwesenheit von Tryptophan nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

4.3 **Bindetasche für das Substrat PRPP und Mg^{2+} Ionen**

In Abbildung 20 ist die Bindetasche für PRPP im Detail dargestellt, die durch die Aminosäurereste G79, D83, T87, N89, S91, T92, K106, D223 und E224 gebildet wird. Sie liegt in einer tiefen Furche innerhalb der α/β -Domäne. Durch die Bindung von PRPP an das Protein kommt es zu einer Strukturierung des glycinreichen Loops $_{79}\text{GTGGD}_{83}$ (lila in Abbildung 20B), der im Apoenzym unstrukturiert vorliegt (Mayans *et al.*, 2002). Hierbei kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen von G79 und D83 mit PRPP (Abbildung 20A).

Ergebnisse und Diskussion

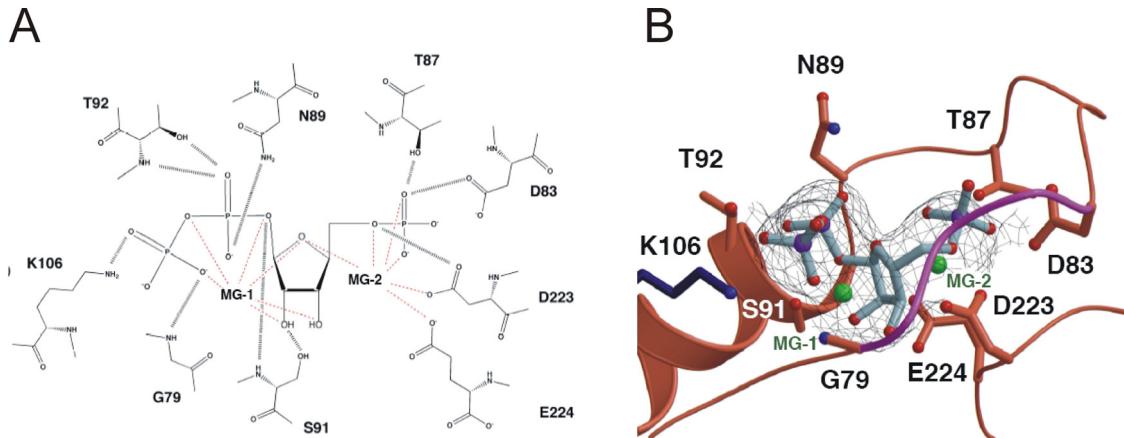


Abbildung 20: Koordination von PRPP und Mg^{2+} durch ssTrpD-wt.

A: Strukturformeln der Reste der PRPP Bindetasche. Elektrostatische Interaktionen zwischen PRPP und ssTrpD-wt sind als gestrichelte Linien dargestellt. Wechselwirkungen zwischen den beiden gebundenen Mg^{2+} -Ionen MG-1 und MG-2 mit PRPP und dem Protein sind durch rote Punkte repräsentiert.

B: Räumliche Darstellung der Reste der PRPP Bindetasche. Die beiden Mg^{2+} -Ionen MG-1 und MG-2 sind als grüne Kugeln dargestellt. Ein Teil der Stickstoffatome ist blau, ein Teil der Sauerstoffatome rot markiert. Zusätzlich ist die Elektronendichte des PRPP gezeigt.

Dieser glycinreiche Loop stellt ein charakteristisches Merkmal innerhalb der TrpD Familie dar und wurde zuerst als Phosphatbindemotiv in nicht verwandten Enzymklassen wie beispielsweise der Ferredoxin-Reduktase und der Phosphofruktokinase identifiziert (Kinoshita *et al.*, 1999). Der Pyrophosphatteil des PRPP kommt in oben abgebildeter Struktur gleich zu liegen wie das Pyrophosphat im Apoenzym (Mayans *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2002).

Wie für andere Vertreter der PRTase Familie beschrieben, wird auch bei ssTrpD das gebundene PRPP durch Mg^{2+} Ionen komplexiert. Abbildung 20 zeigt, dass ein Metallion (MG-1) durch die Hydroxylgruppen der Ribose und die Sauerstoffatome der Pyrophosphatgruppe koordiniert wird und keine direkten Wechselwirkungen mit dem Protein eingeht. Bei Vertretern der PRTasen der Klasse I und II findet sich an gleicher Stelle ebenfalls ein Magnesiumion ohne Interaktionen mit dem Protein (Sharma *et al.*, 1998; Sinha und Smith, 2001).

In ssTrpD findet sich ein zweites Magnesiumion (MG-2) am anderen Ende des PRPP und bildet ein Bindeglied zwischen seiner 5' Phosphatgruppe und den negativ geladenen Resten D223 und E224 (Abbildung 20), die innerhalb der TrpD Familie strikt konserviert sind. In der Nachbarschaft liegt D83, dessen saure

Ergebnisse und Diskussion

Seitenkette jedoch nicht mit MG-2 interagiert, sondern in Wasserstoffbrückenentfernung zu einem Sauerstoffatom der 5' Phosphatgruppe des PRPP liegt (Abbildung 20A).

In Abbildung 21 ist eine Superpositionierung von PRPP Molekülen und Mg²⁺ Ionen gezeigt, so wie sie an bisher untersuchten PRTasen gebunden vorliegen.

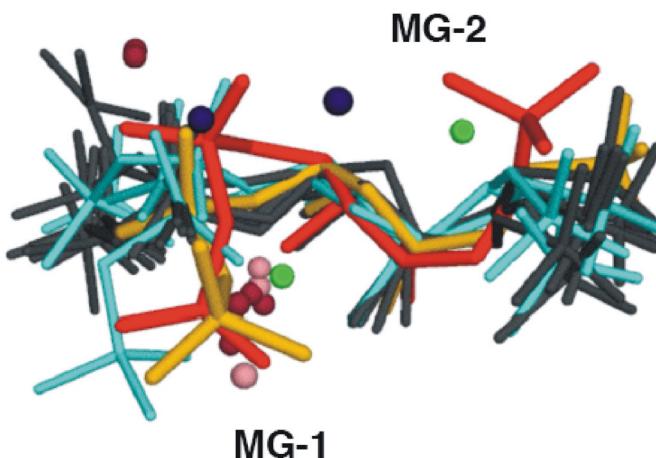


Abbildung 21: Superpositionierung von an PRTasen gebundenen PRPP Molekülen und Mg²⁺ Ionen.

Grundlage hierfür waren folgende PDB Einträge: 1ZVW, 1A95, 1D6N, 1ECC, 1FSG, 1I13, 1L1R, 1LH0, 1QPR, 1TC2 und 1OPR; dunkelgrün: PRPP Moleküle, grün: PRPP Analoga, rot: PRPP in TrpD aus *S. solfataricus*, orange: PRPP in TrpD aus *M. tuberculosis*, lila: Magnesiumionen, pink: Manganionen, grün: Magnesiumionen in TrpD aus *S. solfataricus*, dunkelblau: Magnesiumionen in TrpD aus *M. tuberculosis*.

Die Abbildung macht deutlich, dass ein vergleichbar komplexiertes Metallion am 5' Phosphatende des PRPP wie in ssTrpD in anderen PRTasen bisher nicht gefunden wurde. Im Einklang mit dieser Beobachtung zeigt nur das Pyrophosphatende des PRPP in Lösung eine hohe Affinität zum Mg²⁺ Ion und entsprechend wird dieser Mono-Magnesiumkomplex als das wahre Substrat der PRTasen angesehen (Meola *et al.*, 2003). Dagegen hat der 5' Phosphatteil von PRPP nur eine geringe Affinität zu Mg²⁺ und bildet lediglich in einer mit dem zweiwertigen Ion gesättigten Lösung einen Dimagnesiumkomplex aus (Thompson *et al.*, 1978). Interessanterweise ist die Bindung des PRPP-Mg²⁺ in ssTrpD und mtTrpD trotz hoher Konserviertheit der meisten beteiligten Reste (Lee *et al.*, 2006) leicht unterschiedlich (Abbildung 21). In ssTrpD liegt das PRPP in einer energetisch

Ergebnisse und Diskussion

ungünstigen „S-Form“ vor, während es in mtTrpD, wie auch in anderen PRTasen, eine gestreckte Konfiguration einnimmt. Ob dieser Unterschied mit der unterschiedlichen Koordination der Mg²⁺ Ionen zusammenhängt, ist unklar.

4.3.1 Untersuchung der Bindetasche für PRPP mittels gerichteter Mutagenese

Analog zur Charakterisierung der Bindetaschen für Anthranilsäure wurde die Bindetasche für PRPP bzw. für dessen Komplex mit Mg²⁺ mittels gezielter Mutagenese und Enzymkinetik unter Fließgleichgewichtsbedingungen näher charakterisiert. Dazu wurde Ser91 gegen Alanin ausgetauscht, sowie die sauren Aminosäuren Asp223 und Glu224 gegen die entsprechenden Amide Asparagin bzw. Glutamin.

4.3.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung der ssTrpD Varianten

Die Einbringung gezielter Aminosäuresubstitutionen erfolgte wiederum durch SOE-PCR (3.2.4) mit pQE40-sstrpD-wt als Templat. In der ersten PCR-Runde wurden in getrennten Ansätzen die jeweiligen 5' Mutationsprimer (2.4.8) in Kombination mit dem 3'CpPstI Primer (2.4.1) und der 5'CpRI Primer (2.4.1) in Kombination mit den jeweiligen 3' Mutationsprimern (2.4.8) eingesetzt. Die zweite PCR erfolgte mit den beiden Cy Primern und den beiden im Mutationsbereich überlappenden Megaprimeren als Matrize. Im Anschluss wurden die Genfragmente über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III in den Vektor pQE40 kloniert. Nach Bestätigung der beabsichtigten Basenabfolge durch DNA-Sequenzierung wurden *E. coli* KK8 Zellen mit den verschiedenen pQE40-sstrpD Konstrukten transformiert und die Genexpression und Proteinanreicherung zunächst im analytischen (3.3.1) und danach im präparativen Maßstab (3.3.2) durchgeführt. Anschliessend erfolgte die Anreicherung der ssTrpD Varianten wie unter 4.1 für wildtypisches ssTrpD beschrieben und in Abbildung 22 exemplarisch für ssTrpD-S91A dokumentiert.

Ergebnisse und Diskussion

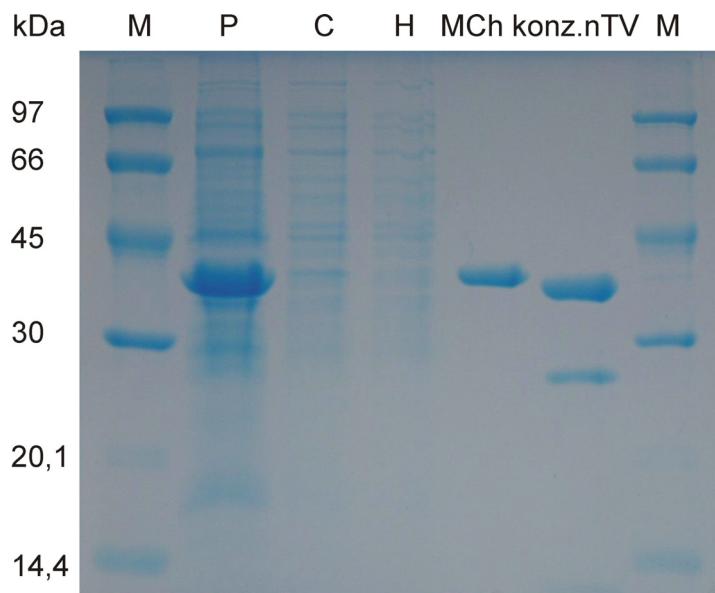


Abbildung 22: Anreicherung von ssTrpD-S91A, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).

kDa: Molekulargewicht der in M aufgetragenen Markerproteine (*Low Molecular Weight Marker*), P: unlösliche Fraktion des Zellextraktes, C: lösliche Fraktion des Zellextraktes, H: Überstand des Hitzeschrittes (65°C, 15 min), MCh: vereinigtes Protein nach der Metalchelat-Affinitätschromatographie, Konz.nTV: einkonzentriertes Protein nach der proteolytischen Abtrennung des N-terminalen His₍₆₎-Tags und präparativer Gelfiltration.

Etwa 90% des Proteins fanden sich in der unlöslichen Fraktion des Zellextraktes (P). Da Rückfaltungsversuche erfolglos blieben, wurden auch diese Varianten wie unter 4.1 beschrieben aus dem löslichen Zellextrakt (C) aufgereinigt. Im Falle von ssTrpD-S91A befand sich etwa 20% eines Fremdproteins in der Probe, wobei es sich wahrscheinlich um nicht abgetrenntes Trypsin handelt.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Ausbeuten bei der Reinigung der verschiedenen Varianten und die erreichten Konzentrationen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4: Übersicht über die Ausbeuten und Konzentrationen der gereinigten ssTrpD Varianten mit Aminosäureaustauschen an der PRPP Bindetasche.

* Daten aus Deuss (2002)

ssTrpD-	Ausbeute [mg] pro 1 l Bakterienkultur	Proteinkonzentration nach dem Einkonzentrieren [mg/ml]
S91A	1,2	0,6
D223N*	2,2	1,3
E224Q*	2	1,6
D223N+E224Q	5	1,8

4.3.1.2 Steady-state enzymkinetische Messungen

Wie unter 4.2.1.1.2 beschrieben, wurden zunächst die für die katalytischen Aktivitäten optimalen $MgCl_2$ Konzentrationen ermittelt. Es zeigte sich, dass wildtypisches ssTrpD durch hohe Konzentrationen von Mg^{2+} deutlich gehemmt wird (Abbildung 23A), was sich vor allem in einem fast 30-fach erhöhtem Wert für K_M^{PRPP} und einem etwa 4-fach erniedrigten Wert für k_{cat} ausdrückt (Tabelle 5). Dagegen stieg die Aktivität der Varianten mit zunehmender Mg^{2+} Konzentration hyperbolisch an und erreichte ab etwa 2 mM $MgCl_2$ ihr Maximum, wie in Abbildung 23B exemplarisch für ssTrpD D223N+E224Q gezeigt ist.

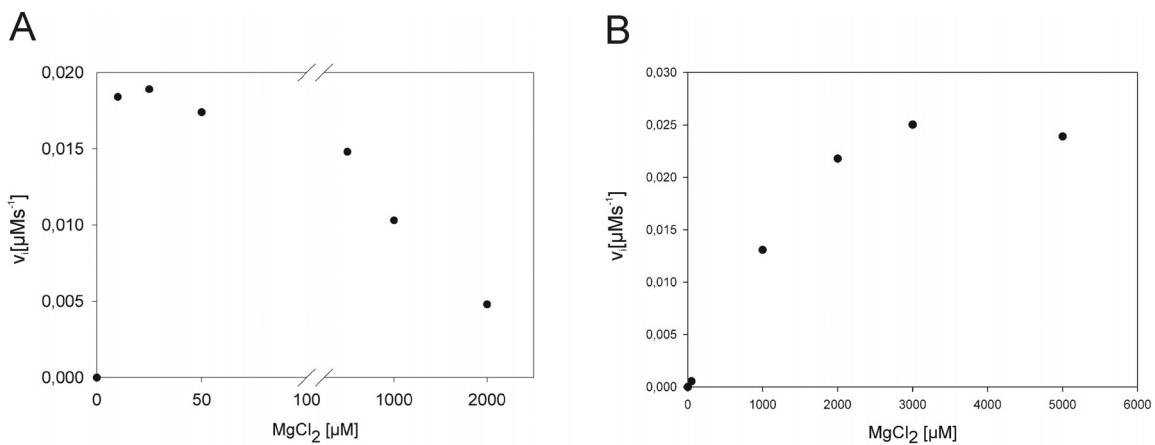


Abbildung 23: Bestimmung der optimalen Mg^{2+} Konzentrationen für ssTrpD-wt (A) bei $37^\circ C$ und ssTrpD D223N+E224Q (B) bei $60^\circ C$.

Die Messungen wurden in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 und sättigenden Konzentrationen an Anthranilsäure und PRPP ($>10 \times K_M$) durchgeführt. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug für ssTrpD-wt 0,05 μM und ssTrpD-D223N+E224Q 0,02 μM .

Ergebnisse und Diskussion

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden sowohl ssTrpD-wt als auch die Varianten in Gegenwart von 2 mM MgCl₂ vermessen und wie unter 4.2.1.1.2 die Werte für k_{cat}, K_M^{PRPP} und K_M^{AA} und ermittelt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Steady-state enzymkinetische Parameter für ssTrpD Varianten mit Aminosäureaustauschen an der PRPP Bindetasche.

K_M^{AA}: Michaelis-Konstante für Anthranilsäure, K_M^{PRPP}: Michaelis-Konstante für PRPP, k_{cat}: Wechselzahl, k_{cat}/K_M: katalytischer Effizienzparameter.

Die Messungen erfolgten bei 60°C in 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Im Falle des wildtypischen ssTrpD wurden Messungen in Anwesenheit von 50 µM bzw. 2 mM MgCl₂ durchgeführt, bei den Varianten nur in Anwesenheit von 2 mM MgCl₂. Bei der Bestimmung von K_M^{PRPP} und K_M^{AA} lag das jeweils zweite Substrat in sättigender Konzentration (>10 x K_M) vor.

wt: Daten aus Tabelle 3; * Daten aus Deuss (2002).

ssTrpD-	MgCl ₂ [µM] Optimum	MgCl ₂ [µM] Zugabe	K _M ^{PRPP} [µM]	K _M ^{AA} [µM]	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M ^{PRPP} [µM ⁻¹ s ⁻¹]	k _{cat} /K _M ^{AA} [µM ⁻¹ s ⁻¹]
wt	25-50	50	156	0,04	4,2	2,6 x 10 ⁻²	105
wt		2000	4300	0,07	1,1	2,5 x 10 ⁻⁴	15,7
S91A	2000	2000	555	0,13	10,1	1,8 x 10 ⁻²	77,7
D223N*	3000	2000	70	0,16	6	8,5 x 10 ⁻²	37,5
E224Q*	3000	2000	260	0,91	5,6	2,1 x 10 ⁻²	6,2
D223N+E224Q	3000	2000	187	1,4	4,1	2,2 x 10 ⁻²	2,9

Ähnlich wie bei den Austauschen von Resten der Anthranilat Bindetaschen (4.2.1.1.2), führen die Austausche an der PRPP Bindetasche zu keiner merklichen Beeinträchtigung des k_{cat} Wertes. Auch die hier ersetzen Reste sind somit für die Katalyse der Reaktion nicht essentiell.

Vergleicht man die bei jeweils optimaler Mg²⁺-Konzentration erhaltenen Ergebnisse, dann liegen die K_M^{PRPP} Werte auch dieser Varianten im Bereich des wildtypischen Enzyms. Dagegen sind die K_M^{AA} Werte der Varianten wiederum erhöht und zwar für ssTrpD-S91A und ssTrpD-D223N 4-fach, für ssTrpD-E224Q 23-fach, für ssTrpD-D223N+E224Q 35-fach (Tabelle 5).

Zusammenfassend ist unklar, warum vor allem der Austausch des in der TrpD Familie konservierten DE (D223-E224) Motivs keine größeren Auswirkungen auf die K_M^{PRPP} und k_{cat} Werte hat. Auch ist nicht einfach zu erkären, warum die Substitution dieser in der PRPP Bindetasche lokalisierten Reste zu einer teilweise deutlichen Erhöhung von K_M^{AA} führt, also vermutlich zu einer Herabsetzung der Affinität des Enzyms für die Bindung von Anthranilsäure.

4.4 Beeinflussung der Ergebnisse durch mit dem Enzym aufgereinigtes Mg^{2+}

Wenn man annimmt, dass der PRPP- Mg^{2+} -Komplex und nicht PRPP alleine das Substrat von PRTasen (Meola *et al.*, 2003) und damit auch von ssTrpD darstellt, dann erscheint es auf den ersten Blick verwunderlich, dass die in Tabelle 3 aufgelisteten K_m^{PRPP} Werte deutlich höher liegen als die zugegebene Konzentration an $MgCl_2$ von 50 μM . Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass an das Enzym gebundene Mg^{2+} Ionen zusammen mit ssTrpD aufgereinigt und durch PRPP für die Reaktion rekrutiert werden. Um diese Hypothese zu testen, wurden mit ssTrpD und ssTrpD-D223N+E224Q Umsatzkurven in Gegenwart sättigender Konzentrationen an AA und PRPP, jedoch ohne extern zugegebenes $MgCl_2$, aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 gezeigt.

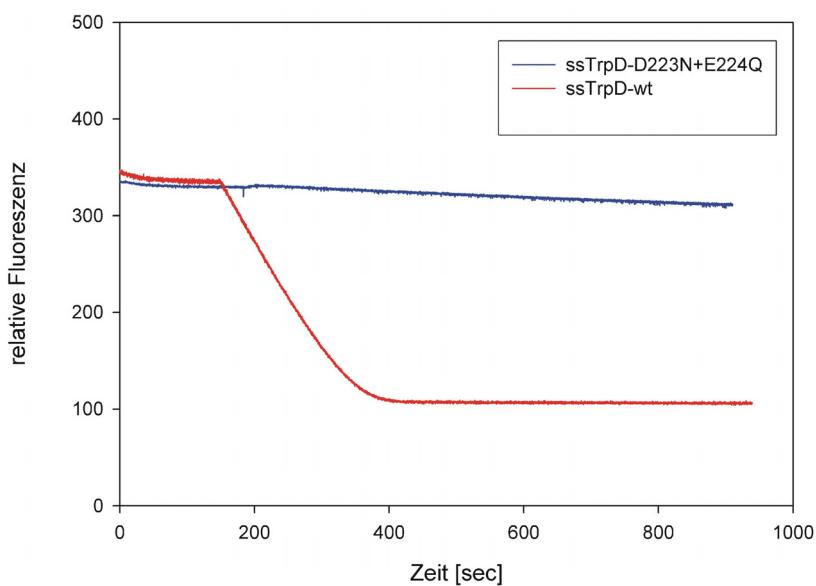


Abbildung 24: Umsatzkurven von ssTrpD-wt und ssTrpD-D223N+E224Q ohne externe Zugabe von Mg^{2+} .

Die Messungen wurden in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 bei 60°C in Gegenwart von 10 μM Anthranilsäure und 3 mM PRPP durchgeführt. Die Konzentrationen von ssTrpD-wt und ssTrpD-D223N+E224Q betrug jeweils 0,01 μM .

Das wildtypische ssTrpD weist ohne externe Zugabe von $MgCl_2$ im Vergleich zu ssTrpD-D223N+E224Q eine deutlich höhere Aktivität auf. Dies deutet darauf hin, dass bei der Aufreinigung des ersteren eine deutlich größere Menge an Mg^{2+} Ionen

Ergebnisse und Diskussion

mitgeschleppt werden. Die plausibelste Erklärung dafür ist, dass es sich dabei um MG-2 handelt, das unter anderem über die Reste Asp223 und Glu224 koordiniert wird (Abbildung 20). Nach Zugabe von PRPP könnte es zu einer Rekrutierung dieser Magnesiumionen als MG-1 und damit zur Ausbildung des PRPP-Mg²⁺ Substrates kommen. Durch den Austausch der Carboxylatgruppen von Asp223 und Glu224 gegen die entsprechenden Amide wäre eine Komplexierung von MG-2 nur noch beschränkt möglich. Damit würde weniger Mg²⁺ mit aufgereinigt und es könnte entsprechend weniger des Metallions durch PRPP rekrutiert werden.

4.5 Untersuchung der MgCl₂ Inhibition

Wie in vorigen Kapiteln beschrieben, wirken sich hohe Konzentrationen an Mg²⁺ inhibierend auf die katalytische Aktivität von wildtypischem ssTrpD und einer Reihe der Varianten aus (Abbildung 23A, Tabelle 5). Dies wird in Abbildung 25 durch den Vergleich von Sättigungskurven für PRPP, die in Anwesenheit von 2 mM MgCl₂ bzw. 50 μM MgCl₂ aufgenommen wurden, nochmals illustriert.

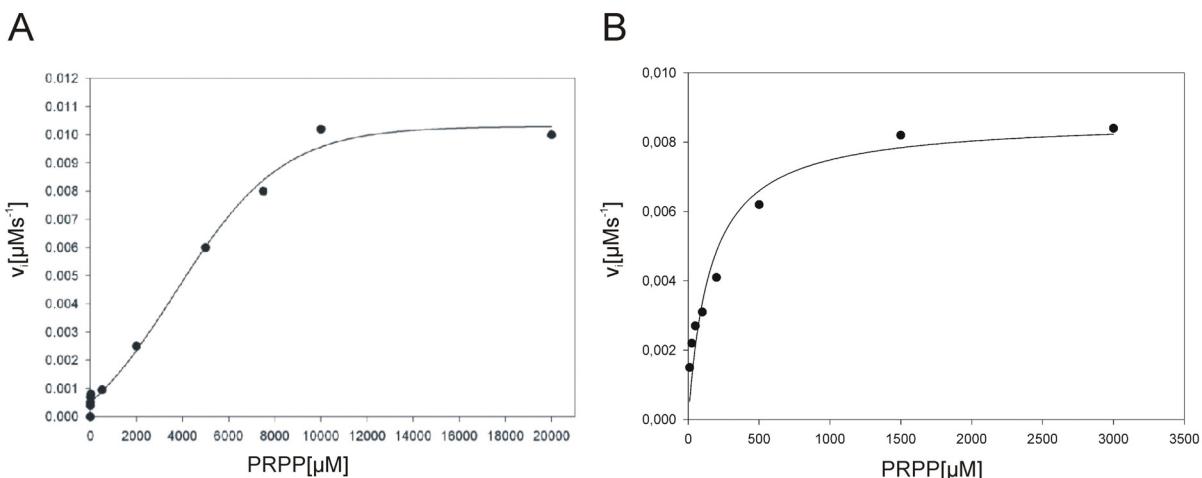


Abbildung 25: PRPP-Sättigungskurven von ssTrpD-wt in Gegenwart sättigender Konzentrationen an Anthranilsäure ($>10 \times K_m$) durchgeführt.

Die Messungen wurden bei 60°C in Tris-HCl pH 7,5 in Anwesenheit hoher (A) und niedriger (B) Konzentrationen an Mg²⁺ durchgeführt.

A: 2 mM MgCl₂, 0,01 μM ssTrpD-wt

B: 50 μM MgCl₂, 0,0025 μM ssTrpD-wt

Ergebnisse und Diskussion

Neben einem erniedrigten k_{cat} Wert (vergleichbarer V_{max} bei 4-fach höherer Enzymkonzentration) führt die erhöhte Mg^{2+} Konzentration zu einer sigmoidalen PRPP-Sättigungskurve mit einem hohen K_M^{PRPP} von 4,3 mM (Abbildung 25A). Dagegen nimmt bei Zugabe nur geringer Konzentrationen an Mg^{2+} die Sättigungskurve den gewohnten hyperbolischen Verlauf und der K_M^{PRPP} ist mit 156 μM deutlich niedriger. Während sich die meisten ssTrpD Varianten mit Aminosäureaustauschen an den Anthranilat Bindetaschen diesbezüglich ähnlich verhalten wie wildtypisches ssTrpD (Deuss, 2002), werden die Varianten mit Austauschen an der PRPP Bindetasche durch $MgCl_2$ aktiviert (Abbildung 23B) und zeigen hyperbolische Sättigungskurven für PRPP (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse legen nahe, dass das am 5' Phosphat des PRPP lokalisierte Mg^{2+} Ion, welches durch Reste der PRPP-Bindetasche komplexiert wird, für die Inhibition und die ungewöhnliche PRPP-Sättigungskurve verantwortlich ist. Diese Hypothese wird in der abschließenden Diskussion (5.2) weiter erörtert.

4.6 Vergleich von TrpD Proteinen aus *Sulfolobus solfataricus* und anderen Hyperthermophilen

Da bisher innerhalb der TrpD Familie von keiner Inhibition durch $MgCl_2$ in der Literatur berichtet wurde, sollte dies anhand der wildtypischen TrpD Enzyme zweier weiterer Vertreter der Hyperthermophilen Bakterien, *Aquifex aeolicus* und *Thermotoga maritima*, überprüft werden. Dazu wurden die Gene *aatrpD* und *tmtrpD* kloniert, heterolog in *E. coli* exprimiert, die Proteine gereinigt und enzymkinetisch charakterisiert.

4.6.1 TrpD aus *Thermotoga maritima*

4.6.1.1 Klonierung und heterologe Expression von *tmtrpD* und Reinigung von tmTrpD

In *Thermotoga maritima* liegen die Gene für die Glutaminase-Untereinheit der Anthranilat-Synthase und die Anthranilat-Phosphoribosyltransferase als *trpG-D*

Ergebnisse und Diskussion

Fusion vor. Ausgehend von dem Plasmid pET15b-tmtrpGD (Ivens, 1998) wurde das tmtrpD Gen mit Hilfe der 5'- und 3'- Klonierungsprimer (2.4.7) amplifiziert und über die eingefügten Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Xba*I in den Vektor pET28a(+) kloniert. Hierdurch wurde bei der Expression N-terminal ein His₍₆₎-Tag an das Protein gehängt, um eine Reinigung durch Metallchelat-Affinitätschromatographie zu ermöglichen.

Nach Bestätigung der beabsichtigten Basenabfolge durch DNA-Sequenzierung wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit dem Plasmid pET28a(+)-tmtrpD transformiert, das Gen ohne Zugabe von IPTG über Nacht bei 37°C im präparativen Maßstab (3.3.2) exprimiert, und anschliessend das Protein gereinigt. Abbildung 26 gibt einen Überblick über das Ergebnis der Expression und der Anreicherungsschritte.

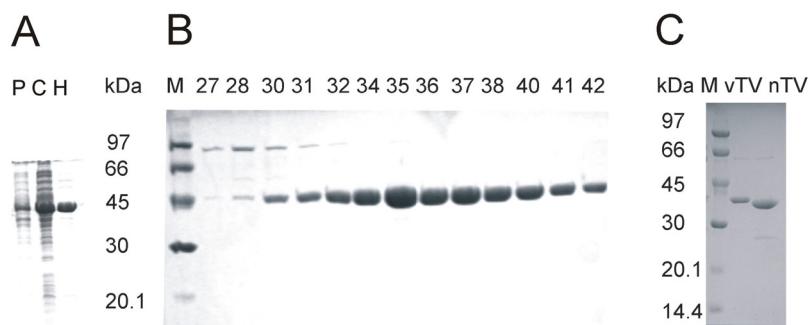


Abbildung 26: Anreicherung von tmTrpD, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).
kDa: Molekulargewicht der in M aufgetragenen Markerproteine (*Low Molecular Weight Marker*).
A: P: unlösliche Fraktion des Zellextraktes, C: lösliche Fraktion des Zellextraktes, H: Überstand des Hitzeschrittes (75°C, 15 min)
B: 27-42: ausgewählte Fraktionen nach der Metallchelat-Affinitätschromatographie
C: vTV: vereinigte Fraktionen vor dem Trypsinverdau, nTV: einkonzentriertes Protein nach der proteolytischen Abtrennung des N-terminalen His₍₆₎-Tags und präparativer Gelfiltration.

Wie aus Abbildung 26A ersichtlich, befanden sich etwa 50% des Proteins in der löslichen Fraktion des Zellextraktes und wurden nach dem Benzonaseverdau der Nukleinsäuren (3.3.2) durch einen Hitzeschritt (3.3.3) bei 75°C für 15 min und Metallchelat-Affinitätschromatographie (3.3.4.1) angereichert (Abbildung 26B). Nach der Dialyse gegen 100 mM KP pH 7,5, proteolytischer Abspaltung des His₍₆₎-

Ergebnisse und Diskussion

Tags und präparativer Gelfiltration ergab sich ein Reinheitsgrad von etwa 90% (Abbildung 26C). Die Ausbeute lag bei 12 mg tmTrpD aus 1 l Bakterienkultur. Das Protein wurde in einer Konzentration von 7,7 mg/ml in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80°C gelagert.

4.6.1.2 Analytische Gelfiltration

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades und zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von tmTrpD-wt wurde ein analytischer Gelfiltrationslauf mit einer Superdex 75 Säule durchgeführt (3.4.4). In Abbildung 27 ist das Elutionsprofil dargestellt.

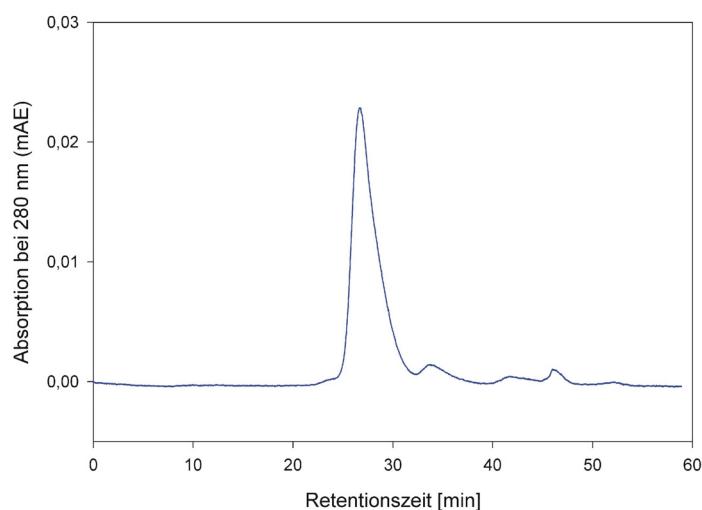


Abbildung 27: Elutionsprofil der analytischen Gelfiltration von tmTrpD.

Der Lauf wurde in 50 mM KP pH 7,5, 300 mM KCl bei RT auf einer Superdex 75 Säule durchgeführt. Es wurden 200 µl einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 0,41 mg/ml aufgetragen. Die Flussrate betrug 0,4 ml/min.

Der symmetrische Peak deutet auf eine homogene Proteinlösung hin. Das anhand der Retentionszeit mit Hilfe der Kalibrierungsgeraden (Anhang) berechnete apparetive Molekulargewicht von 54168 Da liegt zwischen den berechneten Werten für das Monomer (37858 Da) und das Dimer (75716 Da). Dies wurde bereits für ssTrpD beobachtet (Deuss, 2002) und ist vermutlich auf ein aberrantes

Ergebnisse und Diskussion

Laufverhalten aufgrund der stäbchenförmigen Struktur des Proteins zurückzuführen. Ohne weitere Untersuchungen, z.B. mittels analytischer Ultrazentrifugation, ist in Analogie zu ssTrpD von einem dimeren Assoziationszustand von tmTrpD auszugehen.

4.6.1.3 CD-Spektroskopische Untersuchungen der Sekundärstruktur von tmTrpD

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur von tmTrpD wurde eine CD-Spektroskopie im fern-UV Bereich zwischen 185 und 250 nm durchgeführt (3.5.1). Das in Abbildung 28 gezeigte Spektrum weist auf eine Sekundärstruktur mit deutlichem α -helikalen Anteil hin (Nulldurchgang bei ca. 202 nm, Minima bei ca. 208 und 220 nm) und ähnelt damit dem fern-UV Spektrum von ssTrpD (Deuss, 2002).

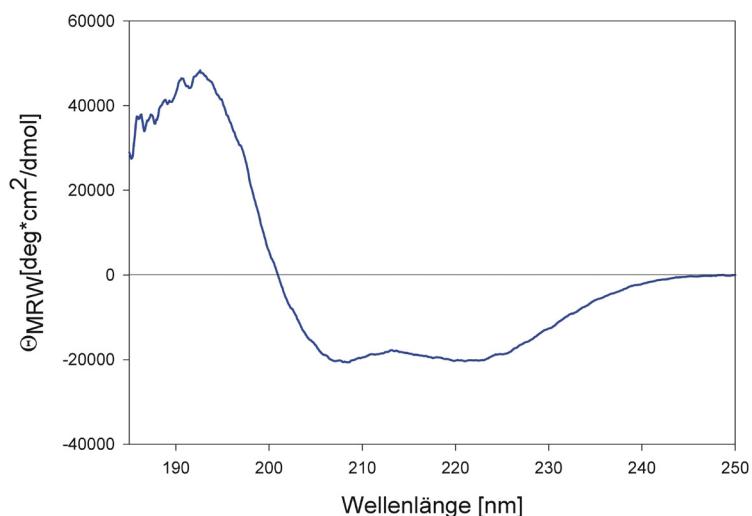


Abbildung: 28: Fern-UV Spektrum von tmTrpD.

Messbedingungen: 10 mM KP, pH 7,5 bei 25°C; Proteinkonzentration: 0,1 mg/ml; Schichtdicke der Küvette: 0,1 cm: Das gezeigte Spektrum ist das Mittel aus 10 aufgenommenen Spektren

Ergebnisse und Diskussion

4.6.2 TrpD aus *Aquifex aeolicus*

4.6.2.1 Klonierung und heterologe Expression von *aatrpD1* und Reinigung von aaTrpD1

Die Sequenzierung des Genoms von *Aquifex aeolicus* zeigte, dass dieser Organismus zwei *trpD* Gene, *aatrpD1* (innerhalb des *trp* Operons) und *aatrpD2* (ausserhalb des *trp* Operons), enthält (Deckert *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur *aatrpD1* zum Vergleich mit den TrpD Proteinen aus *Sulfolobus solfataricus* und *Thermotoga maritima* untersucht.

Zur Herstellung von aaTrpD1 wurde auf das Plasmid pET28a-aatrpD1 zurückgegriffen (Simona Cerrone, Universität zu Köln), das jedoch in der kodierenden Region zwei Mutationen enthielt, die zu den Austauschen D86N und L330S führten. Mittels SOE-PCR (3.2.4) wurde die Wildtypsequenz rekonstruiert. In der ersten PCR-Runde wurde in zwei getrennten Ansätzen der T7 Promotorprimer (2.4.2) mit dem 3' Mutationsprimer (2.4.9) und der 5' Mutationsprimer (2.4.9) in Kombination mit dem 3' Klonierungsendprimer (2.4.7) zur Herstellung der beiden Megaprimer eingesetzt. Die zweite PCR zur Amplifikation des Gesamtlängenfragmentes erfolgte mit dem T7 Promotorprimer, dem 3' Klonierungsendprimer (2.4.7) und den beiden im Mutationsbereich überlappenden Megaprimer als Matrize. Über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XbaI* erfolgte die Klonierung in den Vektor pET28a(+). Nach Überprüfung der beabsichtigten Basenabfolge mittels DNA-Sequenzierung wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit dem Plasmid pET28a-aatrpD1 transformiert, das Gen durch Zugabe von IPTG über Nacht bei 37°C im präparativen Maßstab (3.3.2) exprimiert, und anschliessend das Protein gereinigt.

Abbildung 29 gibt einen Überblick über das Ergebnis der Expression und der Anreicherungsschritte.

Ergebnisse und Diskussion

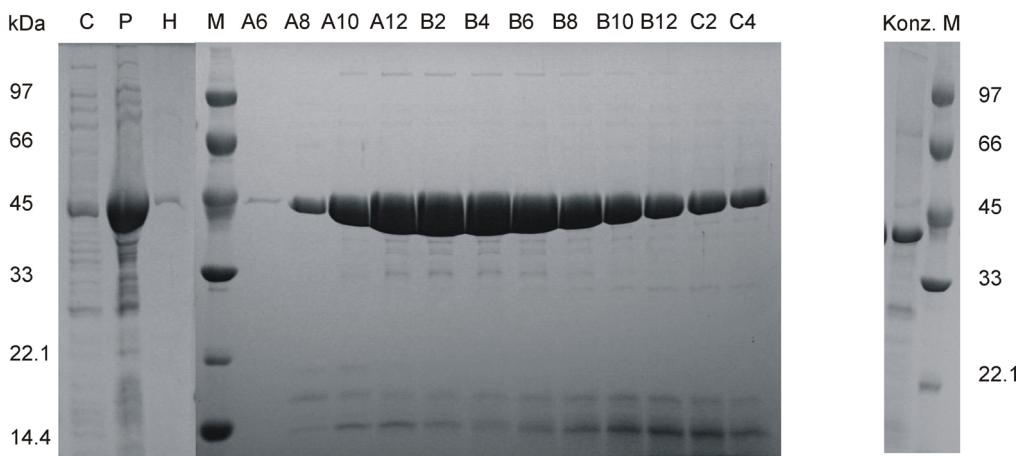


Abbildung 29: Anreicherung von aaTrpD1, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).
kDa: Molekulargewicht der in M aufgetragenen Markerproteine (*Low Molecular Weight Marker*).
P: unlösliche Fraktion des Zellextraktes, C: lösliche Fraktion des Zellextraktes, H: Überstand des Hitzeschrittes. A6-C4: ausgewählte Fraktionen nach der Metallchelat-Affinitätschromatographie, Konz.: einkonzentriertes Protein

Etwa 20% des Proteins befanden sich in der löslichen Fraktion des Zellextraktes. Es wurde nach dem Benzonaseverdau der Nukleinsäuren (3.3.2) über einen Hitzeschritt bei 80°C für 20 min (3.3.3) und Metallchelat-Affinitätschromatographie (3.3.4.1) gereinigt. Aufgrund der Trypsinsensibilität von aaTrpD1-wt (Simona Cerrone, mündliche Mitteilung) wurde auf die proteolytische Abspaltung des N-terminalen His₍₆₎-Tags verzichtet. Nach der Dialyse gegen 100 mM KP pH 7,5 und der Einkonzentrierung lag aaTrpD1 zu etwa 80% sauber vor (Abbildung 29). Die Ausbeute betrug 7 mg Protein aus 1 l Bakterienkultur. Das Protein wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80°C gelagert.

4.6.3 Steady-state enzymkinetische Charakterisierung von tmTrpD und aaTrpD1

Zunächst wurde die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von tmTrpD von der zugegebenen Konzentration an MgCl₂ bestimmt. Es zeigte sich eine ähnliche Optimumskurve wie für ssTrpD-wt (Abbildung 23), wobei jedoch die Inhibition durch hohe Konzentrationen an Mg²⁺ bei tmTrpD wesentlich weniger stark ausgeprägt war (Daten nicht gezeigt). Anschliessend wurden in Anwesenheit von

Ergebnisse und Diskussion

50 μM bzw. 2 mM MgCl₂ die enzymkinetischen Parameter K_M^{PRPP}, K_M^{AA} und k_{cat} wie unter 4.2.1.1.2 beschrieben bestimmt.

In Tabelle 6 sind die für tmTrpD ermittelten Werte aufgelistet und mit denen von ssTrpD-wt verglichen. Außerdem sind die in Anwesenheit von 0,5 mM MgCl₂ gemessenen Werte für K_M^{PRPP}, K_M^{AA} und k_{cat} von aaTrpD1 gezeigt.

Tabelle 6: Steady-state enzymkinetische Parameter für TrpD Varianten aus verschiedenen hyperthermophilen Organismen.

K_M^{AA}: Michaelis-Konstante für Anthranilsäure, K_M^{PRPP}: Michaelis-Konstante für PRPP, k_{cat}: Wechselzahl, k_{cat}/K_M: katalytischer Effizienzparameter.

Die Messungen erfolgten bei 60°C in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 und verschiedenen Konzentrationen an MgCl₂. Bei der Bestimmung von K_M^{PRPP} und K_M^{AA} lag das jeweils zweite Substrat in sättigender Konzentration ($>10 \times K_M$) vor.

Protein	MgCl ₂ [μM] Optimum	MgCl ₂ [μM] Zugabe	K _M ^{PRPP} [μM]	K _M ^{AA} [μM]	k _{cat} [s^{-1}]	k _{cat} /K _M ^{PRPP} [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k _{cat} /K _M ^{AA} [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
ssTrpD-wt	25-50	50	160	0,04	4,2	$2,7 \times 10^{-2}$	105
ssTrpD-wt	25-50	2000	4300	0,07	1,1	$2,6 \times 10^{-4}$	16
tmTrpD	50	50	27	0,01	3,2	0,12	267
tmTrpD	50	2000	26	0,01	2,4	$9,1 \times 10^{-2}$	240
aaTrpD1	500	500	28	0,05	17	0,61	340

Es fällt auf, dass beide Michaelis-Konstanten und die Wechselzahl von tmTrpD in Anwesenheit von 50 μM und 2 mM MgCl₂ praktisch identisch sind. Dies bedeutet, dass hohe Mg²⁺-Konzentrationen weder stark inhibitorisch (wie z.B. bei ssTrpD-wt beobachtet) noch stimulierend (wie z.B. bei ssTrpD-D223N+E224Q) wirken (vgl. Abbildung 23, in der die Mg²⁺-Abhängigkeit der beiden erwähnten Proteine gezeigt wird). Interessanter Weise zeigen ssTrpD-wt und tmTrpD unter jeweils optimalen Mg²⁺ Konzentrationen vergleichbare Wechselzahlen, während der k_{cat} Wert von aaTrpD1 etwa 4-5 fach höher liegt. Dagegen sind die K_M^{PRPP} Werte von tmTrpD und aaTrpD1 etwa 6-fach niedriger als der entsprechende Wert von ssTrpD-wt, während sich die K_M^{AA} Werte nicht wesentlich unterscheiden.

4.7 ***Untersuchung der Scharnierbewegung in ssTrpD-wt***

Die Röntgenstrukturanalyse von ssTrpD-wt mit gebundenen Substraten zeigt, dass die Bindetaschen für die beiden AA Moleküle und PRPP zu weit voneinander entfernt liegen, als dass die Reaktion stattfinden könnte. So beträgt der Abstand der Stickstoffatome von AA I bzw. II vom C1-Atom der Ribose des PRPP 14,6 Å bzw. 8,6 Å (Abbildung 14). Dies bedeutet, dass sich die Substrate bei der Reaktion einander annähern müssen, wahrscheinlich vermittelt durch eine Scharnierbewegung der beiden Domänen der ssTrpD Untereinheit. Diese Bewegung wird vermutlich durch das starre Kristallgitter verhindert, sollte aber in Lösung detektiert werden können. Im Rahmen von Kooperationen wurde dies mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (3.5.3) und von FRET an Einzelmolekülen (3.5.4) versucht.

4.7.1 **Röntgenkleinwinkelstreuung (*small-angle X-ray scattering*)**

Die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Dimitri Svergun (EMBL Hamburg) durchgeführt. Dabei wurden Experimente mit ssTrpD-wt ohne Substrat, sowie in Gegenwart von PRPP plus Mg^{2+} , AA und PRPP plus Mg^{2+} und AA aufgenommen. Einzelheiten zur Aufnahme und Prozessierung der Daten finden sich in Kapitel 3.5.3.

In Abbildung 30 sind die erhaltenen Streukurven (A) und die daraus abgeleiteten Abstandsverteilungsfunktionen (B) dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

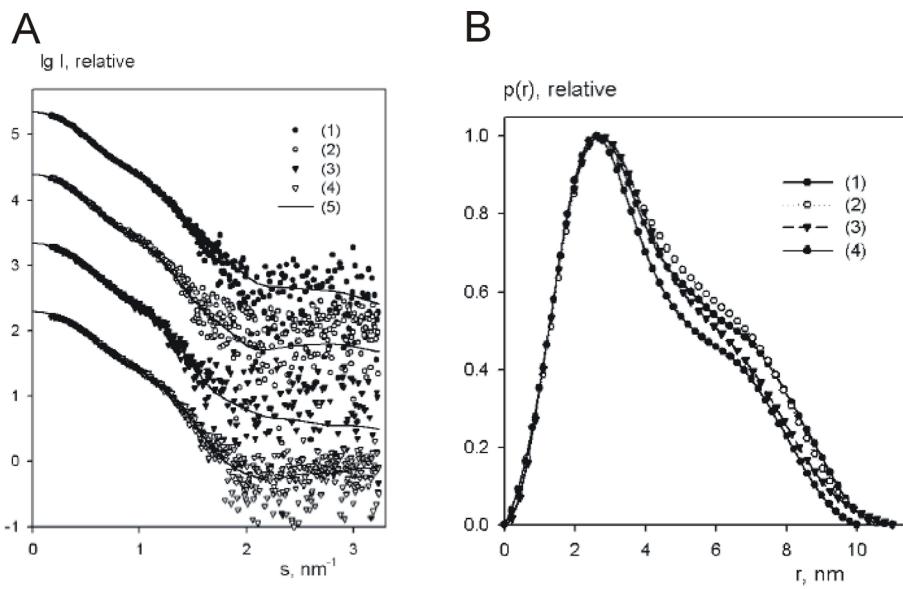


Abbildung 30: Streukurven (A) und Abstandsverteilungsfunktionen (B) von ssTrpD-wt.
 (1): ssTrpD-wt Apoenzym, (2): ssTrpD + 10 mM PRPP + 5 mM MgCl₂, (3): ssTrpD + 10 mM AA, (4): ssTrpD + 10 mM PRPP + 5 mM MgCl₂ + 10 mM AA, (5): berechnete Streuparameter aus dem bestgefitteten Modell

Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die abgeleiteten Gyrationsradien (R_g : mittlerer Abstand der Streuzentren vom Massenschwerpunkt) und maximalen Dimensionen (D_{\max} : maximaler Abstand zweier Streuzentren).

Ausserdem sind die Unterschiede zwischen den experimentell ermittelten Streukurven und den aus der Röntgenstruktur bzw. aus verschiedenen Strukturmodellen (siehe unten) berechneten Streukurven angegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7: Experimentell ermittelte und aus Strukturmodellen berechnete Streuparameter von ssTrpD-wt mit und ohne Substrate.

^aR_g: experimentell ermittelter Gyrationsradius, ^bR_{gt}: berechneter Gyrationsradius des Strukturmodells mit der geringsten Diskrepanz zu den SAXS-Daten; ^cD_{max}: maximaler Abstand zweier Streuzentren; ^d schliesst eine Korrektur von 6 Å für die Hydrathülle ein; χ_c : Relativunterschiede zwischen experimentellen Streukurven und der aus der Röntgenstruktur des apo-Enzyms berechneten Streukurve (pdb code 1O17); χ : Relativunterschiede zwischen experimentellen Streukurven und aus Modellen mit asymmetrischer Scharnierbewegung der beiden Domänen (eine Untereinheit geschlossen, eine offen) berechneten Streukurven; χ_M : Relativunterschiede zwischen experimentellen Streukurven und aus Modellen mit symmetrischer Scharnierbewegung der beiden Domänen (ein Teil der Dimere mit beiden Untereinheiten geschlossen, eine anderer Teil mit beiden Untereinheiten offen) berechneten Streukurven.

Probe	R _g (nm) ^a	R _{gt} (nm) ^b	D _{max} (nm) ^c	χ_c	χ	χ_M
Apo-ssTrpD (Röntgenstruktur)	3,44	-	11,4 ^d			
Apo-ssTrpD	3,44±0,04	3,42	11,0±0,5	1,19	1,17	1,58
ssTrpD/PRPP/Mg ²⁺	3,42±0,05	3,40	11,0±0,5	1,22	1,21	1,59
ssTrpD/AA	3,30±0,10	3,24	10,5±1,0	1,24	1,09	1,21
ssTrpD/PRPP/Mg ²⁺ /AA	3,13±0,06	3,10	10,0±0,5	1,67	1,15	2,33

Ein Vergleich der Gyrationsradien R_g, der maximalen molekularen Größe (D_{max}) und der Abstandsverteilungsfunktionen p(r) (Abbildung 30) zeigt, dass ssTrpD ohne Ligand und mit gebundenem PRPP-Mg²⁺ in Lösung eine sehr ähnliche Struktur aufweist. In beiden Fällen beträgt der Abstand zwischen den Zentren der beiden Untereinheiten im Dimer (D_{inter}), welcher durch die Schulter in Abbildung 30B angezeigt wird, ~7 nm. Im Komplex mit Anthranilsäure weist das Enzym einen vergleichbaren D_{max} Wert und leicht erniedrigte D_{inter} und R_g Werte auf. Im Gegensatz hierzu zeigt das mit allen Substraten komplexierte Enzym um ~1 nm kleinere D_{max} und D_{inter} Werte und einen signifikant kleineren R_g Wert, was auf eine kompaktere Form hindeutet. Entsprechend zeigt der Vergleich der experimentellen Streukurven mit der aus der Röntgenstruktur berechneten Kurve, dass letztere die Konformation in Lösung des unligandierten und des mit nur PRPP-Mg²⁺ besetzten Enzyms gut wiederspiegelt ($\chi_c = 1,19$ bzw. 1,22; Tabelle 7). Die Röntgenstruktur scheint sich jedoch leicht von der Struktur in Lösung des nur mit AA komplexierten ($\chi_c = 1,24$; Tabelle 7) und erheblich von der Struktur des voll ligandierten ssTrpD-wt zu unterscheiden ($\chi_c = 1,67$; Tabelle 7). Aus den Daten kann geschlossen

Ergebnisse und Diskussion

werden, dass die Bindung beider Substrate eine deutlich veränderte Struktur von ssTrpD-wt induziert.

Um diese Strukturänderung genauer zu charakterisieren, wurden Modelle von ssTrpD-wt mit und ohne Liganden erstellt, in denen die große α/β -Domäne in 5° Intervallen gegen die kleine α -helikale Domäne gedreht wurde. Diese Scharnierbewegung wurde alternativ entweder nur in einer Untereinheit (asymmetrisch) oder in beiden Untereinheiten (symmetrisch) simuliert. Die Dimergrenzfläche wurde hierbei konstant gehalten. Es wurden für alle Modelle Streukurven berechnet und diese mit den experimentell ermittelten Kurven verglichen. Während, wie oben angedeutet, die experimentellen Streukurven des Apo-Enzyms und des mit PRPP-Mg²⁺ komplexierten Enzyms den aus der Röntgenstruktur berechneten Streukurven entsprechen, ließ sich die Streukurve des nur mit Anthranilsäure komplexierten ssTrpD gut mit der Streukurve eines Modells zur Übereinstimmung bringen, das eine kleine asymmetrische Scharnierbewegung in nur einer Untereinheit annimmt ($\chi = 1,09$; Tabelle 7). Dagegen konnte nur ein Modell mit einer deutlich asymmetrischen Domänenbewegung die Struktur des voll komplexierten Enzyms zufriedenstellend beschreiben ($\chi = 1,15$; Tabelle 7).

In Abbildung 31 ist die Superpositionierung der besten gefitteten Modelle in der offenen (A) und asymmetrischen (B) Konformation dargestellt. Dabei ist in der unteren Untereinheit jeweils die Rotationsrichtung der α/β -Domäne gegen die α -helikale Domäne durch Pfeile angedeutet.

Ergebnisse und Diskussion

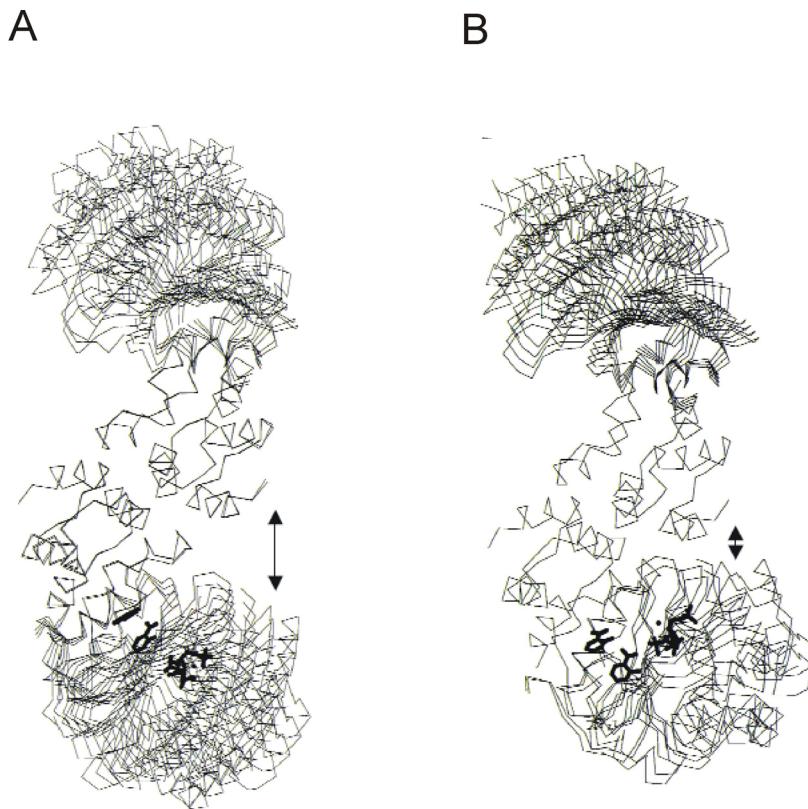


Abbildung 31: Superpositionierung der fünf besten Modelle für die offene-offene (A) und die offene-geschlossene (B) Konformation des homodimeren ssTrpD.

Die gezeigten Modelle nehmen eine asymmetrische Scharnierbewegung an, d.h. nur die beiden Domänen der unteren Untereinheit ändern ihre Lage zueinander. Diese Relativbewegung der Domänen ist durch den Pfeil angedeutet. Die Substrate AA-I, AA-II und PRPP-Mg²⁺ sind in schwarz dargestellt. Die beiden oberen Untereinheiten sind identisch, jedoch aus einem leicht unterschiedlichen Blickwinkel dargestellt.

Um zu überprüfen, ob ssTrpD in Lösung aus einer Mischung von symmetrisch offenen und symmetrisch geschlossenen Dimeren bestehen könnte, wurden die experimentellen Streukurven mit den Streukurven entsprechender Modelle verglichen. Hierbei zeigte sich jedoch eine nur unzureichende Übereinstimmung, die sich in den relativ großen χ_M -Werten ausdrückt (Tabelle 7).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bindung beider Substrate an ssTrpD

zu einer asymmetrischen Scharnierbewegung in nur einer Untereinheit des Proteins führt, die für die Annäherung der Substrate und damit für die Katalyse eine entscheidende Rolle spielen dürfte.

Ergebnisse und Diskussion

4.7.2 Einzelmolekülspektroskopie

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Untersuchungen an Einzelmolekülen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Claus Seidel (Lehrstuhl für Molekulare Physikalische Chemie der Universität Düsseldorf) durchgeführt.

Um die Bewegung der Domänen über FRET verfolgen zu können, wurden, basierend auf der Kristallstruktur von ssTrpD-wt, die Aminosäuren Asn162 aus der α -helikalen Domäne und Lys280 aus der α/β -Domäne durch Cysteinreste ersetzt (Abbildung 14). Der Abstand dieser Reste beträgt 43 Å und kommt damit dem Förster-Radius von 50 Å der verwendeten Farbstoffe Alexa-488 (Donor) und Alexa-594 (Akzeptor) sehr nahe (Abbildung 11). Anschliessend erfolgte die Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe an die SH-Gruppen der Cysteine und die eigentlichen Messungen. Die Grundlagen dieser Technik und Einzelheiten der Durchführung werden in Kapitel 3.5.4 beschrieben.

4.7.2.1 Klonierung des Konstruktes pQE40-sstrpD-N162C+K280C zur Herstellung des Homodimers

Die Varianten ssTrpD-N162C und ssTrpD-K280C wurden nacheinander mittels SOE-PCR hergestellt (Kapitel 3.2.4), wobei pQE40-sstrpD-wt als Ausgangstemplat diente. In der ersten PCR-Runde wurden in zwei getrennten Ansätzen die jeweiligen 5' Mutationsprimer (2.4.8) in Kombination mit den 3' Klonierungsprimern (2.4.4) und die 3' Mutationsprimer (2.4.8) zusammen mit den 5' Klonierungsprimern (2.4.4) eingesetzt. Die zweite PCR erfolgte jeweils mit den beiden Cy Primern und den beiden im Mutationsbereich überlappenden Megaprimeren als Matrize. Im Anschluss an die Amplifikation der Vollängenprodukte wurden die Gene über die Restriktionsschnittstellen *Bam*H I und *Hind*III in den Vektor pQE40 kloniert und die beabsichtigte Basenabfolge durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

Ergebnisse und Diskussion

4.7.2.2 Heterologe Expression und Reinigung von ssTrpD-N162C+K280C (Homodimer)

Anschliessend wurden *E. coli* KK8 Zellen mit pQE40-ss_rpD-N162C+K280C transformiert, die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und das Protein im präparativen Maßstab (3.3.2) angereichert.

Abbildung 32 gibt einen Überblick über das Ergebnis der Expression und der Anreicherungsschritte.

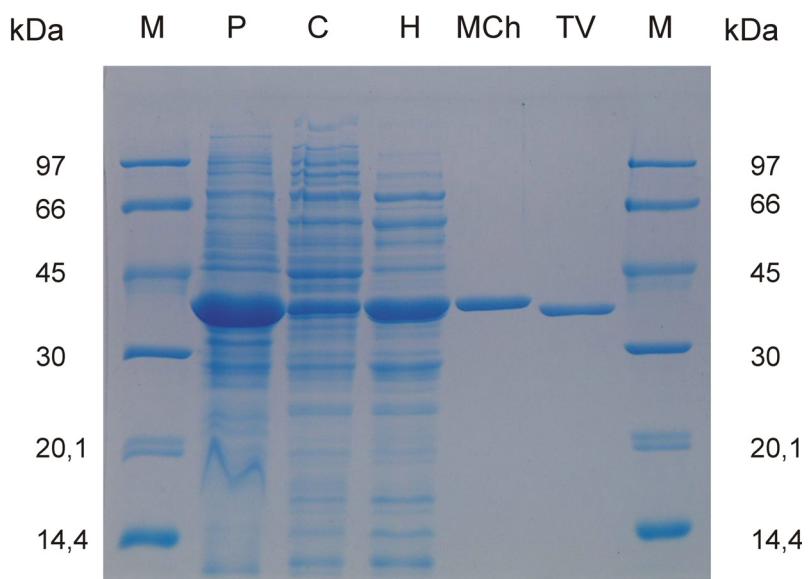


Abbildung 32: Anreicherung von ssTrpD-N162C+K280C, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid)

kDa: Molekulargewicht der in M aufgetragenen Markerproteine (*Low Molecular Weight Marker*).
P: unlösliche Fraktion des Zellextraktes, C: lösliche Fraktion des Zellextraktes, H: Überstand des Hitzeschrittes. MCh: vereinigte Fraktionen nach der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie, TV: Protein nach dem Trypsinverdau zur Abspaltung des N-terminalen His₍₆₎-Tag.

Ein großer Teil von ssTrpD-N162C+K280C befand sich in der unlöslichen Fraktion des Zellextraktes, ein kleinerer Teil in der löslichen Fraktion. Daraus wurde das Protein dann mittels Hitzeschritt (3.3.3) bei 65°C für 15 min und Metallchelat-Affinitätschromatographie (3.3.4.1) gereinigt. Die Fraktionen, die ssTrpD Protein enthielten, wurden vereinigt, gegen 100 mM KP pH 7,5 dialysiert und der His₍₆₎-Tag durch Trypsin entfernt. Das Protein lag danach zu mindestens 90% sauber vor (Abbildung 32). Die Ausbeute betrug 4,7 mg aus 3 l Bakterienkultur. Die Proteinlösung wurde auf 1,5 mg/ml einkonzentriert und nach dem Eintropfen in flüssigen Stickstoff bei -80°C gelagert.

Ergebnisse und Diskussion

4.7.2.3 Einbringung von Fluoreszenzfarbstoffen in ssTrpD-N162C+K280C und Vermessung des markierten Homodimers

4.7.2.3.1 Fluoreszenzmarkierung von ssTrpD-N162C+K280C

Das Protein wurde mit Alexa-488 und Alexa-594 wie unter 3.5.4.2 beschrieben markiert. Nach Abtrennung von überschüssigem Farbstoff mittels Ultrafiltration, wurde ein Absorptionsspektrum im Bereich von 280-720 nm aufgenommen. Dies ist, zusammen mit den Spektren der beiden reinen Farbstoffe, in Abbildung 33 gezeigt.

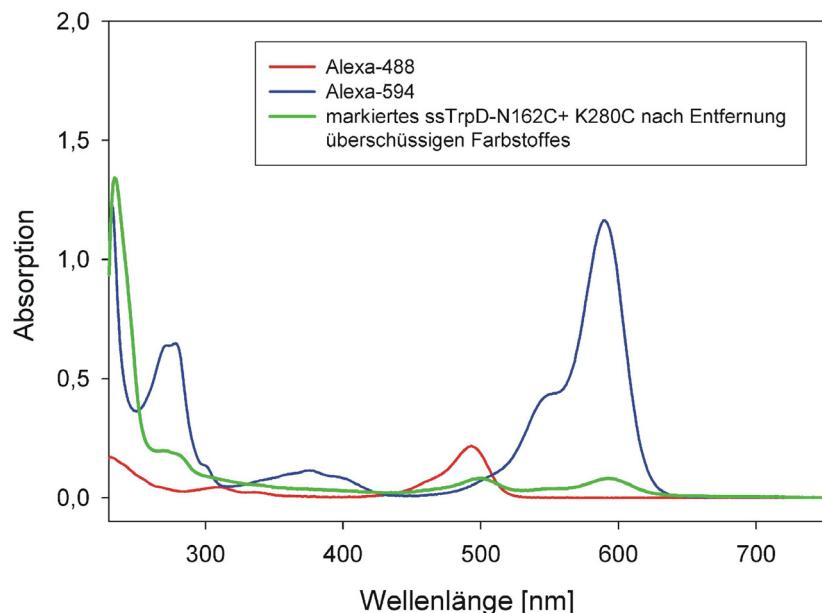


Abbildung 33: Absorptionsspektren der Farbstoffe Alexa-488 und Alexa-594 im Vergleich mit markiertem ssTrpD-N162C+K280C.

Die Spektren wurden in Markierungspuffer (2.10) bei 25°C aufgenommen. Die Konzentration der Farbstoffe betrug 3 µM für Alexa-488 und 12 µM für Alexa-594.

Es ist zu erkennen, dass die Maxima der grünen Kurve im Vergleich zu den Maxima der blauen und roten Kurven zu größeren Wellenlängen hin verschoben sind. Dies deutet darauf hin, dass die Farbstoffe wie beabsichtigt an das Protein gebunden haben.

Ergebnisse und Diskussion

Nach der in Kapitel 3.5.4.2 beschriebenen Methode wurde abgeschätzt, dass pro dimerem ssTrpD je etwa 1 Molekül Alexa-488 und 1 Molekül Alex-594 gebunden waren. Anschliessend wurde ein Fluoreszenzemissionsspektrum aufgenommen. Sollten durch die gemeinsame Markierung eines Proteinmoleküls Donor-Akzeptorpaare in räumliche Nähe gebracht worden sein, dann ist FRET zu erwarten. Dies bedeutet, dass nach Anregung der Donorfluoreszenz bei einer Wellenlänge von 488 nm neben der Donoremission bei 518 nm auch eine Akzeptoremission bei 620 nm zu beobachten sein sollte.

In Abbildung 34 ist das Fluoreszenzspektrum dargestellt.

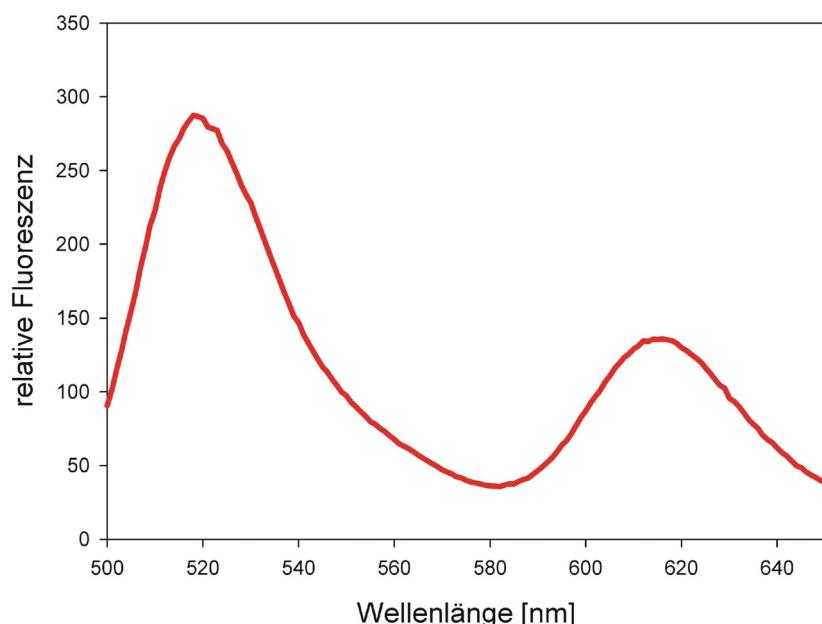


Abbildung 34: Fluoreszenzemissionsspektrum des markierten ssTrpD-N162C+K280C nach Anregung des Donors Alexa-488 bei 488 nm.

Die Spektren wurden in Markierungspuffer (2.10) bei 25°C aufgenommen.
Es ist sowohl Donoremission bei 518 nm als auch Akzeptoremission bei 620 nm zu beobachten.

Tatsächlich ist neben einer starken Donoremission ein kleineres Emissionssignal des Akzeptors zu beobachten. Dies bedeutet, dass zumindest ein Teil der Proteinmoleküle mit beiden Farbstoffen markiert wurde.

Ergebnisse und Diskussion

4.7.2.3.2 Multiparameter Fluoreszenz Detektion (MFD) Messungen mit markiertem ssTrpD-N162C+K280C

Durch SAXS-Messungen konnte gezeigt werden, dass die gemeinsame Bindung von AA und PRPP-Mg²⁺ an ssTrpD zu einer asymmetrischen Scharnierbewegung innerhalb einer Untereinheit des Homodimers führt (Kapitel 4.7.1).

In Abbildung 35 sind, ähnlich wie in Abbildung 30, die offene-offene (A) und die offene-geschlossene (B) Konformation des dimeren ssTrpD gezeigt. Zusätzlich sind die C α -C α Abstände zwischen den durch die eingebrachten Cysteinreste ersetzen Aminosäuren eingezeichnet.

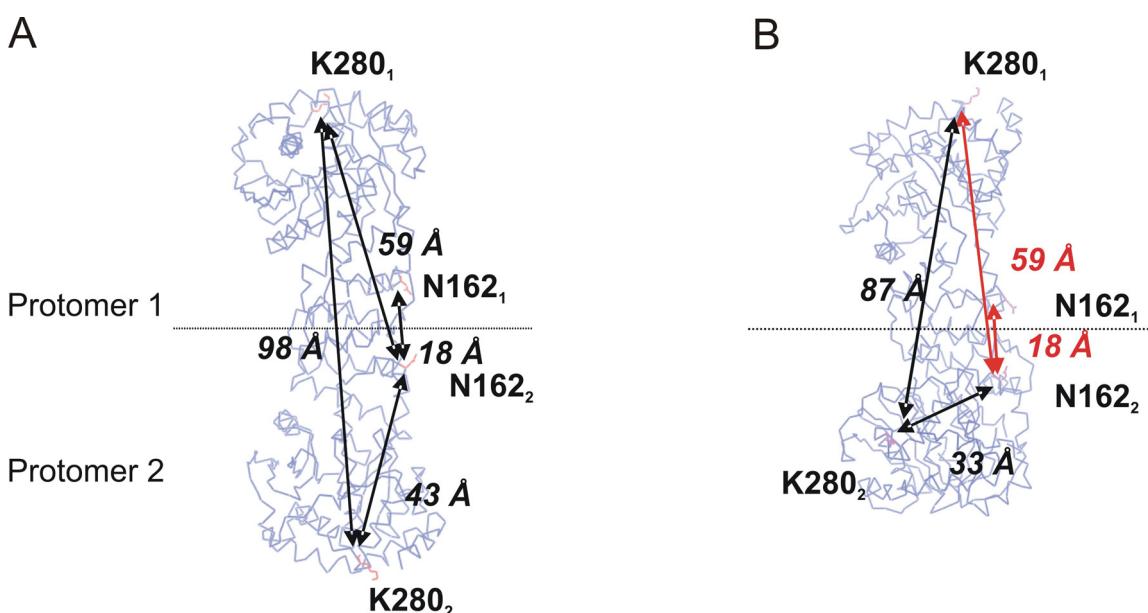


Abbildung 35: Strukturmodell von ssTrpD für die offene-offene (A) und die offene-geschlossene (B) Konformation des homodimeren Proteins (abgeleitet aus SAXS-Messungen, vgl. Abb. 30).

Gezeigt sind die C α -C α Abstände zwischen den durch die eingeführten Cysteinreste ersetzen Aminosäuren. Die rot eingeziechneten Abstände verändern sich nicht bei der Scharnierbewegung innerhalb einer Untereinheit. Die beiden oberen Untereinheiten sind identisch, jedoch aus einem leicht unterschiedlichen Blickwinkel dargestellt.

Aufgrund der Tatsache, dass in jeder der beiden Untereinheiten zwei Cysteinreste eingebracht wurden und eine spezifische Markierung mit Donor oder Akzeptor nicht möglich ist, ist eine Vielzahl an Farbstoffkombinationen zu erwarten (Abbildung 36).

Ergebnisse und Diskussion

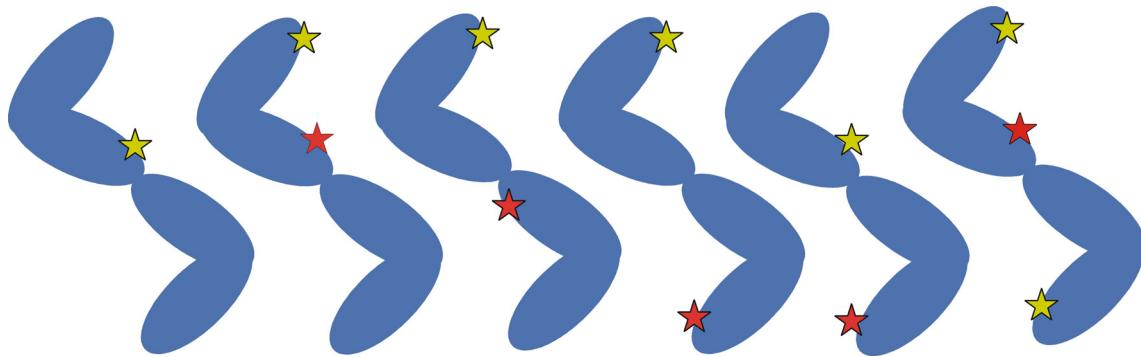


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Kombinationsmöglichkeiten der Fluoreszenzfarbstoffe Alexa-488 und Alexa-594 im ssTrpD-N162C+K280C Homodimer. Alexa-488 (Donor): gelbe Sterne, Alexa-594 (Akzeptor): rote Sterne. Die Positionen von Donor und Akzeptor können vertauscht werden. Auch Kombinationen mit drei oder vier Farbstoffen sind denkbar, treten aber nur mit geringer Wahrscheinlichkeit auf.

Die Analyse dieser heterogenen Spezies und die Diskriminierung zwischen den verschiedenen Signalen wird durch eine in der Arbeitsgruppe von Prof. Claus Seidel entwickelte Methode, der PDA (*Probability Distribution Analysis*), möglich (Antonik *et al.*, 2006).

Die FRET-Messungen an Einzelmolekülen wurden unter vier verschiedenen Bedingungen durchgeführt:

Messung 1: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 µM MgCl₂

Messung 2: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 µM MgCl₂, 1 µM Anthranilsäure

Messung 3: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 µM MgCl₂, 2 mM PRPP

Messung 4: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 µM MgCl₂, 1 µM Anthranilsäure, 2 mM PRPP

Die Proteinkonzentration betrug jeweils 100 pM.

In Abbildung 37 sind die Anzahl der beobachteten Ereignisse (obere Graphik), sowie die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor (S_G/S_R) (untere Graphik) in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

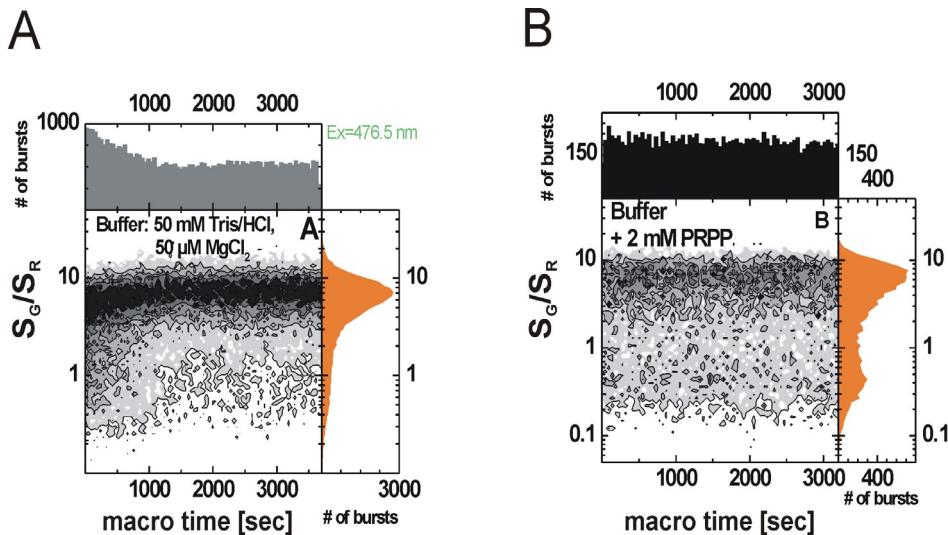


Abbildung 37: 2-D Histogramme der MFD Messungen mit markiertem ssTrpD-N162C+K280C in Puffer (A) und Puffer mit 2 mM PRPP (B).

Macro time: Beobachtungszeit; # of bursts: Anzahl der beobachteten Ereignisse; S_G/S_R : Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Donor (Alexa-488) zu Akzeptor (Alexa-594). Die Intensität der Schwärzung im linken unteren Diagramm ist ein Mass für die Häufigkeit eines bestimmten S_G/S_R Verhältnisses. Die orange Graphik im rechten unteren Diagramm spiegelt die Häufigkeit eines bestimmten S_G/S_R Verhältnisses, aufsummiert über den gesamten Beobachtungszeitraum, wider.

Abbildung 37A zeigt, dass die Anzahl der beobachteten Ereignisse, d.h. die Anzahl der durch das Beobachtungsfenster durchtretenden und zumindest mit Donor markierten ssTrpD Molekülen mit der Zeit abnehmen. Außerdem geht der Anteil von Ereignissen mit kleinem S_G/S_R , d.h. effizientem FRET, zeitabhängig ebenfalls zurück. Beide Effekte lassen sich erklären, wenn man annimmt, dass dimeres ssTrpD bei der geringen Konzentration von 100 pM zeitabhängig in Monomere dissoziert und diese an der Abdeckung der Probenkammer adsorbieren. Dadurch würde sich nicht nur die Anzahl an beobachtbaren Proteinmolekülen verringern, sondern auch rein statistisch der Anteil an nur einfach mit Donor (statt doppelt mit Donor und Akzeptor) markiertem ssTrpD erhöhen. Generell dominieren S_G/S_R Verhältnisse von größer 8, die typisch für „donor-only“ Moleküle sind. Entsprechend ergab die PDA Analyse, dass unter diesen Bedingungen etwa 98% der beobachtbaren Proteinmoleküle einfach mit Donor markiert vorlagen und nur ein kleiner Anteil von 2% sowohl Donor als auch Akzeptor enthält.

Ergebnisse und Diskussion

Aus Abbildung 37B wird deutlich, dass in Anwesenheit von PRPP-Mg²⁺ sowohl die Anzahl der beobachteten Ereignisse als auch die Verteilung der S_G/S_R Verhältnisse über die Zeit weitgehend konstant bleiben. Neben dem in der Häufigkeit weiterhin dominierenden S_G/S_R Verhältnis von größer 8 zeigt sich im rechten unteren Diagramm eine weitere Schulter bei einem S_G/S_R Verhältnis von kleiner 1. Dies deutet darauf hin, dass in Anwesenheit von PRPP-Mg²⁺ in einem signifikanten Anteil der ssTrpD Moleküle effizienter FRET stattfindet. Ein ähnliches Ergebnis wie in Anwesenheit von PRPP-Mg²⁺ ergab sich auch nach Zugabe von Anthranilsäure (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass jedes der beiden Substrate das Dimer von ssTrpD gegen seine Dissoziation in Monomere stabilisiert und damit den Anteil an FRET-Ereignissen erhöht.

In Abbildung 38 sind, aufsummiert über die gesamte Beobachtungszeit, das S_G/S_R Verhältnis (oberes Diagramm) und die Fluoreszenzanisotropie des Donors (unteres Diagramm) gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Anwesenheit des Akzeptors $\tau_{D(A)}$ dargestellt (Kühnemuth und Seidel, 2001; Schaffer *et al.*, 1999; Eggeling *et al.*, 2001).

Ergebnisse und Diskussion

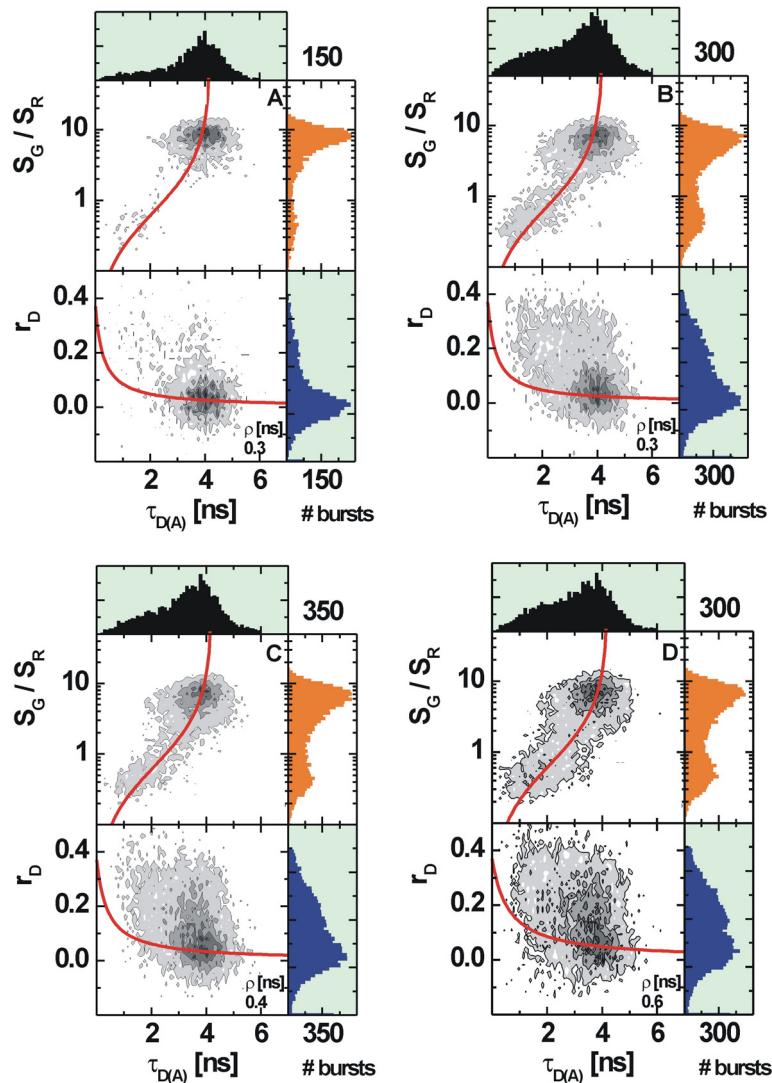


Abbildung 38: Kombinierte 2-D Histogramme der MFD Messungen von markiertem ssTrpD-N162C+K280C unter 4 verschiedenen Pufferbedingungen.

of bursts: Anzahl der beobachteten Ereignisse; S_G/S_R : Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Donor (Alexa-488) zu Akzeptor (Alexa-594). r_D : Anisotropie des Donors; $\tau_{D(A)}$: Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Anwesenheit des Akzeptors. Die Intensität der Schwärzung in den Diagrammen ist ein Maß für die Häufigkeit eines bestimmten S_G/S_R Verhältnisses bzw. einer bestimmten Anisotropie. Die schwarzen, orangen und blauen Graphiken stellen die Häufigkeitsverteilungen von Lebensdauern, S_G/S_R Verhältnissen und Anisotropien dar. Die rote Linie gibt die Verteilung der Rotationskorrelationszeiten ρ des Donors wider.

A: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 μ M MgCl₂

B: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 μ M MgCl₂, 1 μ M Anthranilsäure

C: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 μ M MgCl₂, 2 mM PRPP

D: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 μ M MgCl₂, 1 μ M Anthranilsäure, 2 mM PRPP

In Abbildung 38A zeigt die Hauptpopulation ein S_G/S_R Verhältnis von etwa 10 (kein FRET), eine Anisotropie von etwa 0,01 (hohe Beweglichkeit des Donors) und eine

Ergebnisse und Diskussion

Fuoreszenzlebensdauer von 4 ns. Eine kleinere Subpopulation zeigt hingegen ein S_G/S_R Verhältnis von 0,2-1 (effizienter FRET) und eine Anisotropie zwischen 0,2 und 0,375 (geringe Beweglichkeit des Donors) bei einer verkürzten Fluoreszenzlebensdauer von 1-2 ns. In Anwesenheit jeweils eines Substrates (Abbildung 38 B,C) und besonders bei Zugabe beider Substrate (Abbildung 38 D) nimmt der Anteil der Population mit kleinerem S_G/S_R Verhältnis, größerer Anisotropie und geringerer Lebensdauer zu. Dies deutet darauf hin, dass ein hoher und effizienter FRET bei relativ unbeweglichem Donor-Fluorophor erfolgt. Im Allgemeinen ist das gemessene S_G/S_R Verhältnis sehr breit und lässt auf eine heterogene Probe mit multiplen FRET Signalen schliessen.

In Abbildung 39 sind die Umhüllenden der orangen Diagramme aus Abbildung 38 überlagert dargestellt.

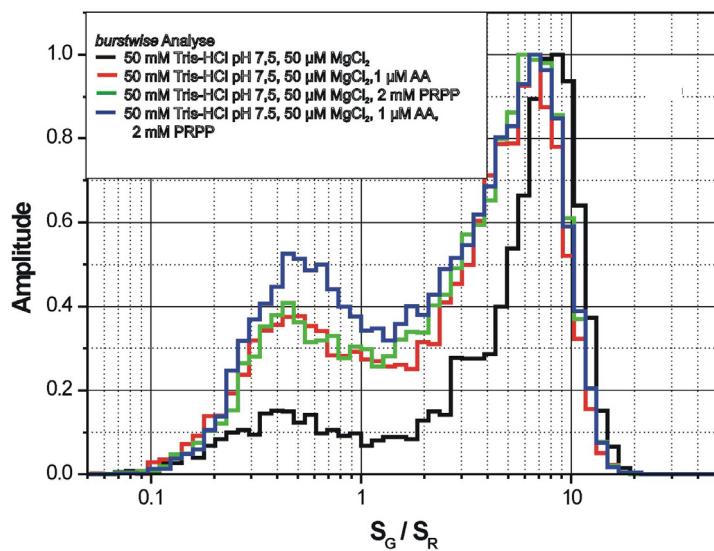


Abbildung 39: Häufigkeitsverteilung der S_G/S_R Verhältnisse von ssTrpD-N162C+K280C bei 4 verschiedenen Pufferbedingungen (entspricht den Umhüllenden der orangen Diagramme in Abbildung 37A-D).

In dieser Darstellung wird noch deutlicher, dass sich der Anteil der Ereignisse mit niedrigem S_G/S_R Verhältnis, entsprechend dem Anteil der ssTrpD-N162C+K280C Moleküle in denen effizienter FRET zu beobachten ist, in Anwesenheit der Substrate deutlich erhöht.

Ergebnisse und Diskussion

Mittels der PDA Analyse werden die S_G/S_R Signale um den Streulichtanteil und das Hintergrundsignal zu F_G/F_R korrigiert, woraus sich mit Hilfe nachstehender Formel der Abstand zwischen Donor und Akzeptor (R_{DA}) berechnen lässt.

$$R_{DA} = R_{0r} \left(\Phi_{FA} \frac{g_R}{g_G} \frac{F_G}{F_R} \right)^{1/6} \quad (\text{Gl.11})$$

Unter Verwendung von Standardparametern für die Akzeptorquantenausbeute $\Phi_{FA} = 0,7$, die Detektionseffizienzen für Akzeptor und Donor von $g_R/g_G = 1,4$ und für einen modifizierten Förster Radius von $R_{0r} = 59 \text{ \AA}$ (Rothwell *et al.*, 2003, Margittai *et al.*, 2003) wurden folgende Donor-Akzeptor Distanzen (R_{DA}) kalkuliert:

$38,5 \pm 1,5 \text{ \AA}$, $47,6 \pm 1,5 \text{ \AA}$, $55,7 \pm 1,5 \text{ \AA}$, $66,2 \pm 2,5 \text{ \AA}$, $82,1 \pm 3 \text{ \AA}$

Die Entferungen entsprechen in erster Näherung den aus den Strukturmodellen berechneten Werten (Abbildung 35), wobei es sich bei dem Abstand von $38,5 \text{ \AA}$ wahrscheinlich um die errechnete Distanz von 33 \AA und bei dem Abstand von 47 \AA vermutlich um die berechnete Entfernung von 43 \AA handelt. Die Entfernung von $55,7 \text{ \AA}$ entspricht dem kalkulierten Abstand von 59 \AA und die Distanz von $82,1 \text{ \AA}$ dem Abstand von 98 \AA im Strukturmodell, während die Distanz von $66,2 \text{ \AA}$ schwer zuzuordnen ist.

4.7.2.4 Klonierung des Konstruktes pQE40-sstrpD-N162C+K280C/sstrpD-wt zur Herstellung des Heterodimers

Zur Vereinfachung der Datenanalyse wurde ein ssTrpD Dimer hergestellt, welches die beiden Cysteinreste nur in einer Untereinheit enthält und damit auch nur in dieser Untereinheit markiert werden kann. Um derartige ssTrpD-wt/ssTrpD-N162C+K280C Heterodimere zu erzeugen, sollten die beiden Gene vom gleichen Plasmid aus exprimiert und an die beiden Proteine zwei unterschiedliche Affinitätstags angehängt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurde mittels PCR unter Verwendung von pQE40-sstrpD-wt als Templat, sowie des 5' Klonierungsprimers 5'-*SphI*/ Strep-Tag (2.4.5) und des 3' Klonierungsprimers 3'-*HindIII* (2.4.4), das sstrpD-wt Gen amplifiziert und gleichzeitig Codon für einen N-terminalen Strep-Tag angefügt. Das Fragment wurde dann über die eingebrachten Schnittstellen für *SphI* und *HindIII* in den Vektor pQE70 kloniert. Hieraus wurde die komplette Transkriptionseinheit (inklusive Promotor und Ribosomen-Bindungsstelle) mittels PCR unter Verwendung der Primer 5'-*XbaI* und 3'-*XbaI* (2.4.6) amplifiziert und hinter die Transkriptionseinheit in pQE40-sstrpD-N162C+K280C unter Verwendung der ausserhalb der MCS lokalisierten *XbaI*-Schnittstelle (Abbildung 4A) kloniert. Das Vorhandensein von zwei unabhängigen Transkriptionseinheiten gewährleistet die Expression beider Gene in einer Zelle, unabhängig von der durch die Klonierung nicht festgelegten Orientierung des sstrpD-wt Gens. Wichtig für die folgende Reinigung ist, dass das produzierte ssTrpD-wt Protein einen N-terminalen Strep-Tag und das sTrpD-N162C+K280C Protein einen N-terminalen His-Tag trägt.

Anschliessend wurden *E. coli* KK8 Zellen mit pQE40-sstrpD-N162C+K280C/sstrpD-wt transformiert und nach Anzucht mehrerer Zwischenkulturen die Genexpression in einem 30 l Fermenter durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert (Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Christian Wandrey, Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich).

Die Anreicherung des rekombinanten Proteingemisches erfolgte zunächst mittels Hitzeschritt (3.3.3). Anschliessend wurde nacheinander eine Metalchelat- und Strep-Tactin-Affinitätschromatographie durchgeführt (3.3.4.1, 3.3.4.2), um das gewünschte Heterodimer von den beiden Homodimeren abtrennen zu können.

Abbildung 40 gibt einen schematischen Überblick über die durchgeführte Reinigungsprozedur.

Ergebnisse und Diskussion

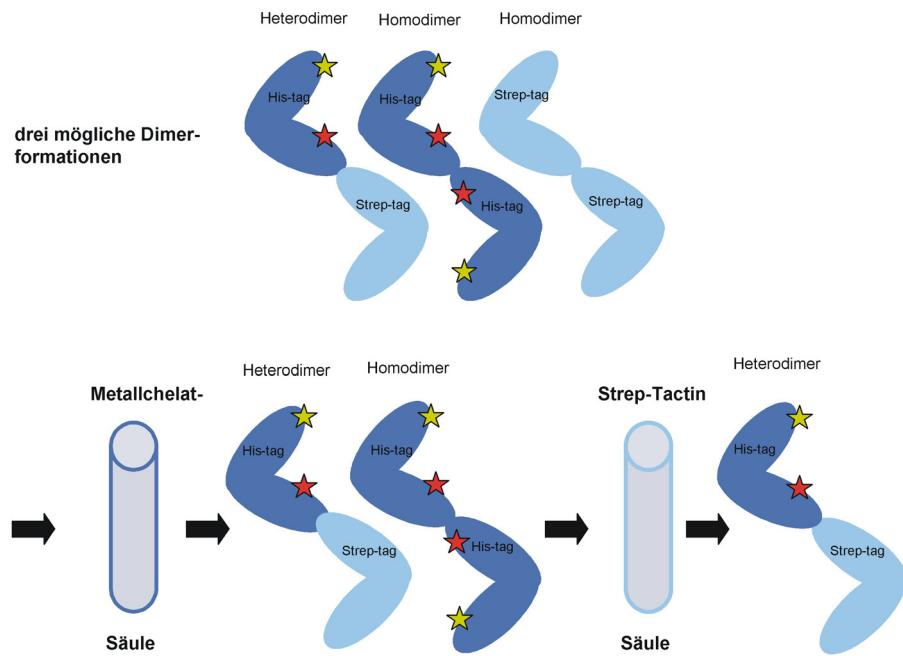


Abbildung 40: Schema für die Anreicherung des Heterodimers ssTrpD-N162C+K280C/ssTrpD-wt aus einer Proteinlösung, welche auch die beiden Homodimere enthält.

Hellblau: ssTrpD-wt Untereinheit mit N-terminalem Strep-Tag; dunkelblau: ssTrpD-N162C+K280C Untereinheit mit N-terminalem His-Tag; gelbe und rote Sterne: Fluoreszenzfarbstoffe Alexa-488 und Alexa-594, gekoppelt an C162 und C280.

Es wurde 590 g Zellpellet erhalten und daraus 50 g aufgearbeitet. Der Hitzeschritt erfolgte für 15 Minuten bei 65°C und der Überstand der Metallchelat-Affinitätschromatographie (3.3.4.1) unterzogen. Fraktionen, die sauberes ssTrpD Protein enthielten (Abbildung 41), wurden vereinigt.

Ergebnisse und Diskussion

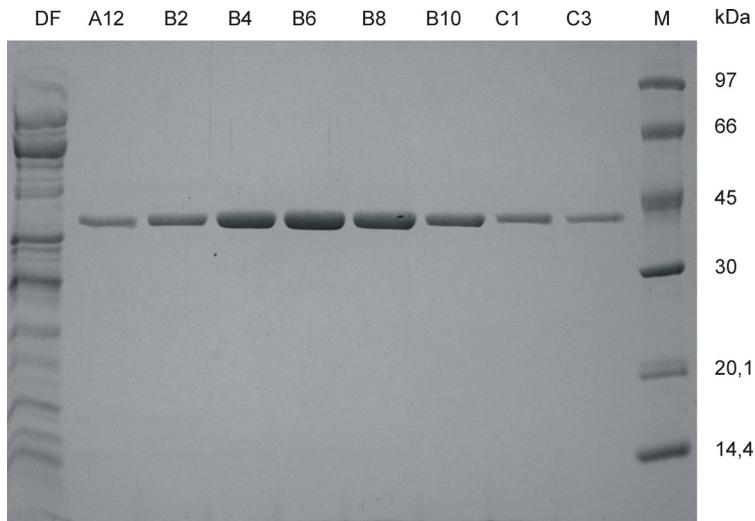


Abbildung 41: Analyse der Elution von rekombinatem ssTrpD-N162C+K280C/ssTrpD-wt (und ssTrpD-N162C+K280C) bei der Metallchelat-Affinitätschromatographie, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).

DF: Durchfluss der Säule, A12-C3: ausgewählte Elutionsfraktionen, kDa: Molekulargewicht der in M aufgetragenen Markerproteine (*Low Molecular Weight Marker*).

Die vereinigten Fraktionen wurden auf ein Volumen von ca. 10 ml einkonzentriert und ohne Dialyse direkt einer Affinitätschromatografie an einer Strep-Tactin-Säule unterzogen (3.3.4.2). Dabei wurde so wenig Protein eluiert, dass es nicht mit einer Coomassie Brilliant Blue G250 Färbung (3.4.2.1), sondern nur durch Silberfärbung nachzuweisen (3.4.2.2) war (Abbildung 42). Das Protein befand sich ausschliesslich in den ersten drei Elutionsfraktionen.

Ergebnisse und Diskussion

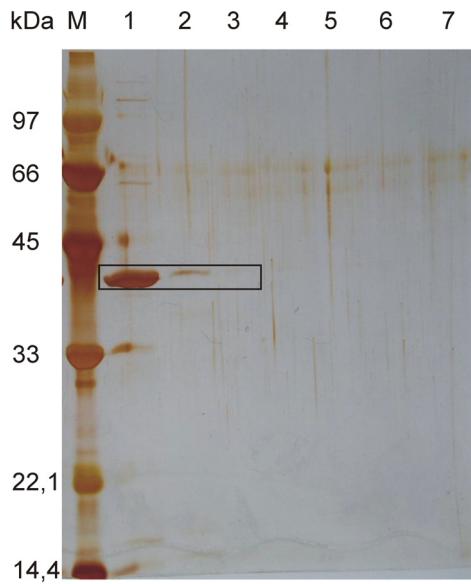


Abbildung 42: Analyse der Elution von rekombinantem ssTrpD-N162C+K280C/ssTrpD-wt bei der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).

kDa: Molekulargewicht der in M aufgetragenen Markerproteine (*Low Molecular Weight Marker*); 1-7: ausgewählte Elutionsfraktionen

Zum Nachweis der beiden Untereinheiten über ihren His₍₆₎- bzw. Strep-Tag wurde jeweils ein Western Blot mit einem Anti-His₍₆₎ Peroxidase-Konjugat (3.4.5.1) und einem Strep-Tactin Alkalische Phosphatase-Konjugat (3.4.5.2) durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 43 gezeigt.

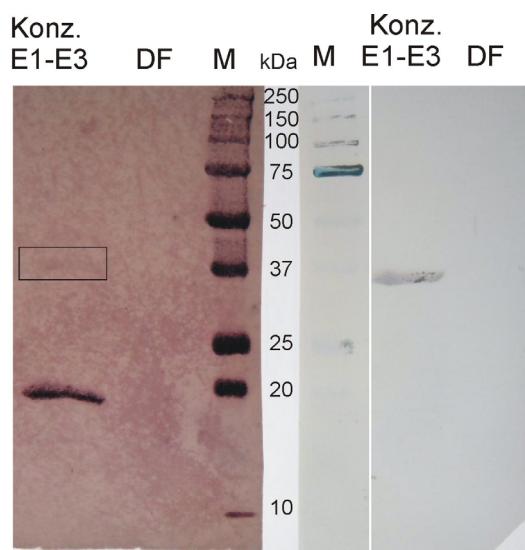


Abbildung 43: Westernblot zum Nachweis des Strep-Tag an ssTrpD-wt (links) und His₍₆₎-Tag an ssTrpD-N162C+K280C (rechts).

links: Nitrocellulose-Membran, rechts: PVDF-Membran; Konz. E1-E3: einkonzentrierte Fraktionen nach der Strep-Tactin- Affinitätschromatographie, DF: Durchfluss der Säule, kDa: Molekulargewicht der in M aufgetragenen Markerproteine (*All Blue Precision Plus Protein Standard*).

Ergebnisse und Diskussion

Das Ergebnis der Western-Blots zeigt eindeutig, dass nach Reinigung über zwei Affinitätssäulen sowohl die Untereinheit mit Strep- als auch mit His-Tag vorhanden ist. Dies deutet darauf hin, dass tatsächlich heterodimeres ssTrpD-N162C+K280C/ssTrpD Protein aufgereinigt wurde. Bei der zusätzlich angefärbten Bande der Größe 21,5 kDa in der linken Abbildung handelt es sich um das ebenfalls mittels Antikörper detektierte Biotin-Carboxyl-Carrier Protein aus *E. coli*. Das Protein wurde im Anschluss ohne Dialyse in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80°C gelagert. Die Gesamtausbeute betrug lediglich 0,05 mg Heterodimer aus 50 mg Zellnassgewicht.

4.7.2.5 Fluoreszenzmarkierung des Heterodimers ssTrpD-N162C+K280C/ssTrpD-wt

Das ssTrpD Heterodimer wurde wie für das Homodimer in Kapitel 4.4.2.3.1 beschrieben mit Alex-488 und Alexa-594 markiert. Erste Messungen mit dem ssTrpD Homodimer hatten gezeigt, dass das Dimer in Anwesenheit der Substrate gegen Dissoziation in Monomere stabilisiert wird (4.4.2.3.2, Abbildung 37). Um Umlagerungen während der Reinigung des Heterodimers und damit die Bildung von Homodimeren zu unterdrücken, wurde Anthranilsäure in einer Konzentration von 1 µM zugegeben. Wegen der geringen Menge konnte die Proteinkonzentration nicht exakt bestimmt werden. Aus dem Absorptionsspektrum wurde grob eine Konzentration von 1 µM abgeschätzt und wie unter 3.5.4.2 beschrieben mit einem je 30-fachen molaren Überschuss der Farbstoffe Alexa-488 und Alexa-594 versetzt. Nach Abtrennung der ungebundenen Farbstoffe mittels Ultrafiltration, wurde die Probe ohne weitere Analyse zu Prof. Seidel geschickt. Ihre Untersuchung mittels Multiparameter Fluoreszenz Detektion steht noch aus.

4.8 Aktivierung einer ssTrpD Variante bei niedriger Temperatur

In früheren Untersuchungen zur Katalyse der TrpD-Reaktion wurden durch Zufallsmutagenese und anschließende *in vivo* Selektion ssTrpD Varianten erzeugt, die bei 37°C eine gesteigerte katalytische Aktivität gegenüber dem Wildtypenzym aufweisen (A. Ivens und R. Sterner, unveröffentlichte Ergebnisse). Bei diesen Experimenten wurde das *sstrpD*-Gen einem mutagenen DNA-*Shuffling* (Stemmer, 1995) unterzogen und in den Expressionsvektor pQE40 kloniert. Mit dem klonierten *sstrpD*-Genpool wurden *trpEGD*-defiziente *E. coli* Zellen transformiert, auf mit Anthranilsäure supplementiertem Minimalmedium ohne Tryptophan ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Über eine im Vergleich zum Wildtypenzym beschleunigte Komplementation der *trpD*-Defizienz wurden mehrere ssTrpD Varianten isoliert, die eine erhöhte katalytische Aktivität aufwiesen. Die isolierte Variante ssTrpD-D83G+F149S, sowie die beiden gezielt hergestellten Einzelvarianten ssTrpD-D83G und ssTrpD-F149S wurden im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert.

Ziel war es, die strukturellen und mechanistischen Grundlagen für die verbesserte Katalyse und die Auswirkungen der veränderten Aktivität auf die Thermostabilität des Enzyms zu untersuchen. Neben einer Charakterisierung mittels *steady-state* Enzymkinetik wurden differentielle *scanning* Kalorimetrie (DSC) und Kinetiken der thermischen Inaktivierung durchgeführt. Die Ergebnisse ergänzen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Struktur-Funktionsbeziehung von ssTrpD.

4.8.1 Heterologe Expression und Reinigung von ssTrpD-D83G+F149S, ssTrpD-D83G und ssTrpD-F149S

Zur Herstellung der drei Varianten wurden jeweils *E. coli* KK8 Zellen mit den Plasmiden pQE40sstrpD-D83G+F149S, pQE40sstrpD-D83G und pQE40sstrpD-F149S transformiert, die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Proteinanreicherung im präparativen Maßstab durchgeführt (3.3.2).

Ergebnisse und Diskussion

Die Proteine wurden aus dem löslichen Teil des Zellextraktes mittels Hitzeschritt bei 65°C für 15 min und anschließender Metallchelat-Affinitätschromatographie gereinigt. Nach proteolytischer Abspaltung des N-terminalen His₍₆₎-Tags wurde das dazu verwendete Trypsin über eine präparative Gelfiltrationssäule (3.3.6) abgetrennt. Abbildung 44 gibt einen Überblick über die letzten Anreicherungsschritte.

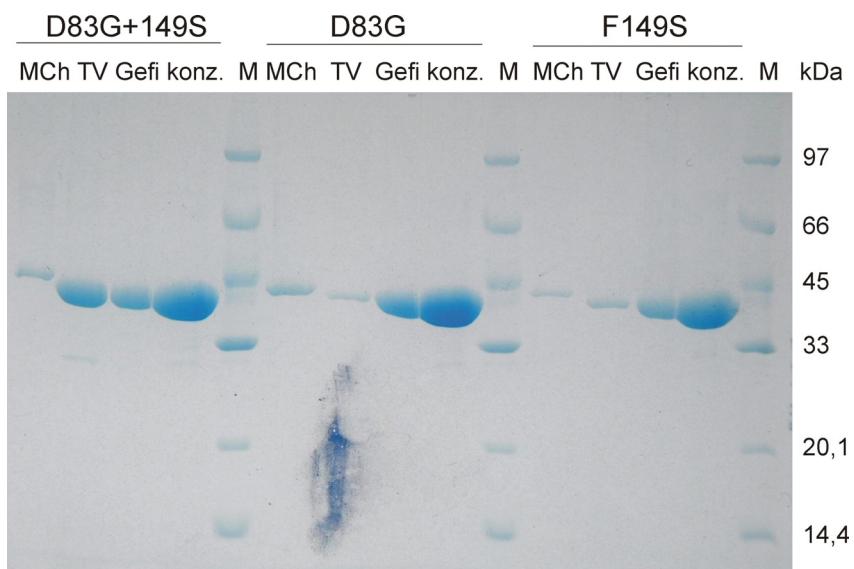


Abbildung 44: Die letzten Anreicherungsschritte bei der Aufreinigung von ssTrpD-D83G+F149S, ssTrpD-D83G und ssTrpD-F149S, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).

MCh: vereinigte Fraktionen nach der Metallchelat-Affinitätschromatographie, TV: Protein nach dem Trypsinverdau, Gefi: vereinigte Fraktionen nach proteolytischer Abtrennung des N-terminalen His(6)-Tags und Entfernung des dazu verwendeten Trypsin mittels präparativer Gelfiltration, konz.: einkonzentriertes Protein; kDa: Molekulargewicht der in M aufgetragenen Markerproteine (*Low Molecular Weight Marker*).

Nach Abtrennung des Trypsins mittels präparativer Gelfiltration ergab sich für alle drei ssTrpD Varianten ein Reinheitsgrad von 95%. Die Ausbeuten aus 1 l Bakterienkultur betrug für ssTrpD-D83G+F149S 3 mg, für ssTrpD-D83G 3,7 mg und für ssTrpD-F149S 2,5 mg. Die gereinigten Proteine wurden auf 3-3,5 mg/ml einkonzentriert, in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80°C gelagert.

4.8.2 Steady-state enzymkinetische Messungen

Wie bei den anderen in dieser Arbeit untersuchten ssTrpD Varianten (4.2.1.1.2, 4.3.1.2), wurden auch hier zunächst die für die katalytische Aktivität optimalen

Ergebnisse und Diskussion

MgCl₂ Konzentrationen ermittelt. Es zeigte sich, dass die Aktivitäten von ssTrpD-D83G+F149S und ssTrpD-D83G mit zunehmender Mg²⁺-Konzentration in einer hyperbolischen Weise ansteigen und sich damit ähnlich verhalten wie ssTrpD-D223N und ssTrpD-E224Q (4.3.1.2; Tabelle 5). Dagegen wird ssTrpD-F149S durch hohe Mg²⁺-Konzentrationen gehemmt, ähnlich wie wildtypisches ssTrpD und eine Reihe weiterer Varianten (4.2.1.1.2).

In Tabelle 8 sind die optimalen Mg²⁺ Konzentrationen für das wildtypische ssTrpD und die drei hier charakterisierten Varianten zusammengefasst.

Tabelle 8: Optimale Mg²⁺ Konzentration für die katalytische Aktivität von ssTrpD-wt, ssTrpD-D83G+F149S, ssTrpD-D83G und ssTrpD-F149S.

Die Messungen wurden in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 bei 37°C unter Sättigung mit AA und PRPP (>10 x K_M) und variierenden MgCl₂ Konzentrationen durchgeführt.

ssTrpD-	optimale MgCl ₂ Konzentration [μM]
wt	25-50
D83G+F149S	2000
D83G	2000
F149S	500

Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden steady-state enzymkinetische Messungen sowohl nach Zugabe von 50 μM als auch von 2 mM, MgCl₂ durchgeführt und wie unter 4.2.1.1.2 und 4.3.1.2 die Werte für k_{cat}, K_M^{PRPP} und K_M^{AA} ermittelt. Die Messungen erfolgten bei 37°C, da die *in vivo* Selektion zur Isolierung von ssTrpD-D83G+F149S bei dieser Temperatur durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 9: Steady-state enzymkinetische Parameter von ssTrpD-wt, ssTrpD-D83G+F149S, ssTrpD-D83G und ssTrpD-F149S bei 37°C.

K_M^{AA} : Michaelis-Konstante für Anthranilsäure, K_M^{PRPP} : Michaelis-Konstante für PRPP, k_{cat} : Wechselzahl, k_{cat}/K_M : katalytischer Effizienzparameter.

Die Messungen wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, bei den angegebenen $MgCl_2$ Konzentrationen durchgeführt. Bei der Bestimmung von K_M^{AA} bzw. K_M^{PRPP} lag das zweite Substrat jeweils in sättigenden Konzentrationen ($>10 \times K_M$) vor. * Zeit bis zum Auftreten sichtbarer Kolonien auf mit 5 mM Anthranilat supplementiertem Minimalmediumplatten nach Ausstreichen des entsprechend transformierten *E. coli* *trpGDE* Defizienzstammes (siehe Deuss, 2002).

ssTrpD-	zugegebene $MgCl_2$ Konzentration [μM]	K_M^{PRPP} [μM]	K_M^{AA} [μM]	$k_{cat} [s^{-1}]$	k_{cat}/K_M^{PRPP} [$\mu M^{-1}s^{-1}$]	k_{cat}/K_M^{AA} [$\mu M^{-1}s^{-1}$]	Komplemen- tations- zeiten* [h]
wt	50	47	0,018	0,3	7×10^{-3}	18,3	~120
wt	2000	2000	0,024	0,1	5×10^{-5}	4,2	
D83G+F149S	50	13,1	3,6	4,4	0,3	1,2	~16
D83G+F149S	2000	23	3,1	13,3	0,6	4,3	
D83G	50	32,8	0,2	1,4	$4,3 \times 10^{-2}$	7,4	~48
D83G	2000	38	0,1	2	5×10^{-2}	16,7	
F149S	50	151	1,2	1,2	$7,9 \times 10^{-3}$	1	~36
F149S	2000	1200	0,4	0,7	$6,2 \times 10^{-4}$	1,8	

Tabelle 9 zeigt, dass sowohl die K_M^{AA} Werte der Doppelvariante ssTrpD-D83G+F149S als auch der beiden Einzelvarianten um einige Größenordnungen im Vergleich zum wildtypischen Enzym erhöht sind. Daraus kann man schliessen, dass die zur Komplementation des $\Delta trpEGD$ Stammes notwendige Zeit unabhängig von der Anthranilataffinität einer gegebenen ssTrpD Variante ist. Dies geht vermutlich darauf zurück, dass den Minimalmediumplatten eine für alle Varianten sättigende Konzentration an Anthranilat (5 mM) zugesetzt wurde. Wie bereits gezeigt (Abbildung 25), wird der k_{cat} Wert von ssTrpD durch hohe Konzentrationen an $MgCl_2$ etwas herabgesetzt und der K_M^{PRPP} drastisch erhöht. Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich für ssTrpD-F149S, nicht jedoch für ssTrpD-D83G+F149S und ssTrpD-D83G, die - wie oben erwähnt - durch Mg^{2+} aktiviert werden.

Ergebnisse und Diskussion

Bei jeweils optimalen oder annähernd optimalen MgCl₂-Konzentrationen (50 µM für ssTrpD-wt und ssTrpD-F149S, 2 mM für ssTrpD-D83G+F149S und ssTrpD-D83G) ist der k_{cat} Wert von ssTrpD-D83G+F149S im Vergleich zum wildtypischen Enzym um das 40-fache und der k_{cat} Wert der Varianten ssTrpD-D83G und ssTrpD-F149S um das 6- bzw. 3,6-fache erhöht. Die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M^{AA} ist für alle Varianten niedriger als für das wildtypische Enzym, wohingegen der Effizienzparameter k_{cat}/K_M^{PRPP} der Varianten ssTrpD-D83G+F149S und ssTrpD-D83G um zwei Größenordnungen erhöht ist. Die Ergebnisse lassen darauf schliessen, dass ssTrpD-D83G+F149S entweder aufgrund seines erhöhten k_{cat} Wertes oder des erniedrigten K_M^{PRPP}, oder einer Kombination aus beidem selektiert wurde. Da jedoch ssTrpD-F149S in der Lage ist, die trpD Defizienz des auxotrophen *E.coli* Stammes bei vergleichbarem K_M^{PRPP} schneller zu komplementieren als das wildtypische Enzym, scheint der k_{cat} Wert der ausschlaggebende Parameter für die Selektion zu sein.

4.8.3 Temperaturabhängigkeit der erhöhten Aktivität von ssTrpD-D83G+F149S

Die enzymkinetische Charakterisierung (4.8.2) hat gezeigt, dass der k_{cat} Wert der Variante ssTrpD-D83G+F149S im Vergleich zu ssTrpD-wt erhöht ist. Um zu untersuchen, ob diese Aktivierung auch bei anderen Temperaturen als 37°C auftritt, wurden die k_{cat} Werte im Temperaturbereich zwischen 25 und 70°C gemessen.

Das Ergebnis ist in Abbildung 45 in Form eines Arrheniusdiagramms dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

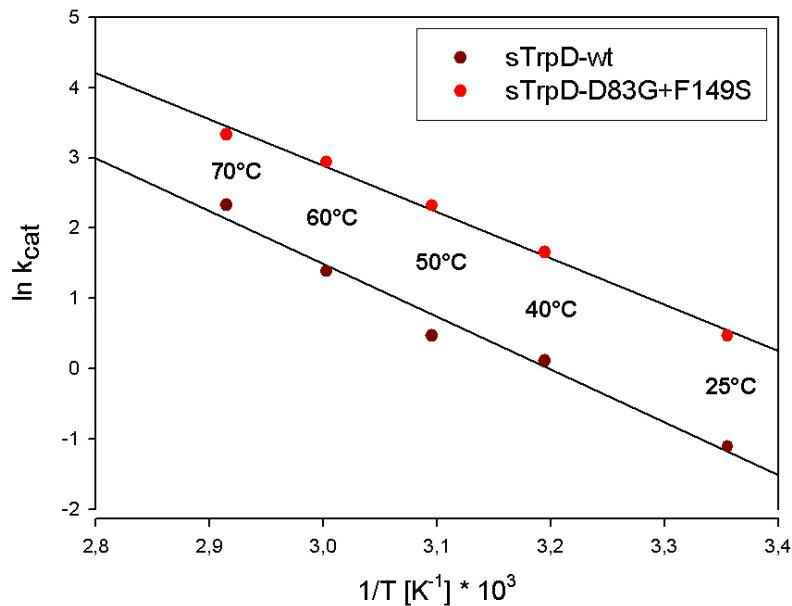


Abbildung 45: Arrheniusdiagramme der Wechselzahlen für ssTrpD-wt und ssTrpD-D83G+F149S.

Die Messungen wurden in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 unter Vollsättigung mit AA und PRPP, sowie bei jeweils optimaler MgCl₂ Konzentration (50 µM für ssTrpD, 2 mM für ssTrpD-D83G+F149S), durchgeführt.

Das Diagramm zeigt, dass die k_{cat} Werte von ssTrpD-D83G+F149S bei allen untersuchten Temperaturen gegenüber dem wildtypischen Enzym gleichermaßen erhöht sind. Die Steigungen der Arrheniusdiagramme und damit auch die Aktivierungsenergien der beiden Proteine sind nahezu identisch und betragen 55 kJ/mol für ssTrpD-D83G+F149S und 62 kJ/mol für ssTrpD-wt. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Reaktion beider Proteine durch den gleichen Schritt limitiert wird.

4.8.4 Untersuchungen der thermischen Stabilität von ssTrpD-D83G+F149S, ssTrpD-D83G und ssTrpD-F149S im Vergleich zu ssTrpD-wt

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die thermische Auffaltung der verschiedenen ssTrpD Varianten mittels differentieller Scanning Kalorimetrie (3.5.6) und thermischer Inaktivierung (3.5.7) untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

4.8.4.1 Differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC)

Da die Denaturierung irreversibel und somit eine thermodynamische Auswertung nicht möglich war, wurde mittels DSC-Messungen die apparente Schmelztemperatur $T_{m(\text{app})}$, d.h. die Temperatur, bei der die Hälfte des Proteins denaturiert vorliegt, ermittelt.

In Abbildung 46 sind die Ergebnisse dargestellt.

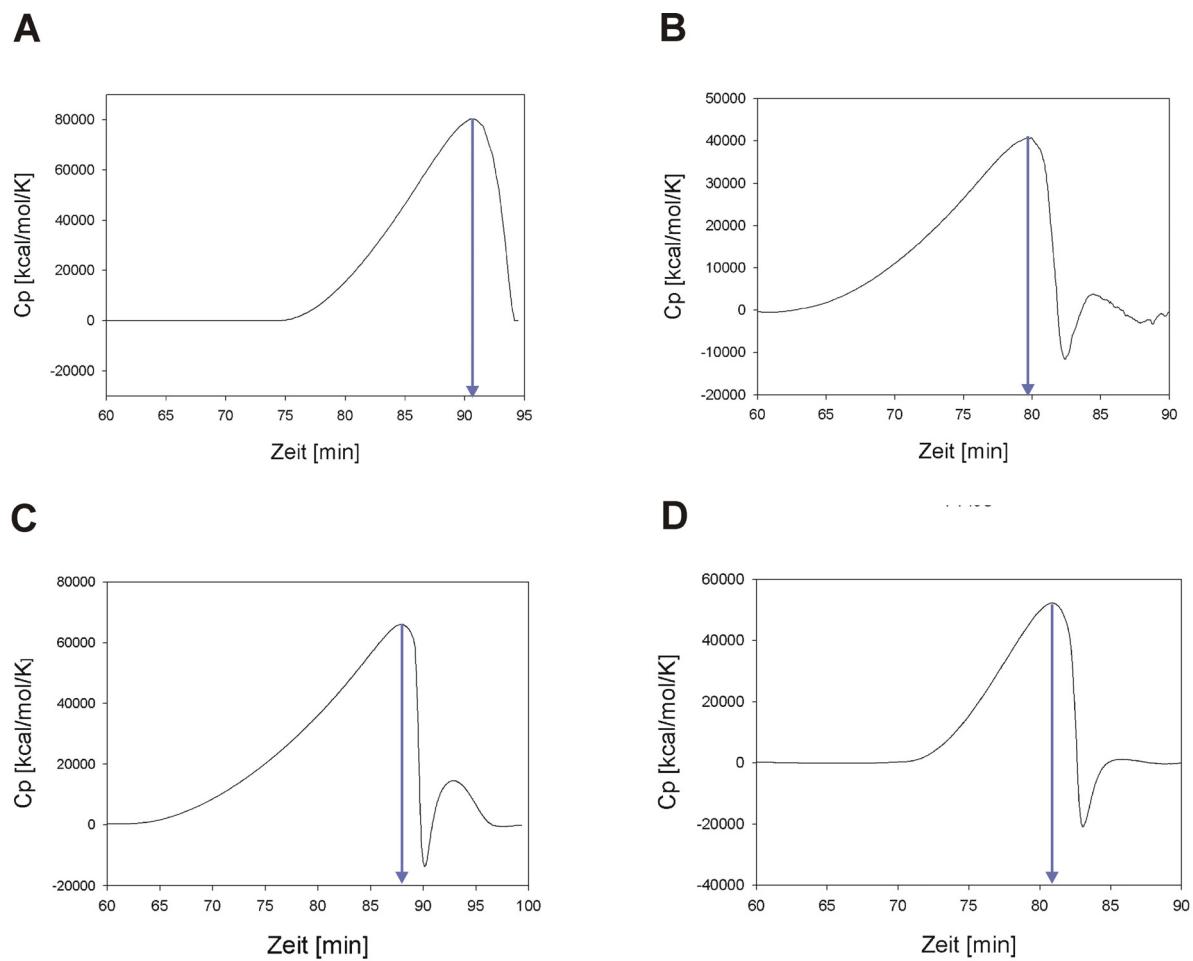


Abbildung 46: DSC-Messungen für das ssTrpD wt Protein (A) und die Varianten ssTrpD-D83G+F149S (B), ssTrpD-D83G (C) und ssTrpD-F149S (D).

Es wurden jeweils 1 mg/ml Protein in 10 mM KP, pH 7,5 bei einer Scanrate von 1°C pro Minute erhitzt.

Die blauen Pfeile geben jeweils die $T_{m(\text{app})}$ Werte an.

Auffällig ist, dass die Denaturierung von ssTrpD-D83G+F149S (B) und ssTrpD-D83G (C) bereits bei etwa 65°C beginnt und die entsprechenden Auffaltungskurven eine deutlich unsymmetrische Form aufweisen, was auf das

Ergebnisse und Diskussion

Vorhandensein von Intermediaten hinweist. Die Auffaltungen von ssTrpD-wt und ssTrpD-F149S setzten bei etwa 75°C bzw. 72°C ein und verlaufen etwas weniger unsymmetrisch.

Die ermittelten $T_m_{(app)}$ Werte sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: $T_m_{(app)}$ Werte für ssTrpD-wt und die aktivierte Varianten.

sTrpD-	$T_m_{(app)}$ (°C)
wt	91
D83G+F149S	79
D83G	88
F149S	81

Das wildtypische Enzym ist mit einer Schmelztemperatur von 91°C wie erwartet sehr thermostabil. Die Stabilität der Varianten ist demgegenüber kaum (ssTrpD-D83G) bzw. nur moderat herabgesetzt (ssTrpD-D83G+F149S, ssTrpD-F149S). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Asp83 und Phe149 keinen wichtigen Beitrag für die konformationelle Stabilität von ssTrpD leisten.

4.8.4.2 Irreversible thermische Inaktivierung

Zusätzlich wurde durch Kinetiken der irreversiblen thermischen Inaktivierung die Halbwertszeit $t_{1/2}$, d.h. die Zeit bis zur Denaturierung der Hälfte des Proteins bei 80°C, bestimmt.

Dazu wurden die Proteine bei 80°C inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten bei 37°C die katalytische Restaktivität unter Vollsättigung beider Substrate und jeweils optimaler MgCl₂ Konzentration gemessen. Der Abfall der Enzymaktivität mit der Zeit war in allen Fällen ein exponentieller Prozess und entsprechend ergab sich nach semi-logarithmischer Darstellung eine abfallende Gerade (Abbildung 47).

Ergebnisse und Diskussion

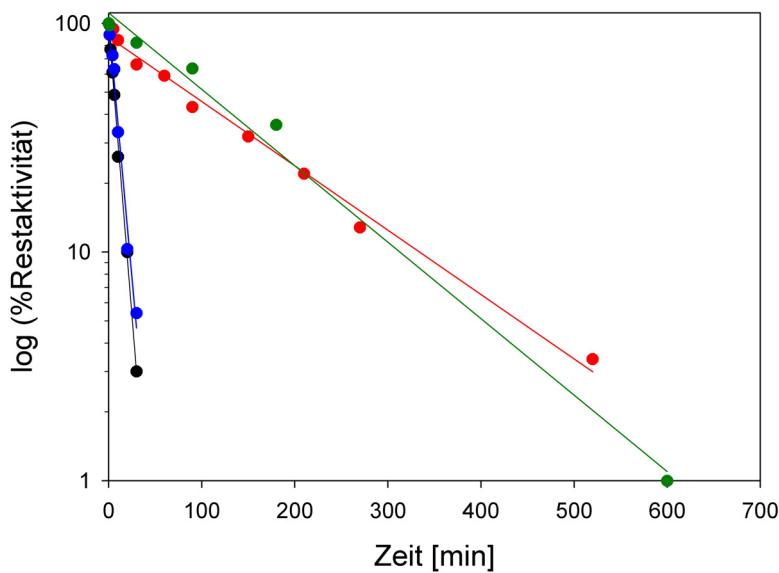


Abbildung 47: Irreversible thermische Inaktivierung von ssTrpD-wt und der aktivierten Varianten.

Die Enzyme wurden bei 80°C in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 inkubiert, nach den angegebenen Zeiten auf Eis abgekühlt, zentrifugiert und die Restaktivitäten bei 37°C in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM MgCl₂ (aktivierte Varianten), 50 µM MgCl₂ (ssTrpD-wt) gemessen.

Die ermittelten Halbwertsszeiten t_{1/2} sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Tabelle 11: t_{1/2}-Werte für ssTrpD-wt und die aktivierte Varianten.

ssTrpD-	Halbwertszeit t _{1/2} [min]
wt	80,5
D83G+F149S	5,5
D83G	125
F149S	7,2

Das wildtypische Enzym ist mit einer Halbwertszeit von 80,5 min sehr stabil gegen Inaktivierung. Die Inaktivierung von ssTrpD-D83G verläuft sogar noch langsamer, während ssTrpD-D83G+F149S und ssTrpD-F149S ihre katalytische Aktivität vergleichsweise schnell verlieren. Dies bedeutet, dass Asp83 keinen wichtigen Beitrag für den Schutz von ssTrpD vor Inaktivierung leistet, während entweder der Verlust von Phe149 oder der Einbau von Serin sich diesbezüglich negativ auswirken. Die Ergebnisse der thermischen Denaturierung bzw. Inaktivierung zeigen, dass eine gesteigerte katalytische Aktivität nicht zwangsläufig zum Verlust der Stabilität von ssTrpD führt. Dieses Ergebnis stützt die bereits früher geäußerte

Ergebnisse und Diskussion

Vermutung, dass die selten gefundene Kombination aus hoher katalytischer Aktivität und Thermostabilität keine physikalische Einschränkung widerspiegelt, sondern eine Folge evolutionärer Anpassung darstellt (Miyazaki *et al.*, 2000). Enzyme aus mesophilen Organismen stehen unter keinem Selektionsdruck, bei hohen Temperaturen stabil zu sein. Entsprechend müssen Enzyme aus hyperthermophilen Organismen in der Regel bei niedrigen Temperaturen nicht besonders aktiv sein.

4.8.5 Untersuchung zum Reaktionsmechanismus von ssTrpD

Wie in Kapitel 4.8.3 beschrieben, deuten die identischen Steigungen der Arrheniusdiagramme (Abbildung 45) darauf hin, dass bei ssTrpD-wt und ssTrpD-D83G+F149S der gleiche Reaktionsschritt geschwindigkeitsbegrenzend ist. Damit stellt sich die Frage, welcher Mechanismus der TrpD Reaktion zugrunde liegt und welcher Schritt der Reaktion der langsamste und damit geschwindigkeitsbestimmend ist.

Es wurden mittels *steady-state* enzymkinetischer Messungen für TrpD aus *Saccharomyces cerevisiae* und *E. coli* nachgewiesen, dass die Reaktion einem sequentiellen Mechanismus mit zufälliger Reihenfolge der Bindung der beiden Substrate (*sequential random-order mechanism*) folgt (Hommel *et al.*, 1989). Um zu prüfen, ob dies auch für TrpD aus *Sulfolobus solfataricus* zutrifft, wurden mehrere Sättigungskurven für Anthranilsäure in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an PRPP gemessen.

Die Ergebnisse sind in doppelt reziproker Form in Abbildung 48 gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

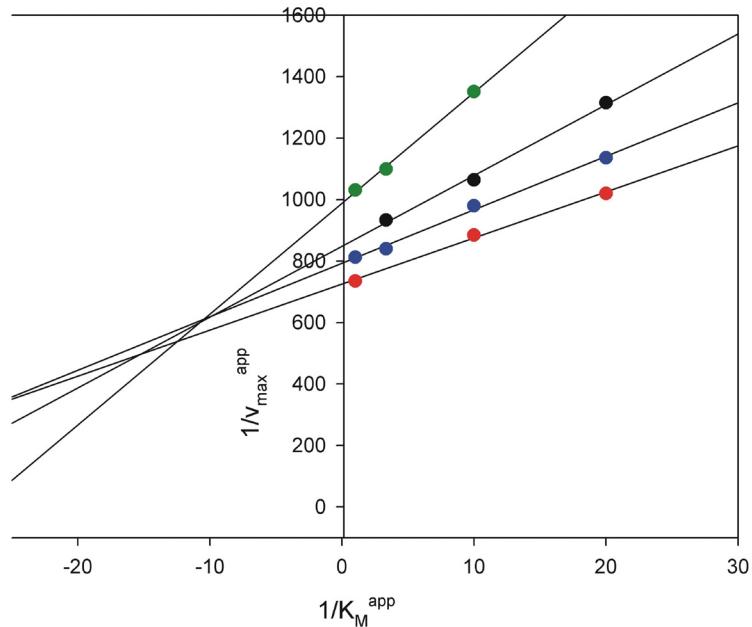


Abbildung 48: AA-Sättigungskurven in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an PRPP (doppelt reziproke Auftragung) von ssTrpD-wt.

Die Messungen wurden in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 μ M MgCl₂ bei 25°C durchgeführt. ssTrpD-wt wurde in einer Konzentration von 5 nM eingesetzt. Die Anthranilsäurekonzentration wurde zwischen 0,05 und 1 μ M variiert. rot: 1 mM PRPP, blau: 500 μ M PRPP, schwarz: 200 μ M PRPP, grün: 100 μ M PRPP; $1/V_{max}^{app}$: Kehrwert der apparenten Maximalgeschwindigkeit V_{max} , $1/K_M^{app}$: Kehrwert des apparenten K_M Wertes für AA.

Der beobachtete gemeinsame Schnittpunkt aller Geraden deutet auf einen sequentiellen Mechanismus hin (Bisswanger, 2000). Mittels Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass Anthranilsäure und PRPP nach Zugabe in jeweils hoher Konzentration unabhängig voneinander an ssTrpD-wt binden können (Marco Marino und Olga Mayans, unveröffentlichte Ergebnisse), was im Einklang mit der für die TrpD Enzyme aus *E. coli* und *Hefe* beobachteten zufälligen Reihenfolge der Substratbindung ist. Andererseits liegt die Dissoziationskonstante K_d^{AA} für die Bindung von AA an ssTrpD-wt um etwa zwei Größenordnungen über der Michaeliskonstante K_M^{AA} (4.2.1.1.3.1, Tabelle 3, Abbildung 17). Dies würde für einen zum mindest teilweise geordneten sequentiellen Mechanismus sprechen. Zur Klärung dieser Frage müsste eine detaillierte Analyse der Produkthemmung erfolgen (Bisswanger, 2000).

Ergebnisse und Diskussion

4.8.6 Bestimmung der Produktinhibitionskonstante für PRA (K_p^{PRA})

Untersuchungen an Klasse I PRTasen haben gezeigt, dass einem schnellen Phosphoribosyltransfer mit gleichzeitiger Entlassung des Pyrophosphates ein langsamer und damit geschwindigkeitsbestimmender Schritt, der der Entlassung des zweiten Produktes entspricht, folgt (Xu *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch im Fall von ssTrpD die Entlassung von PRA den langsamsten Schritt der Gesamtreaktion darstellt:



Falls dies der Fall ist, dann entspricht der k_{cat} Wert dem Wert für k_{off}^{PRA} . Entsprechend sollte der erhöhte k_{cat} Wert von ssTrpD-D83G+F149S sich in einem erhöhten k_{off}^{PRA} widerspiegeln. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde sowohl für ssTrpD-wt als auch für ssTrpD-D83G+F149S durch *steady-state* enzymkinetische Messungen die Produktinhibitionskonstante K_p^{PRA} bei 37°C bestimmt und mit dem k_{cat} Wert verglichen. Dazu wurden vollständige Umsatzkurven (ohne Beseitigung von PRA durch Zugabe der Hilfsenzyme TrpF und TrpC) aufgenommen und mit Hilfe des Programmes COSY mit der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung gefittet (Eberhard, 1990).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Inhibitionskonstanten für das Produkt PRA (K_p^{PRA}) von ssTrpD-wt und ssTrpD-D83G+F149S.

Es wurden gesamte Umsatzkurven in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 37°C, in Gegenwart von sättigenden AA Konzentrationen, 3 mM PRPP und 50 µM (ssTrpD-wt) bzw. 2 mM (ssTrpD-D83G+F149S) MgCl₂ aufgenommen und mit der integrierten Form der Michaelis-Menten Gleichung analysiert (Eberhard, 1990).

37°C	$K_p^{\text{PRA}} [\mu\text{M}]$	$k_{cat} [\text{s}^{-1}]$
ssTrpD-wt	0,4	0,33
ssTrpD-D83G+F149S	25	13,3

Ergebnisse und Diskussion

Es wird deutlich, dass die Werte für K_P^{PRA} und k_{cat} des wildtypischen Enzyms um den Faktor 62 bzw. 40 unterhalb der entsprechenden Werte von ssTrpD-D83G+F149S liegen. Da gilt: $K_P^{PRA} = k_{off}^{PRA}/k_{on}^{PRA}$, würde - unter der Annahme vergleichbarer k_{on}^{PRA} -Werte - die verminderte Produktinhibition der aktivierte Variante tatsächlich auf eine im Vergleich zum wildtypischen Enzym beschleunigte Freisetzung von PRA zurückgehen.

5. Abschließende Diskussion

5.1 Die Funktion der beiden Bindestellen für Anthranilsäure in ssTrpD

Die Röntgenstruktur von dimerem ssTrpD zeigt, dass pro Untereinheit zwei Moleküle Anthranilsäure gebunden sind (Abbildung 14). Obwohl die Titration von ssTrpD keinen Hinweis auf zwei Bindestellen mit unterschiedlichen Affinitäten für Anthranilsäure lieferte (Abbildung 17), ergaben *soaking* Experimente, dass das Molekül bevorzugt an der Anthranilat Bindestelle II komplexiert wird. Diese liegt näher an der PRPP Bindestelle als die Anthranilat Bindestelle I und ihre Zugänglichkeit ist durch Glycinreste an Position 79 und 177 gewährleistet (Marco Marino und Olga Mayans, unpublizierte Beobachtung). Dies legt die Vermutung nahe, dass im Rahmen der von ssTrpD katalysierten Reaktion AA II mit PRPP reagiert. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden potentiell wichtige Aminosäurereste der beiden Bindestellen durch Alanin ersetzt und die Auswirkungen dieser Substitutionen auf die Substratbindung und die katalytische Aktivität untersucht. Unter anderem wurden die Histidinreste an den Positionen 154 und 107 ausgetauscht, die innerhalb der TrpD Familie weitgehend konserviert sind und bezogen auf AA-I und AA-II eine ähnliche Orientierung aufweisen (Abbildung 15B). Die dadurch ermöglichte π - π Interaktion zwischen dem Imidazolring des Histidins und dem konjugierten Ringsystem aromatischer Substrate wird auch bei anderen PRTasen und Nukleosidphosphorylasen beobachtet. So binden beispielsweise in den Quinolat-PRTasen aus *Salmonella typhimurium* und *Mycobacterium tuberculosis* die hoch konservierten Reste H174 bzw. H161 das Quinolat (Eads *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1998). Deshalb ist es umso erstaunlicher, dass weder der Austausch von His107 noch der von His154 gegen Alanin den K_m^{AA} von ssTrpD wesentlich beeinflusst (Tabelle 3). Dagegen führte der Austausch von Arg164, das in der TrpD Familie und der evolutionär verwandten Klasse II Pyrimidin-Nucleosidphosphorylasen konserviert ist, zu einem drastischen Anstieg der Michaelis-Konstante für Anthranilsäure. Die Tatsache, dass dieser Rest Teil der Anthranilat Bindestelle I ist (Abbildung 15), lässt spekulieren, dass er für die produktive Ausrichtung von AA I sorgt, welches

Abschließende Diskussion

seinerseits über eine Wasserstoffbrücke das AA II Molekül für die Katalyse positioniert. Weitere denkbare Rollen von AA I ergeben sich aus der Tatsache, dass Anthranilsäure ein membrangängiges Molekül darstellt, das durch die Komplexierung an der Anthranilat Bindetasche I am Verlassen der Zelle gehindert werden und nach Abreaktion von AA II in dessen Bindetasche nachdiffundieren könnte. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass AA I bei den hohen in der Kristallisation eingesetzten Konzentrationen an Anthranilsäure (10 mM) die Bindetasche von Tryptophan besetzt, welches in TrpD aus *Corynebacterium glutamicum* als *feedback* Inhibitor identifiziert wurde (O'Gara und Dunican, 1995). Tatsächlich konnte die Bindung von Tryptophan an ssTrpD in Titrationsstudien nachgewiesen werden (Abbildung 18), jedoch hatte es selbst in einer Konzentration von 100 µM keinen Einfluss auf die Katalyse von ssTrpD. Die Existenz von zwei Bindestellen für Anthranilsäure scheint keine Besonderheit von ssTrpD zu sein. So wurden in der kürzlich gelösten Röntgenstruktur von TrpD aus *Mycobacterium tuberculosis* mittels *in silico* Docking zwei Anthranilat Bindestellen vorhergesagt (Lee *et al.*, 2006). Nach diesem Modell bildet das konservierte Arg193 (entspricht Arg164 in ssTrpD) wiederum einen Teil der Bindestelle für AA I. Dieses liegt mit einer Distanz von 8,7 Å ebenfalls weiter von der PRPP Bindestelle entfernt als das vorhergesagte AA II, das eine Entfernung von nur 3,5 Å aufweist und durch die Reste H136, P207 und G137 (entsprechen H107, P178 und G79 in ssTrpD) komplexiert wird.

5.2 *Inhibition von ssTrpD durch hohe Konzentrationen an MgCl₂*

Das wildtypische ssTrpD Protein wird durch hohe Konzentrationen an Mg²⁺ gehemmt. Dies drückt sich in einer Verminderung der Wechselzahl und einer drastischen Erhöhung des K_M^{PRPP} Wertes aus (Abbildung 23A, Tabelle 5). Durch den Austausch von Resten in der PRPP Bindetasche wird diese Hemmung aufgehoben und die katalytische Aktivität steigt mit zunehmender Konzentration an Mg²⁺ bis eine Sättigung erreicht ist (Abbildung 23B). Wie in Kapitel 4.5 besprochen, geht die Inhibition vermutlich auf MG-2 zurück, wenn auch der genaue Mechanismus der Hemmung bisher unklar ist. Dies erklärt allerdings nicht,

Abschließende Diskussion

warum nicht nur die Austausche Asp223Asn und Glu224Gln, sondern auch die Austausche Ser91Ala und Asp83Gly (Tabellen 3 und 5) und Lys106Gln (Deuss, 2002) zu einer Aufhebung der Inhibition führen, da die Reste Ser91, Glu83 und Lys106 nicht an der Komplexierung von MG-2 beteiligt sind. Man kann spekulieren, dass ihre Substitution zu einer veränderten Konformation des gebundenen PRPP führt, welche die Bindung von MG-2 an seinem 5' Phosphatende nicht länger ermöglicht. Um diese Hypothese zu testen, müssten die Röntgenstrukturen von ssTrpD-S91A und ssTrpD-D83G mit gebundenem PRPP gelöst werden. Da über die intrazellulären Mg²⁺ Konzentrationen von *S. solfataricus* nichts bekannt ist, lässt sich über das Auftreten der Inhibition *in vivo* oder gar ihre physiologische Relevanz momentan keine Aussage treffen.

Die humane Hypoxanthin-PRTase der Klasse I wird ebenfalls durch Mg²⁺ gehemmt, wobei freies Mg²⁺ als kompetitiver Inhibitor für das Substrat PRPP-Mg²⁺ agiert (Salerno und Giacomello, 1981). Jedoch treten hier, anders als bei ssTrpD, beide Metallionen mit dem Pyrophosphatende des PRPP in Wechselwirkung (Heroux *et al.*, 2000).

5.3 Überlegungen zum Reaktionsmechanismus von ssTrpD

5.3.1 Domänenbewegung zur Annäherung der Substrate

Trotz des Austausches zahlreicher Aminosäuren an den beiden Anthranilat Bindetaschen und der PRPP Bindetasche konnte kein Rest identifiziert werden, der für die Katalyse der Reaktion essentiell ist (Tabellen 3 und 5; Deuss, 2002). Dies ist erstaunlich, da es sich bei den meisten Resten, wie Arg164, Asp83 aus der glycinreichen Schleife ₇₉G₈₀TGGD₈₃ sowie Lys106, His107 und Asn109 aus dem ₁₀₆KHGN₁₀₉ Motiv, um hochkonservierte Aminosäuren innerhalb der TrpD Familie handelt (Mayans *et al.*, 2002) und beispielsweise der Austausch des konservierten Arginin in der evolutionär verwandten Pyrimidin-Nukleosidphosphorylase der Klasse II zu einer Inaktivierung des Enzyms führt (Moghaddam *et al.*, 1995). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Aufgabe des Proteingerüstes von ssTrpD lediglich darin besteht, Anthranilsäure und PRPP in räumliche Nähe

Abschließende Diskussion

und optimale Orientierung für die Reaktion zu bringen. Dies ist in der durch Röntgenstrukturanalyse charakterisierten Konformation offensichtlich nicht der Fall (Abbildung 14), weshalb eine Relativbewegung der beiden Domänen einer Untereinheit als Teil des Reaktionsmechanismus postuliert werden muss. Mittels SAXS-Messungen konnte eine derartige Bewegung tatsächlich nachgewiesen werden. Diese erfolgt aus bisher nicht verstandenen Gründen offensichtlich asymmetrisch, d. h. nur innerhalb einer Untereinheit des Homodimers (Tabelle 7, Abbildung 31).

Die Analyse der Röntgenstrukturen und der SAXS-Messungen zeigt, dass diese Konformationsänderung einen ähnlichen Ausmaß hat wie vergleichbare Domänenbewegungen in den Klasse II Pyrimidin-Nucleosidphosphorylasen. So entspricht der Abstand zwischen AA II und PRPP mit 8,6 Å (Abbildung 14) genau den 8-9 Å zwischen der lytischen Phosphatgruppe und der Nucleosid Spaltstelle in der offenen Form von Pyrimidin-Nucleosidphosphorylasen (Walter *et al.*, 1990) und die Relativrotation der beiden Domänen um 25-33°C einer vergleichbaren Drehung um 21° in der Pyrimidin-Nucleosidphosphorylase aus *Bacillus stearothermophilus* (Pugmire *et al.*, 1998). Diese Ähnlichkeiten sind ein weiterer Hinweis auf die evolutionäre Verwandtschaft dieser beiden Enzymklassen (Mayans *et al.*, 2002).

Um die Domänenbewegung weiter zu charakterisieren, wurden FRET-Messungen an Einzelmolekülen durchgeführt (4.7.2.3.2). Trotz erfolgreicher Markierung von ssTrpD mit Donor- und Akzeptorfarbstoff und erster interessanter Ergebnissen war die Analyse der Daten wegen der Heterogenität der Probe (Abbildung 38) schwierig und lieferte bisher keine eindeutigen Einblicke in die konformationelle Dynamik von ssTrpD. Hier wird es in Zukunft darum gehen, Moleküle mit jeweils nur einem Donor- und einem Akzeptormolekül herzustellen. Eine Möglichkeit dazu ist die selektive Markierung von N162C/N162C bzw. K280C/K280C Homodimeren mit Donor bzw. Akzeptor, ihre anschliessende Dissoziation in Monomere durch extreme Verdünnung (4.7.2.3.2), gefolgt von ihrer Mischung und Konzentrierung. Dadurch sollten sich neben den gewünschten heterodimeren und unterschiedlich markierten N162C/K280C Proteinen lediglich wieder die mit dem gleichen Farbstoff markierten und deshalb aus der FRET-Analyse leicht auszuschliessenden N162C/N162C und K280C/K280C Homodimere bilden. Alternativ dazu wird derzeit versucht, ssTrpD durch Mutationen an der

Abschließende Diskussion

Kontaktfläche der beiden Untereinheiten zu monomerisieren. Eine solche Monomerisierung wurde bereits für die ebenfalls homodimere Phosphoribosylanthranilat-Isomerase aus *Thermotoga maritima* durchgeführt, wobei das erzeugte Monomer stabil und katalytisch aktiv war (Thoma *et al.*, 2000). Gelänge dies auch für ssTrpD, dann könnte ein N162C+K280C Monomer hergestellt, markiert und analysiert werden.

5.3.2 Geschwindigkeitsbestimmender Schritt

Die in Kapitel 4.8.6 beschriebene vergleichende Analyse der Wechselzahlen und der Produktinhibitionskonstanten von ssTrpD-wt und der aktivierte Variante ssTrpD-D83G+F149S deuten darauf hin, dass die Freisetzung von PRA den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion darstellt (Abbildung 45, Tabelle 12). Die aktivierende Wirkung des Asp83Gly ließe sich in diesem Fall strukturell dadurch erklären, dass seine Seitenkette eine Wasserstoffbrücke mit der 5' Phosphatgruppe von PRPP ausbildet (Abbildung 20A), die vermutlich auch nach der Entstehung von PRA erhalten bleibt und dieses am Enzym hält. Durch den Asp83Gly Austausch ginge dem Enzym die Fähigkeit zur Ausbildung dieser Wasserstoffbrücke verloren, was die Freisetzung von PRA erleichtern würde. Um allerdings sicher entscheiden zu können, ob die jeweiligen k_{off}^{PRA} Werte mit den entsprechenden k_{cat} Werten von wildtypischem ssTrpD und der aktivierte ssTrpD-D83G+F149S Variante übereinstimmen, muss die Kinetik der Bindung von PRA an beide Proteine mittels *stopped-flow* Messungen verfolgt werden.

Alternativ kann sich bei der Aktivierung eines Enzyms auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ändern. So ist in der wildtypischen Indolglycerinphosphat-Synthase aus *S. solfataricus* die Umsatzrate durch die Freisetzung von IGP limitiert, während in aktivierte Varianten einer der chemischen Schritte geschwindigkeitsbestimmend wird (Merz *et al.*, 2000).

6. Literatur

Agarwal P.K., 2005. Role of protein dynamics in reaction rate enhancement by enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 15248-15256

Antikainen N.M., Smiley R.D., Benkovic S.J. und Hammes G.G., 2005. Conformation coupled enzyme catalysis: single-molecule transient kinetics investigation of dihydrofolate reductase. *Biochemistry*, 44, 16835-16843

Arnold F.H., Wintrode P.L., Miyazaki K. und Gershenson A., 2001. How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem. Sci.*, 26-100-106

Bisswanger H., 1994. Enzymkinetik, Theorie und Methoden. VCH

Bovee M., Champagne K., Demeler B., Francklyn C., 2002. The Quaternary Structure of the HisZ-HisG N-1-(5'-Phosphoribosyl)-ATP Transferase from *Lactococcus lactis*. *Biochemistry*, 41, 11828-11846

Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-54

Brandl M., Weiss M.S., Jabs A., Suhnel J. Und Hilgenfeld R., 2001. C-H...pi-interactions in proteins. *J Mol Biol*, 307(1), 357-77

Brock T.D., Brock K.M., Belly R.T. und Weiss R.L., 1972. *Sulfolobus*: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Mikrobiol.*, 84, 54-68

Brock T.D., Brock K.M., Belly R.T. und Weiss R.L., 1972. *Sulfolobus*: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Mikrobiol.*, 84, 54-68

Brouns S.J., Wu H., Akerboom J., Turnbull A.P., de Vos W.M. und van der Oost J., 2005. Engineering a selectable marker for hyperthermophiles. *J Biol Chem*, 280(12), 11422-31

Brunger A.T., Adams P.D- und Rice L.M., 1998. Recent developments for the efficient crystallographic refinement of macromolecular structures. *Curr Opin Struct Biol.*, 5, 606-11

Bujard H., Gentz R., Lanzer M., Stüber D., Müller M., Ibrahim I., Häuptle M.T. und Dobberstein B., 1987. A T5 promotor-based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vitro* and *in vivo*. *Methods Enzymol.*, 155, 416-33

Byrnes W.M., Goldberg R.N., Holden M.J., Mayhew M.P. & Tewari Y.B., 2000. Thermodynamics of reactions catalysed by anthranilate synthase. *Biophys Chem*, 84, 45-64

Literatur

Cao H., Pietrak B.L. und Grubmeyer C., 2002. Quinolinate Phosphoribosyltransferase: Kinetic Mechanism for a Type II PRTase. *Biochemistry*, 41, 3520-3528

Certa U., Bannwarth W., Stuber D., Gentz R., Lanzer M., Le Grice S., Guillot F., Wendler I., Hunsmann G. und Bujard H., 1986. Subregions of a conserved part of the HIV gp41 transmembrane protein are differentially recognized by antibodies of infected individuals. *EMBO J.*, 5, 3051-56

Codreanu S.G., Ladner J.E., Xiao G., Stourman N.V., Hachey D.L., Gilliland G.L. und Armstrong R.N., 2002. Local protein dynamics and catalysis: detection of segmental motion associated with rate-limiting product release by glutathione transferase. *Biochemistry*, 41, 15161-15172.

Cowan D.A., 2004. The upper temperature for life – where do we draw the line?, *Trends in Microbiol.*, 12, 58-60

Cho Y., Sharma V., Sacchettini J.C., 2003. Crystal Structure of ATP Phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 278 (10), 8333-8339

Craig S.P., Eakin A.E., 2000. Purine phosphoribosyltransferases. *J. Biol. Chem.* 275, 20231-20234

Daniel R.M. und Cowan D.A., 2000. Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell Mol Life Sci.*, 57(2), 250-64. Review

Deckert G., Warren P.V., Gaasterland T., Young W.G., Lenox A.L., Graham D.E., Overbeek R., Snead M.A., Keller M., Aujay M., Huber R., Feldman R.A., Short J.M., Olsen G.J., Swanson R.V., 1998. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature*, 392(6674)353-8

Deuss M., 2002. Mutationsanalyse des aktiven Zentrums der Anthranilate-Phosphoribosyltransferase aus *Sulfolobus solfataricus*. Diplomarbeit an der Universität zu Köln.

Drewe W.F. Jr. und Dunn M.F., 1985. Detection and identification of intermediates in the reaction of L-serine with *Escherichia coli* tryptophan synthase via rapid-scanning ultraviolet-visible spectroscopy. *Biochemistry*, 24, 3977-3987

Eads J.C., Ozturk D., Wexler T.B., Grubmeyer C. und Sacchettini F.C., 1997. A new function for a common fold: the crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase. *Structure*, 10, 185-193

Eberhard M., 1990. A set of programs for analysis of kinetic and equilibrium data. *Comput Appl Biosci*, 6, 213-21

Eggeling C., Berger S., Brand L., Fries J.R., Schaffer J., Volkmer A. Und Seidel C.A.M., 2001. Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection. *J. Biotech.*, 86, 163-180

Literatur

Eisenmesser E.Z., Bosco D.A., Akke M. Und Kern D., 2002. Enzyme dynamic during catalysis. *Science*, 295, 1520-1523.

Eisenmesser E.Z., Millet O., Labeikovsky W., Korzhnev D.M., Wolf-Watz M. Bosco D.A., Skalicky J.J., Kay L.E. und Kern D., 2005. Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature*, 438, 117-121

Fersht, 1999. Structure and Mechanism in Protein Science, A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. W.H. Freeman & Company

Fling, S. P. & Gregerson, D. S., 1986. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem*, 155, 83-88.

Förster T., 1948. "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.". *Ann.Phys.*, 2, 55-75.

Foster J., Moat A., 1980. Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. *Microbiol Rev.*, 44, 83-105

Grogan D.W., 1989. Phenotypic characterization of the archeabacterial genus *Sulfolobus*: Comparison of five wild-type strains. *J. Bacteriol.*, 171, 6710-6719

Gross J.W., Rajavel M. und Grubmeyer C., 1998. Kinetic Mechanism of Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase: Implications for Energy Coupling. *Biochemistry*, 37, 4189-4199

Hanahan D., 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-580

Henn-Sax M., Thoma R., Schmidt S., Hennig M., Kirschner K., Sterner R., 2002. Two (betaalpha)(8)-barrel enzymes of histidine and tryptophan biosynthesis have similar reaction mechanisms and common strategies for protecting their labile substrates. *Biochemistry*, 41(40), 12032-42

Hennig M., Darimont B., Jansonius J. und Kirschner K., (2002). The Catalytic Mechanism of Indole-3-glycerol phosphate Synthase: Crystal Structures of Complexes of the Enzyme from *Sulfolobus solfataricus* with Substrate Analogue, Substrate, and Product. *J. Mol. Biol.*, 319, 757-766

Hernandez G., Jenney F.E. Jr., Adams M.W. und LeMaster D.M., 2000. Millisecond time scale conformational flexibility in a hyperthermophile protein at ambient temperature. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(7), 3166-70

Heroux A., White E.L., Ross L.J., Kuzin A.P., Borhani D.W., 2000. Substrate deformation in a hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase ternary complex: the structural basis for catalysis. *Structure*, 8(12), 1309-1318

Literatur

- Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K. und Pease L.R.**, 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77, 51-59
- Hommel U., Lustig A. und Kirschner K.**, 1989. Purification and characterization of yeast anthranilate phosphoribosyltransferase. *Eur. J. Biochem.*, 180, 33-40
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., et al.**, 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 77, 61-68.
- Huber R.H., Langworthy T.A., König H., Thomm M., Woese C.R., Sleytr U.B. und Stetter K.O.**, 1986. *Thermotoga maritima* sp. Nov. Represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Arch. Microbiol.*, 144, 324-333
- Inoue H., Nojima H. und Okayama H.**, 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-28
- Jaenicke R.**, 2000. Do ultrastable proteins from hyperthermophiles have high or low conformational rigidity? *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 97(7), 2962-4
- Jaenicke R. und Stern R.**, Life at high temperatures. In: M. Dworkin *et al.*, eds., *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd edition (Latest update release 3.9, March 2002), New York, Springer-Verlag, 2000.
- Kim C., Xuong N.H., Edwards S., Madhusudan, Yee M.C., Spraggan G. und Mills S.E.**, 2002. The crystal structure of anthranilate phosphoribosyltransferase from the enterobacterium *Pectobacterium carotovorum*. *FEBS Letters*, 523, 239-246
- Kinoshita K., Sadanami K., Kidera A. Und Go N.**, 1999. Structural motif of phosphate-binding site common to various protein superfamilies: all-against-all structural comparison of protein-mononucleotide complexes. *Protein Eng.*, 12, 11-14
- Klungsoyr L. Und Kryvi H.**, 1971. Kinetic properties of phosphoribosyladenosine triphosphate synthetase. Inhibition by aggregation at high enzyme concentrations. *Biochim Biophys Acta*, 227, 327-336
- Kroemer D.J., Bloor G. und Fiebig J.**, 2004. Acute Transition Alliance: rehabilitation at the acute/aged care interface. *Aust Health Rev.*, 28(3), 266-74
- Kühnemuth R. Und Seidel C.A.M.**, 2001. Principles of Single Molecule Multiparameter Fluorescence Spectroscopy. *Single Molecules*, 2, 251-254
- Kulik V., Hartmann E., Weyand M., Frey M., Gierl A., Niks D., Dunn M.F. und Schlichting I.**, 2005. On the structural basis of the catalytic mechanism and the regulation of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium* and BX1 from maize, two evolutionarily related enzymes. *J Mol Biol.*, 352, 608-620

Literatur

- Laemmli, U. K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- LeMaster D.M., Tang J., Paredes D.I. und Hernandez G.**, 2005. Enhanced thermal stability achieved without increased conformational rigidity at physiological temperatures: spatial propagation of differential flexibility in rubredoxin hybrids. *Proteins*, 61, 608-616
- Lee C.E., Goodfellow C., Javid-Majd F., Baker E.N. und Lott J.S.**, 2006. The Crystal Structure of TrpD, a Metabolic Enzyme Essential for Lung Colonization by Mycobacterium tuberculosis, in Complex with its Substrate Phosphoribosylpyrophosphate. *J. Mol. Biol.*, 355, 784-797
- Leopoldseder S.**, 2005. Neuartige Tryptophan Synthasen aus Hyperthermophilen : Charakterisierung der Enzyme aus Sulfolobus sulfataricus. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades, Universität Regensburg
- Mayans O., Ivens A., Nissen L.Johan, Kirschner K. und Wilmanns M.**, 2002. Structural analysis of two enzymes catalysing reverse metabolic reactions implies common ancestry. *EMBO Journal* (21),13, 3245-3254
- Meola M., Yamen B., Weaver K. und Sandwick R.K.**, 2003. The catalytic effect of Mg²⁺ and imidazole on the decomposition of 5-phosphoribosyl-α-pyrophosphate in aqueous solution. *J Inorg Biochem*, 93, 235-242
- Merz A., Muh-ching Y., Szadkowski H., Pappenberg G., Crameri A., Stemmer W.P.C., Yanofsky C. und Kirschner K.**, 2000. Improving the Catalytic Activity of a Thermophilic Enzyme at Low Temperatures. *Biochemistry*, 39, 880-889
- Miyazaki K., Wintrode P.L., Grayling R.A., Rubingh D.N. und Arnold F.H.**, 2000. Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J. Mol. Biol.*, 297, 1015-1026
- Moghaddam A., Zhang H.T., Fan T.P., Hu D.E., Lees V.C., Turley H., Fox S.B., Gatter K.C., Harris A.L. und Bicknell R.**, 1995. Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(4), 998-1002
- Morollo A.A. & Bauerle R.**, 1993. Characterization of composite aminodeoxyisochorismate synthase and aminodeoxyisochorismate lyase activities of anthranilate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 9983-7
- Mushegian A.R. und Koonin E.V.**, 1994. Unexpected sequence similarity between nucleosidases and phosphoribosyltransferases of different specificity. *Protein Sci.*, 3, 1081-1088
- Nelson K.E., Clayton R.A., Gill S.R., Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Nelson W.C., Ketchum K.A. et al.**, 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, 399, 323-329

Literatur

O'Gara J.P. und Dunican L.K., 1995. Mutations in the trpD gene of *Corynebacterium glutamicum* confer 5-methyltryptophan resistance by encoding a feedback-resistant anthranilate phosphoribosyltransferase. *Appl Environ Microbiol*, 61(12), 4477-9

Ozturk D.H., Dorfman R.H., Scapin G., Sacchettini J.C., Grubmeyer C., 1995. Structure and function of *Salmonella typhimurium* orotate phosphoribosyltransferase: protein complementation reveals shared active sites. *Biochemistry*, 34, 10764-10770

Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G. und Gray T., 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*, 4, 2411-23

Pace N.R., 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276, 734-740

Pace C.N., Hebert E.J., Shaw K.L., Schell D., Both V., Krajcikova D., Sevcik J., Wilson K.S., Dauter Z., Hartley R.W. und Grimsley G.R., 1998. Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa,Sa2 and Sa3. *J Mol Biol* 279(1), 271-86

Pugmire M.J. und Ealick S.E., 2002. Structural analysis reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochem J.*, 361, 1-25

Romero R.M., Roberts M.F., Phillipson J.D., 1995. Anthranilate synthase in microorganisms and plants. *Phytochemistry*, 39(2), 263-76. Review

Salerno C., Giacomello A., 1981. Human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase. The role of magnesium ion in a phosphoribosylpyrophosphate-utilizing enzyme. *J Biol Chem*. 256 (8), 3671-3673

Scapin G., Grubmeyer C., Sacchettini J.C., 1994. Crystal structure of orotate phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, 33, 1287-1294

Scapin G., Ozturk D.H., Grubmeyer C., Sacchettini J.C., 1995. The crystal structure of the orotate phosphoribosyltransferase complexed with orotate and alpha-D-5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate. *Biochemistry*, 34, 10744-10754

Sharma V., Grubmeyer C. und Sacchettini J.C., 1998. Crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential TB drug target. *Structure*, 6(12), 1587-99

She O., Singh R.K., Confalonieri F., Zivanovic Y., Allard G., Awayez M.J., Chan-Weiher C.C., Clausen I.G., Curtis B.A., De Moors A., Erauso G., Fletcher C., Gordon P.M., Heikamp-de Jong I., Jeffries A.C., Kozera C.J., Medina N., Peng X., Thi-Ngoc H.P., Redder P., Shenk M.E., Teriault C., Tolstrup N., Charlebois R.L., Doolittle W.F., Duguet M., Gaasterland T., Garrett R.A., Ragan M.A., Sensen C.W., Van der Oost J., 2001. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (14), 7835-40

Sinha S.C. und Smith J.L., 2001. The PRT protein family. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 11, 733-739

Sissler M. Delorme D., Bond J., Ehrlich S., Renault P., Francklyn C., 1999. An aminoacyl-tRNA synthetase paralog with catalytic role in histidine biosynthesis. *Proc. Natl. Sci. USA*, 96, 8985-8990.

Smith J.L., Zaluzec E.J., Wery J.P., Niu L., Switzer R.L., Zalkin H., Satow Y., 1994. Structure of the allosteric regulatory enzyme of purine biosynthesis. *Science*, 264, 1427-1433

Svergun D.I. und Koch M.H., 2002. Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. *Curr Opin Struct Biol*, 5, 654-60. Review

Schaffer J., Volkmer A., Eggeling C., Subramaniam V., Striker G. und Seidel C.A.M., 1999. Identification of single molecules in aqueous solution by time-resolved fluorescence anisotropy. *J. Phys. Chem. A*, 103, 331-336

Schmid F.X., 1997. Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Proofs for Protein Structure: A practical approach*. Chapter 11, pp 259-295. Creighton TE, IRL Press, Oxford, 2ed

Schneider B. Knöchel T., Darimont B. Hennig M. Dietrich S., Babinger K., Kirschner K., Sterner R., 2005. Role of the N-terminal extension of the (betaalpha)8-barrel enzyme indole-3-glycerol phosphate synthase for its fold, stability, and catalytic activity. *Biochemistry*, 44(50), 16405-12

Schotte F., Lim M. Jackson T.A., Smirnov A.V., Soman J., Olson J.S., Phillips G.N. Jr., Wulff M., Anfinrud P.A., 2003. Watching a protein as it functions with 150-ps time resolved x-ray crystallography. *Science*, 300, 1944-1947.

Schumacher M., Carter D., Roos D., Ullman B., Brennan R., 1996. Crystal structures of Toxoplasma gondii HGXPTase reveal the catalytic role of a long flexible loop. *Nat. Struct. Biol.*, 3, 881-887

Steiner T. und Koellner G., 2001. Hydrogen bonds with pi-acceptors in proteins: frequencies and role in stabilizing local 3D structures. *J Mol Biol.*, 305(3), 535-57
Stemmer W. P., (1994 A). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 25; 91, 22, 10747-10751.

Stemmer W. P., (1994 B). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*: 370, 389-391.

Sterner R. und Liebl W., 2001, Thermophilic adaptation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 36(1), 39-106. Review

Sterner R., Kleemann G.R., Szadkowski H., Lustig A., Hennig M. und Kirschner K., 1996. Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga*

Literatur

maritima is an extremely stable and active homodimer. *Protein Science*, 5, 2000-08

Studier F.W. und 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

Stüber D., Matile H. und Garotta G., 1990. System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function. *Immunol Methods*, 4, 121-52

Tebar A., Fernandez V., Martin del Rio R., Ballesteros A., 1973. Studies on the quaternary structure of the first enzyme for histidine biosynthesis. *Experientia*, 29, 1477-1479

Thoma R., Hennig M., Sterner R. Und Kirschner K., 2000. Structure and function of mutationally generated monomers of dimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from *Thermotoga maritima*. *Structure*, 8(3), 265-76

Thompson R.E., Li E.L., Spivey H.O., Chandler J.P., Katz A.J. und Appleman J.R., 1978. Apparent stability constants of H⁺ and Mg²⁺ complexes of 5-phosphoribosyl alpha-1-pyrophosphate. *Bioinorg Chem.*, 9(1), 35-45

Towbin H., Staehelin T. und Gordon J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(9), 4350-4

Vega M., Zou P., Fernandez F.J., Murphy G.E., Sterner R., Popov A., Wilmanns M., 2005. Regulation of the hetero-actameric ATP Phosphoribosyl transferase complex from *Thermotoga maritima* by a tRNA synthetase-like subunit. *Molecular Microbiology*, 55, 675-686

Volkman B.F., Lipson D., Wemmer D.E., Kern D., 2001. Two-state allosteric behavior in a single-domain signaling protein. *Science*, 291, 2429-2433.

Walter M.R., Cook W.J., Cole L.B., Short S.A., Koszalka G.W., Krenitsky T.A. und Ealick S.E., 1990. Three-dimensional structure of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* at 2.8 Å resolution. *J Biol Chem*, 265(23), 14016-22

Wang G.P., Lundsgaard C., Jensen K.F. und Grubmeyer C., 1999. Kinetic Mechanism of OMP Synthase: A Slow Physical Step Following Group Transfer Limits Catalytic Rate. *Biochemistry*, 38, 275-283

Wolf-Watz M., Thai V., Henzler-Wildman K., Hadjipavlou G., Eisenmesser E.Z., Kern D., 2004. Linkage between dynamics and catalysis in a thermophilic-mesophilic enzyme pair. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 945-949

Wong K.F., Selzer T., Benkovic S.J. Hammes-Schiffer, 2005. Impact of distal mutations on the network of coupled motions correlated to hydride transfer in dihydrofolate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, 102, 6807-6812

Literatur

Xu Y., Eads J., Sacchettini J.C. und Grubmeyer C., 1997. Kinetic Mechanism of Human Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase: Rapid Phosphoribosyl Transfer Chemistry. *Biochemistry*, 36, 3700-3712

Yanisch-Perron C., Vieira J. Und Messing J., 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp 18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1), 103-19

Yanofsky C., 1999. Trp Operon. In Creighton T. (ed.) “*Encyclopedia of Molecular Biology*”, 4, 2676-2689

Yanofsky C., 2001. Advancing our knowledge in biochemistry, genetics and microbiology through studies on tryptophan metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 1-37

Závodszky P., Kardos J., Svingor, Petsko G.A., 1998. Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(13), 7406-11

Zillig W., Tu J., Holz I., 1981. Thermoproteales- a third oder of thermoacidophilic archaeabacteria. *Nature*, 293 (5827) 85-86

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
AA	Anthranilsäure
Å	Ångström (10^{-10} m)
$0,1\% A_x$	spezifischer Extinktionskoeffizient bei x nm
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bla	β -Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albuminum</i> ; Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Crude extract
C	Cystein
CD	Circulardichroismus
d	Schickdicke der Küvette
D	Aspartat
Da	Dalton
d.h.	das heißt
dsDNA	doppelsträngige DNA
ssDNA	einzelsträngige DNA
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
$\Delta trpEGD$	<i>E.coli</i> Stamm mit Defizienz für TrpEGD-Aktivität
E	Glutamat
<i>E.coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
E_0	Gesamtenzymkonzentration
et al.	Und andere (Autoren) (<i>et alii</i>)
ε_x	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
F	Phenylalanin
FPLC	fast performance liquid chromatography
G	Glycin
h	Stunde

Abkürzungsverzeichnis

H	Histidin
H	Hitzeschritt
His-taq	Anhang von 6 Histidinen an ein Protein
IGPS	Indolglycerolphosphat Synthase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Lysin
Kana	Kanamycin
k_{cat}	Wechselzahl
k_{cat}/K_M	katalytischer Effizienzparameter
kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis-Konstante
KP	Kaliumphosphat-Puffer
l	Liter
L	Leucin
LB	Luria-Bertani
M	mol/l
min	Minute
ml	Milliliter
M_R	<i>molecular weight</i> ; relative Molmasse des Proteins
N	Asparagin
nm	Nanometer
OD _x	optische Dichte bei x nm
ori	Replikationsursprung
P	Pellet, unlösliche Fraktion des Zellextraktes
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PP _i	Pyrophosphat
PRA	N-5'-Phosphoribosylanthranilat
PRAI	Phosphoribosylanthranilatisomerase
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat
Pwo-	<i>Pyrococcus woeseii</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-konzentration
Q	Glutamin
R	Arginin

Abkürzungsverzeichnis

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
ss	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
SV	Säulenvolumen
Taq-	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T_M	Schmelztemperatur des Oligonukleotids
<i>trp</i>	Gene, die für Enzyme des Tryptophanbiosyntheseweges kodieren
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TrpC	Indolglycerolphosphat Synthase
TrpF	Phosphoribosylantranilat Isomerase
U	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
üN	über Nacht
VB	Vogel-Bonner
v_i	Anfangsgeschwindigkeit
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
Vol	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

8. Anhang

8.1 Nukleotidsequenz von *sstrpD*

1	atgaatataa atgagattct taaaaaaactc ataaataaat cagatttaga	50
51	aattaatgag gctgaagaat tagctaaagc tataattaga ggagaagtcc	100
101	cagagatttt agtacagca atttttagtag cattaagaat gaaaagggtgaa	150
151	agtaaaaatg aaatagtagg ttttgctaga gcaatgagag aattagcgat	200
201	caaaaatagac gtgcccaacg caatagacac agctggtaca ggtggcgacg	250
251	gattagggac agtaaacgtt agtaccgcac cagctatctt attgagttt	300
301	gttaatccag ttgccaaaca tggtaatagg gcagtaagtgc gtaaaagcgg	350
351	tagcgctgat gttcttgagg cttaggcta taatattata gttcctccag	400
401	aaaggcggaaa agaactagtc aataaaacga atttcgtttt cctcttgca	450
451	caatactatc atcctgcaat gaagaacgtt gccaatgtaa gaaaaacttt	500
501	ggggatcagg actatttca atattctagg tccattgact aatccagcta	550
551	atgcgaagta tcagttaatg ggagtatttt cgaaaagatca ctttagattta	600
601	ctgtcaaaaaa gtgcatatga attagatttc aataaaataa ttttggtata	650
651	tggagagccg ggtatagatg aggttaagtcc aataggaaat actttcatga	700
701	aaatagtaag taagcgcgtt atagagggaa tcaagttaaa tgtaactgat	750
751	ttcggcataat caccgattcc aatagaaaaag ttaatagtaa attctgcgga	800
801	ggattccgca ataaaaatag ttagagcatt tctgggtaaa gatgaacacg	850
851	tggctgaatt cattaaaatt aacacagcag ttgcgtttt tgcatttagat	900
901	agagtagggcg atttttagaga aggttatgag tatgctgatc atttgataga	950
951	aaaatccttg gataaattaa atgagataat ctcaatgaaat ggtgatgtaa	1000
1001	ctaaaactgaa aacgatagtg gtgaaaagta gtggtaa	1038

8.2 Nukleotidsequenz von *tmtrpG-D* (Sequenzbeginn von *trpD* ist fettgedruckt)

1	atggctccag gcaggagcgg gtatcggtt ccattccgtt ccggagcgcg	50
51	aatatcagga gactctgaac aaactcaggc cttgttcag gagcctggaa	100
101	gttgcgcaga agatccaggc gggattgttt tgaaaagagt gatcggtata	150
151	gacaactacg attcggtcg ttacaacatc gttcagtaca tcggtgaggt	200
201	agaaccagac tgtgaaatcg aagtcttcag aaacgcgcg ataacgatcg	250
251	aagagataga gagaaaaaaat cccactcaca tagttatatc tcctggcccc	300
301	ggaagaccgg aagaagcggg tatctccgtt gatgttgtga ggcacttcag	350
351	cgggaagggtt ccaatactcg gtgtgtgtct tggacaccag gtgatcggct	400
401	acgcttttgg tggaaagatc gtgcgtgcaaa agaggattct tcattggaaag	450
451	acatcgaaatc tcgtacacaa cggaaagggtt gtattctctg gtgtgaaaaa	500
501	tccactcggt gctacgcgtt accattact cgttgtgaa gaggcatccc	550
551	tccctgaagt tctggaaatc accgccccaa gtgacgtatgg agagatcatg	600
601	ggactccagc acaaagaaca cccaaacctt ggagttcgtt ttcattccaga	650
651	atccgtgtcg accgaagaat gaaagagaat cataaagaac ttcctgaaca	700
701	tccaggatat tcaggtaaatc aaagtttccg aagaaacggg aattgacatc	750
751	gtttccgcgtc tcaagaaaact cgtagaattt gaagatctca cttttgaaga	800
801	gagccgtcgt gtgtatgact tcattatgtc cggaaatgcc acggacgctc	850
851	aaattgcagg tttccgtgt gcactcagga tgaaagaggg aacggggagac	900
901	gaactcggtg gaatggccag cgtcatgcga gaaaaatcga ttcattataaa	950
951	agcaccttct ccaagaacgg tcgacacactg cggaaaccggg ggagacgggtt	1000
1001	ttggcacgtt caacatttca acgacaacgg cctttgtcgat tgctgcggct	1050
1051	ggtattcccg ttgcaaaaaca cggtaaccga tctgtctcaa gcaagggtggg	1100
1101	gagtgcgcac gttctcgaag cccgtggta caaacttgaa aagacaccgg	1150

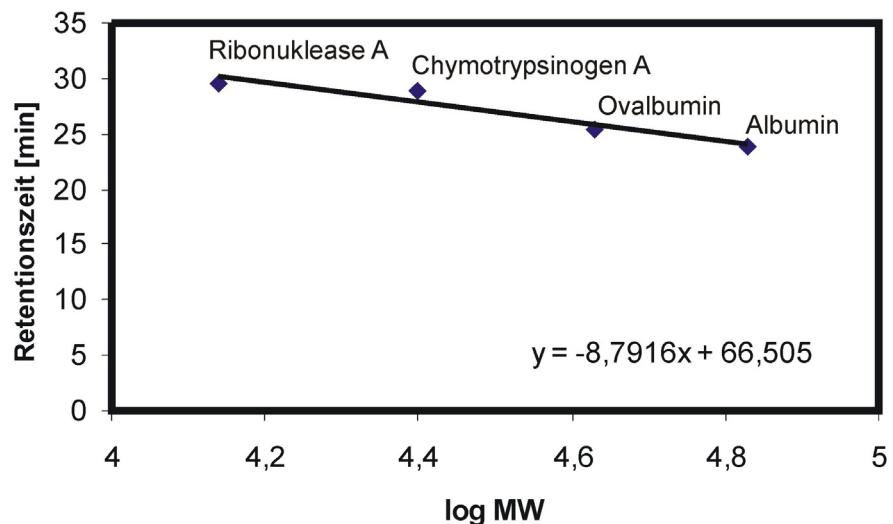
Anhang

1151	aggagatgga	aagagagctc	aaagaaaaccg	gtttttctt	ccttttcgc	1200
1201	ccgcttcttc	atccagcgt	gaagcacgt	atgcccgcg	gaagacagct	1250
1251	gaagataagg	acggcttca	accttcttgg	tcccataaac	aaccctgcca	1300
1301	gggtgaagta	ccaggtgg	ggggcttctcg	atctttctt	cgcttccaa	1350
1351	ctcgcaacgg	cccttcaacg	tcttggtacg	gaacgctcg	cagtgtcaa	1400
1401	cggaggttc	acagacgaac	tcaccacgt	tgttaagaac	aacctaactcc	1450
1451	tcgttactca	ggaagagatc	gtccccatgg	tgtggatcc	cgaagaactc	1500
1501	ggattgaaga	gtggagaccc	cgaggagct	aaaggtcct	ccgatccccaa	1550
1551	agaggcgtac	cggatgtatgg	aaagtgttct	gaaaggagaa	gccagcagaa	1600
1601	cacaggtgga	gacggtggt	ctgaacgcag	gggttgttt	ctggctgg	1650
1651	ggtaatgt	acaccataaa	ggacgggt	ggaaaggctc	tcgatctcat	1700
1701	cagaacgggt	gaggcctaca	aaaaattgag	ggaggtaatg	gactatcaga	1750
1751	agactctggg	aaatagttga				1770

8.3 Nukleotidsequenz von *aatrpD-1*

1	atggaaactgg	taagggaact	gctaaggaaa	atagctgaat	ttgaaaacct	50
51	aactgcgaaa	gaaatgtaca	acttgatgaa	agaagtggcg	gagggaaagg	100
101	caacggacgc	ccagatcgga	gcactcgtaa	tggaaacaaa	gatgaagg	150
151	gaaactcctg	agggaaataga	gggtgcagta	aagcttca	gggaaaaagt	200
201	cgtaaagggtt	cccgtaaaag	atcctgaaga	gctcgtggac	gtagtaggaa	250
251	cgggaggaga	taaaagtct	acttttaacg	tttccactgt	tactgggtt	300
301	gttctcgctg	gtcagggagt	aaaagtggca	aaacatggga	accgctccgt	350
351	ctcttcaaaa	agcggtagtg	cggattttct	ggaagccctc	ggagcaaaag	400
401	tagaacttct	ccctgaaaag	gtggcgagac	ttattgaaga	agtgggattc	450
451	ggatttatgt	tcgctccgct	cttccacccc	gccatgaaaa	gggtcgttc	500
501	tccgagaagg	gaggtggag	tccgatccat	tttaatttt	ataggaccac	550
551	ttacaaaccc	cgcgggtgta	aagaggtatc	tcctcggtgt	ttttcaag	600
601	gaatacgtt	ataaaattcgc	aaaagccctt	aaaaaacctcg	gcgttaaaaa	650
651	ggcattcgtc	gtgcacgggg	aaggtgtat	tgacgaggtg	agcgtagaag	700
701	gggaaaccta	cgttacggaa	gtttcagaag	aagggataag	gagtttacc	750
751	ttttctcctg	aagaactcgg	tgtaaagaga	aagtctctga	gtgaagttag	800
801	ggtaaactcc	ccgaaagaga	gcgtaaaagt	tgcactttca	gttttgagag	850
851	gagaagaggg	aacgcccgg	gatatgttc	tcctgaacgc	aagctcgg	900
901	attctcgat	ctgaaagg	aggggatata	aaggaagcct	ttgaaatggc	950
951	taaggagtc	atagacagcgc	gaaaggctct	ggaggtattt	gagaagtatg	1000
1001	tggaactctc	aaataaaaatc	tga			1023

**8.4 Kalibrierung der analytischen Gelfiltrationssäule
Superdex 75**



9. ***Danksagung***

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Sterner möchte ich mich besonders für die interessante Aufgabenstellung und die Möglichkeit der weitestgehend selbstständigen Bearbeitung des Projektes bedanken. Ich danke ihm für die fachliche Unterstützung und stete Bereitschaft zur Diskussion.

Prof. Dr. E. Brunner danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ich danke allen Kooperationspartnern, ohne die eine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Ein besonderer Dank geht an Hans Jürgen Brandt aus der Arbeitsgruppe von Prof. Wandrey am Forschungszentrum Jülich.

Prof. Olga Mayans, Dr. Marco Marino, Prof. Claus Seidel sowie Dimitri Svergun danke ich für die Arbeiten zur Strukturanalyse und Untersuchungen der Scharnierbewegung.

Ich bedanke mich bei Dr. Nadja Hellmann und Simona Cerrone für die „Asyl“ Gewährung im Kölner Labor über den Umzug der Arbeitsgruppe hinaus. Simona Cerrone danke ich für ihre Unterstützung während dieser Zeit und eine weiterbestehende Freundschaft.

Iris Lambeck und Birgit Schneider danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre und fachlichen Gespräche zu Kölner Zeiten.

Sonja Leopoldsdeder danke ich für eine Freundschaft, die sich bereits unter Diplomanden ausgezeichnet hat. Danke für die nette Begrüßung in Regensburg und die Unternehmungen außerhalb des Labors. Susanne Dietrich danke ich für ihre Kochkünste und freundschaftlichen Gespräche. Besonders bedanken möchte ich mich bei Jeannette Ueckert für die riesige Unterstützung und zahlreichen Überstunden besonders in der Endphase meiner Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Helmut Durchschlag, Klaus Tiefenbach, Markus Richter, Catharina

Danksagung

Dönges, Felix List, Tobias Seitz, Christiane Endres, Lorella Ungar, Sonja Fuchs, Karin und Patrick Babinger, Jörg Claren, Bernhard Dumm, Melanie Vollmer, Barbara Kellerer sowie allen „neuen Diplomanden“ für eine herzliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Andre Fischer und Marion Strieder für ihre bioinformatische Hilfestellung.

Bei Francisco bedanke ich mich für die Geduld und das entgegengebrachte Verständnis. Meiner Familie danke ich für das Interesse an meiner Arbeit.