

MUTATIONSANALYSE UND KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM REAKTIONSMECHANISMUS DER INDOLGLYCERINPHOSPHAT-SYNTHASE 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
Susanne Dietrich aus Kelheim

Mai 2010

Promotionsgesuch eingereicht am: 11. Mai 2010

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Reinhard Sterner

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Christoph Oberprieler

1. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Sterner
2. Prüfer: PD Dr. Rainer Merkl
3. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Wirth

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2005 bis Mai 2010 am Lehrstuhl Biochemie II des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner angefertigt.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
FORMELVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Biosynthese von Tryptophan	1
1.2 ($\beta\alpha$) ₈ -barrel Enzyme.....	2
1.3 Die Indolglycerinphosphat-Synthase	4
1.4 <i>Sulfolobus solfataricus</i>	5
1.5 Enzymatische Aktivität und Stabilität von Proteinen aus hyperthermophilen Mikroorganismen	6
1.6 Von der Sequenz über die Struktur zum Reaktionsmechanismus	7
1.6.1 Informationsgehalt von Aminosäuresequenzen.....	7
1.6.2 Analyse der Tertiärstrukturen von Proteinen	8
1.6.3 Kinetische Untersuchungen zum enzymatischen Reaktions-mechanismus.....	9
1.6.4 Modellerstellung von Reaktionsmechanismen.....	10
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	11
2 MATERIAL	12
2.1 Bakterienstämme	12
2.2 pET-Vektoren für die Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	14
2.3 Oligodesoxyribonukleotide	15
2.3.1 Vektorspezifische Amplifikations- und Sequenzierungsprimer.....	15
2.3.2 Amplifikationsprimer.....	15
2.3.3 Mutationsprimer Superpositionierung	15
2.3.4 Mutationsprimer H2r.....	16
2.3.5 Mutationsprimer FRET-Labeling	17
2.4 Längenstandards	18
2.5 Enzyme.....	18
2.6 Chemikalien	18
2.7 Kits	19
2.8 Verbrauchsmaterialien.....	19
2.9 Geräte	20

2.10 Nährmedien für <i>E. coli</i>.....	22
2.11 Puffer und Lösungen.....	23
2.11.1 Arbeiten mit <i>E. coli</i>	23
2.11.2 Agarosegelektrophorese	24
2.11.3 Polyacrylamidgelektrophorese	24
2.12 Software.....	24
3 METHODEN.....	26
3.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen	26
3.2 Mikrobiologische Methoden.....	26
3.2.1 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> Stämmen.....	26
3.2.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen zur chemischen Transformation	26
3.2.3 Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	27
3.3 Molekularbiologische Methoden	27
3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation)	27
3.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Midi-Präparation)	27
3.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration	28
3.3.4 Agarosegelektrophorese	28
3.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29
3.3.6 Enzymatische Manipulation von dsDNA.....	29
3.3.6.1 Spaltung von dsDNA mit Restriktionsendonukleasen.....	29
3.3.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten.....	29
3.3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
3.3.7.1 Kolonie-PCR.....	31
3.3.8 PCR-Methoden zur gerichteten Mutagenese	31
3.3.8.1 Megaprimer-PCR (Sarkar and Sommer, 1990).....	31
3.3.8.2 Overlap Extension-PCR (Ho et al., 1989)	31
3.3.9 DNA-Sequenzierung	32
3.4 Proteinchemische und organisch-chemische Methoden	32
3.4.1 Genexpression und Proteinanreicherung	32
3.4.1.1 Heterologe Expression und Anreicherung von Proteinen im analytischen Maßstab ..	32
3.4.1.2 Heterologe Expression und Anreicherung rekombinanter Proteine im präparativen Maßstab	33
3.4.2 Proteinreinigung mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie.....	34
3.4.3 Dialyse von Proteinlösungen.....	35
3.4.4 Umpuffern von Proteinlösungen über Gelfiltration	35
3.4.5 Einkonzentrieren von Proteinlösungen.....	36
3.4.6 Lagerung von gereinigtem Protein	36
3.4.7 Synthese und Reinigung der Liganden für sTrpC.....	36
3.4.7.1 Synthese des Substrates CdRP.....	36
3.4.7.2 CdRP-Reinigung mittels HPLC	37
3.4.7.3 Synthese von reduziertem CdRP	39
3.4.7.4 Synthese des Produktes IGP	39
3.5 Analytische Methoden.....	39
3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsspektroskopie	39
3.5.2 Konzentrationsbestimmung von TrpC-Liganden mittels Absorptionsspektroskopie .	41
3.5.2.1 Konzentrationsbestimmung von CdRP	41
3.5.2.2 Konzentrationsbestimmung von rCdRP und IGP	41

3.5.3 SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
3.5.4 Analytische Gelfiltration.....	42
3.5.5 Circular Dichroismus Spektroskopie.....	43
3.5.6 Fluoreszenz-Spektroskopie	45
3.5.7 Messung der Ligandenbindung	46
3.5.7.1 Messung der rCdRP-Bindung an sTrpC unter Gleichgewichtsbedingungen	46
3.5.7.2 Messung der Kinetik der rCdRP-Bindung an TrpC	46
3.5.7.3 Messung der IGP-Bindung an sTrpC unter Gleichgewichtsbedingungen.....	47
3.5.7.4 Messung der Kinetik der IGP-Bindung	47
3.5.7.5 Messung der Kinetik der IGP-Verdrängung von sTrpC.....	48
3.5.8 Enzymkinetik.....	48
3.5.8.1 <i>Steady-state</i> Messung der TrpC-Aktivität.....	49
3.5.8.2 <i>Pre-steady-state</i> Messung von TrpC.....	50
3.5.8.3 Auswertung kinetischer Experimente mit <i>global fit</i> -Prozeduren (Dynafit)	51
3.5.9 Thermische Stabilität.....	52
3.5.9.1 Thermische Inaktivierung	52
3.5.9.2 Thermische Denaturierung	52

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION 53

4.1 Mutationsanalyse von sTrpC.....	53
4.1.1 Rationales Design von sTrpC zur Erhöhung der Aktivität und thermischen Stabilität...	53
4.1.1.1 Ausgangssituation und Strategie.....	53
4.1.1.2 Klonierung der Mutanten	56
4.1.1.3 Heterologe Genexpression in <i>E.coli</i>	56
4.1.1.4 Reinigung der rekombinanten sTrpC-Proteine.....	57
4.1.1.5 Charakterisierung der gereinigten sTrpC-Proteine.....	58
4.1.1.5.1 <i>Steady-state</i> Enzymkinetik	58
4.1.1.5.2 Thermische Stabilität	61
4.1.1.6 Kombination von Einzelmutationen	65
4.1.1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse mit den auf der Basis von tmTrpC hergestellten sTrpC-Mutanten	66
4.1.2 Validierung der durch H2r als auffällig beschriebenen Positionen in sTrpC.....	67
4.1.2.1 Identifizierung wichtiger Positionen in sTrpC durch H2r.....	70
4.1.2.2 Klonierung der Mutanten	72
4.1.2.3 Heterologe Genexpression in <i>E.coli</i> und Reinigung der rekombinanten sTrpC-Proteine	73
4.1.2.4 Charakterisierung der gereinigten sTrpC-Proteine.....	73
4.1.2.4.1 <i>Steady-state</i> Enzymkinetik	73
4.1.2.4.2 Thermische Stabilität	75
4.1.2.5 Zusammenfassung der H2r basierten Varianten.....	78
4.1.3 Weiterführende Untersuchungen an auffälligen Position	79
4.1.3.1 Ligandentitrationen	79
4.1.3.2 Temperaturabhängige Untersuchungen.....	81
4.1.3.3 Zusammenfassung	84
4.2 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von sTrpC	85
4.2.1 Ausgangssituation.....	85
4.2.2 CdRP, rCdRP, IGP und deren möglichen Konformationen.....	87
4.2.3 Reinigung des Substrates CdRP mittels RP-HPLC	89
4.2.4 Analyse der Kinetik von Ligandenbindung und Umsetzung anhand von intrinsischen Signalen.....	91
4.2.4.1 Kinetik der Bindung von Liganden an sTrpC-wt	91
4.2.4.1.1 Kinetik der Bindung von rCdRP	92
4.2.4.1.2 Kinetik der Bindung von IGP	96
4.2.4.1.3 Verdrängung von gebundenem IGP an sTrpC.....	101
4.2.4.2 <i>Pre-steady-state</i> Kinetiken	106

4.2.4.3	<i>Single-turnover</i> Umsatz von CdRP durch sTrpC-wt	106
4.2.4.4	Zusammenfassung und Ausblick	114
4.2.5	Analyse der Kinetik von Ligandenbindung und Umsetzung anhand von an sTrpC gekoppelten Farbstoffen	116
4.2.5.1	Auswahl von Positionen in sTrpC für die Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen .	116
4.2.5.2	Klonierung, heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> und Reinigung der Mutanten	117
4.2.5.3	Bestimmung der <i>steady-state</i> enzymkinetischen Parameter.....	118
4.2.5.4	Erste Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten Enzymen	119
4.2.5.5	Zusammenfassung und Ausblick	121
5	ZUSAMMENFASSUNG	122
6	LITERATURVERZEICHNIS	124
7	ANHANG	133
7.1	Expression und Reinigung des Hilfsenzyms tmTrpC	133
7.2	Nucleotid- und Proteinsequenzen der verwendeten Konstrukte.....	133
7.2.1	Nucleotidsequenz von <i>strpC-wt</i>	133
7.2.2	Nucleotidsequenz von <i>tmtrpC-wt</i>	134
7.2.3	Aminosäuresequenz von sTrpC-wt	134
7.2.4	Aminosäuresequenz von tmTrpC-wt	134
7.3	Analytische Gelfiltration.....	134
7.3.1	Kalibrierung der Superdex-75	134
7.3.2	Analytische Gelfiltrationsläufe von sTrpC-wt und den Mutanten	135
7.4	Auswertung kinetischer Experimente mit DynaFit	136
8	DANKSAGUNG	139
9	ERKLÄRUNG	141

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reaktionen und Enzyme der Tryptophan Biosynthese.....	1
Abbildung 2: Die $(\beta\alpha)_8$ -barrel Faltung.....	3
Abbildung 3: Röntgenstruktur von TrpC aus <i>Sulfolobus solfataricus</i> mit gebundenem Substrat CdRP (1LBL)	4
Abbildung 4: Plausibler Reaktionsmechanismus von sTrpC auf der Basis von Struktur- und Mutationsanalysen (Hennig et al., 2002).....	5
Abbildung 5: Bestimmung der CdRP-Konzentration durch den enzymatisch katalysierten und spektrophotometrisch verfolgten Umsatz zu IGP.....	41
Abbildung 6: Superpositionierung von sTrpC mit gebundenem Produkt IGP (1A53) und tmTrpC ohne Ligand (1I4N)	54
Abbildung 7: Superpositionierung und Darstellung unterschiedlicher Reste in der Bindungstasche von sTrpC und tmTrpC	55
Abbildung 8: Herstellung von sTrpC-wt im analytischen Maßstab, dokumentiert mittels SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).....	56
Abbildung 9: Reinigung des rekombinant exprimierten sTrpC-wt Proteins.....	57
Abbildung 10: Sättigungskurve von sTrpC-wt.....	59
Abbildung 11: Röntgenstruktur von sTrpC mit gebundenem Substrat CdRP (schwarz).....	60
Abbildung 12: Thermische Denaturierung: auf der Basis von tmTrpC hergestellte sTrpC-Einzelmutanten im Vergleich mit sTrpC-wt.....	61
Abbildung 13: Thermische Inaktivierung von sTrpC-wt.....	62
Abbildung 14: Röntgenstrukturen von (A) sTrpC (1IGS) mit modelliertem F187 und (B) tmTrpC (1I4N).....	64
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Arbeitsweise von H2r.....	67
Abbildung 16: Röntgenstruktur von sTrpC (1IGS).....	70
Abbildung 17: Röntgenstruktur von sTrpC mit gebundenem Produkt IGP (schwarz).....	71
Abbildung 18: Röntgenstruktur von sTrpC.....	72
Abbildung 19: Thermische Denaturierung: Auf der Basis von H2r hergestellt Mutanten im Vergleich mit sTrpC-wt.....	76
Abbildung 20: Titrationskurve von rCdRP an sTrpC-wt.....	79
Abbildung 21: Titrationskurve von IGP an sTrpC-wt.....	80
Abbildung 22: Arrhenius-Diagramm von sTrpC-wt	82
Abbildung 23: Untersuchung der Struktur von sTrpC-wt durch CD-Spektroskopie bei 25, 37 und 48 °C.....	83
Abbildung 24: Arrhenius-Diagramme: sTrpC-Mutanten im Vergleich mit sTrpC-wt.....	83
Abbildung 25: Plausibler Reaktionsmechanismus von sTrpC auf der Basis von Struktur- und Mutationsanalysen (Hennig et al., 2002)	85
Abbildung 26: Mögliche Keto-Enol-Tautomerisierung des Substrates CdRP und daraus entstehende IGP-Konformere.	88
Abbildung 27: Präparativer HPLC-Lauf zur CdRP-Reinigung mit einer HiPAK C18-Säule... .	90
Abbildung 28: Analytischer HPLC-Lauf zur Überprüfung der CdRP-Reinheit mit einer Nucleosil C18-Säule.	91
Abbildung 29: Messung der Kinetik der rCdRP-Bindung an sTrpC-wt durch Verfolgung der <i>Stopped-flow</i> Transienten.	93
Abbildung 30: Kinetik der Bindung von rCdRP an sTrpC-wt: Sekundärdiagramme der Raten und Amplituden.....	94
Abbildung 31: Globale Analyse der Bindung von rCdRP an sTrpC-wt mit DynaFit.	95

Abbildung 32: Messung der Kinetik der IGP Bindung an sTrpC-wt durch Verfolgung der <i>Stopped-flow</i> Transienten.....	97
Abbildung 33: Kinetik der IGP-Bindung an sTrpC-wt und Fit der initialen Phase mit einer einfache-exponentielle Gleichung.....	97
Abbildung 34: Kinetik der Bindung von IGP an sTrpC-wt: Sekundärdiagramme der Raten und Amplituden.....	98
Abbildung 35: Globale Analyse der Bindung von IGP an sTrpC-wt mit DynaFit nach Modell 1 am Beispiel von zwei Transienten.....	99
Abbildung 36: Verdrängung von IGP aus dem Komplex mit sTrpC-wt durch Orthophosphat: Sekundärdiagramme der Raten und Amplituden.....	102
Abbildung 37: Kinetik der IGP-Verdrängung aus dem Komplex mit sTrpC-wt und Fit mit einer einfache exponentiellen Gleichung.....	103
Abbildung 38: Verdrängung von IGP aus einem sTrpC-IGP Komplex durch Phosphat: Sekundärdiagramme der Raten und Amplituden.....	104
Abbildung 39: STO-Umsatzkurven unter Beobachtung der Absorptionsänderung.	107
Abbildung 40: STO-Umsatzkurven unter Beobachtung der Fluoreszenzänderung nach einer Anregung bei 280 nm und einem Emissions-Cut-off-Filter von 335 nm.	107
Abbildung 41: STO-Umsatzkurven mit verschiedenen sTrpC-wt und CdRP Konzentrationen	109
Abbildung 42: Analyse der STO-Umsetzung von CdRP durch sTrpC-wt.....	110
Abbildung 43: STO-Umsetzung von CdRP durch sTrpC: Sekundärdiagramme der Raten und Amplituden.....	111
Abbildung 44: Röntgenstruktur von sTrpC-wt mit hervorgehobenen Resten R18, D61, T186, G212 und F246.....	117
Abbildung 45: Kalibrierungsgerade der Superdex 75 Gelfiltrationssäule	135

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Extinktionskoeffizienten und molare Masse (M_r) untersuchter Proteine	40
Tabelle 2: Zusammensetzung 12,5 %iger SDS-PAGE Gele.	42
Tabelle 3: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter: auf der Basis von tmTrpC hergestellte sTrpC-Einzelmutanten im Vergleich mit sTrpC-wt und tmTrpC-wt.....	59
Tabelle 4: Halbwertszeiten der thermischen Inaktivierung: auf der Basis von tmTrpC hergestellte sTrpC-Einzelmutanten im Vergleich mit sTrpC-wt und tmTrpC-wt.	63
Tabelle 5: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter und Halbwertszeiten der thermischen Inaktivierung: auf der Basis von tmTrpC hergestellten sTrpC-Mehrfachmutanten im Vergleich mit Einzelmutanten, sTrpC-wt und tmTrpC-wt.....	65
Tabelle 6: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter: auf der Basis von H2r hergestellte sTrpC-Mutanten im Vergleich mit sTrpC-wt.....	74
Tabelle 7: Thermische Stabilität: T_M - und $t_{1/2}$ (75 °C)-Werte von auf Basis der von H2r hergestellten sTrpC-Mutanten im Vergleich mit sTrpC-wt.	77
Tabelle 8: Bindung von rCdRP und IGP: sTrpC-Mutanten im Vergleich mit sTrpC-wt.	81
Tabelle 9: Arrhenius-Break-Temperaturen und Aktivierungsenergien: sTrpC-Mutanten im Vergleich mit sTrpC-wt.	84
Tabelle 10: Globale Analyse der Bindung von IGP an sTrpC-wt mit DynaFit: Ratenkonstanten und differentielle molare Fluoreszenzkoeffizienten für Modell 1.....	100
Tabelle 11: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter der TrpC-Reaktion: sTrpC-Cystein-Mutanten im Vergleich mit sTrpC-wt ^a	118
Tabelle 12: Proteine für die Kalibrierung der Superdex 75 Gelfiltrationssäule.	135

Formelverzeichnis

Formel 1: Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.	28
Formel 2: Berechnung der Schmelztemperatur T_M von PCR-Primern.	30
Formel 3: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{280} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$	39
Formel 4: Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten ${}^{0,1\%}\text{A}_{280} [\text{cm}^2/\text{mg}]$	40
Formel 5: Berechnung der Proteinkonzentration mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten ${}^{0,1\%}\text{A}_{280}$	40
Formel 6: Berechnug der durchschnittlichen Elliptizität pro Aminosäure aus der in Fern-UV CD-Spektren gemessenen Elliptizität.	44
Formel 7: Berechnung der molaren Elliptizität aus der, über Nah UV Circular Dichroismus gemessenen Elliptizität.	44
Formel 8: Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenz von der zutritierten Ligandenmenge.	46
Formel 9: Berechnung der Entropie der Position k	68
Formel 10: Berechnung der Entropie zweier Positionen k und l	68
Formel 11: Ein normiertes Maß für die gegenseitige Abhängigkeit der Aminosäurekompositionen an den Positionen k und l	68

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption; Adenosin
AA	Anthranilsäure
Å	Ångström (10^{-10} m)
$0,1\%A_x$	spezifischer Extinktionskoeffizient bei x nm [$\text{cm}^2\text{mg}^{-1}$]
ABT	Arrhenius-Break-Temperatur
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>bla</i>	β -Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Cytosin, <i>Crude extract</i> (lösliche Zellfraktion)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Circular-Dichroismus
CdRP	1-(o-carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5-phosphat
cm	Zentimeter ($1 \cdot 10^{-2}$ m)
C-terminal	Carboxyterminales Ende einer Polypeptidkette
CV	<i>Column Volume</i> (Säulenvolumen)
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
Da	Dalton [g/mol]
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N= A, C, G oder T)
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
DTT	Dithiothreitol
eTrpC	TrpC aus <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
et al.	und andere (Autoren) (et alii)

EtBr	Ethidiumbromid
f	Verdünnungsfaktor
FPLC	<i>Fast performance liquid chromatography</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
g	Gramm; Zentrifugalbeschleunigung
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
h	Stunde
H	löslicher Überstand des Hitzeschritts
HEPPS	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-propansulfonsäure
(His) ₆ -Tag	Anhang von 6 Histidinen an ein Protein (Hexahistidin-Tag)
HPLC	<i>High pressure liquid chromatographie</i>
IGP	Indol-3-glycerinphosphat
IGPS	Indolglycerinphosphat-Synthase (=TrpC)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
k _{cat}	Wechselzahl
k _{cat} /K _M	katalytischer Effizienzparameter
K _d	thermodynamische Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton ($1 \cdot 10^3$ g/mol)
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
KP	Kaliumphosphat Puffer
l	Liter
lacZ	Gen der β -Galactosidase
LB	Luria-Bertani (-Medium)
In	natürlicher Logarithmus
log	dekadischer Logarithmus
M	Molar [mol/l]
m	Milli- ($1 \cdot 10^{-3}$)
mA	Milliampere
max.	maximal
MCS	multiple Klonierungsstelle eines Plasmids
mg	Milligramm

X

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPa	Megapascal
M _r	Molare Masse
MSA	multiples Sequenzalignment
MTO	<i>multiple turnover</i>
mwco	<i>molecular weight cut off</i>
n	nano ($1 \cdot 10^{-9}$)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
N-terminal	aminoterminales Ende einer Polypeptidkette
OD _x	optische Dichte bei x nm
OE	<i>Overlap extension</i>
ori	Replikationsstartpunkt eines Plasmids (<i>origin of replication</i>)
P	Pellet (unlösliche Fraktion eines Zellextraktes)
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PRA	Phosphoribosylanthranilat
PRPP	5-Phosphoribosyl- α -1-pyrophosphat
Pwo	<i>Pyrococcus woeseii</i>
R	Allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
rCdRP	reduzierte Form des CdRP
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>Reversed-phase</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
STO	<i>single turnover</i>
sTrpC	TrpC aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>

T	Temperatur; Thymidin
T_A	Annealing-Temperatur
T_M	Schmelztemperatur
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TIM	Triosephosphatisomerase
<i>T. maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
<i>tmTrpC</i>	TrpC aus <i>Thermotoga maritima</i>
Trp	Tryptophan
TrpC	Indolglycerolphosphat-Synthase
U	Unit
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v_i	Anfangsgeschwindigkeit
wt	Wildtyp
(w/v)	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
Δ	Differenz
ε_x	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
λ	observierte Ratenkonstante
μ	Mikro ($1 \cdot 10^{-6}$)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
θ_{obs}	gemessene Elliptizität

1 Einleitung

1.1 Die Biosynthese von Tryptophan

Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure, die von Mikroorganismen und höheren Pflanzen selbst synthetisiert werden kann, von Säugetieren jedoch über die Nahrung aufgenommen werden muß. Der Biosyntheseweg geht aus von Chorismat und besteht aus sechs Reaktionsschritten, welche von monomeren Enzymen und Multienzymkomplexen katalysiert werden. Die einzelnen Reaktionen und die sie katalysierenden Enzyme sind in Abbildung 1 dargestellt.

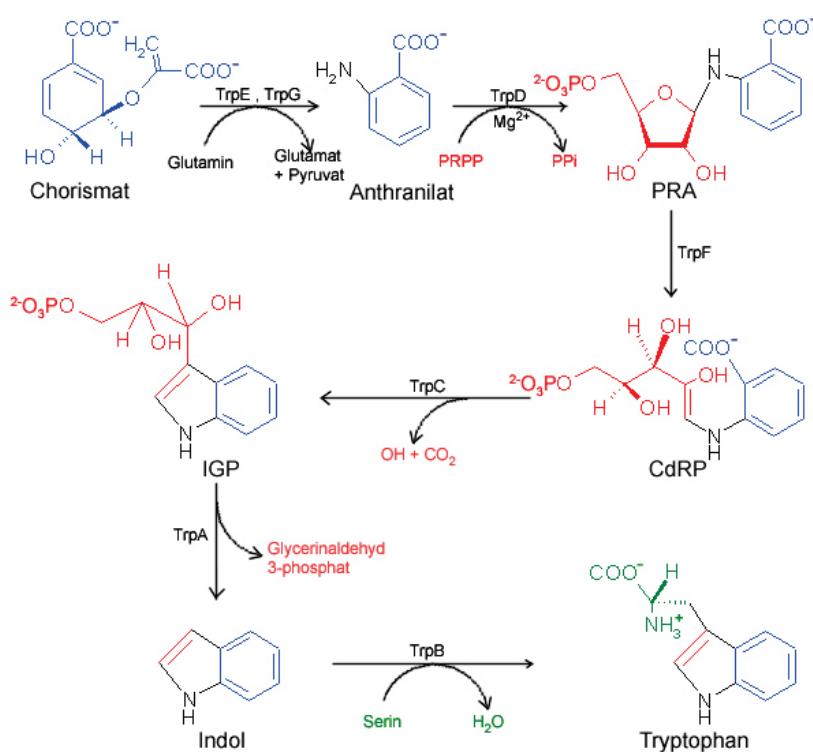


Abbildung 1: Reaktionen und Enzyme der Tryptophan Biosynthese.

PRA: N-(5'-Phosphoribosyl)anthranilat, CdRP: 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5-phosphat, IGP: Indol-3-glycerinphosphat, TrpE, TrpG: große und kleine Untereinheit der Anthranilat Synthase; TrpD: Anthranilat-Phosphoribosyltransferase; TrpF: PRA Isomerase; TrpC: IGP Synthase; TrpA: α -Untereinheit der Tryptophan Synthase; TrpB: β -Untereinheit der Tryptophan Synthase.

Die sieben Gene für die benötigten Enzyme liegen in den meisten Organismen in einem kanonischen Operon vor, was eine gemeinsame Regulation auf der Transkriptions- und Translationsebene ermöglicht, häufig unter Beteiligung des Trp-Repressors und mittels Attenuation über ein Tryptophan-reiches *leader*-Peptid (Stewart und Yanofsky, 1986). Auf Enzymebene wird die Tryptophan-Biosynthese durch *feedback*-Inhibition reguliert. Dabei wird die TrpE-Untereinheit des

Multienzymkomplexes Anthranilat Synthase kompetitiv durch das Endprodukt, Tryptophan inhibiert (Knöchel et al., 1999). Seit einigen Jahren sind hochauflöste Röntgenstrukturen für alle an diesem gut untersuchten Stoffwechselweg beteiligten Enzyme bekannt (Yanofsky, 2001, 2003).

1.2 **($\beta\alpha$)₈-barrel Enzyme**

Ein in der Natur weit verbreitetes Strukturmotiv von Enzymen ist das $(\beta\alpha)_8$ -barrel, welches nach der ersten gelösten Struktur mit dieser Faltung, der Triosephosphatisomerase (TIM) aus dem Hühnchen, alternativ als TIM-barrel bezeichnet wird (Banner et al., 1975). Phylogenetische Analysen von Proteinstrukturen zeigen, dass das $(\beta\alpha)_8$ -barrel zu den ältesten Faltungstypen gehört (Caetano-Anolles et al., 2007). Insgesamt sind bis heute fast 900 Strukturen von $(\beta\alpha)_8$ -barrel Proteinen bekannt und in der Proteindatenbank abgelegt. Hierbei handelt es sich fast ausschließlich um Enzyme, die sich in fünf der sechs von der Enzymkommission definierten Hauptklassen finden lassen (Nagano et al., 1999).

Die Grundstruktur von $(\beta\alpha)_8$ -barrel Proteinen besteht aus acht konsekutiven Einheiten, die sich jeweils aus einem β -Strang und einer darauffolgenden α -Helix zusammensetzen. Innerhalb einer Einheit ist ein β -Strang mit einer α -Helix über einen $\beta\alpha$ -Loop verbunden, während die Einheiten untereinander über $\alpha\beta$ -Loops miteinander verknüpft sind. In der Mitte des Enzyms liegen die leicht verdrehten, parallel angeordneten β -Stränge und bilden ein zentrales Fass (Wierenga, 2001). Umgeben wird das Fass von den acht, meist amphipatischen α -Helices, wobei die hydrophile Seite mit dem Lösungsmittel interagiert, während ihre hydrophobe Seite den β -Strängen zugewandt ist (Pujadas und Palau, 2001). Mindestens 200 Aminosäuren sind für die stabile Grundstruktur eines TIM-barrel notwendig (Bork et al., 1995; Sterner und Höcker, 2005), wobei die meisten Proteine aufgrund von Insertionen und Extensionen länger sind (Nagano et al., 2002). Die Struktur des $(\beta\alpha)_8$ -barrel lässt sich in zwei Bereiche unterteilen: einen Katalysepol, welcher die C-terminalen Enden der β -Stränge und die anschließenden $\beta\alpha$ -Loops umfasst und die Reste des aktiven Zentrums beinhaltet, und einen Stabilitätspol, welchem der Rest der Struktur inclusive der $\alpha\beta$ -Loops angehört und der für die konformationelle Stabilität wichtig ist (Abbildung 2).

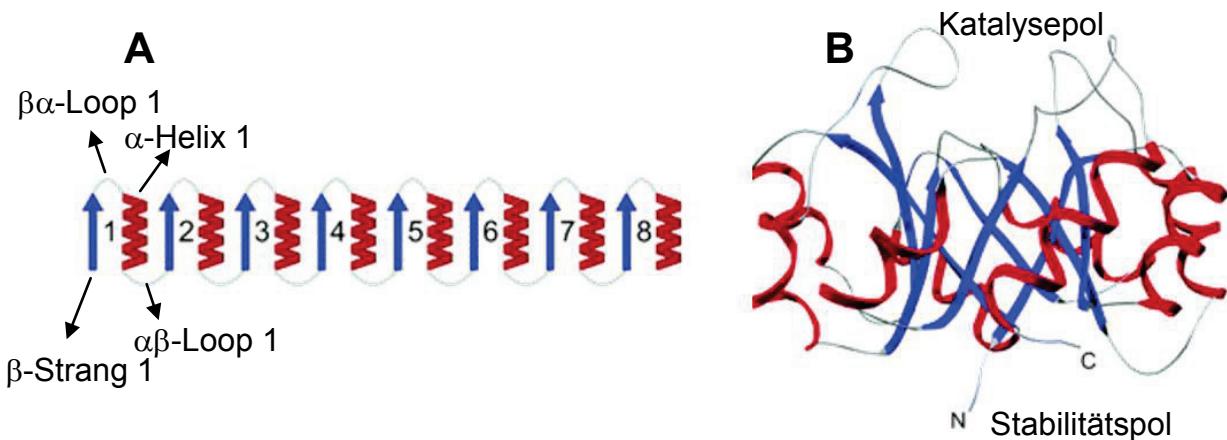


Abbildung 2: Die $(\beta\alpha)_8$ -barrel Faltung.

A: Topologische Darstellung der rechtsgängigen $\beta\alpha$ -Supersekundärstruktur aus acht $(\beta\alpha)$ -Modulen. In blau sind β -Stränge, in rot α -Helices und in grau die verbindenden Loops dargestellt.
 B: Seitenansicht eines kanonischen $(\beta\alpha)_8$ -barrel Proteins. Im Zentrum ist das aus acht β -Strängen gebildete Fass zu erkennen, welches von acht α -Helices umgeben ist. Die katalytisch essentiellen Reste liegen an den C-terminalen Enden der β -Stränge und in dem darauf folgenden $\beta\alpha$ -Loops (Katalysepol). Der restliche Teil der Faltung, inklusive der gegenüberliegenden Seite des Fasses mit den $\alpha\beta$ -Loops, ist für die konformationelle Stabilität verantwortlich (Stabilitätspol).

Bezüglich der Evolution von $(\beta\alpha)_8$ -barrel Enzymen gibt es zwei unterschiedliche Theorien. Die Theorie konvergenter Evolution geht davon aus, dass die Faltung mehrfach unabhängig voneinander entstanden ist. Hierfür sprechen die allgemein geringen Sequenzidentitäten (Nagano et al., 2002), die Vielfalt unterschiedlicher Funktionen und katalysierter Reaktionsmechanismen (Anantharaman et al., 2003), sowie die Existenz von $(\beta\alpha)_8$ -barrel Proteinen ohne enzymatische Funktion (Hennig et al., 1992). Die Theorie der divergenten Evolution postuliert dagegen, dass die Grundstruktur des $(\beta\alpha)_8$ -barrel nur einmal entstanden ist und die Vielzahl der über 60 bekannten unterschiedlichen Reaktionen durch anschließende Genduplikationen und Diversifikationen entstanden ist (Gerlt und Raushel, 2003; Henn-Sax et al., 2001; Höcker et al., 2001; Sterner und Höcker, 2005; Vega et al., 2003). In den letzten Jahren haben sich die Hinweise dafür verdichtet, dass zumindest ein großer Teil der bekannten TIM-barrel Enzyme durch divergente Evolution entstanden ist. Der wichtigste ist die strikte Konservierung der Lage des aktiven Zentrums in allen bekannten Vertretern am Katalysepol (Abbildung 2). Daneben konnte mit dem Programm PSI-Blast zwischen 12 Vertretern der 23 definierten Superfamilien der $(\beta\alpha)_8$ -barrel in der SCOP-Datenbank (*structural classification of proteins*) eine signifikante Sequenzähnlichkeit nachgewiesen werden (Copley und Bork, 2000). Die durch Experimente im Labor etablierten Fremdaktivitäten von $(\beta\alpha)_8$ -barrel Reaktionen auf dem Gerüst von anderen TIM-barrel Enzymen durch wenige Aminosäureaustausche sind wohl einer der überzeugendsten Hinweise auf

divergente Evolution dieses Faltungstyps (Claren et al., 2009; Joerger et al., 2003; Jürgens et al., 2000; Leopoldseder et al., 2004; Schmidt et al., 2003).

1.3 Die Indolglycerinphosphat-Synthase

Die Indolglycerinphosphat-Synthase (IGPS, TrpC) katalysiert den 4. Schritt in der Biosynthese des Tryptophans und weist die typische Struktur eines $(\beta\alpha)_8$ -barrel Enzyms auf (Hennig et al., 2002). Die Röntgenstrukturanalyse der Enzyme aus *E. coli* (Wilmanns et al., 1992), *Sulfolobus solfataricus* (Hennig et al., 1995) und *Thermotoga maritima* (Knöchel et al., 2002) zeigte, dass TrpC N-terminal der kanonischen 8 β -Stränge und 8 α -Helices eine etwa 45 Aminosäuren lange Extension enthält, die sich seitlich am zentralen β -barrel vom Stabilitätspol zum Katalysepol vorbei streckt und dort eine Wand des aktiven Zentrums bildet (Abbildung 3).

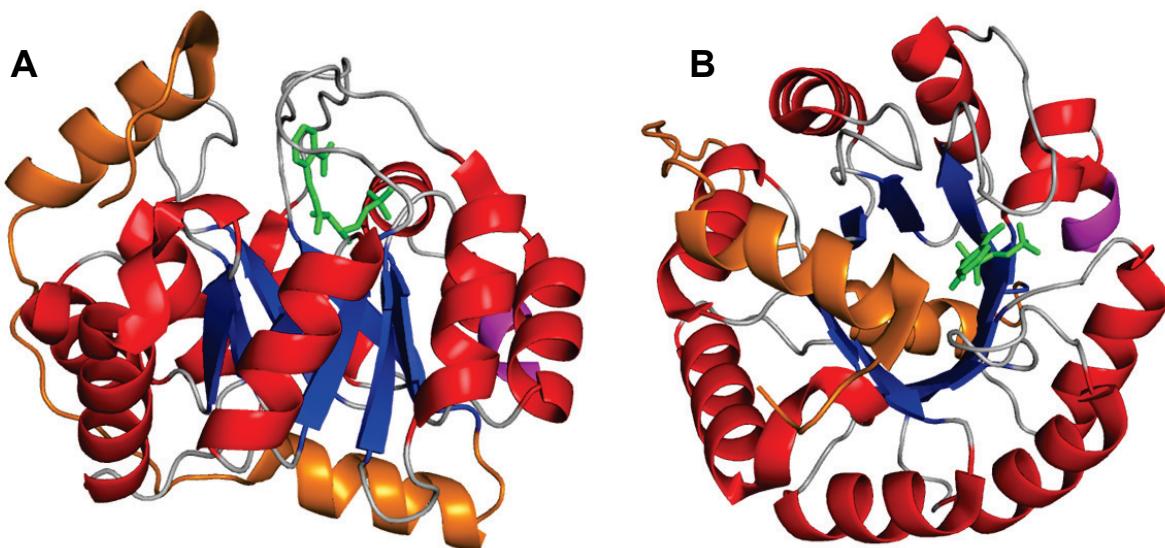


Abbildung 3: Röntgenstruktur von TrpC aus *Sulfolobus solfataricus* mit gebundenem Substrat CdRP (1LBL).

Die N-terminale Extension ist in orange, der C-Terminus ist in pink und das Substrat ist in grün hervorgehoben. A: Seitenansicht des β-Fasses; B: Aufsicht auf das aktive Zentrum;

In einigen Organismen, wie z.B. *E. coli* und *Phanerochaete chrysosporium* liegt TrpC mit anderen Enzymen der Tryptophanbiosynthese fusioniert vor, meist bildet sie jedoch ein isoliertes Monomer (Eberhard et al., 1995; Schrank et al., 1991).

Die von TrpC katalysierte irreversible Ringschlußreaktion von 1-(*o*-Carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5-phosphat (CdRP) zu Indol-3-glycerinphosphat (IGP) kann in drei Schritte (Kondensation, Dehydratisierung, Decarboxylierung) unterteilt werden und läuft folglich über zwei Intermediate ab (Hennig et al., 2002). Durch Mutationsanalyse des aktiven Zentrums von TrpC aus *E. coli* (eTrpC) (Darimont et al., 1998) und die Röntgenstrukturanalyse von TrpC aus

Sulfolobus solfataricus (sTrpC) mit gebundenem Substrat, Substratanalogon und Produkt konnten die katalytisch aktiven Reste bestimmt und ein plausibler Reaktionsmechanismus postuliert werden (Hennig et al., 2002) (Abbildung 4).

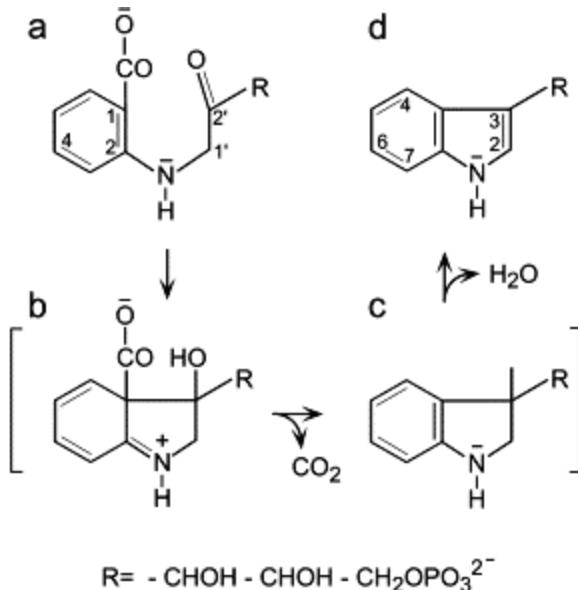


Abbildung 4: Plausibler Reaktionsmechanismus von sTrpC auf der Basis von Struktur- und Mutationsanalysen (Hennig et al., 2002).

a: Substrat CdRP; b: Intermediat I; c: Intermediat II; d: Produkt IGP

Die Seitenkette von K110 wirkt als allgemeine Säure und die Seitenkette von E159 als allgemeine Base. Neben diesen absolut essentiellen Resten gibt es in sTrpC einige Bereiche, die für die Bindung des Substrats und/oder Produktes eine wichtige Rolle spielen: die Phosphatbindestelle (K53, G212, G233, S234), die Ribulose/Triosebindestelle (E51, K53, K110, E159, N180), die Anthranilatbindetasche (W8, P57, F89, R182, L184) und die Indolbindetasche (F89, K110, F112, I133, L184) (Hennig et al., 2002). Eine ausführliche Beschreibung des Reaktionsmechanismus findet sich in 4.2.1.

1.4 *Sulfolobus solfataricus*

Sulfolobus solfataricus gehört zur Domäne der Archaeen und zum Phylum der Crenarchaeota. Als ein hyperthermophiles Archaeon wird es der Klasse der Thermoprotei zugeordnet. Man findet den Organismus hauptsächlich in heißen Quellen in Gebieten mit vulkanischer Aktivität, z. B. im Yellowstone Nationalpark, in Island oder Italien. Erstmals gefunden wurde er in einem flachen Vulkankrater, namens Solfatara in der Nähe von Neapel (Brock et al., 1972). *Sulfolobus solfataricus* wächst, wie der Name schon andeutet, in schwefelreichen, sauren,

heißen Quellen mit einem Temperaturoptimum von 75 bis 80 °C und pH-Werten zwischen 2 und 4. Bei einem cytosolischen pH von ungefähr 6,5 hält *Sulfolobus solfataricus* einen starken pH-Gradienten über die Cytoplasmamembran aufrecht (Moll und Schäfer, 1988). Der Organismus ist ein aerober Chemolithotropher, der H₂S oder S⁰ zu H₂SO₄ oxidiert und CO₂ als Kohlenstoffquelle nutzt. Er kann in Abwesenheit von S⁰ aber auch chemoorganotroph wachsen, wobei verschiedene organische Verbindungen, wie Kohlenhydrate und Peptide verstoffwechselt werden.

1.5 Enzymatische Aktivität und Stabilität von Proteinen aus hyperthermophilen Mikroorganismen

Enzyme sind hoch effiziente und spezifische Katalysatoren, welche eine Vielzahl chemischer Reaktionen beschleunigen. Enzyme müssen so konzipiert sein, dass sie in ihrer natürlichen Umgebung auf der einen Seite stabil sind, um ihre Struktur aufrecht erhalten zu können. Auf der anderen Seite müssen sie flexibel genug bleiben, um konformationelle Änderungen während des Katalyseprozesses zu ermöglichen. Enzyme thermophiler oder anderer extremophiler Organismen müssen diese beiden gegenteiligen Anforderungen zur selben Zeit erfüllen und sowohl Aktivität als auch Stabilität unter extremen Bedingungen gewährleisten (Hough und Danson, 1999; Sterner und Liebl, 2001). In Proteinen aus thermophilen Mikroorganismen wurden eine erhöhte Anzahl an Salzbrücken, eine kompaktere Struktur, die Fixierung der N- und C-Termini der Polypeptidkette und eine Erhöhung des Oligomerisierungsgrades als mögliche stabilisierende Faktoren diskutiert (Jaenicke und Bohm, 1998). Enzyme hyperthermophiler Organismen, d.h. solche mit einem Wachstumsoptimum von mindestens 80 °C, besitzen in ihrem natürlichen physiologischen Umfeld nahe des Siedepunktes von Wasser eine vergleichbare Aktivität wie ihre homologen Vertreter in mesophilen Organismen in deren Lebensraum. Entsprechend sind Enzyme aus Hyperthermophilen und Mesophilen bei ihren jeweiligen optimalen Wachstumstemperaturen katalytisch vergleichbar aktiv (Jaenicke, 2000). Bei Raumtemperatur ist die Aktivität dieser hyperthermophilen Enzyme aber oft stark verringert, wofür eine eingeschränkte konformationelle Flexibilität verantwortlich gemacht wurde (Merz et al., 2000). Allerdings gibt es natürlich vorkommende, extrem thermostabile Enzyme aus Hyperthermophilen, welche auch bei niedrigen Temperaturen katalytisch hoch aktiv sind (Henn-Sax et al., 2002; Sterner et al., 1996). Somit schließen sich extreme Thermostabilität und gleichzeitige hohe Aktivität bei niedrigen Temperaturen nicht generell aus. Bei einer

Erhöhung der Temperatur um 10 °C verdoppelt sich etwa die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion (Harcourt, 1867). Ein Plot des Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten und des reziproken Werts der absoluten Temperatur (Arrhenius, 1889) zeigt normalerweise einen linearen Zusammenhang. Dies bedeutet, dass alle Reaktionen, sowohl enzymatische als auch spontane, in thermophilen Organismen schneller ablaufen als bei mesophilen Organismen. Dennoch sind für einige Enzyme aus hyperthermophilen Organismen auch diskontinuierliche Arrhenius-Diagramme bekannt (Fabry und Hensel, 1987; Hensel et al., 1987; Lakatos et al., 1978). Damit erreichen diese Enzyme vermutlich durch eine Änderung des ratenlimitierenden Schrittes bei hohen Temperaturen nicht die durch Messungen bei niedrigen Temperaturen zu erwarteten Umsatzgeschwindigkeiten.

1.6 Von der Sequenz über die Struktur zum Reaktionsmechanismus

1.6.1 Informationsgehalt von Aminosäuresequenzen

Generell determiniert die Aminosäuresequenz eines Proteins dessen Faltung. Allerdings ist es nicht möglich, aus einer einzelnen Sequenz Informationen zur Bedeutung einzelner Positionen abzuleiten. Sind jedoch die Sequenzen vieler, zueinander homologer Proteine bekannt, so kann ein multiples Sequenzalignment (MSA) berechnet werden. In einem MSA werden die Sequenzen in optimaler Weise zueinander ausgerichtet, so dass jede Spalte die Besetzung einer Proteinposition angibt. Die meisten sequenzbasierten Alignmentverfahren bewerten die Bedeutung einzelner Positionen und Reste für die Struktur und Funktion eines Proteins nach dem Grad der Konserviertheit (Fischer et al., 2008). Gängig ist zudem die Berechnung so genannter Sequenzlogos (Schneider und Stephens, 1990). Häufig ist die spezifische Funktion nahe verwandter Proteine durch einige wenige Residuen determiniert. Kombiniert man MSAs solcher Proteine miteinander, so fallen Positionen auf, die innerhalb der einzelnen Gruppen konserviert sind, im Vergleich der Gruppen aber unterschiedlich besetzt sind. Derartige Muster deuten auf Positionen hin, die für die spezifische Aktivität verantwortlich sind. So bestimmt zum Beispiel das Werkzeug SDSpred mit Hilfe von MSAs Residuen in Proteinfamilien, die mit biochemisch ähnlichen (jedoch nicht völlig identischen) Liganden interagieren (Kalinina et al., 2004).

Wie oben erwähnt, ist es relativ einfach, stark konservierte Positionen zu identifizieren. Es lassen sich aus MSAs aber mit einfachen Methoden nicht direkt

diejenigen Aminosäuren ermitteln, deren Bedeutung von der Zusammensetzung ihrer Umgebung abhängt. Darunter fallen Reste, die stabilisierende Kontakte mit benachbarten Seitenketten ausbilden, oder die genaue Ausrichtung des aktiven Zentrums bzw. die Signalweiterleitung bei Allosterieeffekten sicher stellen. Aus solchen Gründen kann es zu gegenseitigen Abhängigkeiten in den Aminosäurehäufigkeiten benachbarter Positionen kommen. Sind diese Effekte hinreichend ausgeprägt, so sollte die gemeinsame Evolution der entsprechenden Positionen durch bioinformatische Methoden der Korrelationsanalyse sichtbar gemacht werden können (Merkl R, 2008). Für derartige Untersuchungen sind MSAs erforderlich, die mehr als 125 Sequenzen enthalten (Martin et al., 2005). Aufgrund der großen Anzahl abgeschlossener Genomprojekte ist dieses Kriterium für praktisch alle mikrobiellen Proteine erfüllt.

1.6.2 Analyse der Tertiärstrukturen von Proteinen

Dreidimensionale Strukturen von Proteinen sind heutzutage für Enzymanalysen unerlässlich. Strukturen dienen als direkte dreidimensionale Modelle, aus denen sich z.B. Informationen über den Bindungs- und Katalysemechanismus von Enzymen ableiten lassen (Brew und Nagase, 2010; Emsley et al., 2010; Simonovic und Steitz, 2009). Besonders informativ sind sie in Gegenwart von gebundenem Substrat, Intermediat oder Produkt einer Reaktion. Falls diese fehlen, können bioinformatische Algorithmen zur Modellierung von Liganden in Strukturen verwendet werden (Jorgensen, 2009). Durch Superpositionierung (Überlagerung) bekannter Röntgenstrukturen können zwei verwandte Proteine direkt miteinander verglichen werden, so dass Gemeinsamkeiten und Unterschiede sowohl in der Struktur als auch auf Aminosäureebene direkt auffallen (Cygler et al., 1993; Nagano et al., 2002). Bei der computergestützten Superpositionierung bewerten Programme die Güte der Überlagerung nach unterschiedlichen Kriterien, wie Ähnlichkeiten von intramolekularen Residuen-Kontakten (Holm und Sander, 1993) oder es werden mehrere Parameter zur Bewertung der Übereinstimmungen zwischen Residuenpaaren berechnet (Levitt und Gerstein, 1998).

Leider ist die *de novo* Vorhersage der Proteinstruktur aus der Sequenz unter Verwendung von moleküldynamischen Simulationen ein bisher nicht gelöstes Problem der Bioinformatik. Durch die Vielzahl an bekannten Röntgenkristallstrukturen ist es dennoch mit Homologiemodellierung möglich aus einer bekannten Aminosäuresequenz ein zuverlässiges Modell für die unbekannte

Tertiärstruktur des Proteins abzuleiten. Homologiemodellierung beruht auf dem Prinzip, dass Proteine mit ähnlichen Sequenzen auch gut in ihrer Struktur übereinstimmen, wobei Informationen, wie Atomabstände, Bindungslängen, Bindungswinkel etc., aus bereits bekannten Strukturen verwendet werden, um die unbekannte Proteinstruktur anhand ihrer Sequenz vorauszusagen (Wiltgen und Tilz, 2009).

1.6.3 Kinetische Untersuchungen zum enzymatischen Reaktionsmechanismus

Enzyme sind Biokatalysatoren und steigern die Geschwindigkeiten metabolischer Reaktionen um bis zu 17 Größenordnungen (Wood et al., 2010). Während der enzymkatalysierten Reaktion kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Substrat und funktionellen Gruppen, wie den Seitenketten der Aminosäuren, Metall-Ionen und Coenzymen, wodurch der Übergangszustand stabilisiert und die Aktivierungsenergie herab gesetzt wird. Durch *steady-state* Analysen lassen sich die katalytischen Eigenschaften eines Enzyms mit wenigen Parametern wie der Wechselzahl k_{cat} , der Michaeliskonstante K_M und der daraus resultierenden katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M beschreiben. Diese Parameter spiegeln aber bei weitem nicht den vollständigen Reaktionsmechanismus wider, der nur mit Hilfe von *pre-steady-state* Messungen aufgeklärt werden kann. Diese liefern Informationen über die Anzahl und Art von Reaktionsintermediaten, sowie mikroskopische Ratenkonstanten der einzelnen Reaktionsschritte (Biro et al., 2010). Diese Schritte treten oft innerhalb weniger Millisekunden auf und können direkt durch *Stopped-flow* oder chemische *Quenched-flow* Methoden gemessen werden. Durch die Verfolgung der Reaktion mittels eines optischen Signals, meist der Fluoreszenz, dienen *Stopped-flow* Apparate als leistungsfähige und leicht zugängliche Arbeitsgeräte, die enzymatisch katalysierte Reaktionen von der Substratbindung über chemische Schritte bis hin zur Bildung und Freisetzung des Produktes aufzeichnen (Johnson, 1998).

Durch die zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzintensität von intrinsischen Tryptophanen, eingebauten unnatürlichen Aminosäuren (Mendes et al., 2010) und an Aminosäuren gekoppelte Farbstoffe (Hammes-Schiffer und Benkovic, 2006) können mit den oben genannten Methoden auch Bewegungen des Enzyms während der Bindung oder Katalyse detektiert und anschließend bekannten Schritten des Reaktionsmechanismus zugeordnet werden.

1.6.4 Modellerstellung von Reaktionsmechanismen

Die kombinierte Analyse von Sequenzen, Strukturen und kinetischen Daten eines Enzyms bildet die Grundlage für die Formulierung eines Reaktionsmechanismus. Durch die Identifizierung essentieller Reste über Mutationsstudien und Strukturanalysen in Gegenwart von Liganden kann meist eine plausible Vorstellung über den Ablauf der chemischen Reaktion und das Auftreten von möglichen Intermediaten entwickelt werden. Die Ermittlung der mikroskopischen Ratenkonstanten mit denen Substrate gebunden, Intermediate gebildet und Produkte freigesetzt werden ermöglicht den Schritt von einer qualitativen zu einer quantitativen Analyse. Oftmals jedoch kann die Fülle isoliert gewonnener Daten mit mehreren plausiblen Reaktionsmechanismen in Einklang gebracht werden. Dann müssen durch globale Analysen und Modellierungen postulierte Modelle bestätigt bzw. ausgeschlossen werden. Prinzipiell kann ein Reaktionsmechanismus umso präziser formuliert werden, je mehr unterschiedliche Informationen zu einem Enzym vorliegen.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Indolglycerinphosphat-Synthase aus *Sulfolobus solfataricus* (sTrpC) durch Mutationsanalysen des aktiven Zentrums und enzymkinetischen Messungen umfassend charakterisiert. Obwohl das Enzym bereits vor Beginn der Arbeit recht gut untersucht worden war, blieben bis dahin einige wichtige Fragen ungelöst.

Unter anderem besitzt sTrpC im Vergleich zu TrpC aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* (tmTrpC) eine niedrigere Stabilität, eine wesentlich schlechtere katalytische Effizienz und eine stärker ausgeprägte Produktinhibition, wobei die für die Unterschiede verantwortlichen Aminosäuren nicht bekannt waren. Durch die Superpositionierung der Strukturen von sTrpC und tmTrpC sollten die entsprechenden Reste in sTrpC identifiziert, gegen die aus tmTrpC ausgetauscht und die resultierenden Mutanten charakterisiert werden.

Mit einem neu entwickelten bioinformatischen Algorithmus sollten zudem auffällige Positionen in der TrpC-Familie identifiziert und durch Mutagenese auf ihre Bedeutung für die Funktion und Stabilität von sTrpC untersucht werden.

Um ein besseres Verständnis für den komplexen Reaktionsmechanismus von sTrpC zu erlangen, sollten mittels *pre-steady-state* Kinetiken Bindungs- und Umsatzstudien durchgeführt werden, um die Ratenkonstanten der einzelnen Reaktionsschritte zu bestimmen und ein schlüssiges Reaktionsmodell aufzustellen.

Zusätzlich sollten in Kooperation mit Prof. Dr. Nina Goodey (Montclair State Universität, USA) Bewegungen in sTrpC durch Fluoreszenzmarkierungen und FRET-Messungen analysiert werden.

2 Material

2.1 Bakterienstämme

Klonierungsstämme

E. coli DH5 α (Hanahan, 1983)

F $^-$, endA1, hsdR17 (r $_k^-$ m $_k^-$), supE44, thi1, recA1, gyrA (Nal r), relA1, Δ(lacZYA-argF)
U169, Φ80, lacZΔM15

E. coli NEB5 α (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt am Main)

fhuA2, Δ(argF-lacZ)U169, phoA, glnV44, Φ80, Δ(lacZ)M15, gyrA96, recA1, relA1,
endA1, thi-1, hsdR17

Bei diesen Zellen handelt es sich um ein *E. coli* DH5 α Derivat. Durch die Deletion des Gens fhuA2 fehlt der Eisen-Hydroxamat-Aufnahme-Rezeptor auf der Zelloberfläche, was verhindert, dass der Bakteriophage T1, der an diesen Rezeptor bindet, die Zellen befällt. Somit sind diese Zellen T1-resistant.

E. coli NEBTurbo (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt am Main)

F $^+$, proA $^+$ B $^+$, lacI q , Δ(lacZ)M15/fhuA2, Δ(lac-proAB), glnV, gal R(zgb-210::Tn10), Tet s ,
endA1, thi-1, Δ(hsdS-mcrB)5

Die T1-Resistenz von *E. coli* NEB5 α ist mit einem langsameren Zellwachstum verbunden. Dieser Nachteil wird von *E. coli* NEBTurbo Zellen kompensiert, wodurch sie innerhalb von 8 h bei Inkubation bei 37°C sichtbare Kolonien bilden können.

Expressionsstämme

E. coli BL21(DE3) (Studier und Moffatt, 1986)

B F $^-$ ompT hsdS (r $_B^-$ m $_B^-$) dcm $^+$ gal λ(DE3)

Diese Zellen tragen auf ihrem Chromosom das Gen für die T7 RNA-Polymerase, die zur Genexpression im pET-System verwendet wird.

E. coli BL21-CodonPlus(DE3) (STRATAGENE, La Jolla, USA)

B F $^-$ ompT hsdS (r $_B^-$ m $_B^-$) dcm $^+$ Tet r gal λ(DE3) endA Hte

- RP-Stamm: [argU proL Cam r]

- RIL-Stamm: [argU ileY leuW Cam r]

- RIPL-Stamm: [*argU proL Cam^r*] [*argU ileY leuW Strep/Spec^r*] BL21 CodonPlus (DE3) RP Zellen enthalten auf einem pACYC-basierten Plasmid Gene für die tRNAs *argU* und *proL*. Dieser Expressionsstamm erlaubt dadurch die effiziente Expression von Genen, die die in *E. coli* seltenen Codone AGA und AGG für Arginin und CCC für Prolin enthalten. BL21 CodonPlus (DE3) RIL Zellen enthalten auf einem pACYC-basierten Plasmid Gene für die tRNAs *argU*, *ileY* und *leuW*. Dieser Expressionsstamm erlaubt dadurch die effiziente Expression von Genen, die die in *E. coli* seltenen Codone AGA und AGG für Arginin, AUA für Isoleucin und CUA für Leucin enthalten. BL21 CodonPlus (DE3) RIPL Zellen enthalten auf einem pACYC-basierten Plasmid Gene für die tRNAs *argU* und *proL* sowie auf dem Plasmid pSC101 Gene für die tRNAs *argU*, *ileY* und *leuW*. Dieser Expressionsstamm erlaubt dadurch die effiziente Expression von Genen, die die in *E. coli* seltenen Codone, welche für die RP- und RIL-Stämme bereits genannt wurden, enthalten. Das pACYC-Plasmid enthält zusätzlich das Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase, die Resistenz gegen Chloramphenicol vermittelt. Das pSC101-Plasmid vermittelt zusätzlich Resistenz gegen Streptomycin und Spectinomycin.

***E. coli T7 Express* (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt am Main)**

fhuA2 lacZ::T7gene1 lon ompT gal sulA11 dcm R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2

Bei diesen Zellen handelt es sich um ein *E. coli* BL21(DE3) Derivat. Durch die Deletion des Gens *fhuA2* fehlt der Eisen-Hydroxamat-Aufnahme-Rezeptor, wodurch diese Zellen resistent gegen den Bacteriophage T1 sind. Zusätzlich enthalten die Zellen eine Tetrazyklinresistenz.

***E. coli T7 Express Rosetta* (Lehrstuhl Sterner)**

fhuA2 lacZ::T7gene1 lon ompT gal sulA11 dcm R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [argU argW glyT ileX, leuW metT proL thrT thrU tyrU Cam^r]

Diese Expressionszellen wurden am Lehrstuhl Biochemie II hergestellt. Es handelt sich um *E. coli* T7 Express Zellen, die zusätzlich das pRARE Plasmid aus *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS NOVAGEN, Darmstadt) enthalten, wodurch die Expression von Genen mit in *E. coli* seltenen Codonen (AGA, AGG, AUA, CCC, CUA, GGA; welche für die Aminosäuren Arginin, Isoleucin, Threonin, Leucin und Glycin codieren) in

einem T1-resistenten *E. coli* Stamm ermöglicht wird. Neben der Tetrazyklinresistenz erhalten die Zellen durch das pRARE-Plasmid zusätzlich eine Chloramphenicolresistenz.

***E. coli* Rosetta 2 (Novagen)**

F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm pRARE2 (Cam^R)*

Rosetta 2 sind Expressionszellen auf der Grundlage von BL21 und wurden entwickelt um die Expression von eukaryotischen Proteinen, welche seltene Codone enthalten, in *E. coli* zu steigern. Dieser Stamm besitzt plasmidcodiert die Gene für tRNAs für sieben seltene Codone (AGA, AGG, AUA, CCC, CUA, GGA, CGG; welche für die Aminosäuren Arginin, Isoleucin, Threonin, Leucin und Glycin codieren). Auf dem Plasmid befindet sich ebenfalls das Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase, wodurch eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol gegeben ist.

2.2 pET-Vektoren für die Expression von Proteinen in *E. coli*

Gene, die in die multiple Klonierungsstelle (MCS) von pET-Vektoren (NOVAGEN, plasmid for expression by T7 RNA Polymerase) eingefügt wurden, werden durch die RNA-Polymerase des Phagen T7 (Studier et al., 1990) transkribiert. Die Expression der Gene erfolgt in speziellen *E. coli* Stämmen, die eine chromosomal Kopie der T7 RNA-Polymerase besitzen. Die Expression des T7 RNA-Polymerasegens sowie des in die MCS inserierten Gens erfolgt unter der Kontrolle des lacUV5-Promotor-Operators und wird durch die Zugabe von Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Das zur Unterdrückung der Expression erforderliche Gen für den lac-Repressor (*lacI*) liegt auf dem Plasmid und wird konstitutiv exprimiert.

pET21a(+)

Der pET21a(+-)Vektor ist so konstruiert, dass unmittelbar stromabwärts der MCS sechs Histidin-Codone liegen. Das hergestellte Protein trägt dadurch C-terminal einen (His)₆-Tag, der eine Aufreinigung durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie ermöglicht.

Nach Transformationen mit dem pET21a(+-)Vektor kann mittels der enthaltenen Ampicillin-Resistenz (*bla*) auf *E. coli* Zellen selektiert werden, die das Plasmid aufgenommen haben.

2.3 Oligodesoxyribonukleotide

Bei endständigen Amplifikationsprimern sind die genannten Restriktionsschnittstellen unterstrichen. Bei Mutationsprimern sind diejenigen Basen, die von der Originalsequenz abweichen, fett gedruckt. Wurden Primer von Dritten zur Verfügung gestellt, erfolgt die Angabe der Person bzw. des Herstellers in Klammern.

2.3.1 Vektorspezifische Amplifikations- und Sequenzierungsprimer

5'T7 Promotor

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

3'T7 Terminator

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

2.3.2 Amplifikationsprimer

5' sstrpC NheI (Birgit Schneider)

5'-CTA GCT AGC ATG CCA CGT TAT-3'

Primer ssTrpC (Birgit Schneider)

5'-CCG CTC GAG TAG TAT AAA TTC-3'

2.3.3 Mutationsprimer Superpositionierung

5'strpC W8A

5'-CTT AAA GGA **GCG** CTT AAA GAC-3'

3'strpC W8A

5'-GTC TTT AAG **CGC** TCC TTT AAG-3'

5'strpC W8D

5'-CTT AAA GGA **GAC** CTT AAA GAC-3'

3'strpC W8D

5'-GTC TTT AAG **GTC** TCC TTT AAG-3'

5'sTrpC R54K+K55A

5'-GAA TAT AAA **AAG GCA** TCT CCC-3'

3'sTrpC R54K+K55A

5'-GGG AGA **TGC CTT** TTT ATA TTC-3'

5'sTrpC L187F

5'-CTA GAA ACC **TTT** GAG ATA AAT-3'

3'sTrpC L187F

5'-ATT TAT CTC **AAA** GGT TTC TAG-3'

5'strpC-L187W richtig

5'-CTA GAA ACC **TGG** GAG ATA AAT AAG-3'

3'strupC-L187W richtig

5'-CTT ATT TAT CTC **CCA** GGT TTC TAG-3'

5'sTrpC F230V

5'-GTT AAC GCT **GTC** CTA ATC GG-3'

3'sTrpC F230V

5'-CCG ATT AGG **ACA** GCG TTA AC-3'

2.3.4 Mutationsprimer H2r

5'strupC R54K+R64F

5'-AAA **AAG** AAA TCT CCC TCT GGA TTA GAT GTT GAA **TTC** GAT CCA-3'

3'strupC R54K+R64F

5'-TGG ATC **GAA** TTC AAC ATC TAA TCC AGA GGG AGA TTT **CTT** TTT-3'

5'strupC R54A-R64A

5'-AAA **GCC** AAA TCT CCC TCT GGA TTA GAT GTT GAA **GCC** GAT CCA-3'

3'strupC R54A-R64A

5'-TGG ATC **GGC** TTC AAC ATC TAA TCC AGA GGG AGA TTT **GGC** TTT-3'

5'strupC I133E

5'-GAT ACT GTA TTG CTA **GAA** GTC AAA ATA-3'

3'strupC I133E

5'-GTA TTT TGA **CTT** CTA GCA ATA GAG TAT C-3'

5'strupC I133A

5'-GAT ACT GTA TTG CTA **GCA** GTC AAA ATA C-3'

3'strupC I133A

5'-GTA TTT TGA CTG CTA **GCA** ATA CAG TATA C-3'

5'strupC I133D

5'-GTA TTG CTA **GAC** GTC AAA ATA C-3'

3'strupC I133D

5'-GTA TTT TGA **CGT** CTA GCA ATA C-3'

5'strupC L142Y

5'-CTA ACT GAA AGA GAA **TAT** GAG AGT TTA TTG-3'

3'strupC L142Y

5'-CAA TAA ACT CTC **ATA** TTC TCT TTC AGT TAG-3'

5'strupC L142A

5'-CTA ACT GAA AGA GAA **GCT** GAG AGT TTA TTG-3'

3'strupC L142A

5'-CAA TAA ACT CTC **AGC** TTC TGT TTC AGT TAG-3'

5'strupC-S117Y

5'-GTT AAG GAA **TAC** CAA ATT GAT G-3'

3'strupC-S117Y

5'-CAT CAA TTT **GGT** ATT CCT TAA C-3'

5'strupC-S117K

5'-GTT AAG GAA **AAA** CAA ATT GAT G-3'

3'strupC-S117K

5'-CAT CAA TTT **GTT** TTT CCT TAA C-3'

5'strupC-S181N

5'-GGA ATT AAT **AAT** AGA GAT CTA-3'

3'strupC-S181N

5'-CTA GAT CTC **TAT** TAT TAA TTC C-3'

5'strupC-S181A richtig

5'-GGA ATT AAT **GCA** AGA GAT CTA G-3'

3'strupC-S181A richtig

5'-C TAG ATC TCT **TGC** ATT AAT TCC-3'

2.3.5 Mutationsprimer FRET-Labeling

5'-strupC-R18C

5'-ATT ATC TTT **ATG** CAG GCC CTC A-3'

3'-strupC-R18C

5'-TGA GGG CCT **GCA** TAA AGA TAA T-3'

5'-strupC-D61C

5'-TCT GGA TTA **TGT** GTT GAA AGG-3'

3'-strupC-D61C

5'-CCT TTC AAC **ACA** TAA TCC AGA-3'

5'-strupC-T186C

5'-GAT CTA GAA **TGC** CTT GAG ATA-3'

3'-strupC-T186C

5'-TAT CTC AAG **GCA** TTC TAG ATC-3'

5'-strupC-G212E

5'-GCA GAA AGT **GAA** ATT TCT GAG AGG-3'

3'-strupC-G212E

5'-CCT CTC AGA AAT **TTC** ACT TTC TGC-3'

3'-strpC-F246S-Xhol

5'-CCG CTC GAG TAG TAT **ACT** TTC TTT-3'

2.4 Längenstandards

DNA-Längenstandards

Smart Ladder (EUROGENTEC)

Polynukleotidgrößen [bp]: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200

GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot)

Polynukleotidgrößen [bp]: 20000, 10000, 7000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 75

Proteinlängenstandard

Unstained Protein Low Molecular Weight Marker (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot) für SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid).

Proteingrößen [kDa]: 116,0 (β -Galactosidase), 66,2 (Rinder Serum Albumin), 45,0 (Ovalbumin), 35,0 (Lactat-Dehydrogenase), 25,0 (REase Bsp98I), 18,4 (β -Lactoglobulin), 14,4 (Lysozyme)

2.5 Enzyme

GoTaq DNA-Polymerase	PROMEGA, Mannheim
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a. M.
Pwo DNA-Polymerase	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a. M.
T4-DNA-Ligase	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot

2.6 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien besaßen den höchstmöglichen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen:

AMERSHAM PHARMACIA Biotech	Freiburg
APPLICHEM GmbH	Darmstadt
BIO101 Inc.	Carlsbad, USA
BIORAD LABORATORIES	München
BIOZYM	Hess. Oldendorf
BODE CHEMIE	Hamburg
BOEHRINGER MANNHEIM	Mannheim

CARL ROTH GMBH & Co. KG	Karlsruhe
DIFCO	Dreieich
FLUKA	Neu-Ulm
GERBU Biotechnik GmbH	Gailberg
GIBCO/BRL	Eggestein
MERCK	Darmstadt
MP BIOCHEMICALS	Illkirch, Frankreich
NATIONAL DIAGNOSTICS	Simerville, NJ, USA
OXOID	Wesel
RIEDEL-DE HAEN	Seelze
ROCHE DIAGNOSTICS	Mannheim
SERVA	Heidelberg
SIGMA-ALDRICH	Deisenhofen
VWR	Leuven, Belgien

2.7 Kits

GeneJET Plasmid Miniprep Kit	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
Nucleobond PC100/500 <i>DNA-Extraction Kit</i>	MACHEREY-NAGEL, Düren
Nucleospin Extract II	MACHEREY-NAGEL, Düren
QIAprep spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAEX II Gelextraktions Kit	QIAGEN, Hilden

2.8 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschläuch: Visking, Typ 27/32, 14 kDa ROTH GmbH + Co, Karlsruhe

Einwegspritzen Omnifix 2 ml, 5 ml und 60 ml BRAUN Biotech, Melsungen

Faltenfilter MACHEREY-NAGEL, Düren

Konzentratoren:

Amicon Ultra 4 bzw. 15 (mwco: 10 kDa) MILLIPORE, Eschborn

Roti-Spin MINI-10 ROTH GmbH + Co, Karlsruhe

Kunststoffküvetten:

0,5 ml Mikroküvetten SARSTEDT, Nümbrecht

UVette EPPENDORF, Wesseling-Berzdorf

Kunststoffrörchen 15 ml, 50 ml SARSTEDT, Nümbrecht

Latex-Handschuhe Sempermed SEMPERIT, Wien, Österreich

Membranfilter ME24 Ø47 mm; 0,2 µm SCHLEICHER&SCHUELL, Dassel

Nitrocellulosefilter (Ø13 mm) MILLIPORE, Eschborn

NAP5, NAP10 und NAP25 Säulen	GE HEALTHCARE, München
Nitril Untersuchungshandschuhe	VWR, Leuven, Belgien
Parafilm „M“ Laboratory Film	PECHINEY, Plastic Packaging, Menasha, USA
Pasteurpipetten	HIRSCHMANN, Ebermannstadt
PCR-Gefäße 0,2 ml	PEQLAB, Erlangen
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	SARSTEDT, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	ROTH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel 2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Spritzenfilter Porengröße 0,2 µm	RENNER GmbH, Daunstadt
Spritzenfilter Nylon 0,22 µm A0641	ROTH, Karlsruhe
Filterpapier 3 MM	WHATMAN, Maidstone, GB

2.9 Geräte

Autoklaven	
München 25	MMM, München
VE-40	SYSTECH GmbH, Wettenberg
Brutschränke	BINDER GmbH, Tuttlingen
Chromatographieanlagen:	
1200 HPLC System	AGILENT, Böblingen
ÄKTA basic better	GE HEALTHCARE, München
ÄKTA purifier 10	GE HEALTHCARE, München
verwendete Säulen:	
HisTrap FF Crude 5 ml	GE HEALTHCARE, München
Superdex 75 HR 10/300 GL	GE HEALTHCARE, München
Hipak C18 Säule, 250 x 8 mm; 5 µm Partikelvolumen	BISCHOFF, Leonberg
Vorsäule C18, 33 x 8mm; 5 µm Partikelvolumen	BISCHOFF, Leonberg
Nucleosil C18 Säule, 250 x 3 mm; 5 µm Partikelvolumen	BISCHOFF, Leonberg
Circular Dichroismus Spektralpolarimeter J-815	JASCO GmbH, Groß Umstadt
Computer	DELL Optiplex Systems
Fluoreszenz-Spektrometer Cary Eclipse	VARIAN, Darmstadt

Gasbrenner Gasprofi 2SCS	WLD Tec GmbH, Göttingen
Gefrierschrank -80 °C	MDF-U72V, SANYO, Tokyo, Japan
Gefrierschrank -20 °C	LIEBHERR, Nussbaumen
Gefriertrockungsanlage Lyovac GT2	LEYBOLD-HERAEUS, Hürth
Gelelektrophoresekammern:	
Agarose-Elektrophorese-Apparatur	HOEFER Pharmacia Biotech, USA
SDS-Elektrophoresekammer	
Mighty Small II	HOEFER Pharmacia Biotech, USA
Multi Gel Caster Gelgießstand	GE HEALTHCARE, München
Glaspipetten & Glaswaren	SCHOTT, Mainz
	FISCHER SCIENTIFIC, Schwerte
	NOVOGLAS, Bern, Schweiz
Hamilton Mikroliterspritze, 25 µl	HAMILTON, Bansduz, Schweiz
Heizblock-Thermostat HBT-2 131	HLC, Bovenden
Inkubationsschüttler:	
GFL 3033	GFL, Burgwedel
Certomat H	BRAUN Biotech, Melsungen
Certomat BS-1	BRAUN Biotech, Melsungen
Magnetrührer:	
MR0, MR2000	HEIDOLPH, Kelheim
MR1, MR3001 (beheizbar)	HEIDOLPH, Kelheim
Microliterpipetten: Research 2, 10, 100, 1000	EPPENDORF, Hamburg
Mikrowelle HMT 842C	BOSCH, Nürnberg
Multi-Doc-It Digital Imaging System	UVP Inc., USA
Netzgeräte:	
Power Supply EPS 301	GE HEALTHCARE, München
Power Pack P25	BIOMETRA, Göttingen
PCR-Geräte:	
Mastercycler personal	EPPENDORF, Hamburg
Mastercycler gradients	EPPENDORF, Hamburg
Peristaltikpumpe Miniplus 2	GILSON Medical Electronics, Frankreich
pH-Meter inolab Level1	INOLAB, Weilheim
Pipettus-accu	HIRSCHMANN, Eberstadt
Quarzküvetten:	

101-QS (Schichtdicke 10 mm)	HELLMA GmbH & Co. KG, Müllheim
105-QS (Schichtdicke 10 mm)	HELLMA GmbH & Co. KG, Müllheim
Temperierbare Rundküvette, 0,5 cm Schichtdicke, Typ 65	STARNA, Pfungstadt
0,02 cm Rundküvette, Typ 31/B	STARNA, Pfungstadt
Rotationsverdampfer Laborota 4000	HEIDOLPH, Schwabach
Schütteltisch Rocking Platform	BIOMETRA, Göttingen
<i>Stopped-flow</i> SX20	APPLIED PHOTOPHYSICS
Ultraschallgerät Branson Sonifier 250D	HEINEMANN, Schwäbisch Gmünd
UV-Leuchttisch Reprostar	CAMAG Chemie Erzeugnisse, Berlin
UV-Vis Spektralphotometer Cary 100 Bio	VARIAN, Darmstadt
UV-Vis Biophotometer	EPPENDORF, Hamburg
Vakuumpumpe ME 2C	VACUUMBRAND, Wertheim
Vortex Genie 2	SCIENTIFIC IND., Bohemia, USA
Waagen:	
MC1	SARTORIUS, Göttingen
SI-114	DENVER INSTRUMENT, Göttingen
Wasserbad 1003	GFL, Burgwedel
Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage	MILLIPORE, Eschborn
Zentrifugen:	
Centrifuge 5810R	EPPENDORF, Hamburg
Centrifuge 5415D	EPPENDORF, Hamburg
Centrifuge 5415R	EPPENDORF, Hamburg
Sorvall RC 2B, 5C plus mit SS34- bzw. GS3-Rotoren	DU PONT Instruments, Bad Homburg

2.10 Nährmedien für *E. coli*

Zur Sterilisation wurden die Medien für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Bei Selektivmedien wurden die entsprechenden Antibiotika nachträglich, nach Abkühlen der Medien auf ca. 60 °C, in Form von sterilfiltrierten, 1000-fach konzentrierten Stammlösungen zugegeben.

Luria-Bertani-(LB)-Medium

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

LB-Agar

LB-Medium plus 1,5 % (w/v) Bacto-Agar

Betain-Sorbitol Rich Medium

1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, 2 % (v/v) Glycerin, 2,5 mM Betain, 500 mM Sorbitol; nach dem Autoklavieren wurden pro Liter 50 ml 1 M K₂HPO₄, 50 ml 20 % (w/v) Glucose und 10 ml 1 M MgCl₂ (jeweils steril filtriert) zugegeben.

SOB-Medium (Sambrook, 1989)

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,05 % (w/v) NaCl, 2,0 % (w/v) Trypton; nach dem Autoklavieren wurden 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂ und 2,5 mM KCl (jeweils steril filtriert) hinzugefügt.

SOC-Medium

SOB-Medium plus 20 mM Glucose (steril filtriert) nach dem Autoklavieren.

SOC-Agar

SOC-Medium plus 1,5 % (w/v) Bacto-Agar.

2.11 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Puffer steril filtriert und bei Raumtemperatur gelagert. Es wurde MILLIPORE bzw. bidestilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet.

2.11.1 Arbeiten mit *E. coli*

Antibiotika

Die langfristige Lagerung der gelösten Antibiotika erfolgte nach Sterilfiltrierung bei -20 °C, die kurzfristige Lagerung bei 4 °C.

Ampicillin-Stammlösung (1000×)

150 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser gelöst und steril filtriert.

Chloramphenicol-Stammlösung (1000×)

30 mg/ml Chloramphenicol in 100 % EtOH gelöst und steril filtriert.

Tetrazyklin-Stammlösung (1000×)

12,5 mg/ml Tetrazyklin in 100 % EtOH gelöst und steril filtriert.

CaCl₂

1 M CaCl₂ in Wasser gelöst, steril filtriert und bei RT gelagert.

Glucose

20 % (w/v) Glucose in Wasser gelöst, steril filtriert und bei RT gelagert.

IPTG-Stammlösung

0,5 M IPTG in Wasser gelöst, steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

TFBI-Puffer

100 mM KCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerol.

Die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden bei 4 °C gelagert und der Puffer (100 ml) direkt vor der Verwendung angesetzt.

TFBII-Puffer

100 mM Tris/HCl, pH 7,0, 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂, 15 % Glycerol.

Die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden bei 4 °C gelagert und der Puffer (10 ml) direkt vor der Verwendung angesetzt.

2.11.2 Agarosegelektrophorese

Agarose (1%)

5 g Agarose wurden in 500 ml 0,5 x TBE gelöst, aufgekocht und bei 60 °C gelagert.

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid (EtBr)

TBE (5x)

445 mM Borsäure, 12,5 mM EDTA, 445 mM Tris (resultierender pH-Wert: 8,15)

2.11.3 Polyacrylamidgelektrophorese

Ammoniumpersulfat (APS)-Stammlösung (10%)

10 % (w/v) APS in Wasser gelöst, steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

Coomassie Färbelösung

0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 und R250, 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig, filtriert, bei RT lichtgeschützt gelagert.

SDS-PAGE Trengelpuffer

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

SDS-PAGE Sammelgelpuffer

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

SDS-PAGE Laufpuffer (resultierender pH-Wert: 8,5)

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

SDS-PAGE Probenpuffer (2x):

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

2.12 Software

Bioedit V.7.0.9	IBIS BIOSCIENCES, Tom Hall
Cary Eclipse Version 1.1 (175)	VARIAN Australia Pty. Ltd. 2002
Cary Win UV Version 3.0 (182)	VARIAN Australia Pty. Ltd. 2002
Chemstation B.04.01	AGILENT
Corel Draw Version 14	COREL Corp.
Deep View Swiss PDB Version 3.7	Guex & Peitsch 1997
Dynafit 3	BioKin Ltd, Watertown, USA
Endnote Version 9	WINTERTREE Software Inc.
Pov Ray Version 3.1g	POV-Team
Pro-Data Viewer	APPLIED PHOTOPHYSICS
ProtParam	www.expasy.ch/tools/protparam.html
PyMOL™ 0.99rc6	DELANO SCIENTIFIC LCC.
SigmaPlot 8.0/10.0/11.0	SPSS INC.

3 Methoden

3.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Glaswaren und hitzestabile Verbrauchsmaterialien, wie z. B. Pipettenspitzen, wurden ebenso autoklaviert und anschließend bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet. Hitzelabile Lösungen wurden in Stammlösungen angesetzt und, je nach Volumen, durch einen Membranfilter der Porengröße 0,2 µm mittels einer Vakuumpumpe oder durch einen Spritzenfilter der Porengröße 0,2 µm filtriert. Lösungen für den Gebrauch an den chromatographischen Anlagen wurden bei Bedarf mindestens 30 min im Exsikkator entgast.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli* Stämmen

Alle verwendeten *E. coli* Stämme wurden bei 37 °C unter Schütteln bei 140 rpm (1 Liter Kultur) bzw. 220 rpm (5, 50 und 250 ml Kulturen) angezogen. Die Anzucht erfolgte in der Regel in LB-Medium. Bei plasmidtragenden Stämmen wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum (150 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Chloramphenicol, 12,5 µg/ml Tetrazyklin) aus einer tausendfach konzentrierten, steril filtrierten Stammlösung zugegeben.

Um Einzelkolonien zu erhalten, wurde die Zellsuspension auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und üN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur kurzzeitigen Lagerung wurden die Platten oder Suspensionen gut verschlossen im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurde ein Aliquot einer üN-Kultur im Verhältnis 1:1 in 87 % Glycerin in einem sterilen Schraubdeckelgefäß aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen zur chemischen Transformation

Zur Präparation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (Inoue et al., 1990) wurden 500 ml SOB-Medium mit einer frischen üN-Kultur des entsprechenden Stammes auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Kultur wurde 15 min auf Eis gekühlt, in 50 ml-Röhrchen überführt

und die Zellen durch Zentrifugation (3200 x g, 10 min, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 100 ml eiskaltem TFBII-Puffer resuspendiert, erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert und das erhaltene Pellet in 10 ml eiskaltem TFBII-Puffer aufgenommen. Sofort nach dem Resuspendieren wurden 100 µl Aliquots der Zellsuspension in Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis überführt und bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Zur Transformation chemisch kompetenter Zellen wurde ein Aliquot der Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit etwa 100 ng Plasmid-DNA (maximales Volumen: 20 µl) bzw. 10 bis 20 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für 45 s einem Hitzeschock bei 42 °C im Thermoblock ausgesetzt. Anschließend wurde der Ansatz nochmals für fünf Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium folgte eine einstündige Kur bei 37 °C im Schüttler bei 220 rpm, um die Antibiotikaresistenz auszubilden. Bei Transformation eines gereinigten Plasmids wurden 100 µl bzw. geeignete Verdünnungen der Zellsuspension auf Selektivagar ausplattiert. Bei Transformation eines Ligationsansatzes wurde die Zellsuspension für 1 min bei 1500 x g abzentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und anschließend ausplattiert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Minipräparation)

Die analytische Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte entweder mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen oder mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas. Dazu wurden aus einer frischen üN Kultur 5 ml Zellsuspension abzentrifugiert (3200 x g, 1 min, RT). Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte anschließend nach den Angaben des Herstellers. Zur Elution wurden stets 50 µl steriles Wasser verwendet und die gewonnene DNA bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Midi-Präparation)

Die Isolierung von Plasmid-DNA zu präparativen Zwecken erfolgte durch das NucleoBond PC 100 (Midi-Präparationen) von Macherey-Nagel. Dazu wurden aus

einer frischen üN Kultur 50 ml Zellsuspension abzentrifugiert (3200 x g, 10 min, 4 °C). Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte anschließend nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der AX100 Säulen. Zur Elution wurden stets 50 µl steriles Wasser verwendet und die gewonnene DNA bei -20 °C gelagert.

3.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz entspricht eine OD₂₆₀ von 1 (mit $^{0,1\%}A_{260} = 20 \text{ cm}^2\text{mg}^{-1}$ und einer Küvetten-Schichtdicke von 1 cm) einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml dsDNA (bzw. 35 µg/ml RNA oder 33 µg/ml ssDNA). Dadurch kann die DNA-Konzentration wie folgt berechnet werden:

$$c_{dsDNA} = \frac{A_{260} \cdot 50 \cdot f}{1000}$$

Formel 1: Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.

c _{dsDNA}	Konzentration an doppelsträngiger DNA [µg/µl]
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
f	Verdünnungsfaktor

Eine saubere DNA-Lösung sollte oberhalb von 300 nm keine messbare Absorption zeigen und einen OD₂₆₀/OD₂₈₀ Quotienten von mindestens 1,8 aufweisen.

3.3.4 Agarosegelektrophorese

Im Agarosegel werden DNA-Fragmente ihrer Länge entsprechend aufgetrennt. Durch Zugabe des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid werden die Banden im Gel unter UV-Licht sichtbar (Sharp et al., 1973). Zur Herstellung eines Agarosegels wurde 1 % (w/v) Agarose in 0,5 % TBE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf 50 - 60 °C wurden 0,2 µl der Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) pro ml Agarose hinzugegeben, die Lösung in eine Gelkammer gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt. Nach dem Erkalten wurde das fertige Gel mit 0,5 % TBE-Puffer überschichtet und der Taschenkamm entfernt. Die DNA-Proben wurden bei Bedarf mit 5 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 190 V für etwa 20 min durchgeführt. Als Größenstandard wurden 5 µl des GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladders oder Smart Ladders verwendet (2.4).

Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm sichtbar gemacht und mit Hilfe des Imager Multi-Doc-It Digital Imaging System die Gele dokumentiert.

3.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Gewünschte Fragmentbanden wurden unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe des Nucleospin II-Kits von Macherey-Nagel laut Anleitung des Herstellers. Nach einer PCR wurde die isolierte DNA in 40 µl, nach einem präparativen Verdau in 30 µl Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.3.6 Enzymatische Manipulation von dsDNA

3.3.6.1 Spaltung von dsDNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die spezifische Spaltung von dsDNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet (Wilson und Murray, 1991), die eine palindromische Erkennungssequenz benötigen. Sie erzeugen einzelsträngige Überhänge, sogenannte *sticky ends*, mit 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden. Für präparative Spaltungen zur späteren Ligation von Fragmenten wurde die gesamte Menge an erhaltenem PCR-Produkt und separat 2 µg Vektor-DNA mit 10 U von jedem Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 30 µl bei 37 °C für 4 h verdaut. Die Reaktionen wurden in dem jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Die Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (3.3.4) und für die Ligation aus dem Gel aufgereinigt (3.3.5).

3.3.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wurden geschnittener Vektor und PCR-Produkt in einem abgeschätzten molaren Verhältnis von 1 zu 4 gemischt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 U T4-DNA-Ligase im entsprechenden Puffer üN bei 16 °C im Thermocycler oder 1 h bei RT. Danach wurden kompetente *E. coli* Zellen mit dem Ansatz chemisch (3.2.3) transformiert.

3.3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente (Mullis und Faloona, 1987). Sie ermöglicht die selektive Vervielfältigung des DNA-Templates auch aus einem komplexen DNA-Gemisch

heraus. Die Reaktion basiert auf der Anlagerung (*annealing*) und Verlängerung (*extension*) zweier Oligonukleotid-Primer, die auf komplementären Strängen in entgegengesetzter Richtung die Zielregion einer doppelsträngigen DNA flankieren. Die Reaktion besteht aus aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen, die jeweils durch drei Phasen unterschiedlicher Temperatur charakterisiert sind. In der ersten Phase, der Denaturierungsphase, wird die Doppelstrang-DNA durch Erhitzen aufgeschmolzen und somit in Einzelstrang-DNA überführt. Durch das anschließende Absenken der Temperatur in der *annealing*-Phase kommt es zur Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die komplementären Zielregionen der einzelsträngigen Matrizen-DNA. In der Extensions-Phase werden bei höherer Temperatur die Primer durch eine thermostabile Polymerase komplementär zur Matrize verlängert. In den aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen kommt es zu einer exponentiellen Akkumulation der durch die beiden Primer flankierten DNA-Sequenz.

Die Reaktionen wurden in 50 µl Gesamtvolumen durchgeführt und enthielten folgende Komponenten: 5 - 100 ng Matrizen DNA, 1 µM eines jeden Primers, 0,1 mM dNTPs, 1,25 U GoTaq Polymerase und $\frac{1}{5}$ Volumen 5 x Green GoTaq Reaktionspuffer. Für die Gewährleistung von *proof reading* Aktivität wurden 2,5 U Pwo-Polymerase hinzugefügt. Alternativ zu der Mischung aus GoTaq und Pwo wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase nach Herstellerangaben eingesetzt. Nach einer anfänglichen Denaturierung für 3 Minuten bei 95 °C wurde der eigentliche Reaktionszyklus gestartet. Die Denaturierung erfolgte in der Regel für 45 s bei 95 °C, das Primer-*annealing* für 45 s bei der für das jeweilige Primerpaar charakteristischen Temperatur und die Extension für 1 min/kb bei 72 °C. Dieser Zyklus wurde 30-mal durchlaufen und nach einer abschließenden Extension für 10 Minuten bei 72 °C der Ansatz auf 4 °C abgekühlt. Die Schmelztemperatur T_M eines Primers wurde mit Formel 2 berechnet und die beiden Primer so gewählt, dass sie sich in ihrer Schmelztemperatur möglichst ähneln.

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

Formel 2: Berechnung der Schmelztemperatur T_M von PCR-Primern.

%GC GC-Gehalt des Primers [%]

n Anzahl der Nukleotide des Primers

Die *annealing* Temperatur T_A wurde jeweils auf $T_M - 3$ °C festgelegt.

3.3.7.1 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung des Erfolgs einer Klonierung wurde ein Insert-screening mittels Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden auf Selektivplatten gewachsene Einzelkolonien dem PCR-Ansatz hinzugefügt und bei einem verlängerten ersten Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 95 °C aufgeschlossen. Hierzu wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze von der Platte gepickt und kurz auf dem Boden des PCR-Gefäßes verstrichen. Die freigesetzte DNA diente in den folgenden Amplifikationsrunden als Matrize. Als Primer wurden in der Regel genflankierende Plasmidprimer eingesetzt. Die Reaktionen wurden in 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt und enthielten folgende Komponenten: 1 µM der Primer, 0,1 mM dNTPs, 1 U GoTaq DNA-Polymerase und $\frac{1}{5}$ Volumen 5 x Green GoTaq Reaktionspuffer. Die Amplifizierung erfolgte mittels Standard-Protokoll wie in 3.3.7 beschrieben.

3.3.8 PCR-Methoden zur gerichteten Mutagenese

3.3.8.1 Megaprimer-PCR (Sarkar und Sommer, 1990)

Die Megaprimer-PCR ist eine Form der DNA-Manipulation, mit der gerichtet Punktmutationen eingeführt werden. In einer ersten PCR wird der Megaprimer mit Hilfe eines genflankierenden Primers und eines Primers, der die Mutation enthält, amplifiziert. Der Megaprimer wird mittels präparativer Gelelektrophorese (3.3.5) gereinigt und dient zusammen mit einem flankierenden Primer zur Amplifizierung des gesamten Gens in einer zweiten PCR. Die erste und zweite PCR erfolgten nach Standardprotokoll (3.3.7), wobei die optimale Anlagerungstemperatur T_A gegebenenfalls experimentell ermittelt wurde. In der Regel wurde diese Methode gewählt, wenn die zu mutagenisierende Position innerhalb der ersten oder letzten 100 Nukleotide eines Gens lag.

3.3.8.2 Overlap Extension-PCR (Ho et al., 1989)

Bei der Overlap Extension (OE)-PCR zur gerichteten Mutagenese werden zwei zueinander komplementäre Mutationsprimer von 25 bis 35 bp Länge definiert, die im zentralen Bereich den gewünschten Nukleotidaustausch tragen. Im ersten Schritt werden in zwei getrennten PCRs die beiden Mutationsprimer in Kombination mit einem genflankierenden Primer, zur Amplifikation von zwei Genfragmenten genutzt und diese mittels präparativer Gelelektrophorese (3.3.5) gereinigt. Diese Fragmente

überlappen im Bereich der ausgetauschten Nukleotide und dienen in einer zweiten PCR als Matrize, um in Kombination mit genflankierenden Primern das vollständige Gen mit den ausgetauschten Nukleotiden zu amplifizieren. Die Amplifizierung erfolgte mittels Standard-Protokoll (3.3.7), wobei die optimale Anlagerungstemperatur T_A gegebenenfalls experimentell ermittelt wurde. Diese Mutagenisierungsmethode wurde gewählt, wenn die zu mutagenisierende Position relativ mittig im Gen lag, so dass die beiden überlappenden Fragmente eine vergleichbare Länge aufwiesen.

3.3.9 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen von mutagenisierten und klonierten Genen erfolgte durch die Firma Geneart (Regensburg, www.geneart.com). Es wurde das Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger et al., 1977) verwendet. Bei diesem Verfahren werden verschiedene fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynukleotide zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden in der *Thermal Cycle Sequencing* Reaktion (Sears et al., 1992; Slatko, 1994) eingesetzt. Dadurch entstehen 3'-terminal fluoreszenzmarkierte Einzelstrang-Abbruchfragmente, die gelektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Nukleotidsequenz wurde anschließend auf einem ABI PRISM 3700 DNA Analyzer von Applied Biosystems ausgelesen. Die abgegebenen Proben mit einem Gesamtvolumen von 8 µl enthielten zwischen 100 und 300 ng DNA und jeweils 10 pmol eines Sequenzierungsprimers, wodurch die DNA linear amplifiziert wurde. Die im ABI-Format erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Bioedit analysiert.

3.4 Proteinchemische und organisch-chemische Methoden

3.4.1 Genexpression und Proteinanreicherung

3.4.1.1 Heterologe Expression und Anreicherung von Proteinen im analytischen Maßstab

Alle zu exprimierenden Gene im *E. coli* Wirtssystem lagen im der pET21a(+) vor und standen somit unter Kontrolle des T7 Promotor- und lac Operator- Systems (2.2). Um zu untersuchen, ob sich die klonierten Gene überexprimieren lassen, wurden Expressionen im analytischen Maßstab (Probeexpressionen) durchgeführt. Dazu wurden mit einer frisch transformierten *E. coli* Kolonie 5 ml LB Medium mit entsprechenden Antibiotika inkuliert und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Mit dieser Kultur wurden weitere 50 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika

angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,6 inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz auf zwei Kolben aufgeteilt. In einem Kolben wurde die Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert, im anderen wurde kein IPTG zugegeben. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen durch Zentrifugation (1500 x g, 10 min, 4 °C) pelletiert, in 1 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und mit einem Ultraschall Desintegrator (Branson Digital Sonifier, Model 250 D; Amplitude 20 %, 20 Sekunden mit einer 4 mm Mikrospitze) aufgeschlossen. Die Proben wurden in der Tischzentrifuge zentrifugiert (16000 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand vollständig in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das erhaltene Pellet mit den unlöslichen Zellbestandteilen (P) wurde in 1 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und 100 µl davon in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Vom Überstand mit dem löslichen Zellextrakts (*crude extract*, C) wurden ebenfalls 100 µl in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Um die Thermostabilität des Enzyms abschätzen zu können, wurden je 100 µl des Überstandes für 15 min bei 65, 70 und 75 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in der Tischzentrifuge zentrifugiert (16000 x g, 10 min, RT) und der Überstand dieses Hitzeschrittes (H) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die verschiedenen Proben (P, C, H) wurden mit gleichem Volumen (je 100 µl) 2x SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE (2.11.3) analysiert.

3.4.1.2 Heterologe Expression und Anreicherung rekombinanter Proteine im präparativen Maßstab

Um größere Mengen an rekombinanten Proteinen zu reinigen, wurden Expressionen im präparativen Maßstab durchgeführt. Dazu wurden mit einer frisch transformierten *E. coli* Kolonie 50 - 250 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum inokuliert und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Mit dieser Kultur wurden 1 bis 4 Liter LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,6 inokuliert. Daraufhin wurde die Expression mit 0,5 mM IPTG induziert, über Nacht geschüttelt und durch Zentrifugation (1500 x g, 10 min, 4 °C) pelletiert. Nach erfolgter Zellernte wurden die Pellets in 25 ml Aufschlusspuffer pro Liter Expressionsmedium resuspendiert. Der anschließende Zellaufschluss erfolgte in 50 ml Falconröhrchen durch Sonifizieren mit einem Ultraschall Desintegrator (Branson Digital Sonifier Model 250 D; Amplitude 40 %, Makrospitze, 2 x 2 min mit jeweils 30 s Puls und 30 s Pause). Die Probe wurde während der gesamten Prozedur auf Eis gehalten, um eine übermäßige Erwärmung

der Lösung zu vermeiden. Anschließend wurden, wie bei der Probeexpression unter 3.4.1.1 beschrieben, je 100 µl Aliquots der löslichen (C) und unlöslichen (P) Zellfraktion entnommen. Die restliche Probe wurde zentrifugiert (23400 x g, 15 min, 4 °C), der Überstand in 50 ml Falconröhrchen überführt und für 15 min im Wasserbad erhitzt. Die jeweilige Temperatur des Hitzeschrittes wurde entsprechend den Ergebnissen der Probeexpression gewählt, wobei eine optimale Anreicherung des rekombinanten Proteins angestrebt wurde. Nach dem Hitzeschritt wurde erneut scharf zentrifugiert (23400 x g, 20 min, 4 °C), der Überstand in ein frisches 50 ml Falconröhrchen überführt und bis zur chromatographischen Aufreinigung auf Eis gehalten. Um bei schwach exprimierten sTrpC-Mutanten höhere Ausbeuten zu erreichen, wurde in einigen Fällen anstelle von LB-Medium das Betain-Sorbitol-Medium verwendet (2.10).

3.4.2 Proteinreinigung mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie

Die Metallchelat-Affinitätschromatographie wurde mit der Säule HisTrap FF crude (GE HEALTHCARE; CV: 5 ml; max. Druck: 0,5 MPa) durchgeführt. Diese Säule besteht aus Sepharose 6 (*FastFlow*) Medium und dem daran gebundenem Chelator Iminodiaktische Säure (IDA). IDA besitzt sechs Koordinationsstellen, von denen an drei Metallionen (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} oder Fe^{3+}) immobilisiert werden können, während die anderen drei zur Komplexierung der Stickstoff- und Schwefelatome von Histidinen, Tryptophanen oder Cysteinen zur Verfügung stehen. Proteine, die gentechnisch mit einem N- oder C-terminalem (His)₆-Tag fusioniert wurden, binden nach Beladung der Säule mit Metallionen (in dieser Arbeit wurde stets Ni^{2+} verwendet) spezifisch an die Säule, da die Metallionen zusätzliche Koordinationsstellen für die Histidine bereitstellen. Die Elution von gebundenem Protein erfolgt durch Anlegung eines Imidazolgradienten, wobei die Imidazolmoleküle mit den chemisch äquivalenten Histidin-Seitenketten des rekombinanten Proteins um die Bindestellen an der Säule konkurrieren. In den Puffern darf sich weder EDTA noch DTT befinden. EDTA würde die gebundenen Nickelionen komplexieren und damit von der Säule entfernen, während DTT die Ionen zu elementarem Nickel reduzieren würde.

Die Beladung der Säule mit Nickelionen erfolgte nach Angaben des Herstellers und wurde bei Bedarf durchgeführt.

Die Reinigung erfolgte an der Chromatographie-Anlage ÄKTA Purifier 10 (GE HEALTHCARE) nach folgender Methode:

Flussrate:	4 ml/min
Äquilibrierung:	2 CV Laufpuffer ^a
Beladen:	20 - 120 ml Proteinlösung in Aufschlusspuffer
Waschen:	8 CV Laufpuffer ^a
Eluieren:	15 CV Gradient von 0 - 600 mM Imidazol mit Elutionspuffer ^b ; es wurden Fraktionen à 2 ml gesammelt.
Reinigung der Säule:	5 CV Elutionspuffer ^b
Äquilibrierung:	5 CV Laufpuffer ^a

Spülen und Lagerung

der Säule: 5 CV H₂O; 3 CV 20 % Ethanol

^a: Laufpuffer: 100 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl, 10 mM Imidazol

^b: Elutionspuffer: 100 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl, 1 M Imidazol

Die Elution der Proteine wurde über die Messung der Absorption bei 260 und 280 nm verfolgt und ausgewählte Fraktionen über SDS-PAGE analysiert (2.11.3). Fraktionen mit sauberem rekombinannten Proteien wurden vereinigt und dialysiert.

3.4.3 Dialyse von Proteinlösungen

Zur Entfernung des Imidazols und der Kalium- und Chloridionen wurden die Proteinlösungen nach der Affinitätschromatographie zweimal gegen einen mindestens 100-fachen Volumenüberschuss an 100 mM KP pH 7,5 bei 4 °C für 4 bis 6 h im Kühlraum dialysiert. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch (Visking) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 14 kDa verwendet, welcher das Protein zurückhält, während niedermolekulare Substanzen die Membran passieren können.

3.4.4 Umpuffern von Proteinlösungen über Gelfiltration

Alternativ zur Dialyse wurden zum Umpuffern von kleinen Volumina (bis 2,5 ml) von Proteinlösungen auch Entsalzungssäulen (Sephadex G-25, GE Healthcare) verwendet, die auf dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie beruhen. Wegen des geringen Ausschlussvolumens von 5 kDa können Proteine die Säule ungebremst passieren, während niedermolekulare Substanzen wie Salze oder Pufferbestandteile retardiert werden. Die NAP-5, NAP-10 und NAP-25 Säulen (GE HEALTHCARE) wurden nach Herstellerangaben verwendet.

3.4.5 Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Bei Bedarf wurden Proteinlösungen mit Hilfe der Amicon Zentrifugenröhren (Amicon Ultra 4; molekulare Ausschlussgrenze: 10 kDa) über eine semipermeable Membran nach Herstellerangaben (3600 x g, 4 °C) einkonzentriert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach dem Volumen des einzukonzentrierenden Proteins.

3.4.6 Lagerung von gereinigtem Protein

Die gereinigten und konzentrierten Proteine wurden in flüssigen Stickstoff getropft und bei -80 °C gelagert.

3.4.7 Synthese und Reinigung der Liganden für sTrpC

3.4.7.1 Synthese des Substrates CdRP

Das Substrat CdRP der IGPS ist nicht käuflich zu erwerben, kann aber enzymatisch oder chemisch hergestellt werden. Im ersten Fall wird CdRP ausgehend von PRPP und AA mit Hilfe von TrpD und TrpF über das Zwischenprodukt PRA hergestellt (Eberhard et al., 1995).

Da mit diesem Ansatz jedoch nur relativ geringe Mengen an niedrig konzentriertem CdRP hergestellt werden können, wurde das Molekül im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich chemisch synthetisiert (Creighton und Yanofsky, 1970). Hierfür werden 58,8 mg Ribose-5-phosphat in 0,2 ml Wasser und 27,44 mg Anthranilsäure in 0,2 ml Ethanol gelöst, gemischt und bei RT im Dunkeln für etwa 20 h inkubiert. Die entstehende orange-gelbe Flüssigkeit wird auf das 10-fache Volumen mit Wasser aufgefüllt, um entstandenes und nicht zu CdRP umgesetztes PRA zu AA und Ribose-5-Phosphat zu hydrolysierten. Nach einer Stunde wird die Lösung fünf- bis siebenmal mit je 5 ml Ethylacetat ausgeschüttelt um die AA zu entfernen. Die obere Ehtylacetatphase färbt sich gelblich solange sie noch Anthranilat enthält. Anschließend wird mit Stickstoff gespült, damit sich das restliche in Lösung befindliche Ethylacetat verflüchtigt. Daraufhin kann die Konzentration vom synthetisierten CdRP am Spektralphotometer durch enzymatische Umsetzung zu IGP bestimmt werden (3.5.2.1). Obwohl diese Aufreinigung zur Aufnahme von Sättigungskurven im Rahmen von *steady-state* Kinetiken ausreicht (Creighton und Yanofsky, 1970), führt sie nicht zur vollständigen Entfernung der AA und anderer Neben- und Abbauprodukte der Synthese. Um besonders reines CdRP für transiente Kinetiken zu erhalten, wurde ein weiterer Reinigungsschritt mittels HPLC durchgeführt.

3.4.7.2 CdRP-Reinigung mittels HPLC

Mittels *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) können verschiedene Bestandteile eines Reaktionsansatzes oder eines Substanzgemisches mit sehr hoher Empfindlichkeit und Trennschärfe detektiert und separiert werden. Hierbei werden die Komponenten einer Probe chromatographisch auf einer Säule getrennt und durch Absorptions- oder Fluoreszenzmessung ein Elutionsprofil des Laufs erstellt. Unterschiedliche Substanzen zeichnen sich durch verschiedene Retentionszeiten aus, über die sie durch den Vergleich mit Standardsubstanzen oder ihr Absorptions- und Fluoreszenzspektrum identifiziert werden können. Je nach den zu trennenden Substanzen werden verschiedene Typen von Säulen und Laufmitteln eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich *reversed phase* Säulen verwendet. Bei diesen handelt es sich um Kieselgele, die mit langen Kohlenwasserstoffketten modifiziert wurden. Dadurch erhält man eine sehr unpolare Oberfläche, an die Substanzen über hydrophobe Wechselwirkungen binden können. Zur Elution wurde eine Gradiententrennung mit einem wässrigen Puffer und einem organischen Lösungsmittel verwendet. Durch Zumischen des organischen Lösungsmittels zur wässrigen Phase sinkt die Polarität des Laufmittels, wodurch seine Elutionskraft steigt. Die an die Säule gebundenen Substanzen eluieren also gemäß ihrer Polarität, wobei sich polare Stoffe vor den unpolaren von der Säule lösen.

Die Abtrennung des synthetisierten CdRP von Abbau- bzw. Nebenprodukten, sowie Anthranilat erfolgte über eine 8 x 250 mm HiPAK C18-Säule der Firma Bischoff mit 5 µm Partikelgröße (mit zusätzlicher C18-Vorsäule, 8 x 33 mm, Partikelgröße 5 µm):

Programm 1 (präparativer Lauf):

Laufmittel A: 40 mM Ammoniumacetat pH 6,0

Laufmittel B: 40 % (v/v) Acetonitril

Flussrate: 3,5 ml/min

Säulentemperatur: RT

Injektionsvolumen: 100 µl Probe

Zeit [min]	% Laufmittel B
0,00	0,5
5,80	0,5
10,00	1,8
15,00	100
20,00	100
21,00	0,0

Die nachfolgende Analyse wurde mit einer analytischen Nucleosil C18-Säule (3 x 250 mm, 5 µm Partikelgröße, Firma Bischoff) durchgeführt:

Programm 2 (analytischer Lauf):

Laufmittel A: 40 mM Ammoniumacetat pH 6,0

Laufmittel B: 40 % (v/v) Acetonitril

Flussrate: 0,5 ml/min

Säulentemperatur: RT

Injektionsvolumen: 50 µl Probe

Zeit [min]	% Laufmittel B
0,00	0,0
3,00	0,0
4,40	0,2
5,80	0,8
7,20	1,3
8,60	3,2
10,00	5,0
25,00	25,0
30,00	50,0
34,00	75,0
37,00	75,0
45,00	100,0
48,00	100,0
53,00	0,0

3.4.7.3 Synthese von reduziertem CdRP

Bei rCdRP handelt es sich um ein unreaktives Substrat аналогon, das sich von CdRP dadurch unterscheidet, dass am C2'-Atom des Zuckers die Keto- zu einer Hydroxylgruppe reduziert wurde (Hommel et al., 1995).

Die Synthese von rCdRP ging von HPLC-gereinigtem CdRP aus. Zur Reduktion wird die CdRP-Lösung mittels KOH auf einen pH von 7 – 8 titriert. Zu der CdRP-Lösung wird Natriumborhydrid in etwas mehr als äquimolarer Menge gegeben und bei RT für etwa 1 h stehen gelassen. Durch Zugabe von tmTrpC zu einem Aliquot der Reaktionslösung wurde spektralphotometrisch untersucht, ob alles CdRP reduziert wurde und folglich keine Produktion von IGP mehr zu detektieren war.

Zur weitgehenden Entfernung des Ammoniumacetats und des Natriumborhydrids wurde die rCdRP-Lösung in Aliquots für 10 min in der Speedvac bei 60 °C eingeengt. Die Reinheit wurde mittels eines Absorptionsspektrums überprüft, wobei der Quotient A₂₅₂/A₂₇₈ optimalerweise einen Wert von 25 erreichen sollte (Bisswanger et al., 1979). Im Rahmen dieser Arbeit lag der Quotient zwischen 20,0 und 21,6. Anschließend wurde das rCdRP aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.4.7.4 Synthese des Produktes IGP

Zur Synthese von IGP wurde 1 ml (~1,1 mM) HPLC-gereinigtes CdRP mit 100 µl 1 M HEPPS pH 7,5 versetzt und 1 µM tmTrpC zugefügt. Die Menge wurde so bemessen, dass der komplette Umsatz binnen 1 h bei 60 °C stattfand. Anschließend wird das Enzym mittels eines Amicon Konzentrators abgetrennt und das saubere IGP einer Konzentrationsbestimmung unterzogen, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptions-spektroskopie

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sowie Disulfidbrücken (Cystine) absorbieren UV-Licht in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 300 nm. Aus der Aminosäuresequenz kann nach (Pace et al., 1995) der molare Extinktionskoeffizient ε₂₈₀ errechnet werden (Formel 3).

$$\varepsilon_{280} = \sum Trp \cdot 5500 + \sum Tyr \cdot 1490 + \sum Cystine \cdot 125$$

Formel 3: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten ε₂₈₀ [M⁻¹cm⁻¹].

Unter Einbeziehung des Molekulargewichtes lässt sich daraus der spezifische Extinktionskoeffizient (${}^{0,1\%}A_{280}$) ermitteln (Formel 4).

$${}^{0,1\%}A_{280} = \frac{\varepsilon_{280}}{M_r}$$

Formel 4: Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten ${}^{0,1\%}A_{280}$ [cm²/mg].
 M_r molare Masse des Proteins [g/mol]

Damit kann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Proteinkonzentration durch Extinktionsmessung bei 280 nm bestimmt werden (Formel 5):

$$A_{280} = {}^{0,1\%}A_{280} \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = A_{280} / {}^{0,1\%}A_{280} \cdot d$$

Formel 5: Berechnung der Proteinkonzentration mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten ${}^{0,1\%}A_{280}$.

A_{280} gemessene Absorption bei 280 nm
 c Konzentration [mg/ml]
 d Schichtdicke der Küvette [cm]
 ${}^{0,1\%}A_{280}$ spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [cm²/mg]

Es wurden Spektren von 220 – 350 nm aufgenommen, wobei sich das Absorptionsmaximum des Proteins bei 278 nm befinden und keine Absorption bei Wellenlängen über 300 nm auftreten sollte, um Verfälschungen der Konzentrationsbestimmung durch auf Aggregatbildung zurückgehende Lichtstreuung ausschließen zu können.

In Tabelle 1 sind die molaren Extinktionskoeffizienten, Molekulargewichte und spezifischen Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit verwendeten wildtypischen sTrpC und tmTrpC Proteine, sowie der sTrpC-Mutanten mit veränderter Zusammensetzung an aromatischen Resten zusammengestellt.

Tabelle 1: Extinktionskoeffizienten und molare Masse (M_r) untersuchter Proteine

Protein	$\varepsilon_{(280)} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$	$M_r [\text{g/mol}]$	${}^{0,1\%}A_{280} [\text{cm}/\text{mg}]$
sTrpC-wt	17210	28587	0,60
sTrpC-W8A	13410	29295	0,46
sTrpC L142Y	20400	28638	0,71
sTrpC L187W	24410	29484	0,83
tmTrpC-wt	22220	28583	0,78

3.5.2 Konzentrationsbestimmung von TrpC-Liganden mittels Absorptionsspektroskopie

3.5.2.1 Konzentrationsbestimmung von CdRP

Die Konzentration von chemisch synthetisiertem und gereinigtem CdRP wurde spektrophotometrisch über seine durch tmTrpC katalysierte Umsetzung zu IGP bestimmt (Abbildung 5).

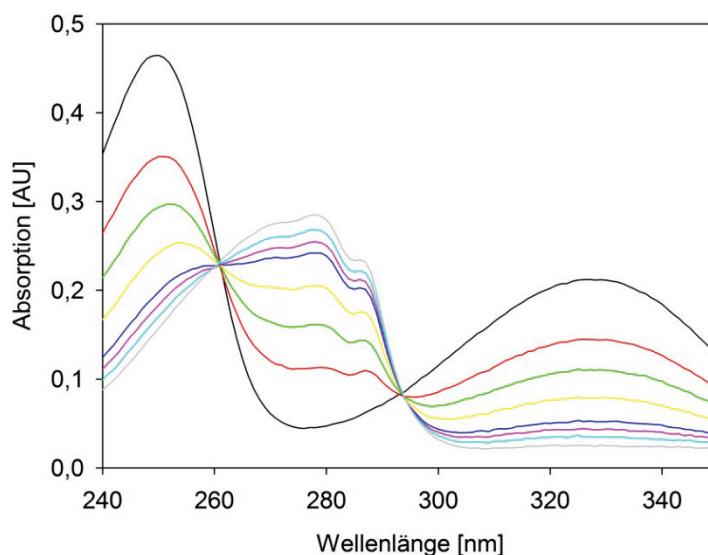


Abbildung 5: Bestimmung der CdRP-Konzentration durch den enzymatisch katalysierten und spektrophotometrisch verfolgten Umsatz zu IGP.

In einem Ansatz von 200 µl wurde ein 5 µl Aliquot des neu synthetisierten CdRP (schwarze Kurve) in 50 mM EPPS, pH 7,5 mit 4 mM EDTA bei Raumtemperatur mit 0,1 µM tmTrpC versetzt und sein zeitabhängiger Umsatz zu IGP (graue Kurve) verfolgt. Im Bereich zwischen 240 nm und 340 nm zeigen die Absorptionsspektren isosbestische Punkte bei ungefähr 261 nm und 294 nm. Die Quantifizierung des enzymatisch umsetzbaren CdRPs erfolgte mit den differentiellen Extinktionskoeffizienten bei 327 nm und 278 nm. Bei geringen Differenzen wurde der Mittelwert gebildet.

Dazu wurde die Zunahme der Absorption bei 278 nm [$\Delta\epsilon_{278}(\text{IGP-CdRP}) = 4,48 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$] und ihre Abnahme bei 327 nm [$\Delta\epsilon_{327}(\text{IGP-CdRP}) = 3,43 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$] quantifiziert (Creighton und Yanofsky, 1970; Hommel et al., 1995). Die isosbestischen Punkte bei 261 nm und 294 nm belegen, dass außer CdRP und IGP keine messbaren Mengen anderer spektroskopisch detektierbarer Substanzen anwesend sind.

3.5.2.2 Konzentrationsbestimmung von rCdRP und IGP

Die Konzentrationsbestimmungen für rCdRP und IGP erfolgten spektralphotometrisch unter Verwendung von $\epsilon_{327} = 3,42 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für das Substrat analogon (Bisswanger et al., 1979) und $\epsilon_{278} = 5,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für das Produkt der TrpC-Reaktion (Kirschner et al., 1975).

3.5.3 SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine werden durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und negativ geladen. Dabei bindet SDS an das Protein in einem Verhältnis von einem Molekül SDS pro 1,4 Aminosäureresten. Die Eigenladung des Proteins kann neben der Negativladung des mit SDS komplexierten Proteins vernachlässigt werden, so dass SDS-beladene Proteine identische Ladungs-Masse-Verhältnisse aufzeigen. Die Auftrennung in einem Polyacrylamidgel beruht daher allein auf dem Siebeffekt, wobei die Laufgeschwindigkeit dem Logarithmus der Masse umgekehrt proportional ist (Laemmli, 1970). Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten 12,5 %igen SDS-Gele.

Tabelle 2: Zusammensetzung 12,5 %iger SDS-PAGE Gele.

Die Mengenangaben gelten für 13 Gele.

	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (6 %)
Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer	19,5 ml	7,38 ml
Acrylamid-SL (30 %)	26,2 ml	5,9 ml
H ₂ O	31,58 ml	15,95 ml
TEMED	89 µl	29 µl
APS (10 %)	195 µl	89 µl

Die Proben wurden 1:1 mit 2x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und kurz abzentrifugiert (16000 x g, 30 s). Es wurden je 5–20 µl der Proben in die Geltaschen gefüllt. Als Längenstandard diente der Low Molecular Weight Marker (2.4). Die Elektrophorese wurde bei 45 mA und 300 V mit 1x SDS-PAGE Laufpuffer durchgeführt und dauerte ca. 30 min. Anschließend wurden die Gele mit SDS-PAGE Färbelösung gefärbt, wobei die Nachweisgrenze des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 200 - 500 ng Protein/mm² beträgt. Die Gele wurden 10 min in der Färbelösung geschwenkt und im Anschluss durch wiederholtes Aufkochen in Wasser (Mikrowelle 900 W) die Hintergrundfärbung entfernt.

3.5.4 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. 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 mit einem CV von 24 ml an einer Chromatographie-Anlage ÄKTA Basic 10 better (GE Healthcare) verwendet. Auf die mit 100 mM KP-Puffer, pH 7,5, 300 mM KCl äquilierte Säule wurden jeweils 100 µl einer Proteinlösung der Konzentration 10 µM über einen Auftragsloop injiziert. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts wurde die Säule mit Proteinen bekannter Größe kalibriert (7.3.1), wobei die Elution über Absorptionsspektroskopie bei 280 nm verfolgt wurde. Da für globuläre Proteine ein linearer Zusammenhang zwischen dem dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts und der Elutionszeit besteht, lässt sich mit Hilfe der Kalibrierungsgerade das apparte Molekulargewicht eines untersuchten Proteins abschätzen.

3.5.5 Circular Dichroismus Spektroskopie

Circular Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) ist eine spezielle Form der UV/Vis-Spektroskopie, die auf Wechselwirkungen von zirkular polarisiertem Licht mit optisch aktiven Substanzen, wie Proteinen, beruht. Optisch aktive Substanzen besitzen unterschiedliche Brechungsindizes für rechts- und links-polarisiertes Licht, was zu unterschiedlichen Verzögerungen beim Durchgang der Lösung und somit zu einer Phasenverschiebung Φ führt. Weiterhin unterscheiden sich bei optisch aktiven Substanzen die Extinktionskoeffizienten für rechts- und links-polarisiertes Licht, was beim Durchgang der Lösung zu elliptisch polarisiertem Licht führt. Die Elliptizität (Θ_{obs}) wird bei CD-Messungen als Signal verwendet.

Die CD-Spektroskopie eignet sich besonders zu Untersuchungen von Proteinkonformationen. Die Absorption im Wellenlängenbereich von 170 bis 250 nm (Fern-UV CD) wird hauptsächlich von den Peptidbindungen bestimmt, so dass dieser Teil des Spektrums Aussagen über die Sekundärstruktur ermöglicht. Die verschiedenen Sekundärstrukturelemente wie α -Helix, β -Faltblatt oder *Random-coil* besitzen sehr distinkte Fern-UV CD-Spektren (Johnson, 1990). Aus diesen verschiedenen Signalen setzt sich ein Proteinspektrum zusammen (Stark, 1965), wobei α -Helices die anderen Strukturelemente in der Signalintensität dominieren. Als Fern-UV CD-Spektren werden in der Regel auf die durchschnittliche molare Elliptizität pro Aminosäure (Θ_{MRW}) normiert (Formel 6).

$$\theta_{MRW} = \frac{\theta_{obs} \cdot MRW}{c \cdot d} = \frac{\theta_{obs} \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A}$$

Formel 6: Berechnung der durchschnittlichen Elliptizität pro Aminosäure aus der in Fern-UV CD-Spektren gemessenen Elliptizität.

Θ_{MRW}	durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure [deg*cm ² *dmol ⁻¹]
Θ_{obs}	gemessene Elliptizität [mGrad]
MRW	mittlere Molmasse der Aminosäurenreste (<i>mean residue weight</i>) [Da]
c	Konzentration der Proteinlösung [mg/ml]
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
M_r	Molare Masse des Proteins [g/mol]
N_A	Anzahl der Aminosäuren

Fern-UV CD-Spektren bei 25 °C wurden in Quarzküvetten (Schichtdicke: 1 mm) mit 8 - 13 µM Protein in 10 mM KP, pH 7,5 durchgeführt. Das CD -Signal, gemessen als Elliptizität θ_{obs} , wurde in Abständen von 0,5 nm aufgenommen (Scan-Geschwindigkeit: 50 nm/min, Mittelwertbildung aus drei Durchläufen). Zusätzlich wurde stets ein reines Pufferspektrum aufgenommen, welches vom Proteinspektrum abgezogen wurde. Vergleichende Fern-UV CD-Spektren von sTrpC-wt und sTrpC-R54K+R64F bei 25, 37 und 48 °C erfolgten in einer verschließbaren Rundküvette (Schichtdicke: 0,02 cm).

Die Absorption im Bereich von 250 bis 320 nm (Nah-UV CD) ist auf die aromatischen Aminosäuren zurückzuführen. Kleine Änderungen in der Umgebung eines Chromophors führen hierbei zu einer deutlichen Änderung des Signals. Das Nah-UV CD-Spektrum ist somit eine empfindliche Methode zur Untersuchung der Tertiärstruktur von Proteinen (Schmid, 1997) und wird in der Regel auf die molare Elliptizität normiert (Formel 7).

$$\theta = \frac{\theta_{obs} \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot d}$$

Formel 7: Berechnung der molaren Elliptizität aus der, über Nah UV Circular Dichroismus gemessenen Elliptizität.

Θ	molare Elliptizität [deg*cm ² *dmol ⁻¹]
Θ_{obs}	gemessene Elliptizität [mGrad]
c	Konzentration der Proteinlösung [mg/ml]
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
M_r	Molare Masse des Proteins [g/mol]

Die Nah-UV CD Spektren von sTrpC-wt und sTrpC-R54K+R64F wurden in einer temperierbaren Rundküvette (Schichtdicke: 0,5 cm) bei 25, 37 und 48 °C aufgenommen (Scan-Geschwindigkeit 20 nm/min, Mittelwertbildung aus fünf Durchläufen). Zusätzlich wurde stets ein reines Pufferspektrum aufgenommen,

welches vom Proteinspektrum abgezogen wurde. Alle Messungen erfolgten an einem JASCO CD-Spektropolarimeter J-815.

3.5.6 Fluoreszenz-Spektroskopie

Absorbiert ein Molekül Licht bestimmter Wellenlänge, so wird es von einem energetischen Grundzustand in einen angeregten Zustand transferiert. Die Rückkehr in den Grundzustand kann unter anderem durch die Emission eines Photons geschehen. Dieser Vorgang ist als Fluoreszenz messbar. Die Energie eines emittierten Photons ist geringer als die eines absorbierten, was einer Verschiebung zu größerer Wellenlänge, also einer Rotverschiebung, entspricht. Die intrinsische Fluoreszenz eines Proteins beruht auf den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, wobei in der Regel die Tryptophanfluoreszenz dominiert. Beide Seitenketten können bei 280 nm angeregt werden, bei 295 nm erfolgt die spezifische Anregung von Tryptophan. Sowohl die Intensität der Fluoreszenzemission als auch die Lage des Emissionsmaximums hängen stark von der unmittelbaren Umgebung des Chromophors ab. Die Fluoreszenz von Tryptophan zeigt eine Abhängigkeit von der Polarität der Umgebung. Eine stark polare Umgebung bewirkt eine Rotverschiebung der Emission zu einem Maximum bei ca. 350 nm gegenüber einem Maximum bei 325 nm in unpolarer Umgebung. Über die Messung von Fluoreszenzspektren kann also eine Aussage über den Grad der Lösungsmittlexposition eines Tryptophans in einem Protein gemacht werden. Wenn sich die Umgebung der Fluorophore verändert, z.B. durch Bindung eines Interaktionspartners, kommt es zu Änderungen der Form des Emissionsspektrums (Rotverschiebung/Blauverschiebung) sowie der Quantenausbeute (Schmid, 1997). Daneben kann auch die Eigenfluoreszenz des Liganden selbst (in der vorliegenden Arbeit IGP) als Messsignal verwendet werden, wobei die oben genannten Prinzipien genauso gültig sind.

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. 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 (Fürster, 1948). Somit ist es möglich die Bindung von rCdRP an sTrpC über den entstehenden FRET

nach Anregung des einzigen Tryptophanrests W8 bei 280 bzw. 295 nm und dem Anthranilsäureanteil des rCdRPs (Absorptionsmaximum bei 327 nm) zu messen.

3.5.7 Messung der Ligandenbindung

3.5.7.1 Messung der rCdRP-Bindung an sTrpC unter Gleichgewichtsbedingungen

Zur Bestimmung der Affinität von sTrpC für rCdRP wurden Messungen am Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse (Varian, Darmstadt) in einer vierseitig geschliffenen 3 ml Quarzküvette durchgeführt. Die Spaltbreite betrug bei der Excitation 5 nm und der Emission 10 nm, die Verstärkung betrug 600 V (medium). Nach Vorlage von sTrpC-wt bzw. der Mutanten in 50 mM HEPPS, pH 7,5, 4 mM EDTA wurden bei 25 °C ansteigende Mengen an rCdRP zugegeben und nach Anregung der Fluoreszenz von W8 bei 280 nm die Emission in einem Bereich von 300 bis 450 nm verfolgt. Aus der Abnahme der Emission bei 324 nm bzw. der Zunahme des FRET-Signals bei 415 nm Titrationskurven erstellt. Über die Titration von Puffer zu sTrpC-wt und rCdRP zu Puffer wurden die Titrationskurven um die Verdünnung und die geringe Eigenfluoreszenz von rCdRP korrigiert und anschließend mit einer quadratischen Gleichung gefittet (Formel 8).

$$F = F_0 + 0,5 \cdot (F_{max} - F_0) \cdot \left[1 + \frac{(x + K_D)}{p} - \sqrt{\left(1 + \frac{(x + K_D)}{p}\right)^2 - \frac{4x}{p}} \right]$$

Formel 8: Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenz von der zutitrierten Ligandenmenge.

F_0, F_{max}	Fluoreszenz in Abwesenheit des Liganden bzw. bei höchster Ligandenkonzentration
x	Konzentration des zutitrierten Liganden
K_D	Thermodynamische Dissoziationskonstante
p	Konzentration der Bindestellen des vorgelegten Analyten

Aus dem Fit erhält man den Wert für die Dissoziationskonstante K_D und – falls nicht als bereits bekannt angenommen – die Zahl der Bindestellen in sTrpC für rCdRP.

3.5.7.2 Messung der Kinetik der rCdRP-Bindung an TrpC

Um die Ratenkonstanten der Interaktion von sTrpC mit rCdRP zu ermitteln, wurden transiente Kinetiken aufgenommen. Dazu wurde die Fluoreszenz von W8 wurde bei einer Wellenlänge von 295 nm angeregt und der zeitliche Verlauf des FRET-Signals mit einem *Cut-off*-Filter von 400 nm an einer *Stopped-flow*-Anlage (Applied-Photophysics SX20) mit einer 1 cm Messzelle verfolgt. Es wurden zwei Messreihen unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung durchgeführt, wobei bei der ersten der

Ligand konstant gehalten wurde ($0,25 \mu\text{M}$), während das Enzym im deutlichen Überschuss vorlag und in seiner Konzentration variiert wurde ($0,25 - 5 \mu\text{M}$). Die zweite Messreihe fand mit konstanter Enzymkonzentration statt ($0,25 \mu\text{M}$), während die Konzentration des im Überschuss vorliegenden Liganden variiert wurde ($0,25 - 5 \mu\text{M}$). Die Messungen wurden in $50 \text{ mM HEPES pH } 7,5$, 4 mM EDTA bei 25°C durchgeführt. Es wurden jeweils mindestens sechs Transienten für jede Bedingung aufgenommen und gemittelt. Die Auswertung der erhaltenen Kurven erfolgte in dem Gerät zugehörigem Programm Pro-Data Viewer. Die Transienten wurden an zweifach bzw. dreifach exponentielle Funktionen angeglichen. Die hieraus ermittelten observierten Ratenkonstanten (λ) und Amplituden (A) wurden in Sekundärdiagrammen gegen die eingesetzten Liganden- bzw. Enzymkonzentrationen aufgetragen.

3.5.7.3 Messung der IGP-Bindung an sTrpC unter Gleichgewichtsbedingungen

Zur Bestimmung der Affinität von sTrpC für IGP wurden Messungen am Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse (Varian, Darmstadt) in einer vierseitig geschliffenen 3 ml Quarzküvette durchgeführt. Die Spaltbreite betrug bei der Excitation 5 nm und der Emission 10 nm , die Verstärkung lag bei 600 V (medium). Nach Vorlage von sTrpC-wt bzw. den Mutanten in $50 \text{ mM HEPES, pH } 7,5$, 4 mM EDTA wurden bei 25°C ansteigende Mengen an IGP zugegeben und nach Anregung der Fluoreszenz von W8 bei 295 nm aus der Zunahme der Emission bei 330 nm Titrationskurven erstellt. Über die Titration von Puffer zu sTrpC-wt und IGP zu Puffer wurden die Titrationskurven um die Verdünnung und die hohe Eigenfluoreszenz von IGP korrigiert und anschließend mit einer quadratischen Gleichung gefitett (Formel 8). Aus dem Fit erhält man den Wert für die Dissoziationskonstante K_D und – falls nicht als bereits bekannt angenommen – die Zahl der Bindestellen in sTrpC für IGP.

3.5.7.4 Messung der Kinetik der IGP-Bindung

Um die Ratenkonstanten der Interaktion von sTrpC mit IGP zu ermitteln, wurden transiente Kinetiken aufgenommen. Dazu wurde die Fluoreszenz von W8 bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt und der zeitliche Verlauf der Emission mit einem Cut-off-Filter von 335 nm an einer *Stopped-flow* (Applied-Photophysics SX20) Anlage mit einer 1 cm Messzelle verfolgt. Es wurden zwei Messreihen unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung durchgeführt, wobei bei der ersten der Ligand konstant gehalten wurde ($1 \mu\text{M}$), während das Enzym im deutlichen Überschuss vorlag und in seiner Konzentration variiert wurde ($5 - 15 \mu\text{M}$). Die zweite Messreihe fand mit

konstanter Enzymkonzentration statt ($1 \mu\text{M}$), während die Konzentration des im Überschuss vorliegenden Liganden variiert wurde ($5 - 13 \mu\text{M}$). Außerdem wurden für globale Analysen Messungen in ähnlichen molaren Verhältnissen von Ligand und Enzym durchgeführt ($\text{sTrpC} = 0,5 \mu\text{M}$ und $\text{IGP} = 0,5 - 4 \mu\text{M}$; $\text{sTrpC} = 1 - 4 \mu\text{M}$ und $\text{IGP} = 2 \mu\text{M}$). Die Messungen wurden in $50 \text{ mM HEPES pH } 7,5$, 4 mM EDTA bei 25°C durchgeführt. Die Verstärkung betrug $279,4 \text{ V}$ und es wurden jeweils mindestens sechs Transienten für jede Bedingung aufgenommen und gemittelt. Die Auswertung der erhaltenen Kurven erfolgte in dem Gerät zugehörigem Programm Pro-Data Viewer. Die Transienten wurden an einfach und mehrfach exponentielle Funktionen angeglichen und anhand der ähnlichen Abweichungen, wurde eine Auswertung mit einfach exponentiellen Funktionen bevorzugt. Die hieraus ermittelten observierten Ratenkonstanten (λ) und Amplituden (A) wurden in Sekundärdiagrammen gegen die eingesetzten Liganden- bzw. Enzymkonzentrationen aufgetragen.

3.5.7.5 Messung der Kinetik der IGP-Verdrängung von sTrpC

An sTrpC gebundenes IGP wurde bei unterschiedlichen Enzym/Ligand-Verhältnissen durch die Zugabe von Orthophosphat verdrängt und die Kinetik der Abdissoziation nach Anregung der Indolfluoreszenz bei 280 nm über die Zunahme der Fluoreszenzemission mit einem Cut-off-Filter mit 335 nm verfolgt. Die Messungen wurden in $50 \text{ mM HEPES pH } 7,5$, 4 mM EDTA bei 25°C durchgeführt. Die Verstärkung betrug $279,4 \text{ V}$ und es wurden jeweils mindestens sechs Transienten für jede Bedingung aufgenommen und gemittelt. Die Auswertung der erhaltenen Kurven erfolgte in dem Gerät zugehörigem Programm Pro-Data Viewer. Die Transienten wurden an einfach exponentielle Funktionen angeglichen. Die hieraus ermittelten observierten Ratenkonstanten (λ) und Amplituden (A) wurden in einem Sekundärdiagrammen gegen die eingesetzten Liganden- bzw. Enzymkonzentrationen aufgetragen.

3.5.8 Enzymkinetik

Um enzymkinetische Parameter chemischer Reaktionen bestimmen zu können, muß die zeitliche Änderung der Konzentration eines oder mehrerer Reaktionsteilnehmer gemessen werden. Entscheidend ist dabei, die Ausgangsstoffe möglichst schnell und homogen zu durchmischen, denn hierdurch werden die Anfangsbedingungen der kinetischen Gleichung festgelegt, durch die die jeweilige Reaktion beschrieben wird.

Je nachdem welche Bedingungen vorherrschen, unterscheidet man *steady-state* und *pre-steady-state* Messungen. Bei *steady-state* Messungen handelt es sich um *multiple-turnover* (MTO) Analysen, welche sich bereits im Reaktionsgleichgewicht befinden. Im Gegensatz hierzu untersucht man mit *pre-steady-state* Analysen den Bereich vor dem Reaktionsgleichgewicht, also idealerweise den ersten Komplett-Umsatz der Bindung des Substrates bis zur Freisetzung des Produktes. Hierzu verwendet man meist so genannte *single-turnover* (STO) Methoden.

3.5.8.1 Steady-state Messung der TrpC-Aktivität

Die Aktivitätsbestimmung für sTrpC-wt und der Mutanten erfolgte unter Fließgleichgewichtsbedingungen (*steady-state*) bei 25 °C oder 37 °C in 50 mM HEPES pH 7,5, 4 mM EDTA. Hierzu wurde der Umsatz von CdRP zu IGP über die Zeit mit einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer verfolgt (Eberhard et al., 1995; Hankins et al., 1975; Merz et al., 1999b), wobei die Proteine jeweils vor der Messung durch NAP-Säulen in 50 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 4 mM EDTA umgepuffert wurden. Um die Normierung des gemessenen Fluoreszenzsignals zu ermöglichen, wurden die Reaktionen bis zum vollständigen Umsatz von CdRP zu IGP verfolgt. Durch die hohe Produktinhibition von sTrpC und der damit einhergehenden steten Verlangsamung der Reaktion konnte dies in einer angemessenen Zeitspanne nur durch Zugabe von tmTrpC-wt erreicht werden.

Aus den initialen Fluoreszenzänderungen wurden die Anfangsgeschwindigkeiten v_i der Reaktion in Abhängigkeit der eingesetzten Substratkonzentrationen graphisch ermittelt. Aus den resultierenden Sättigungskurven wurden V_{max} und K_M^{CdRP} durch einen Fit mit einer hyperbolischen Funktion (Programm Sigma Plot 11.0) bestimmt. Über die Beziehung $k_{cat} = V_{max}/[E_0]$ wurde die Wechselzahl aus der Maximalgeschwindigkeit und der eingesetzten Enzymkonzentration errechnet. Zur Bestimmung der Wechselzahl k_{cat} bei verschiedenen Temperaturen, wurden bei jeder Messtemperatur zwei Messungen mit unterschiedlichen, aber sättigenden Substratkonzentrationen durchgeführt und das Ergebnis gemittelt. Die Messungen erfolgten in 50 mM HEPES, pH 7,5 (bei der jeweiligen Messtemperatur), 4 mM EDTA. Die Auftragung des natürlichen Logarithmus der Wechselzahl $\ln k$ gegen die reziproke absolute Temperatur $\frac{1}{T}$ liefert eine Gerade mit der allgemeinen Gleichung

$$y = -mx + t, \text{ wobei } x = \frac{1}{T}; y = \ln k; m = -\frac{E_A}{R}; \text{ und } t = \ln A \text{ ist. Dadurch lässt sich die}$$

Aktivierungsenergie E_A aus der Steigung m der Geraden mit $E_A = -m \cdot R$ ermitteln, wobei R für die allgemeine Gaskonstante steht.

3.5.8.2 Pre-steady-state Messung von TrpC

Single-turnover (STO) Messungen dienen der Analyse von *pre-steady-state* Kinetiken. Unter STO-Messungen versteht man Untersuchungen, bei denen ein einzelner Umsatz beobachtet wird. Da das schwache Signal einer einzelnen Reaktion mit normalen Nachweismethoden nicht zu detektieren wäre, wird durch Synchronisierung vieler einzelner Reaktionen auf einen Startzeitpunkt eine ausreichende Verstärkung erreicht. Dies wird durch die Verwendung eines großen Überschusses an Enzym im Vergleich zum Substrat bewirkt, wobei wie folgt vorgegangen wird.

Bei einer einfachen Bindungsreaktion $E + S \rightleftharpoons ES$ ergibt sich die Dissoziationskonstante zu $K_D = \frac{[E][S]}{[ES]}$.

Da die freie Enzymkonzentration $E = E_{total} - ES$, die freie Substratkonzentration analog hierzu $S = S_{total} - ES$ ist, ergibt sich: $K_D = \frac{(E_{total}-ES)(S_{total}-ES)}{ES}$

Durch Umstellen erhält man eine quadratische Gleichung:

$$E_{total} \cdot S_{total} - (E_{total} + S_{total} + K_D) \cdot ES + ES^2 = 0$$

Nach Einsetzen der Werte für E_{total} und S_{total} lässt sich bei bekanntem KD der Wert für ES und damit wiederum der Anteil an Enzym mit gebundenem Substrat berechnen: $y = \frac{ES}{E_{total}}$.

Bei $y \geq 0,95$ kann man von STO-Bedingungen ausgehen.

Pre-steady-state Messungen wurden an einer *Stopped-flow* Anlage (Applied Photophysics SX20) mit Fluoreszenz- und Absorptionsdetektion durchgeführt. Der enzymatische Umsatz durch sTrpC von CdRP zu IGP bei 25 °C in 50 mM HEPPS, pH 7,5, 4 mM EDTA wurde sowohl über photometrische Signaländerung bei 327 nm (Abbau von CdRP) und 278 nm (Bildung von IGP), als auch über fluoreszenzspektrometrische Signaländerung bei Anregung von 280 nm und einem Emissions-*cut-off*-Filter von 335 nm (Bildung von IGP) beobachtet werden. Es wurden für die fluoreszenzspektrometrischen Untersuchungen Enzymkonzentration von 6, 10 und 20 µM (Messzellkonzentration) und Substratkonzentrationen von 0,5, 1 und 2,5 µM (Messzellkonzentration) verwendet. Die optimale Spannung für die

Verstärkung wurde durch Messung mit der höchsten Signaländerung bestimmt, diese wurde dann für die komplette Messreihe konstant gehalten wurde.

Die erhaltenen Messdaten wurden mit Hilfe des Programms Pro-Data Viewer mit einfach und mehrfach exponentiellen Fits ausgewertet und die dadurch erhaltenen Amplituden A und observierten Geschwindigkeitskonstanten λ wurden in Sekundärdiagrammen gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Konzentrationsabhängigkeiten von Amplituden oder Ratenkonstanten geben Hinweise auf Reaktionsschritte, die eventuell bei Messung einer einzigen Konzentration übersehen würden.

Zur Ermittlung der mikroskopischen Ratenkonstanten können die Transienten gleichzeitig einer globalen Analyse unterzogen werden.

3.5.8.3 Auswertung kinetischer Experimente mit *global fit*-Prozeduren (Dynafit)

Mit Hilfe des Programms DynaFit (DynaFit Version 3, BioKin Ltd., Pullman, USA) können unter Annahme eines bestimmten Bindungs- oder Reaktionsmodells mehrere Bindungs- bzw. Umsatzkurven gleichzeitig angepasst werden (globale Analyse). Eine ausführliche Darstellung sowie alle Gleichungsdaten finden sich im Anhang (7.4). Bindungs- und Umsatzkurven von sTrpC mit IGP bzw. CdRP wurden im Fluoreszenzmodus gemessen. Unter Verwendung von DynaFit wurden verschiedene Modelle für den Bindungs- und Reaktionsmechanismus entwickelt und die zugehörigen Differentialgleichungen, welche die zeitliche Änderung der Konzentrationen der verschiedenen angenommenen Spezies beschreiben, in Gleichungsdateien zusammengefasst. Fluoreszenzkoeffizienten wurden als differentielle Koeffizienten berechnet, d.h. als Differenz zwischen der Fluoreszenz von sTrpC und der betrachteten Substanz (wie Ligand, oder Enzym-Ligand-Komplex). Da sämtliche Konzentrationen in μM angegeben wurden, hat der differentielle Fluoreszenzkoeffizient die Einheit μM^{-1} .

Im Falle der STO-Messungen von sTrpC und CdRP und den Bindungsmessungen von rCdRP bzw. IGP an sTrpC wurden die Ratenkonstanten sowie die differentiellen molaren Fluoreszenzkoeffizienten der Komplexe als freie Parameter variiert, bis minimale Abweichungen der über numerische Integration der Differentialgleichungen simulierten Daten von den Meßwerten erreicht wurde.

3.5.9 Thermische Stabilität

3.5.9.1 Thermische Inaktivierung

Die irreversible thermische Inaktivierung erfolgt im einfachsten Fall aus dem gefalteten Ausgangsprotein zum ungefalteten Protein ohne Zwischenschritte. Dies kann durch chemische Modifikation katalytisch essentieller Reste oder durch Aggregation denaturierter Proteinketten hervorgerufen werden. Es wurden Proben von sTrpC-wt und den Mutanten in 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA bei 75, 80, und 85 °C im PCR-Block inkubiert und zu definierten Zeitpunkten Aliquots entnommen. Nach der Entnahme wurden die Proben auf Eis gestellt, kurz abzentrifugiert und anschließend Aktivitätsmessungen bei 25 °C unter Sättigung mit CdRP durchgeführt. Aus den Anfangssteigungen wurden die jeweiligen V_{max} -Werte bestimmt, die graphisch als Restaktivität ($V_{max}(t)/V_{max}(0)$) gegen die Inkubationszeit t aufgetragen wurden. Durch einen einfach exponentiellen Fit wurde die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ermittelt.

3.5.9.2 Thermische Denaturierung

Es wurde der Verlust der Sekundärstruktur infolge thermischer Denaturierung bei 220 nm verfolgt. Die Messungen erfolgten in einer verschließbaren Quarzküvette (Schichtdicke 1 mm) mit den in 3.5.5 genannten Probenbedingungen. Die Temperaturspanne von 25 °C bis 105 °C wurde in Schritten von 1 °C/min durchlaufen. Die Kurve wurde anschließend mit der Sovitzky-Golay-Methode geglättet und mit dem Programm *Denatured Protein* die Schmelztemperatur T_m bestimmt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Mutationsanalyse von sTrpC

4.1.1 Rationales Design von sTrpC zur Erhöhung der Aktivität und thermischen Stabilität

4.1.1.1 Ausgangssituation und Strategie

Die Indolglycerinphosphat-Synthasen (IGPS) aus dem hyperthermophilen Archaeon *Sulfolobus solfataricus* (sTrpC) und dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* (tmTrpC) sind enzymkinetisch gut untersuchte Enzyme. Beide Organismen besitzen ein Wachstumsoptimum bei etwa 80 °C, dennoch unterscheiden sie sich in ihrer katalytischen Aktivität und Stabilität. Betrachtet man steady-state enzymkinetische Messungen bei 25 °C, dann fällt die um den Faktor 14 höhere katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M^{CdRP}) von tmTrpC mit 3,8 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ im Vergleich zu sTrpC mit 0,28 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf. Die höhere Effizienz ist auf die niedrigere Michaelis-Konstante K_M^{CdRP} (0,025 μM im Vergleich zu 0,09 μM) und die höhere Wechselzahl k_{cat} (0,095 s^{-1} im Vergleich zu 0,025 s^{-1}) zurückzuführen (Schneider et al., 2005a). Besonders auffallend ist zudem die unterschiedliche Bindungsstärke des Produktes IGP bei beiden Enzymen. Während IGP an tmTrpC nur mit einem K_P^{IGP} von > 0,3 μM bindet, ist die Affinität von sTrpC mit einem K_P^{IGP} von 0,015 μM deutlich höher (Merz et al., 1999a). Sichtbar wird die starke Produktinhibition schon beim Messen der einzelnen Umsatzkurven unter Fließgleichgewichtsbedingungen, wobei ein linearer Bereich kaum auszumachen ist und die Bestimmung der Anfangssteigung entsprechend fehlerbehaftet ist. Durch transiente Kinetiken wurde in früheren Arbeiten die Dissoziationsrate des IGP von sTrpC-wt bei 37 °C bestimmt. Der dabei ermittelte Wert von $k_{off}^{IGP} = 0,19 \text{ s}^{-1}$ stimmt mit der Wechselzahl $k_{cat} = 0,15 \text{ s}^{-1}$ im Rahmen der Messgenauigkeit überein. Dies bedeutet, dass die Produktfreisetzung im wildtypischen sTrpC den ratenlimitierenden Schritt der Reaktion darstellt (Merz et al., 2000).

Die Raten der thermischen Inaktivierung von sTrpC und tmTrpC differieren bei gleichen Temperaturen im Bereich des Wachstumsoptimums stark. Während sTrpC bei einer Temperatur von 75 °C eine Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 120 min aufweist (Schneider et al., 2005b), liegt für tmTrpC der $t_{1/2}$ -Wert bei über 700 min. Bei 85 °C besitzt sTrpC einen $t_{1/2}$ -Wert von 3,8 min, während der von tmTrpC bei 20,1 min liegt.

(eigene, unpublizierte Daten). Aus diesen Werten wird deutlich, dass tmTrpC deutlich resistenter gegen thermische Inaktivierung ist als sTrpC.

Da sowohl für sTrpC als auch tmTrpC Kristallstrukturen vorhanden sind, wurden mittels Superpositionierung der beiden Enzyme Aminosäuren im Bereich der Ligandenbindungstasche identifiziert, die möglicherweise für die unterschiedliche katalytische Effizienz, Produktinhibition und Inaktivierungsrationen verantwortlich sind. Anschließend wurden die entsprechenden Reste in sTrpC gegen die aus tmTrpC ausgetauscht und die resultierenden Mutanten bezüglich Aktivität und Thermostabilität charakterisiert.

Als Grundlage für die Superpositionierung wurde sTrpC mit gebundenem IGP (1A53) gewählt und mit tmTrpC ohne Ligand (1I4N) überlagert (Abbildung 6).

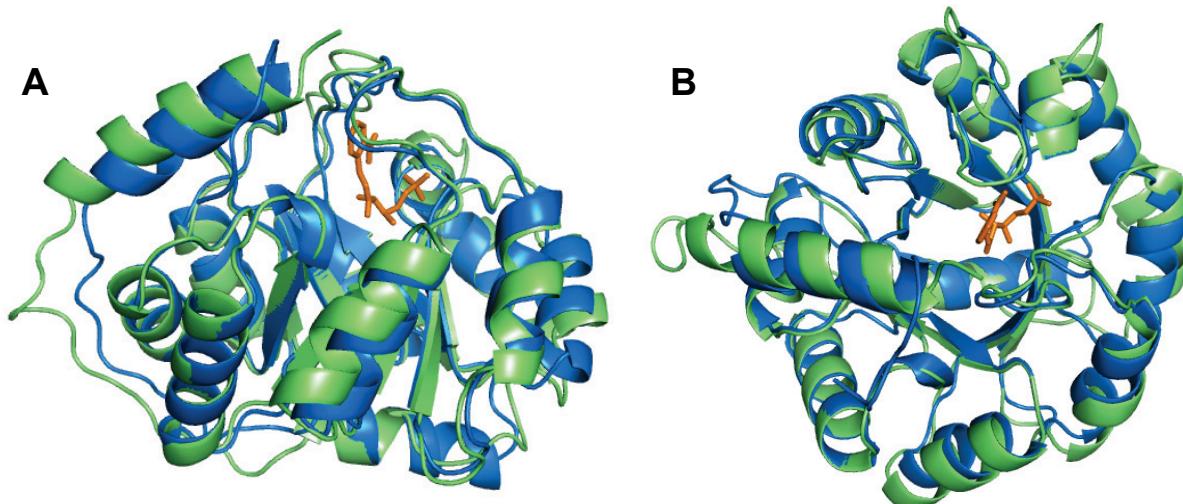


Abbildung 6: Superpositionierung von sTrpC mit gebundenem Produkt IGP (1A53) und tmTrpC ohne Ligand (1I4N).

Bänderdiagramme mit 1A53 in blau und 1I4N in grün. An 1A53 gebundenes IGP ist orange markiert. Die 246 C_α-Atome lassen sich mit einem RMSD-Wert von 1,5 Å überlagern.

A: Seitenansicht der zentralen β-Fässer; B: Aufsicht auf die aktiven Zentren;

Bei genauer Betrachtung der beiden überlagerten Bindungstaschen zeigt sich, dass dort nur wenige Positionen der beiden Enzyme unterschiedliche Aminosäuren aufweisen (Abbildung 7).

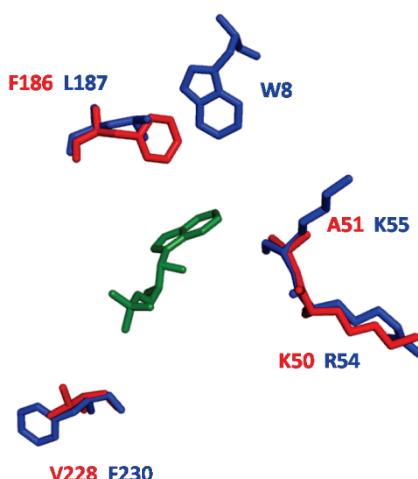


Abbildung 7: Superpositionierung und Darstellung unterschiedlicher Reste in der Bindungstasche von sTrpC und tmTrpC.

Die Reste von sTrpC sind in blau dargestellt, die entsprechenden Reste von tmTrpC sind in rot gezeigt; IGP ist in grün dargestellt.

Der Rest W8 von sTrpC befindet sich in der zusätzlichen α -Helix 00, während R54 und K55 den $\beta\alpha$ -Loop 1 auf der Seite des β -Stranges begrenzen. L187 ist in dem verlängerten $\beta\alpha$ -Loop 6 positioniert, welcher sich direkt über dem aktiven Zentrum befindet. Der Rest F230 liegt im β -Strang 8. Besonders auffallend ist die Position W8, die in der N-terminalen Extension liegt. TmTrpC besitzt ebenfalls eine N-terminalen Extension, die jedoch in dem betrachteten Bereich in der Röntgenstruktur leicht verschoben ist, so dass keine zu W8 äquivalente Aminosäure zugeordnet werden kann. Eine teilweise oder vollständige Deletion der N-terminalen Extension in sTrpC bzw. tmTrpC führt in den resultierenden Proteinen sTrpC Δ 9 und sTrpC Δ 26 bzw. tmTrpC Δ 25 zu einer drastischen Erhöhung des K_M^{CdRP} -Wertes (Schneider et al., 2005b; Stehlin et al., 1997). Dies deutet darauf hin, dass W8 in sTrpC an der Bindung des Substrates (und eventuell auch des Produktes) beteiligt ist. Da in tmTrpC an der vergleichbaren Stelle in der Struktur keine Aminosäure vorhanden ist, wurde W8 in sTrpC sowohl gegen Alanin (kleiner Rest), sowie gegen Aspartat (geladener Rest) ausgetauscht. Die weiteren in Abbildung 7 dargestellten Reste am aktiven Zentrum von sTrpC wurden gegen die entsprechenden Aminosäuren aus tmTrpC ausgetauscht: Das Arginin an Position 54 wurde gegen ein Lysin (R54K), das Leucin an Position 187 gegen ein Phenylalanin (L187F) und das Phenylalanin an Position 230 gegen ein Valin (F230V) ausgetauscht. Zusätzlich zu R54K wurde Lysin 55 durch ein Alanin (K55A) getauscht, um die Abfolge von drei hintereinander liegenden Lysinen zu vermeiden. Das benachbarte Lysin 53 ist an der Koordination der Carboxylgruppe von CdRP und vermutlich auch an der Initiation des Ringschlusses zum Indol beteiligt (Hennig et al., 2002).

4.1.1.2 Klonierung der Mutanten

Als Templat für die Mutagenese diente das in pET21a(+) klonierte wildtypische *strpC* Gen (Schneider, 2004). Ausgehend davon wurden folgende Mutanten mittels OE-PCR (3.3.8.2) oder Megaprimer-PCR (3.3.8) kloniert: W8A, W8D, R54K+K55A, L187F, F230V. Als Vektor für die Klonierung der mutierten Gene wurde wiederum pET21a(+) gewählt, da dadurch C-terminal an das rekombinante Protein ein Hexahistidin-Tag angefügt wurde und hiermit die Reinigung über Metallchelataffinitätschromatographie möglich war (3.4.2). Als Primerpaare für die PCR wurden jeweils 5'- und 3'- Oligonucleotide mit den entsprechenden Austauschen (2.3.3) verwendet. Nach der Synthese des Vollängenprodukts wurden sowohl der Vektor als auch die über ein Gel gereinigten Fragmente mit *Nhe*I und *Xho*I verdaut (3.3.6.1) und anschließend ligiert (3.3.6.2). Mit dem Ligationsansatz wurden NEB T7 Turbo Zellen (2.1) transformiert (3.2.3) und auf LB_{Amp}-Medium ausplattiert. Mittels Kolonie-PCR (3.3.7.1) wurden Einzelkolonien identifiziert, welche das Plasmid mit Insert enthielten. Die beabsichtigte Basenfolge wurde in allen Fällen durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

4.1.1.3 Heterologe Genexpression in *E.coli*

Mit Plasmidpräparationen der erstellten Konstrukte wurden chemisch kompetente *E. coli* Rosetta oder Rosetta 2 Zellen (2.1) transformiert (3.2.3) und auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika (2.1, 2.2) ausplattiert. Ausgehend von Einzelkolonien wurden Probeexpressionen (3.4.1.1) durchgeführt und Klone mit hoher Proteinproduktion zur präparativen Expression ausgewählt (3.4.1.2). Die Ergebnisse waren für sTrpC-wt und die hergestellten Mutanten ähnlich und werden in Abbildung 8 am Beispiel des wildtypischen Enzyms gezeigt.

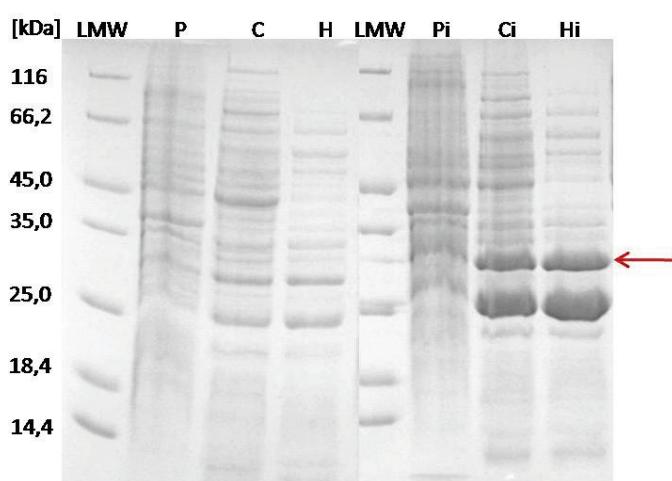


Abbildung 8: Herstellung von sTrpC-wt im analytischen Maßstab, dokumentiert mittels SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).

LMW = Größenstandard, low molecular weight; P = Pellet; C = Crude extract; H = Hitzeschritt bei 65 °C; i = Induktion der Expression mit 0,5 mM IPTG bei OD₆₀₀ = 0,6; Der Pfeil markiert sTrpC-wt, die prominente Bande bei etwa 25 kDa zeigt in den Expressionszellen überexprimierte Chaperone an.

Zur präparativen Expression wurden jeweils 2 Liter LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit einer Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und bei einer OD_{600} von ungefähr 0,6 mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden am nächsten Tag geerntet und mittels Ultraschall aufgeschlossen (3.4.2).

4.1.1.4 Reinigung der rekombinanten sTrpC-Proteine

Da es sich bei sTrpC um ein Enzym aus einem hyperthermophilen Organismus handelt, konnte ein erster Anreicherungsschritt durch einen Hitzeschritt bei 65 °C für 15 min erfolgen. Hierbei denaturierte ein Großteil der Wirtsproteine und wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Die abschließende Reinigung erfolgte über Metallchelataffinitätschromatographie (3.4.2). Die Elution der Proteine wurde mittels eines Imidazolgradienten durchgeführt und über die Messung der Absorption bei 280 nm und 260 nm verfolgt. Wildtypisches sTrpC und die Mutanten eluierten jeweils bei einer Imidazolkonzentration von ungefähr 200 mM. In Abbildung 9 A ist exemplarisch das Elutionsprofil von sTrpC-wt gezeigt.

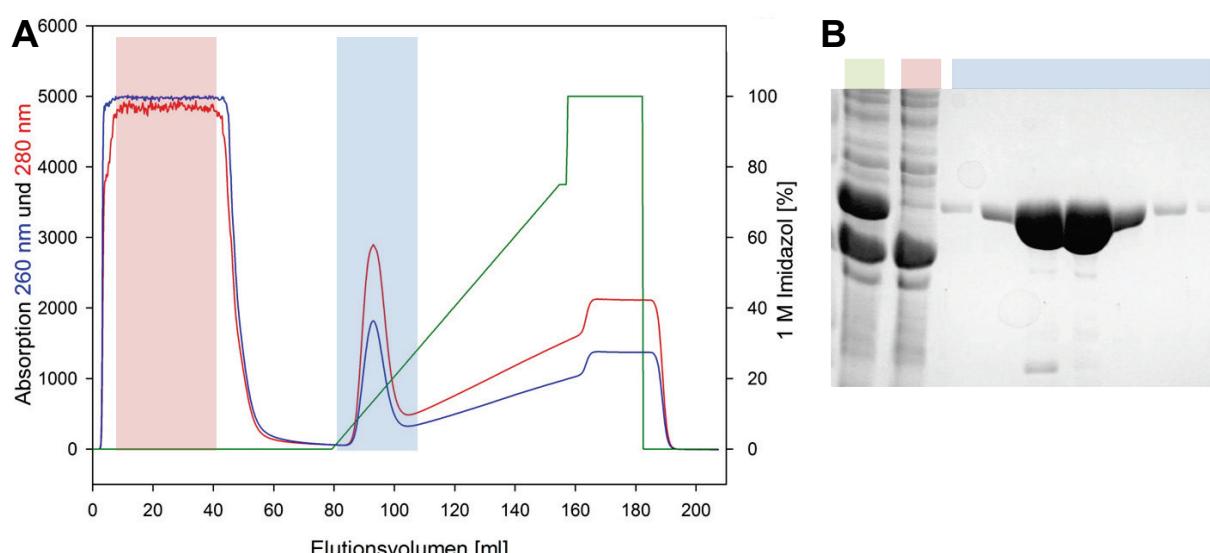


Abbildung 9: Reinigung des rekombinant exprimierten sTrpC-wt Proteins.

A: Elutionsprofil der Reinigung über Metallchelataffinitätschromatographie, aufgenommen über die Messung der Absorption bei 260 (blau) und 280 nm (rot). Die Elution erfolgte über einen Gradient von 0-600 mM Imidazol (grün). Der Durchlauf ist rot, der Elutionsbereich ist blau hinterlegt.

B: SDS-PAGE (12,5% Acrylamid) der aufgetragenen Probe (grün), des vereinigten Durchlaufs (rot) und der Elutionsfraktionen mit sTrpC-wt (blau).

Die Analyse ausgewählter Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (2.11.3) (Abbildung 9 B). Die Fraktionen mit gereinigtem Protein wurden vereinigt und zur Entfernung des Imidazols und des KCl zweimal gegen 5 Liter 100 mM KP pH 7,5 bei 4 °C für mindestens 4 Stunden dialysiert. Nach der photometrischen

Konzentrationsbestimmung (3.5.1) wurden die Proteine in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80 °C gelagert.

Der Anteil an löslichem Protein im Zellextrakt bewegte sich zwischen 80 % und 95 %, die Reinheit lag bei > 95 %, der Quotient A_{280}/A_{250} war immer größer als 1,8, so dass Verunreinigungen durch Nukleinsäuren oder Nukleotide ausgeschlossen werden konnten. Die Ausbeuten schwankten zwischen 5 und 30 mg aus einem Liter Zellkultur, je nach sTrpC-Protein und verwendeten Expressionszellen (2.1).

4.1.1.5 Charakterisierung der gereinigten sTrpC-Proteine

4.1.1.5.1 Steady-state Enzymkinetik

Um die Effekte der Austausche zuverlässig bestimmen und Artefakte durch unterschiedlich aufgereinigtes Substrat, oder andere systematische Fehler ausschließen zu können, wurde sTrpC-wt mit jeder synthetisierten Charge des Substrates CdRP erneut vermessen. Alle Messungen wurden bei 25 °C und in 50 mM HEPPS/KOH pH 7,5 mit 4 mM EDTA durchgeführt. Die Enzyme wurden vor Verwendung über NAP-Säulen in den Messpuffer umgepuffert und 30 min bei 4 °C zentrifugiert, um eventuelle Aggregate abzutrennen. Anschließend wurde erneut eine photometrische Konzentrationsbestimmung (3.5.1) durchgeführt.

Der Umsatz von CdRP zu IGP durch sTrpC kann fluorimetrisch detektiert werden. Hierbei wird die Produktbildung nach Anregung bei 280 nm und über die Zunahme der Emission bei 350 nm verfolgt.

In Abbildung 10 ist beispielhaft eine Sättigungskurve für sTrpC-wt gezeigt, wobei die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen ist.

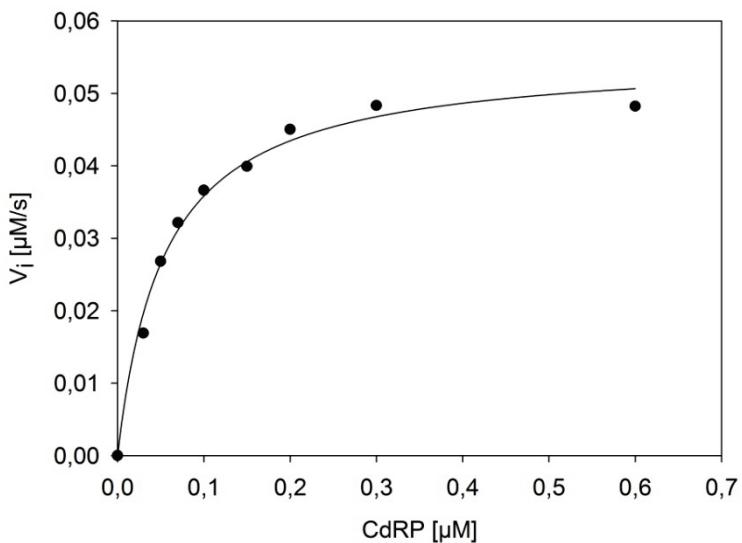


Abbildung 10: Sättigungskurve von sTrpC-wt.

Die zugrunde liegenden Umsatzkurven wurden in 50 mM HEPES/KOH, pH 7,5 und 4 mM EDTA bei 25 °C aufgenommen. Es wurden 0,05 - 0,6 μM CdRP durch 0,01 μM sTrpC-wt umgesetzt und die gemessenen Raten auf 1 μM Enzym umgerechnet. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis eines Computerfits (Sigma Plot) mit einer hyperbolischen Funktion. Daraus wurde ein K_M^{CdRP} von 0,05 μM und ein k_{cat} von 0,055 s⁻¹ ermittelt.

Die durch einen hyperbolischen Fit der Kurve ermittelten Werte für $k_{cat} = 0,06 \text{ s}^{-1}$ und $K_M^{CdRP} = 0,05 \mu\text{M}$ sind den veröffentlichten Werten von $k_{cat} = 0,025 \text{ s}^{-1}$ und $K_M^{CdRP} = 0,09 \mu\text{M}$ (Schneider et al., 2005b) bzw. $k_{cat} = 0,03 \text{ s}^{-1}$ und $K_M = 0,04 \mu\text{M}$ (Merz et al., 2000) sehr ähnlich.

In Tabelle 3 sind die katalytischen Parameter von sTrpC-wt und der Mutanten im Vergleich mit tmTrpC-wt aufgeführt.

Tabelle 3: Steady-state enzymkinetische Parameter: auf der Basis von tmTrpC hergestellte sTrpC-Einzelmutanten im Vergleich mit sTrpC-wt und tmTrpC-wt.

Angegeben für k_{cat} und K_M^{CdRP} sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Sättigungskurven. Messbedingungen: 50 mM HEPES pH 7,5, 4 mM EDTA, 25 °C.

^a: Schneider et al. (2005)

Protein	$k_{cat} [\text{s}^{-1}]$	$K_M^{CdRP} [\mu\text{M}]$	$k_{cat}/K_M^{CdRP} [\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$
sTrpC-wt	0,06 ($\pm 0,0017$)	0,05 ($\pm 0,0058$)	1,20
sTrpC-W8A	0,13 ($\pm 0,0022$)	1,40 ($\pm 0,0830$)	0,09
sTrpC-W8D	0,13 ($\pm 0,0036$)	2,60 ($\pm 0,2698$)	0,05
sTrpC-R54K+K55A	0,10 ($\pm 0,0028$)	1,60 ($\pm 0,1457$)	0,06
sTrpC-L187F	0,04 ($\pm 0,0004$)	0,05 ($\pm 0,0025$)	0,80
sTrpC-F230V	0,04 ($\pm 0,0017$)	1,70 ($\pm 0,1972$)	0,02
tmTrpC-wt ^a	0,095	0,025	3,8

Die Daten zeigen, dass bei allen Mutanten, außer L187F, die Michaeliskonstante K_M^{CdRP} deutlich ansteigt (Faktor 28 bis 52), während die Wechselzahl k_{cat} sich von sTrpC-wt um maximal den Faktor 2 unterscheidet. Dies bedeutet, dass die Mutationen die Substratbindung merklich beeinträchtigen, jedoch kaum Auswirkung auf die Katalyse haben. Damit wurde die durch die Mutationen angestrebte Annäherung der katalytischen Effizienz von sTrpC an die von tmTrpC-wt nicht erreicht.

Von W8 ist bekannt, dass es Teil der Substratbindetasche ist (Hennig et al., 2002) und zusammen mit F89 die Anthranilateinheit des CdRP ausrichtet. Neben dem Wegfall hydrophober Wechselwirkungen zwischen dem Indolring von W8 und dem Substrat resultieren die Substitutionen W8A und W8D möglicherweise in einer anderen Ausrichtung von F89 und des benachbarten Y88 was zur Abnahme der Substrataffinität beitragen könnte (Abbildung 11 A). Die Austausche R54K+K55A führen ebenfalls zu einer stark erhöhten Michaeliskonstante. Aus den Röntgenstrukturen deutet der Austausch R54K auf keine räumliche Änderung der Bindungstasche hin, während K55 in Richtung von Y88 deutet und der Austausch K55A somit ähnliche indirekte Konsequenzen wie die W8A und W8D Austausche haben könnte (Abbildung 11B).

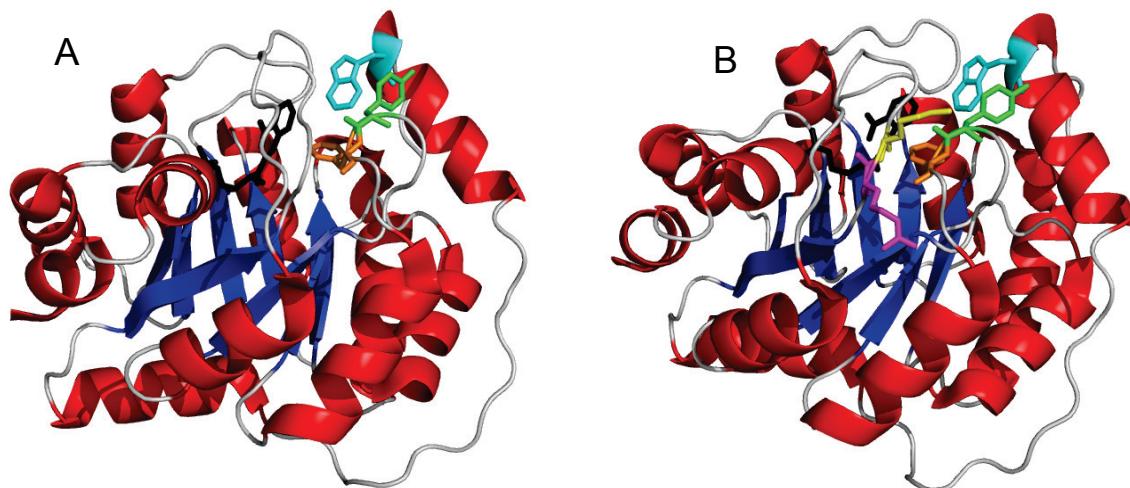


Abbildung 11: Röntgenstruktur von sTrpC mit gebundenem Substrat CdRP (schwarz).

A: W8 ist in cyan, Y88 in grün, F89 in orange gezeigt.

B: R54 ist in pink, K55 in gelb, W8 in cyan, Y88 in grün und F89 in orange gezeigt.

Die deutlich erhöhte Michaeliskonstante der F230V Mutante lässt sich anhand der Röntgenstruktur nicht erklären, da die Seitenkette der Position F230 dem Substrat abgewandt ist und in Richtung der α -Helix 8 zeigt.

4.1.1.5.2 Thermische Stabilität

Die thermische Stabilität von Enzymen kann durch mindestens zwei unterschiedliche Methoden quantifiziert werden. Durch thermische Denaturierung verliert ein Enzym neben seiner Tertiär- auch seine Sekundärstruktur, was sich über die Abnahme des Fern-UV-Signals verfolgen lässt. Aus den Auffaltungskurven lässt sich die Schmelztemperatur T_M bestimmen, bei der 50 % des Proteins im ungefalteten Zustand vorliegen. Durch thermische Inaktivierung wird die Halbwertszeit $t_{1/2}$ bestimmt. Sie sagt aus, nach welcher Zeit ein Enzym noch 50 % der ursprünglichen Aktivität aufweist und ist somit ein Indikator für die Stabilität des aktiven Zentrums. Die hergestellten sTrpC Mutanten wurden sowohl mittels thermischer Denaturierung als auch Inaktivierung mit sTrpC-wt verglichen.

In Abbildung 12 sind die thermischen Denaturierungskurven gezeigt.

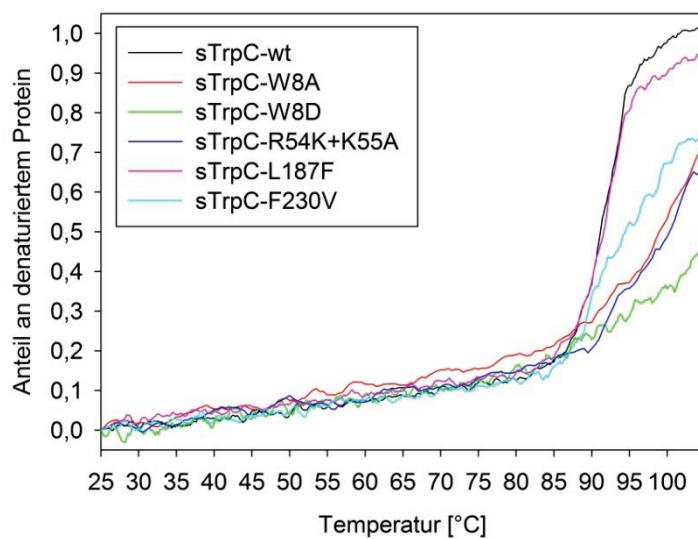


Abbildung 12: Thermische Denaturierung: auf der Basis von tmTrpC hergestellte sTrpC-Einzelmutanten im Vergleich mit sTrpC-wt.

Die Messungen erfolgten in 10 mM KP, pH 7,5 mit 8 – 12 μ M Protein. Das CD Signal bei 220 nm wurde normiert und die Kurven wurden mit der Savitzky-Golay-Methode geglättet. Die Auswertung durch das Programm Denatured Protein ergab einen T_M von 92 °C für sTrpC-wt sowie die Mutante L187F. Von den anderen Varianten konnten aufgrund der unkooperativen Auffaltung keine T_M -Werte bestimmt werden.

Ein Vergleich der Auffaltungskurven der sTrpC-Mutanten W8A, W8D, R54K+K55A und F230V mit der von sTrpC-wt zeigt, dass keine der Austausche zu Einbußen in der thermischen Stabilität führt (Abbildung 12). Die Denaturierung beginnt, ebenso wie bei sTrpC-wt jeweils bei etwa 87 °C, erfolgt jedoch mit Ausnahme von L187F mit deutlich geringerer Kooperativität. Dadurch war der Denaturierungsvorgang bei der höchsten experimentellen Temperatur von 105 °C noch nicht abgeschlossen, weshalb für die restlichen sTrpC-Mutanten keine exakten Schmelzpunkte ermittelt werden konnten.

Bei der thermischen Inaktivierung wurden die sTrpC-Enzyme einer Temperatur von 75 °C ausgesetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten die Restaktivität mittels *steady-state* Enzymkinetik unter Substratsättigung bei 25 °C bestimmt. Nach Auftragung der Restaktivität gegen die Inkubationszeit wurde mittels eines einfach exponentiellen Fits die Halbwertszeit bestimmt. Exemplarisch ist die thermische Inaktivierungskurve von sTrpC-wt in Abbildung 13 gezeigt, aus der ein $t_{1/2}$ -Wert von 120 min ermittelt wurde.

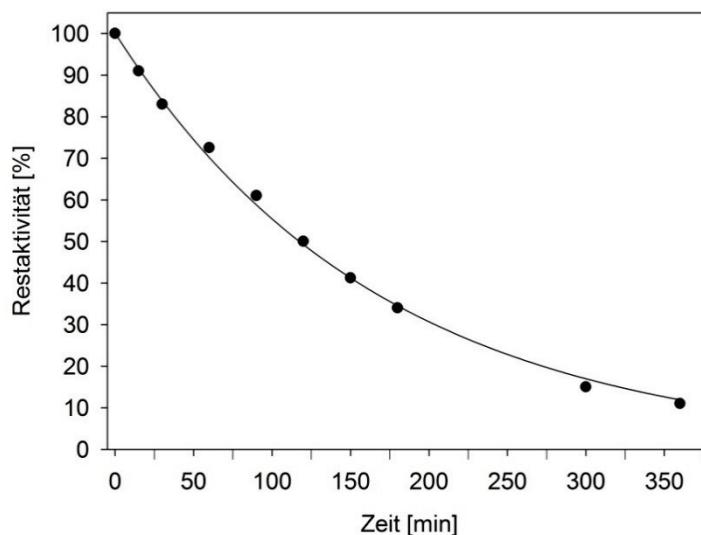


Abbildung 13: Thermische Inaktivierung von sTrpC-wt.

Eine Stammlösung von 0,2 µM sTrpC-wt wurde bei 75 °C in 50 mM HEPES, pH 7,5 4 mM EDTA inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und nach Zugabe von 1 µM CdRP die Restaktivität bei 25 °C ermittelt. Die aus dem exponentiellen Fit berechnete Halbwertszeit $t_{1/2}$ beträgt 120 min.

In Tabelle 4 sind die $t_{1/2}$ -Werte von sTrpC-wt und der Mutanten sowie von tmTrpC bei 75 °C und, soweit gemessen, bei 85 °C aufgeführt.

Tabelle 4: Halbwertszeiten der thermischen Inaktivierung: auf der Basis von tmTrpC hergestellte sTrpC-Einzelmutanten im Vergleich mit sTrpC-wt und tmTrpC-wt.
Die Inkubation erfolgte jeweils in 50 mM HEPPS, pH 7,5, 4 mM EDTA. Die Restaktivitäten wurden bei 25 °C gemessen.

Protein	t _{1/2} (75 °C) [min]	t _{1/2} (85 °C) [min]
sTrpC-wt	120	3,8
sTrpC-W8A	48	---
sTrpC-W8D	37	---
sTrpC-R54K+K55A	163	---
sTrpC-L187F	690	10,2
sTrpC-L187W	690	---
sTrpC-F230V	91	---
tmTrpC-wt	---	20,1

Während der Austausch F230V zu einer leichten Abnahme und die Austausche R54K+K55A zu einer geringen Zunahme der Halbwertszeit führen, zeigen die Mutationen W8A und W8D eine um etwa den Faktor drei erniedrigte Halbwertszeit. Diese Effekte sind allesamt für eine schlüssige Interpretation zu gering.

Auffallend ist dagegen der durch den Austausch L187F verursachte deutliche Anstieg des t_{1/2} (75 °C)-Wertes von 120 auf 690 min. Da die für eine so hohe Halbwertszeit erforderliche lange Inkubationszeit zu Artefakten führen kann, wurden die Messungen für sTrpC-wt und die L187F Mutante bei 85 °C wiederholt, wobei t_{1/2}-Werte von 3,8 min bzw. 10,2 min ermittelt wurden; tmTrpC zeigt bei dieser Temperatur eine Halbwertszeit von 20,1 min (Tabelle 4). Der Austausch L187F bewirkt somit eine deutliche Stabilisierung des aktiven Zentrums von sTrpC, die jedoch noch nicht die von tmTrpC erreicht. Um diesen Befund zu verstehen, wurde mit Hilfe des Programmes Yasara in die veröffentlichte Struktur (1IGS) von sTrpC-wt an die Position 187 ein Phenylalanin mit Hilfe einer Amber-Energieminimierung modelliert. In Abbildung 14 A ist zu erkennen, dass sich das modellierte F187 bei sTrpC in das aktive Zentrum hineindreht, während dies der kürzeren Seitenkette von L187 nicht in vergleichbarem Maße möglich ist. In der berechneten Struktur interagiert die Seitenkette von F187 mit der gegenüberliegenden Seitenkette von W8 über ein *stacking* der aromatischen Ringe (Entfernung ~3 Å). Bei Betrachtung der Röntgenstruktur von tmTrpC in Abbildung 14 B ist eine ähnliche Situation zu erkennen, wobei jedoch ein zu W8 äquivalenter Rest fehlt. Der nächstgelegene hydrophobe Rest ist P53, dessen Seitenkette aber aufgrund der relativ großen

Entfernung von 4 Å mit dem wildtypischen F186 eventuell nur schwach wechselwirkt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die erhöhte Halbwertszeit der L187F-Mutante von sTrpC auf die Interaktion der neu eingeführten Seitenkette mit dem Indolring an W8 zurückgeht, während das aktive Zentrum von tmTrpC auf andere Weise effizient geschützt wird.

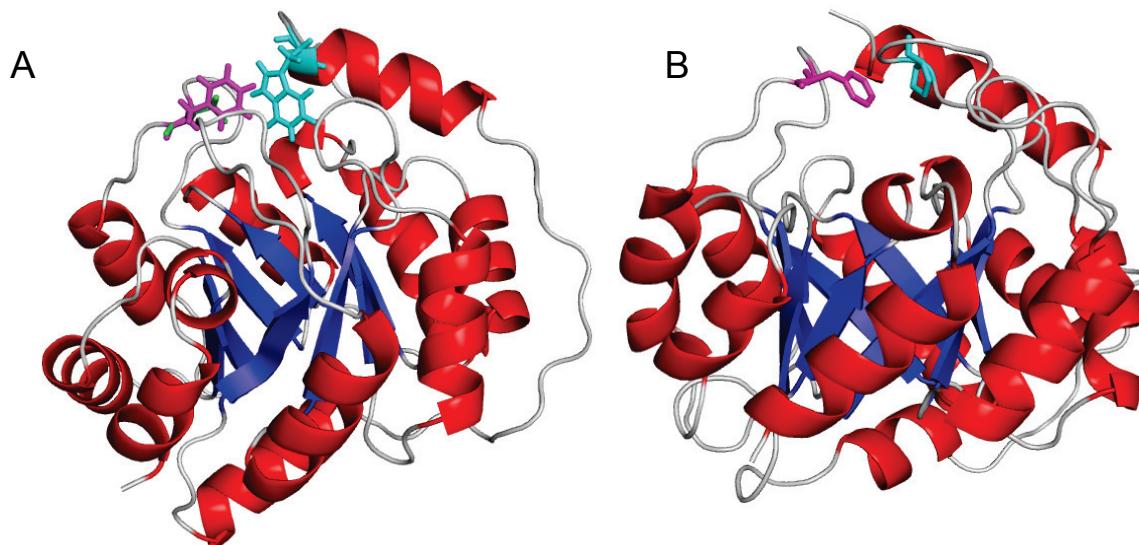


Abbildung 14: Röntgenstrukturen von (A) sTrpC (1IGS) mit modelliertem F187 und (B) tmTrpC (1I4N).

In A) ist der wildtypische Rest L187 (grün) und das mit Yasara modellierte F187 (pink) gezeigt, sowie W8 (cyan). In B) sind F186 in pink und P53 in cyan dargestellt.

Zur weiteren Überprüfung der Position 187 wurde statt eines Phenylalanins die noch größere Aminosäure Tryptophan eingebaut. Die sTrpC-Mutante L187W wurde wie in 4.1.1.2 beschrieben kloniert, exprimiert (4.1.1.3) und gereinigt (4.1.1.4). Das Absorptionspektrum nach der Dialyse in 100 mM KP-Puffer zeigte ein Protein-Spektrum mit leichter Aggregationstendenz und Nukleotidanteil. Durch diese Beeinflussung des Spektrums war eine genaue Proteinkonzentrationsbestimmung nicht möglich, weshalb die katalytischen Parameter nicht zuverlässig bestimmt werden konnten. Eine grobe Abschätzung ergab eine Erniedrigung des k_{cat} -Wertes um etwa den Faktor 10 und einen moderaten Anstieg von K_M^{CdRP} . Bei Betrachtung einzelner Umsatzkurven waren nach dem Starten der Reaktion zwei Schritte zu beobachten. Auf eine erste schnelle *pre-steady-state* Phase (als deutlicher *burst* zu erkennen), folgte eine zweite, langsamere *steady-state* Phase. Dies deutet darauf hin, dass die Freisetzung des Produktes IGP in dieser Mutante enorm verlangsamt ist. Thermische Inaktivierung bei 75 °C ergab einen $t_{1/2}$ -Wert von 690 min (Tabelle 4). Dies unterstützt die Theorie, dass eine hydrophobe Aminosäure an Position 187 das

aktive Zentrum durch die Interaktion mit W8 stabilisiert. Ebenso wie L187F zeigt auch die L187W-Mutante bei thermischer Denaturierung eine zu sTrpC-wt identische Schmelzkurve mit einem T_m -Wert von 92 °C (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass die konformationelle Stabilität des Proteins durch diese Austausche an Position 187 nicht erhöht wird.

4.1.1.6 Kombination von Einzelmutationen

Die bisher untersuchten Mutanten sTrpC-W8A, W8D, R54K+K55A, L187F und F230V näherten sich in Bezug auf Stabilität und Aktivität nicht in erhofftem Ausmaß an tmTrpC-wt an (Tabelle 3, 4). Im Folgenden wurde untersucht, ob sich durch das gleichzeitige Einführen mehrerer Mutationen deutlichere Effekte erzielen lassen. Die Austausche W8A und W8D wurden dabei aufgrund der drastischen Destabilisierung des aktiven Zentrums nicht weiter berücksichtigt. Da die Mutante sTrpC-R54K+K55A eine leicht erhöhte Wechselzahl (Tabelle 3) und Halbwertszeit (Tabelle 4) aufweist, wurde sie mit dem in isolierter Form weitgehend neutralen Austausch F230V kombiniert. Eine weitere Mutante enthielt zusätzlich zu diesen drei Austauschen die L187F Substitution. Die neuen Konstrukte wurden wie in 4.1.1.2 beschrieben kloniert, exprimiert (4.1.1.3), gereinigt (4.1.1.4) und analysiert (4.1.1.5).

Die *steady-state* kinetischen Parameter und Halbwertszeiten der Inaktivierung bei 75 °C der neuen Mutanten sind zusammen mit denen der bereits diskutierten Mutanten in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Steady-state enzymkinetische Parameter und Halbwertszeiten der thermischen Inaktivierung: auf der Basis von tmTrpC hergestellten sTrpC-Mehrfachmutanten im Vergleich mit Einzelmutanten, sTrpC-wt und tmTrpC-wt.

Pufferbedingungen für Aktivitätsmessungen bei 25 °C und Inaktivierung bei 75 °C: 50 mM HEPPS, pH 7,5, 4 mM EDTA. ^a: Schneider et al. (2005).

Protein	k_{cat} [s ⁻¹]	K_M^{CdRP} [μM]	k_{cat}/K_M^{CdRP} [μM ⁻¹ s ⁻¹]	$t_{1/2}$ (75 °C) [min]
sTrpC wt	0,06	0,05	1,2	120
sTrpC-R54K+K55A	0,10	1,60	0,06	163
sTrpC-L187F	0,04	0,05	0,80	690
sTrpC-F230V	0,04	1,70	0,02	91
sTrpC-R54K+K55A+F230V	0,11	1,60	0,07	31
sTrpC-R54K+K55A+L187F+F230V	0,05	1,20	0,04	81
tmTrpC-wt ^a	0,095	0,025	3,8	> 700

Die enzymkinetischen Parameter von sTrpC-R54K+K55A+F230V entsprechen denen von R54K+K55A, während der $t_{1/2}$ (75 °C) Wert durch die zusätzliche Mutation von 163 auf 31 min sinkt. Dies bedeutet, dass die destabilisierende Wirkung von F230V im Kontext der R54K+K55A Austausche deutlich stärker ausgeprägt ist als im Kontext von sTrpC-wt.

Durch das nachfolgende Einfügen des Austausches L187F steigt die Halbwertszeit auf 81 min an, das bedeutet die stabilisierende Wirkung dieser Mutation zeigt sich auch im Kontext der anderen drei Austausche. Die wildtypische Stabilität von 120 min wird jedoch nicht wieder erreicht.

4.1.1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse mit den auf der Basis von tmTrpC hergestellten sTrpC-Mutanten

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Veränderung des aktiven Zentrums von sTrpC nach dem Vorbild von tmTrpC bestenfalls zu einer leichten Verbesserung des k_{cat} -Wertes, jedoch nicht zu einer Erhöhung der katalytischen Effizienz führte. Die Bindung des Produktes IGP wurde nicht näher charakterisiert, da aus den Umsatzkurven immer noch von einer sehr affinen Bindung des Produktes ausgegangen werden kann, womit auch hier keine Verbesserung erzielt werden konnte. Nur der Austausch L187F führte zu einer deutlichen Erhöhung der Halbwertszeit der thermischen Inaktivierung. Die Resultate erbrachten jedoch neue Erkenntnisse über die Substratbindung, da mit Ausnahme von L187F alle Mutationen zu einer drastischen Erhöhung der Michaeliskonstante für CdRP führten.

Neben rationalem Design, das auf der Analyse und dem Vergleich von Röntgenstrukturen beruht, treten zunehmend bioinformatische Ansätze zur gezielten Modifizierung von Proteinen in den Vordergrund. Ein diesbezüglicher Algorithmus wurde von PD Dr. R. Merkl (Lehrstuhl Biochemie II, Universität Regensburg) entwickelt und im Rahmen dieser Arbeit erstmals am Beispiel von sTrpC experimentell validiert. Die Grundlagen des als H2r bezeichneten Programmes (Merkl und Zwick, 2008) und die auf der Basis dieser Vorhersagen hergestellten Mutanten werden im folgenden Kapitel beschrieben.

4.1.2 Validierung der durch H2r als auffällig beschriebenen Positionen in sTrpC

Das Programm H2r, welches im Folgenden genauer beschrieben wird, bewertet anhand von multiplen Sequenzalignments (MSA) auffällige Positionen im Bezug auf ihre Vernetzung mit anderen Positionen, sowie coevolvierende Positionen. Es besteht jedoch bei Verwendung von MSAs die Gefahr, dass aus einem ungenügend gefiltertem MSA verzerrte Häufigkeiten abgeleitet werden, da identische oder sehr ähnliche Sequenzen nahe verwandter Mikroorganismen überrepräsentiert sein können. Dies würde sich in Perturbationsanalysen durch das Auftreten konservierter Reste anstelle von korrelierten Mustern bemerkbar machen. Aus diesem Grund wird vor der eigentlichen Analyse das eingegebene MSA durch H2r prozessiert, um die Güte der Analyse zu steigern. Es werden alle Sequenzen eliminiert, die im paarweisen Vergleich einen oberen Schwellenwert identischer Positionen über- bzw. einen unteren Schwellenwert unterschreiten. Die Kernidee des Programmes besteht darin, auf der Basis eines zuverlässigen MSAs das Vorkommen von Aminosäure a_i an Position k in Abhängigkeit von der Besetzung a_j an Position l zu analysieren. Das Besondere ist hier jedoch, dass an Position k jede Aminosäure in die Analyse einbezogen wird, statt nur die häufigste, wie in anderen Programmen (Suel et al., 2003). Die Vorgehensweise von H2r wird in Abbildung 15 veranschaulicht.

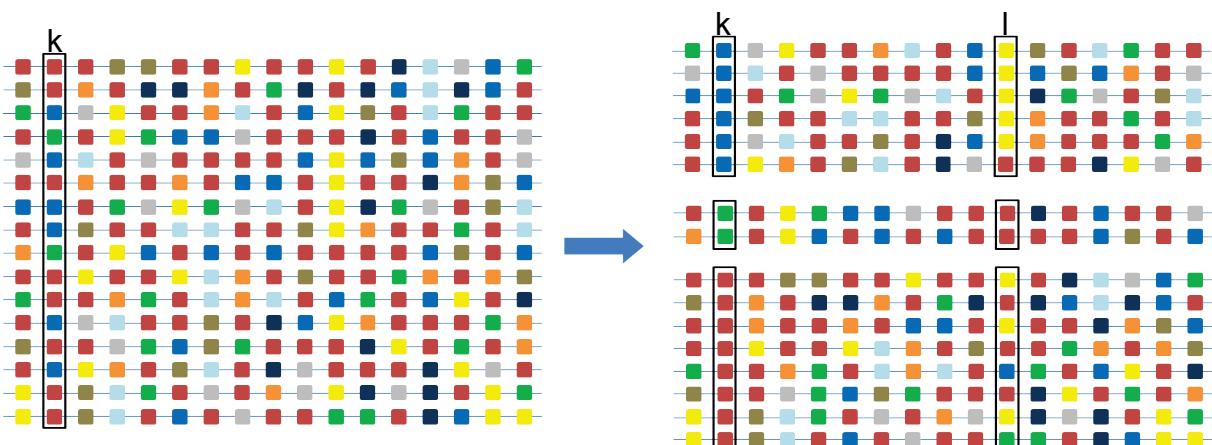


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Arbeitsweise von H2r.

Links: Schematische Darstellung eines MSAs. Jede Sequenz ist durch eine blaue Linie gekennzeichnet, die einzelnen Aminosäuren werden durch Kästchen dargestellt. Die Farben stehen für verschiedene Aminosäuren. Betrachtet man die Spalte k und sortiert die Sequenzen nach an dieser Position vorkommenden Aminosäuren, erhält man eine neue Anordnung (rechts) und kann nun die Häufigkeit einer Aminosäure a_j an Position l betrachten. In der Abbildung sind 2 coevolvierende Reste dargestellt (Position k = blau mit Position l = gelb und Position k = grün mit Position l = rot), und ein von Position l unabhängig evolvierender Rest (Position k = rot).

Es gibt mehrere Verfahren, um die Konserviertheit einzelner Positionen und die gegenseitige Abhängigkeit in der Besetzung mit Resten zu quantifizieren. Ein häufig verwendetes Maß um das Vorkommen von Aminosäuren an Position k zu quantifizieren ist die Entropie $H(k)$, welche nach Formel 9 berechnet wird. Hierbei ist $f(a_i^k)$ die relative Häufigkeit mit der Aminosäure a_i an Position k vorkommt. Um positive Werte zu erhalten, wird die Summe negiert.

$$H(k) = - \sum_{i=1}^{20} f(a_i^k) \ln f(a_i^k)$$

Formel 9: Berechnung der Entropie der Position k .

Die Entropie $H(k)$ macht eine Aussage über die Häufigkeit der Aminosäure a_i an Position k .

Völlig analog kann die Kopplung zwischen den Aminosäurehäufigkeiten zweier Positionen k und l bestimmt und mit Hilfe von Formel 10 die gemeinsame Entropie $H(k, l)$ berechnet werden.

$$H(k, l) = - \sum_{i=1}^{20} f(a_i^k, a_j^l) \ln f(a_i^k, a_j^l)$$

Formel 10: Berechnung der Entropie zweier Positionen k und l .

Die Entropie $H(k, l)$ bewertet das gemeinsame Vorkommen der Aminosäuren a_i an Position k und a_j an Position l .

Es hat sich bewährt die gegenseitige Abhängigkeit in der Aminosäurekomposition mit Hilfe eines normierten Wertes zu quantifizieren. Gut geeignet dafür ist z.B. $U(k, l)$ (Press et al., 1992), der nach Formel 11 berechnet wird.

$$U(k, l) = 2 \frac{H(k) + H(l) - H(k, l)}{H(k) + H(l)}$$

Formel 11: Ein normiertes Maß für die gegenseitige Abhängigkeit der Aminosäurekompositionen an den Positionen k und l .

$U(k, l)$ nimmt Werte zwischen 0 und 1 an. Sind die Spalten k und l komplett unabhängig ist $U(k, l) = 0$, bei einer vollständigen Abhängigkeit der beiden Spalten ist $U(k, l) = 1$. Hohe Werte bei der Analyse zweier Spalten deuten somit auf die Kopplung in der Besetzung mit Aminosäuren an den Positionen k und l hin. Da die Entropie $H(k, l)$ aus der Häufigkeit $f(a_i^k, a_j^l)$ bestimmt wird und die Häufigkeiten $f(a_i^k, a_j^l)$ für alle 20 mal 20 Kombinationen geschätzt werden müssen, muss das

MSA hinreichend viele Sequenzen enthalten. Es hat sich gezeigt, dass 125 Sequenzen die untere Grenze für solche Analysen darstellen (Martin et al., 2005). Aus den Entropien der Einzelpositionen k , l und dem Wert $H(k, l)$ lässt sich mit $MI(k, l) = H(k) + H(l) - H(k, l)$ die sogenannte *mutual information* bestimmen. Dieser Wert war oft die Grundlage für Analysen von coevolvierenden Positionen, jedoch wurde gezeigt, dass nicht normalisierte *MI*-Werte nur ein schwacher Indikator für Coevolutionsvorhersagen sind (Martin et al., 2005). Aber auch normalisierte *MI*-Werte können zu Fehlinterpretationen führen, vor allem bei weniger stark korrelierten Positionen. Um die Spezifität der Vorhersagen zu verbessern, werden in H2r Konzepte der Netzwerkanalyse genutzt. Hierbei wird angenommen, dass ein Rest der an mehreren auffälligen Kopplungen beteiligt ist, mit höherer Wahrscheinlichkeit eine wichtige Funktion im Protein besitzt, als wenn eine Kopplung mit nur einer anderen Position vorliegt. Im Rahmen einer Analyse berechnet H2r zunächst eine Liste mit den 75 höchsten $U(k, l)$ - Werten. Anschließend wird für jede Position k bestimmt, wie häufig sie in dieser Liste vertreten ist; diese Zahl wird als $conn(k)$ ausgegeben. Die Angabe $conn(35) = 4$ bedeutet demnach, dass die Position 35 des betrachteten Proteins an vier der 75 auffälligsten Kopplungen beteiligt ist. Simulationsexperimente zeigten, dass $conn(k)$ -Werte > 2 bei zufällig zusammen gesetzten Sequenzen extrem unwahrscheinlich sind. Oben wurde bereits erwähnt, dass eine nicht repräsentative Zusammensetzung des MSAs die Analyse verfälschen kann. Um die Abhängigkeit der Resultate von der Eingabe zu bewerten verwendet H2r ein *Bootstrapverfahren*. Hierbei werden durch Zufall eine bestimmte Anzahl an Sequenzen aus dem gesamten MSA ausgewählt (hier 75 %) und jeweils mit H2r ausgewertet. Durch eine mehrmalige Wiederholung dieses Vorgangs (meist 25 mal) werden den einzelnen Positionen *Bootstrap*-Werte zugeordnet, welche angeben, wie häufig diese Position in den Analysen auffällig war. *Bootstrap*-Werte, die nahe bei dem Wert 1,0 liegen, belegen, dass die Vorhersagen für die betrachtete Position nur wenig von der Zusammensetzung der gewählten Stichprobe abhängen.

Die Bewertung von MSAs mit Hilfe von H2r erweitert das Spektrum „auffälliger“ Positionen. Zusätzlich zu den konservierten Residuen, die einfach zu erkennen sind, charakterisieren nun auffällige $U(k, l)$ - bzw. $conn(k)$ -Werte potentiell wichtige Positionen, die bei naiver Analyse von MSAs oder Strukturen leicht übersehen werden.

4.1.2.1 Identifizierung wichtiger Positionen in sTrpC durch H2r

Bei einer ersten Analyse verwendete Dr. R. Merkl ein MSA bestehend aus 588 postulierten IGPS-Sequenzen. Nach Entfernen zu ähnlicher und unähnlicher Sequenzen blieben 272 Vertreter mit einer Länge von 253 Aminosäuren übrig. Den höchsten $U(k,l)$ Wert zeigten die Reste 54 und 64 mit $U(54,64) = 0,513$. *Conn(54)* lag mit einem Wert von 3 am unteren Bereich der Verlässlichkeit und wurde nur von 15% der *Bootstrap*-Analysen gestützt. *Conn(64)* war mit einem Wert von 7 deutlich auffälliger und zeigte einen *Bootstrap*-Wert von 96 %. Aufgrund der unterschiedlichen *conn(k)*-Werte kann man postulieren, dass eine Einzelmutation an Position 54 keinen großen, ein Austausch an Position 64 jedoch einen deutlich detektierbaren Effekt haben sollte. Der hohe $U(54,64)$ lässt vermuten, dass bestimmte Doppelmutationen einen starken Effekt auf enzymkinetische oder Stabilitätsparameter haben könnten.

Aus dem MSA wurden die jeweils häufigsten Aminosäuren für die beiden Positionen in TrpC bestimmt. Auf dieser Basis wurden in sTrpC an Position 54 eine Lysin-(R54K) und an Position 64 eine Phenylalaninmutation (R64F) eingefügt, sowohl einzeln als auch in Kombination. Die Röntgenstruktur zeigt, dass R54 und R64 den $\beta\alpha$ -Loop1 begrenzen ($C\alpha$ Abstand 7,4 Å) (Abbildung 16), der vermutlich für die Substratbindung wichtig ist (Hennig et al., 2002).

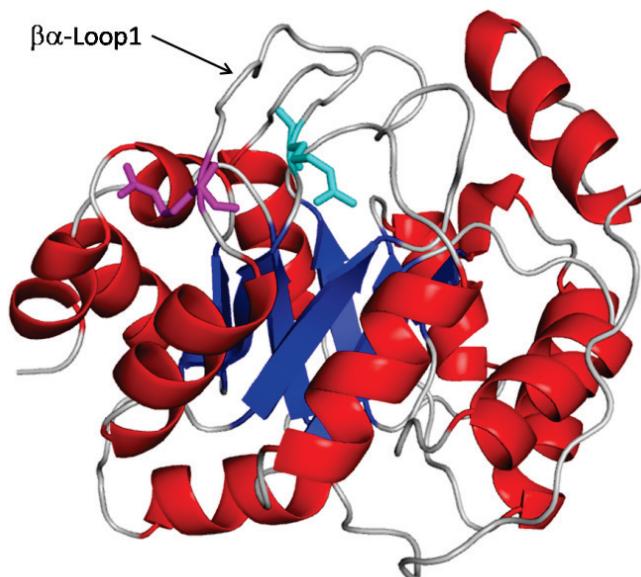


Abbildung 16: Röntgenstruktur von sTrpC (1IGS).
R54 ist in cyan und R64 in pink dargestellt.

Die R54K Mutation, die auch schon auf der Basis des Vergleichs der aktiven Zentren von sTrpC und tmTrpC im Kontext der Doppelmutante R54K+K55A hergestellt wurde

(4.1.1), könnte eventuell zu einer Beeinflussung des direkt benachbarten Restes L53 führen, der essentiell für die Aktivität ist (Hennig et al., 2002). Um zu überprüfen ob eventuell auftretende Änderungen der Stabilität oder Aktivität von der Art der eingefügten Aminosäuren abhängen, wurde zusätzlich die Doppelmutante R54A+R64A hergestellt und charakterisiert.

Bei einer zweiten bioinformatischen Analyse wurde ein wesentlich größeres MSA mit ursprünglich 1452 Sequenzen verwendet. H2r filterte durch Entfernen von sehr ähnlichen bzw. unähnlichen Sequenzen das MSA auf 654 Einträge. Bei den Konnektivitätsanalysen war die Position 133 mit dem Wert $conn(133) = 9$ und einem *Bootstrap*-Wert von 96 % am auffälligsten. Der Rest I133 liegt in β -Strang 4 (Abbildung 17) und ist an der Bindung des Indolrings des Produktes IGP beteiligt (Hennig et al., 2002). Durch einen Austausch an dieser Stelle besteht die Möglichkeit, die Produktbindung über den Indolring negativ zu beeinflussen. Ebenfalls auffällig war die Position 142 mit dem Wert $conn(142) = 4$ und einem *Bootstrap*-Wert von ebenfalls 0,96. Der Rest befindet sich in α -Helix 4 und deutet Richtung β -Strang 5 (Abbildung 17).

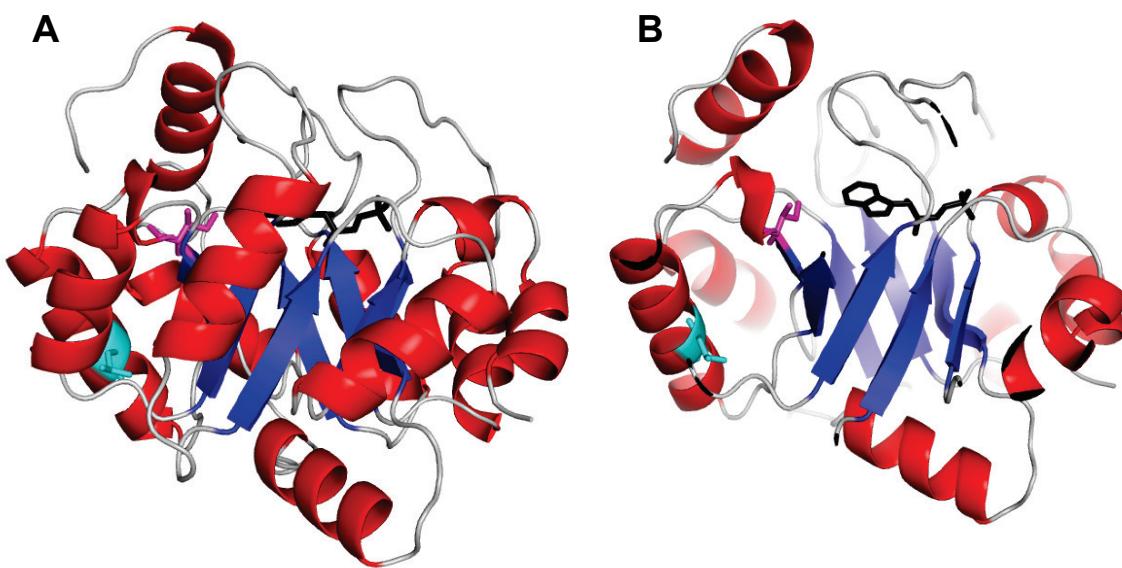


Abbildung 17: Röntgenstruktur von sTrpC mit gebundenem Produkt IGP (schwarz).

A: Seitensansicht von sTrpC; I133 ist in pink und L142 in cyan dargestellt.

B: Ansicht des zentralen β -Fasses zur Verdeutlichung der Position von I133 (pink) und L142 (cyan).

Durch die weitgehende Konservierung von Isoleucin an Position 133 und Leucin an Position 142 war es schwierig aus dem MSA alternative Reste zu bestimmen. Ein Sequenzlogo eines größeren MSA zeigte an diesen Positionen jedoch leichte Unterschiede in der Besetzung. Aus der Basis der dabei beobachteten Häufigkeiten

wurden die Mutanten I133D, I133E und I133A, sowie L142Y und L142A hergestellt und charakterisiert.

Bei einer dritten Bewertung von sTrpC mittels H2r wurde ein MSA von 588 Sequenzen verwendet, das auf 249 Sequenzen reduziert wurde. Die Position 117 war mit $conn(k) = 7$ und einem *Bootstrap*-Wert von 96 % besonders auffällig. Der Rest S117 befindet sich am Anfang von α -Helix 3 und wurde gegen Lysin (S117K) und Tyrosin (S117Y) ausgetauscht. Hervorstechend war zudem Position S181 mit $conn(k) = 4$, der *Bootstrap*-Wert lag jedoch bei zwei durchgeföhrten Analysen bei 50 bzw. 64 %. Der Rest S181 liegt am Ende von β -Strang 6 und sollte gegen Asparagin und Alanin ausgetauscht werden. Durch einen Fehler in den Primern wurde statt S181N die Doppelmutante S181N+R182I hergestellt. Die Position der beiden Austausche ist in Abbildung 18 dargestellt.

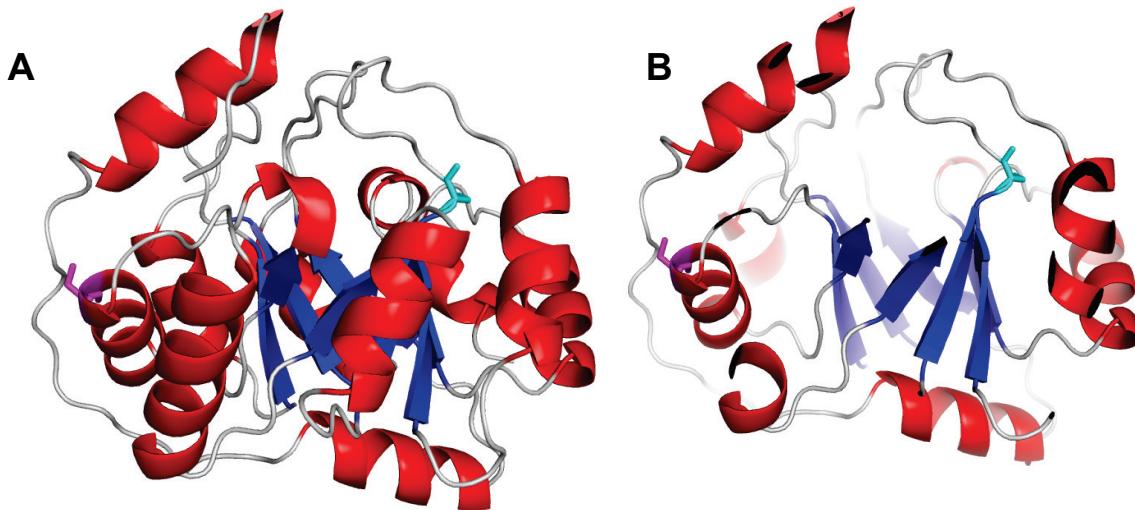


Abbildung 18: Röntgenstruktur von sTrpC.

A: Seitenansicht sTrpC; S117 ist in pink und S181 in cyan dargestellt.

B: Ansicht des zentralen β -Fasses zur Verdeutlichung der Position von S117 (pink) und S181 (cyan).

In den Analysen eins und drei war zusätzlich die Position 8 auffällig. In beiden Auswertungen zeigte sich eine $conn(k) = 6$ mit einem *bootstrap* von 96 %. Der Rest W8 wurde aber bereits auf der Basis des Vergleichs der aktiven Zentren von sTrpC und tmTrpC mutagenisiert (4.1).

4.1.2.2 Klonierung der Mutanten

Ebenso wie für die in Kapitel 4.1 beschriebenen Mutanten diente hier als Grundlage für die Mutagenese das in pET21a(+) klonierte wildtypische *strpC* Gen (Schneider, 2004). Die Mutanten R54K, R64F, R54K+R64F, R54A+R64A, I133A, I133E, L142A, L142Y, S117K, S117Y und S181N+R182I wurden mittels OE-PCR (3.3.8.2) oder

Megaprimer-PCR (3.3.8.1) hergestellt und wie in 4.1.1.2 beschrieben in den Vektor pET21a(+) kloniert. Durch einen Fehler in den Primern wurde anstelle der Einzelmutation S181N ein weiterer Austausch R182I eingefügt. Somit wurde anstelle der geplanten Einzelmutante die Doppelmutante S181N+R182I erstellt.

4.1.2.3 Heterologe Genexpression in *E.coli* und Reinigung der rekombinanten sTrpC-Proteine

Die Probeexpression erfolgte wie in 4.1.1.3 beschrieben. Mit Ausnahme der Mutante L142Y, die sich hauptsächlich im Pellet befand, wurden alle Proteine größten Teils in löslicher Form hergestellt.

Die präparative Expression der Proteine und ihre Reinigung mittels Hitzeschritt und Metallchelataffinitätschromatographie erfolgte wie unter 3.4.1.2 und 3.4.2 beschrieben. Die Ausbeuten lagen zwischen 20 und 40 mg pro Liter Zellkultur, nur vom hauptsächlich unlöslich exprimierten sTrpC-L142Y konnten lediglich 2 mg pro Liter gewonnen werden.

4.1.2.4 Charakterisierung der gereinigten sTrpC-Proteine

4.1.2.4.1 Steady-state Enzymkinetik

Die Vorbereitung der Proben und die enzymkinetischen Messungen erfolgten wie in 4.1.1.5.1 beschrieben.

Die aus den Sättigungskurven ermittelten Parameter der Mutanten sind zusammen mit denen von sTrpC-wt in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Steady-state enzymkinetische Parameter: auf der Basis von H2r hergestellte sTrpC-Mutanten im Vergleich mit sTrpC-wt.

Angegeben für k_{cat} und K_M^{CdRP} sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Sättigungskurven. Messbedingungen: 50 mM HEPPS pH 7,5, 4 mM EDTA, 25 °C.

Protein	$k_{cat} [\text{s}^{-1}]$	$K_M^{CdRP} [\mu\text{M}]$	$k_{cat}/K_M^{CdRP} [\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$
sTrpC-wt	0,06 ($\pm 0,0017$)	0,05 ($\pm 0,0058$)	1,20
sTrpC-R54K	0,06 ($\pm 0,0010$)	0,20 ($\pm 0,0031$)	0,35
sTrpC-R64F	0,15 ($\pm 0,0221$)	0,47 ($\pm 0,1514$)	0,43
sTrpC-R54K+R64F	0,14 ($\pm 0,0029$)	1,80 ($\pm 0,1344$)	0,08
sTrpC-R54A+R64A	0,17 ($\pm 0,0076$)	2,70 ($\pm 0,3982$)	0,06
sTrpC-I133A	0,06 ($\pm 0,0014$)	1,60 ($\pm 0,1339$)	0,04
sTrpC-I133E	0,03 ($\pm 0,0009$)	0,27 ($\pm 0,0334$)	0,11
sTrpC-I133D	0,07 ($\pm 0,0018$)	0,82 ($\pm 0,0836$)	0,09
sTrpC-L142A	0,04 ($\pm 0,0014$)	1,00 ($\pm 0,1458$)	0,04
sTrpC-L142Y	0,07 ($\pm 0,0032$)	0,82 ($\pm 0,0782$)	0,09
sTrpC-S117K	0,06 ($\pm 0,0030$)	0,20 ($\pm 0,0339$)	0,30
sTrpC-S117Y	0,07 ($\pm 0,0026$)	0,20 ($\pm 0,0238$)	0,35
sTrpC-S181A	0,008 ($\pm 0,0031$)	0,59 ($\pm 0,0864$)	0,01
sTrpC-S181N+R182I	0,18 ($\pm 0,0121$)	0,28 ($\pm 0,0933$)	0,64

Die Austausche R54K, S117K und S117Y zeigen keine große Auswirkung auf die katalytischen Parameter. Der k_{cat} ist wildtypisch, der K_M^{CdRP} 4-fach erhöht. Dagegen führt der R64F Austausch zu einem etwa dreifach erhöhten k_{cat} und einem fast 10-fach erhöhten K_M^{CdRP} .

Die Ergebnisse für die Doppelmutanten R54K+R64F und R54A+R64A ähneln sich. Der k_{cat} ist im Vergleich zum Wildtyp leicht heraufgesetzt und entspricht dem von R64F, der K_M^{CdRP} -Wert ist dagegen im Vergleich zu den Einzelmutanten drastisch erhöht (Tabelle 6). Wie bereits in Kapitel 4.1.1.5.1 diskutiert und in Abbildung 11 dargestellt, ragt die Seitenkette von R54 nicht in das aktive Zentrum hinein und wurde ebenso wie R64 auch in früheren Untersuchungen nicht als Teil der Substratbindetasche identifiziert (Hennig et al., 2002). Offensichtlich führt jedoch der gleichzeitige Austausch beider Reste zu einer Konformationsänderung des von ihnen eingerahmten ($\beta\alpha$)-Loops 1 mit der Konsequenz einer schlechteren Substratbindung durch die darin lokalisierten Aminosäuren K53 und P57.

Austausche an Position I133 haben kaum eine Auswirkung auf k_{cat} , führen jedoch zu einem merklichen Anstieg von K_M^{CdRP} . Der Effekt ist bei I133A am drastischsten ausgeprägt, dessen K_M^{CdRP} Wert um den Faktor 50 über dem von sTrpC-wt liegt.

Vermutlich kommt es durch die Verkürzung der hydrophoben Seitenkette zu einer Vergrößerung der Bindetasche (Abbildung 17), mit der Konsequenz einer schlechteren Fixierung von CdRP am aktiven Zentrum. Die kürzeste Entfernung von I133 zu CdRP beträgt jedoch 8 Å, was für eine direkte Interaktion zu weit ist.

Bei den I133D und I133E Mutanten fällt der Anstieg des K_M^{CdRP} mit einem Faktor von 6 bzw. 12 moderater aus. Die Tatsache, dass ein Austausch von einem hydrophoben zu einem hydrophilen Rest zu einer weniger starken Einschränkung der Substratbindung führt, als der Austausch einer langen Seitenkette gegen eine sehr kurze, stützt die Hypothese der zu großen Bindetasche in der I133A-Mutante. Interessanterweise war I133 auf der Basis der Röntgenstruktur bereits als Teil der Indolbindetasche des Produktes IGP identifiziert worden (Hennig et al., 2002), bisher jedoch nicht als an der Substratbindung beteiligter Rest.

Der Austausch von L142 gegen Alanin oder Tyrosin lässt den k_{cat} -Wert unverändert, führt jedoch zu einem recht deutlichen Anstieg von K_M^{CdRP} . Da der Rest relativ weit vom aktiven Zentrum entfernt liegt, war dieser Effekt nicht unbedingt zu erwarten.

Der Austausch S181A bewirkt eine Erniedrigung des k_{cat} und eine Erhöhung des K_M^{CdRP} um jeweils eine Größenordnung. Die resultierende mehr als 100-fache Abschwächung der katalytischen Effizienz lässt sich nicht erklären, denn das wildtypische Serin ist mit 7 Å recht weit vom Substrat entfernt. Auch war für S181 bisher keine Rolle für die Katalyse bekannt. Es ist jedoch dem Rest R182 benachbart, welcher vermutlich an der Substratbindung über das Anthranilat beteiligt ist (Hennig et al., 2002). Der geplante Austausch S181N wurde durch einen Fehler im Oligonucleotid zu der Doppelmutante S181N+R182I. Der K_M^{CdRP} ist wie erwartet erhöht, jedoch liegt der Wert unter dem der Einzelmutante S181A. Die Wechselzahl ist in der Doppelmutante auf den fünffachen Wert von sTrpC-wt gestiegen. Dieses Resultat ist unerwartet und derzeit nur schwer zu erklären.

Diese Ergebnisse zeigen, dass H2r tatsächlich funktionell relevante Reste in sTrpC identifizieren kann, die weder konserviert sind, noch bei der Analyse der Röntgenstruktur auffallen.

4.1.2.4.2 Thermische Stabilität

Um Aussagen über die konformationelle Stabilität treffen zu können, wurden die Varianten wie unter 4.1.1.5.2 beschreiben einer thermischen Denaturierung bzw. Inaktivierung ausgesetzt.

Die Denaturierungskurven der Varianten R54K, R64F, R54K+R64F und R54A+R64A sind in Abbildung 19 A, die der Mutanten I133A, I133D, I133E, L142A und L142Y in Abbildung 19 B dargestellt.

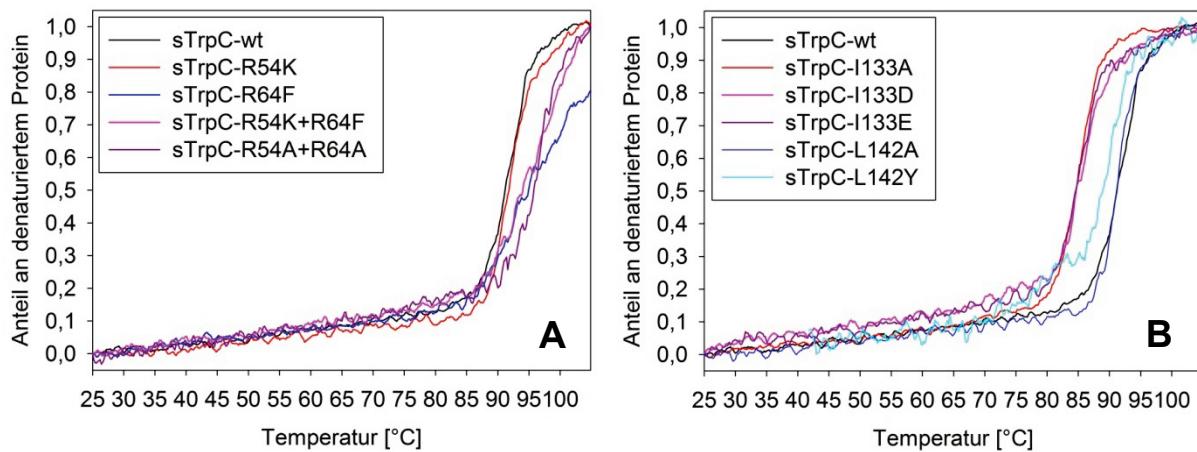


Abbildung 19: Thermische Denaturierung: Auf der Basis von H2r hergestellt Mutanten im Vergleich mit sTrpC-wt.

Die Messungen erfolgten in 10 mM KP, pH 7,5 mit je 8-12 µM Protein. Das CD Signal bei 220 nm wurde normiert, die Kurven mit der Savitzky-Golay-Methode geglättet und mit dem Programm Denatured Protein ausgewertet. A: sTrpC-wt und Mutanten R54K, R64F, R54K+R54F, R54A+R64A; B: sTrpC-wt und Mutanten I133A, I133D, I133E, L142A, L142Y.

Im Gegensatz zu den Mutanten in 4.1.1.5.2 lassen sich hier, bis auf R64K alle Schmelzkurven auswerten und der zugehörige T_M -Wert bestimmen. Die Mutanten R54K, L142A, L142Y, S117K, S117Y, S181A und S181N+R182I besitzen mit T_M -Werten zwischen 90 und 93 °C nahezu unveränderte Schmelzpunkte wie sTrpC-wt mit 92 °C (Schmelzkurven teilweise nicht gezeigt). Leicht erhöht ist der T_M mit 94 °C der Doppelmutanten R54K+R64F und R54A+R64A. Dieser liegt eventuell noch höher, da trotz kooperativer Auffaltung, der Bereich der Basislinie für denaturiertes Protein bei so hohen T_M -Werten für die Auswertung sehr kurz ist. Die Austausche an Position I133 weisen einen T_M -Wert von 85 °C auf, was einer Erniedrigung der thermischen Stabilität von 7 °C im Vergleich zu sTrpC-wt entspricht.

In Tabelle 7 sind die aus den mittels Fern-UV CD ermittelten Schmelztemperaturen T_M und die Halbwertszeiten der thermischen Inaktivierung $t_{1/2}$ (75 °C) aufgelistet.

Tabelle 7: Thermische Stabilität: T_M - und $t_{1/2}$ (75 °C)-Werte von auf Basis der von H2r hergestellten sTrpC-Mutanten im Vergleich mit sTrpC-wt.

Messbedingungen für $t_{1/2}$ (75 °C): 50 mM HEPPS, pH 7,5, 4 mM EDTA; Inkubationstemperatur 75 °C, Messtemperatur 25 °C.

Messbedingungen für T_M : 10 mM KP pH 7,5; Temperaturgradient von 25 °C bis 105 °C bei einer Heizrate von 1 °C/min.

Protein	T_M [°C]	$t_{1/2}$ [min]
sTrpC wt	92	120
sTrpC-R54K	92	123
sTrpC-R64F	---	40
sTrpC-R54K+R64F	94	65
sTrpC-R54A+R64A	94	73
sTrpC-I133A	85	22
sTrpC-I133E	85	18
sTrpC-I133D	85	30
sTrpC-L142A	92	72
sTrpC-L142Y	90	143
sTrpC-S117K	90	77
sTrpC-S117Y	91	68
sTrpC-S181A	93	245
sTrpC-S181N+R182I	92	121

Die Daten der thermischen Inaktivierung zeigen eine ähnliche Tendenz wie die der Denaturierung. Während sich die $t_{1/2}$ (75 °C)-Werte der meisten Mutanten um nicht mehr als einen Faktor zwei von sTrpC-wt unterscheiden, führen Austausche von I133 zu einer deutlichen Abnahme der Stabilität. Die I133E Mutante verliert am schnellsten ihre Aktivität und weist nur noch einen $t_{1/2}$ -Wert von 18 min auf.

4.1.2.5 Zusammenfassung der H2r basierten Varianten

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mutationen an fast allen von H2r identifizierten Positionen mehr oder weniger deutliche Verschlechterungen der Michaeliskonstanten für CdRP (Substratbindung) und/oder der thermischen Stabilität von sTrpC nach sich ziehen. Dagegen wird die Wechselzahl nur durch den S181A-Austausch merklich verringert. Während für I133 zumindest eine Beteiligung an der Bindung von IGP bekannt war (Hennig et al., 2002), hatten bisherige Sequenz- und Strukturanalysen keine Hinweise auf die Bedeutung von R64, L142 und S181 für die Ligandenbindung oder Stabilität für sTrpC erbracht.

4.1.3 Weiterführende Untersuchungen an auffälligen Position

Im Folgenden wurden einige der bisher mittels *steady-state* Enzymkinetik und thermischer Denaturierung bzw. Inaktivierung untersuchten sTrpC-Mutanten zusätzlich im Bezug auf die Ligandenbindung (Substratanalogen rCdRP; Produkt IGP) und Temperaturabhängigkeit ihrer Aktivität charakterisiert.

4.1.3.1 Ligandentitrationen

Zusätzlich zu sTrpC-wt wurden die Mutanten von Position I133 und L142Y aufgrund des stark verschlechterten K_M^{rCdRP} (Tabelle 6) untersucht. Als Referenz diente L187F, dessen Michaeliskonstante der von sTrpC-wt entspricht (Tabelle 3).

Die Bindung des Substratanalogs rCdRP an sTrpC kann mittels FRET zwischen dem einzigen Tryptophanrest W8 und dem aromatischen Ring von rCdRP, oder über die durch die Bindung verursachte Emissionsabnahme von W8 direkt werden verfolgt werden (3.5.7.1).

In Abbildung 20 ist exemplarisch die Titrationskurve der rCdRP-Bindung an sTrpC-wt gezeigt.

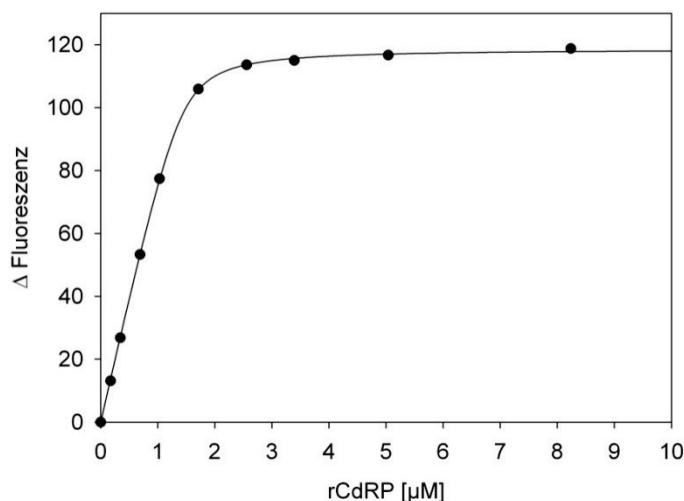


Abbildung 20: Titrationskurve von rCdRP an sTrpC-wt.

Es wurden 2 μM sTrpC-wt vorgelegt und mit 0,17 bis 8 μM rCdRP in 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA bei 25 °C titriert. Die Anregungswellenlänge war 280 nm, die Emissionswellenlänge 324 nm. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis eines Computerfits mit der in Formel 8 (3.5.7.1) gezeigten quadratischen Funktion. Daraus wurde ein K_D^{rCdRP} von 0,05 μM ermittelt; der Äquivalenzpunkt liegt bei 1,4.

Der hieraus ermittelte K_D^{rCdRP} ist mit 0,05 μM dem K_M^{rCdRP} von 0,05 μM (Tabelle 3) identisch.

In Abbildung 21 A sind exemplarisch die Rohdaten der Titration von sTrpC-wt mit IGP (rot) und die Daten nach Korrektur um die Eigenfluoreszenz des Liganden (schwarz) gezeigt.

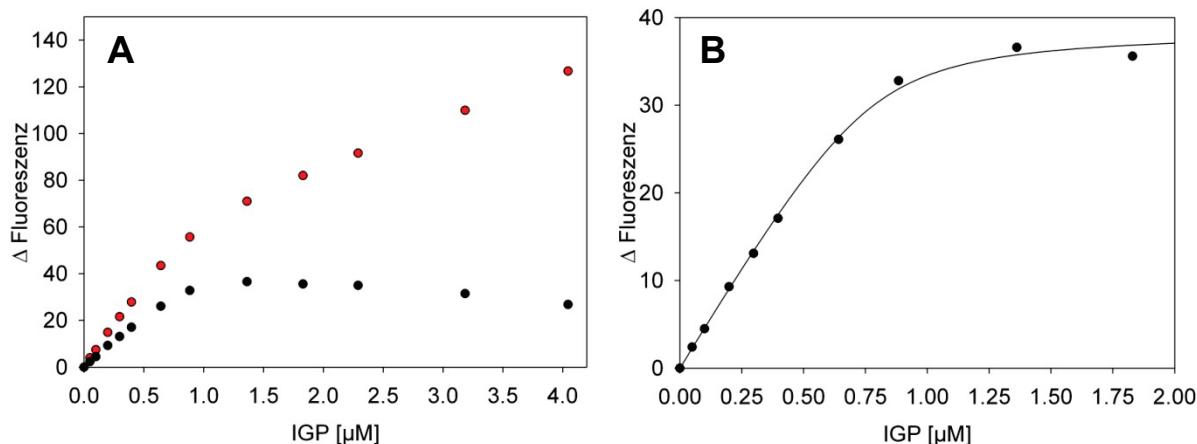


Abbildung 21: Titrationskurve von IGP an sTrpC-wt.

1,1 μM sTrpC-wt wurden mit 0,05 – 4 μM IGP bei 25 °C in 50 mM HEPES, pH 7,5 und 4 mM EDTA titriert. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm, die Emission wurde bei 330 nm bestimmt.

A: In rot ist die Messkurve der Bindung dargestellt, in schwarz die um die Eigenfluoreszenz des IGP korrigierte Bindungskurve. B: Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis eines Computerfits mit der in Formel 8 (3.5.7.1) gezeigten Funktion an die korrigierten Daten. Daraus wurde ein K_D^{IGP} von 0,02 μM ermittelt; der Äquivalenzpunkt liegt bei 0,84.

Bei höheren IGP Konzentrationen scheint es, als würde das reine IGP Signal in der Korrekturtitration überschätzt, da es im Sättigungsbereich leicht sinkt. Die Signale einer Bindungskurve müssen nicht unbedingt der Addition der beiden Einzelsignale entsprechen, da beide Substanzen miteinander interagieren können und es auch zu Verschiebungen in den Emissionsmaxima kommen kann. Bei stark fluoreszierenden Stoffen, wie IGP, kann bei diesen Konzentrationen auch ein innerer Filtereffekt auftreten. Dies sind mögliche Erklärungen für das Absinken des korrigierten Graphen im Sättigungsbereich. Für die Auswertung wurden deshalb die Werte bei den höchsten IGP-Konzentrationen nicht berücksichtigt (Abbildung 21 B). Der mittels quadratischem Fit ermittelte K_D^{IGP} von 0,02 μM ist sehr niedrig und bestätigt die starke Bindung des Produktes. Zusätzlich werden die Messungen von Merz et al. (2000) bei 37 °C mit einem K_D^{IGP} von 0,03 μM bestätigt.

In Tabelle 8 sind die Bindungskonstanten für rCdRP und IGP zusammen mit den Michaelis-Konstanten für die Mutanten im Vergleich zu sTrpC-wt zusammengefasst.

Tabelle 8: Bindung von rCdRP und IGP: sTrpC-Mutanten im Vergleich mit sTrpC-wt.

Messbedingungen: 50 mM HEPPS, pH 7,5, 4 mM EDTA, 25 °C (3.5.7.1, 3.5.7.2); n.b.: nicht bestimmbar.

Protein	$K_M [\mu M]$	$K_D^{rCdRP} [\mu M]$	$K_D^{IGP} [\mu M]$
sTrpC-wt	0,05	0,05	0,02
sTrpC-I133A	1,60	0,07	n.b.
sTrpC-I133D	0,82	0,19	0,12
sTrpC-I133E	0,27	0,50	1,70
sTrpC-L142Y	0,82	0,13	0,03
sTrpC-L187F	0,05	0,1	0,03

Vergleicht man die K_D^{rCdRP} -Werte mit den K_M^{CdRP} -Werten fällt auf, dass diese sich bei sTrpC-wt, L187F und I133E entsprechen. Bei den Mutanten I133A, I133D und L142Y liegt der K_D^{rCdRP} deutlich niedriger als der über *steady-state* Messungen bestimmten K_M^{CdRP} .

Obwohl eine einfache Interpretation dieser Diskrepanz nicht möglich ist, spricht sie für eine Änderung des Reaktionsmechanismus. Gleichzeitig kommt es bei diesen Mutanten zu einer deutlichen Abnahme der Affinität für das Produkt IGP, die im Falle von I133A sogar eine zuverlässige Bestimmung von IGP unmöglich machte.

4.1.3.2 Temperaturabhängige Untersuchungen

Eine weitere Möglichkeit die Aktivität eines Enzyms zu charakterisieren sind temperaturabhängige enzymkinetische und biophysikalische Messungen. Bereits in einer früheren Arbeit wurde auf einen diskontinuierlichen Arrhenius-Plot von sTrpC-wt in Tris-Puffer bei pH 9,0 hingewiesen, jedoch keine weiteren Untersuchungen dazu durchgeführt (Andreotti et al., 1997). Dies wäre ein möglicher Hinweis, warum sich die Aktivität von sTrpC bei Raumtemperatur durch Zufallsmutagenese nur in geringem Maße steigern ließ (Merz et al., 2000). Um dies zu überprüfen wurden von sTrpC-wt und ausgewählten Mutanten die Wechselzahlen bei verschiedenen Temperaturen gemessen und die Ergebnisse in einem Arrhenius-Diagramm dargestellt. In Abbildung 22 ist das von sTrpC-wt gezeigt.

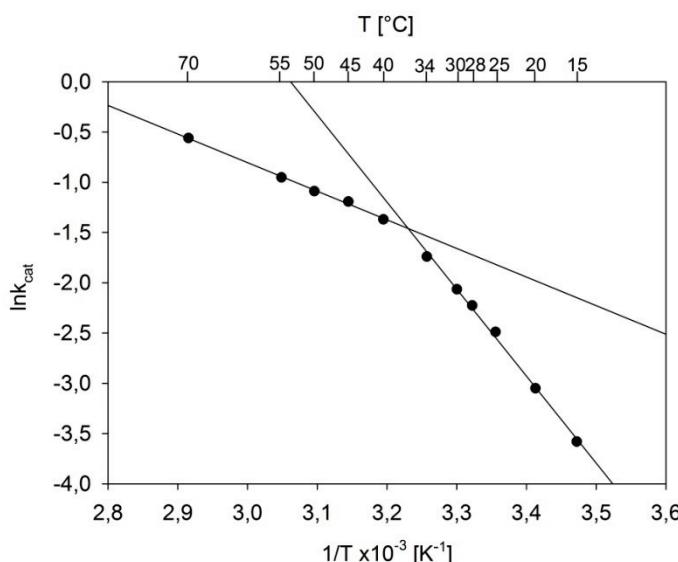


Abbildung 22: Arrhenius-Diagramm von sTrpC-wt.

Messbedingungen: 50 mM HEPES, pH 7,5 (bei der jeweiligen Messtemperatur), 4 mM EDTA. Jeder k_{cat} -Wert wurde bei zwei unterschiedlichen, jedoch jeweils sättigenden CdRP-Konzentrationen bestimmt und gemittelt.

Das Diagramm weist einen Knick zwischen 34°C und 40°C auf. Der Schnittpunkt der beiden Geraden liegt bei 36,5°C und wird als Arrhenius-Break-Temperatur (ABT) bezeichnet. Aus den Steigungen des Diagramms wurde für den unteren Temperaturbereich eine Aktivierungsenergie von 72 kJ/mol und für den oberen eine Aktivierungsenergie von 24 kJ/mol berechnet (3.5.8.1). Diese Werte liegen sehr nahe bei denen für das Enzym GAPDH aus *Thermotoga maritima* mit 78,6 kJ/mol und 32,8 kJ/mol (Wrba et al., 1990). Damit liegen die Werte von sTrpC-wt im gewöhnlichen Bereich für hyperthermophile Enzyme. Ein diskontinuierlicher Arrhenius-Plot kann verschiedene Ursachen haben. Eine Möglichkeit stellt die Änderung des ratenlimitierenden Schrittes einer komplexen Enzymreaktion dar (Allen et al., 1990). Eine alternative Erklärung dazu ist eine temperaturinduzierte Konformationsänderung im Bereich der ABT. Hierbei ist der Unterschied der beiden Aktivierungsenergien normalerweise hoch und die strukturelle Änderung kann eventuell mit physikalischen Methoden wie CD-Polarisierung (Allen et al., 1990), UV/Vis Spektrometrie (Massey et al., 1966), DSC-Messungen (Moosavi-Nejad et al., 2001) oder Trübung (Biosca et al., 1983) nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob eine temperaturbedingte Konformationsänderung für den diskontinuierlichen Arrhenius-Plot verantwortlich ist, wurde die Sekundär- und Tertiärstruktur von sTrpC-wt durch Fern-UV und Nah-UV CD-Spektroskopie bei 25 °C, 37 °C und 48 °C untersucht (Abbildung 23).

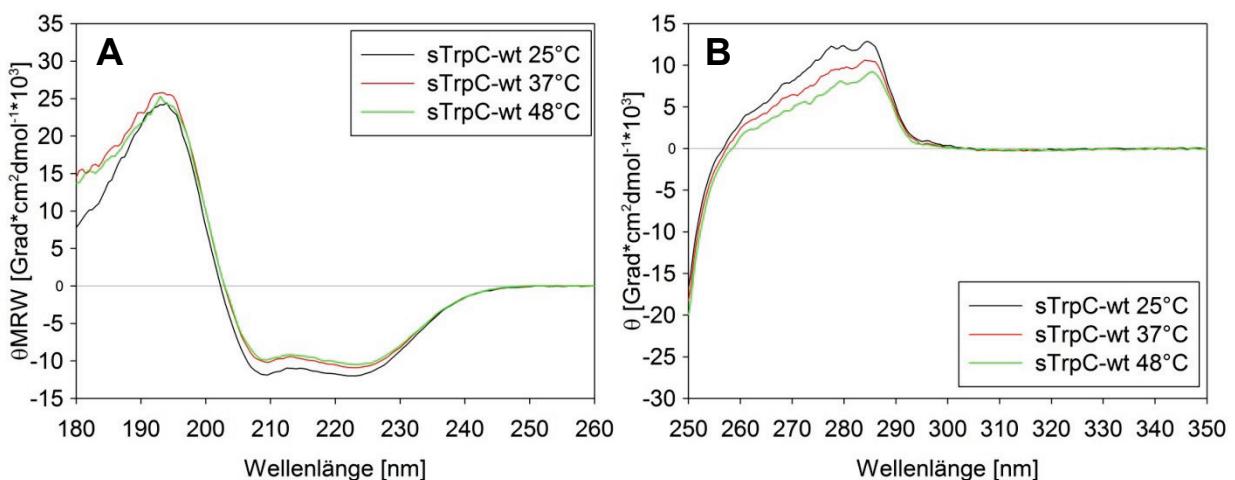


Abbildung 23: Untersuchung der Struktur von sTrpC-wt durch CD-Spektroskopie bei 25, 37 und 48 °C.

Es wurden je 5 Spektren gemittelt und mit dem Pufferspektrum korrigiert. A: Fern-UV-CD-Spektren von 45 μM sTrpC-wt gemessen in 10 mM KP pH 7,5 in einer 0,02 cm Glasrundküvette. B: Nah-UV-CD-Spektren von 107 μM sTrpC-wt gemessen in 10 mM KP pH 7,5 in einer 0,5 cm Glasrundküvette.

Die beobachteten Unterschiede der CD-Spektren sind sehr gering und sprechen nicht dafür, dass die Diskontinuität des Arrhenius-Diagramms durch konformationelle Änderungen hervorgerufen wird.

Außer für sTrpC-wt wurden auch für eine Reihe von Mutanten die Wechselzahlen bei mindestens acht unterschiedlichen Temperaturen bestimmt. Die resultierenden Arrhenius-Diagramme sind in Abbildung 24 in vereinfachter Form gezeigt.

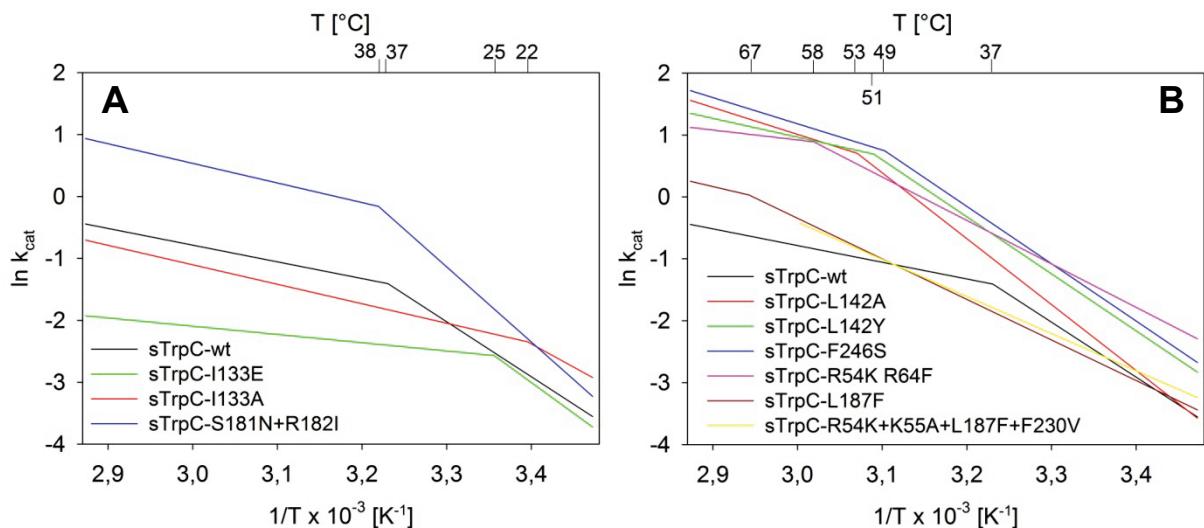


Abbildung 24: Arrhenius-Diagramme: sTrpC-Mutanten im Vergleich mit sTrpC-wt.

Messbedingungen: 50 mM HEPES, pH 7,5 bei der jeweiligen Messtemperatur, 4 mM EDTA; A: Mutanten mit gleicher ABT (S181N+R182I) und niedrigerer ABT (I133A und I133E) als sTrpC-wt. B: Mutanten mit höherer ABT als sTrpC-wt.

Die ABTs und Aktivierungsenergien sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Arrhenius-Break-Temperaturen und Aktivierungsenergien: sTrpC-Mutanten im Vergleich mit sTrpC-wt.

Protein	ABT [°C]	E _A [kJ/mol] (T < ABT)	E _A [kJ/mol] (T > ABT)
sTrpC-wt	37	72	24
sTrpC-I133A	22	62	26
sTrpC-I133E	25	83	11
sTrpC-L142A	53	88	36
sTrpC-L142Y	51	77	25
sTrpC-L187F	67	54	26
sTrpC-R54K+K55A+L187F+F230V	>60	50	n.b.
sTrpC-R54K+R64F	58	58	13
sTrpC-F246S	49	77	35
sTrpC-S181N+R182I	38	99	27

4.1.3.3 Zusammenfassung

Liganden titrationen an sTrpC-wt und Mutanten zeigen, dass der K_D^{rCdRP} nicht bei allen sTrpC-Proteinen mit dem K_M^{CdRP} übereinstimmt. Die Diskrepanz der deutlich niedrigeren K_D^{rCdRP} Werte spricht für eine Änderung des Reaktionsmechanismus in einigen Mutanten.

Abbildung 24 und Tabelle 9 belegen, dass neben sTrpC-wt auch alle untersuchten Mutanten einen Knick im Arrhenius-Diagramm aufweisen. Die ABTs schwanken dabei zwischen 22 °C (I133A) und 67 °C (L187F). Die Aktivierungsenergien im unteren Temperaturbereich bewegen sich zwischen 50 kJ/mol (R54K+K55A+L187F+F230V) und 99 kJ/mol (S181N+R182I), die im oberen Temperaturbereich zwischen 11 kJ/mol (I133E) und 36 kJ/mol (L142A). Da CD-Spektren von sTrpC-wt unter- und oberhalb des ABT auf keine wesentlichen strukturellen Unterschiede hinweisen (Abbildung 23), lassen sich die unterschiedlichen Steigungen in den Arrhenius-Diagrammen momentan am einfachsten durch unterschiedliche ratenlimitierende Schritte der Reaktion erklären.

Zur Identifizierung dieser Schritte und zum Verständnis der unterschiedlichen ABTs und Aktivierungsenergien der verschiedenen sTrpC-Proteine ist die Aufklärung des Reaktionsmechanismus von sTrpC erforderlich. Untersuchungen dazu werden im nächsten Kapitel beschrieben.

4.2 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von sTrpC

4.2.1 Ausgangssituation

Bereits 1956 veröffentlichte Yanofsky, dass IGP ein Intermediat der Indolbiosynthese (Tryptophanbiosynthese) darstellt (Yanofsky, 1956), 1960 beschrieb er CdRP als weiteres Intermediat (Smith und Yanofsky, 1960). Im Jahre 1966 wurde die IGPS als Teil des Tryptophan-Operons in *E. coli* beschrieben, welche die Umsetzung von CdRP zu IGP katalysiert (Creighton und Yanofsky, 1966). Die essentiellen Aminosäuren von TrpC aus *E. coli* (eTrpC) wurden mittels Mutationsanalyse bestimmt (Daramont et al., 1998; Eberhard und Kirschner, 1989). Diese Reste sind konserviert und wurden unter anderem auch in tmTrpC und sTrpC nachgewiesen. Die Röntgenstrukturen dieser drei Enzyme sind bekannt (Knochel et al., 2002), außerdem konnte die Struktur von sTrpC mit gebundenem CdRP, rCdRP und IGP aufgeklärt werden (Hennig et al., 2002). Anhand der räumlichen Anordnung der Residuen im aktiven Zentrum von sTrpC und ihrem Abstand zum gebundenen Liganden wurde ein Reaktionsmechanismus formuliert, der in Abbildung 25 gezeigt ist.

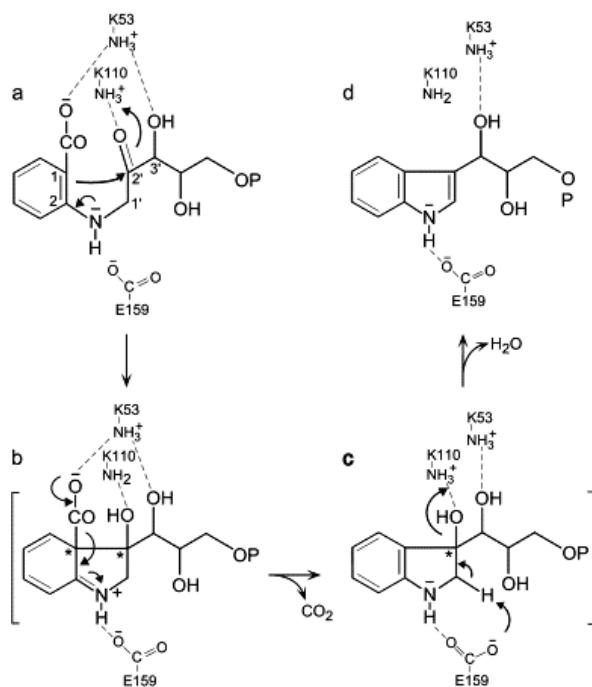


Abbildung 25: Plausibler Reaktionsmechanismus von sTrpC auf der Basis von Struktur- und Mutationsanalysen (Hennig et al., 2002).

Wasserstoffbrücken sind als ---- angedeutet, vorübergehend auftretende asymmetrische C-Atome sind mit * gekennzeichnet. Die Pfeile deuten an, wie die Reaktion durch die eingezzeichneten Reste unterstützt wird.

a) Essentielle Aminosäuren von sTrpC mit gebundenem Substrat CdRP. Die Bindung ist unproduktiv, da C1 und C2' mit ca. 4 Å für die Ausbildung einer C-C Bindung zu weit voneinander entfernt liegen. Vermutlich werden die beiden C-Atome durch die Salzbrücke zwischen K53 und der Carboxylatgruppe in einen produktiven Abstand von etwa 2 Å gebracht, der die Ausbildung der C-C Bindung erlaubt. b) Intermediat I1 (Modell); c) Intermediat I2 (Modell); d) sTrpC mit gebundenem Produkt IGP.

Die Bindung des Substrates CdRP an sTrpC wird durch mehrere Gruppen von Resten koordiniert. Die Phosphatbindestelle wird durch die Reste K53, G212, G233 und S234, die Ribulose/Triosebindestelle durch E51, K53, K110, E159 und N180 gebildet. Die Anthranilatbindetasche fixiert mittels der Reste W8, P57, F89, R182 und L184 den aromatischen Teil des Substrates. Abbildung 26 a zeigt den unproduktiven sTrpC:CdRP Komplex, in dem der Abstand zwischen C1 und C2' mit 4,8 Å zu groß ist, um eine C-C Verbindung zu initiieren. Die protonierte ϵ -Aminogruppe des K110 (welche als generelle Säure wirkt) polarisiert das C2' Carbonyl-Kohlenstoffatom des CdRPs durch Wasserstoffbrücken zum Carbonyl-Sauerstoffatom. Die Pfeile in Abbildung 25 a zeigen, wie das elektrophile C2'-Atom das π -Elektronensystem des Benzenringes angreifen kann. Die niedrige Elektronendichte der Ribulose-Einheit deutet daraufhin, dass diese Region des Substrates flexibel ist (Hennig et al., 2002). Es ist somit wahrscheinlich, dass der Übergangszustand des Kondensationsschrittes von (thermischen) Bewegungen begleitet wird. Die Salzbrücke zwischen K53 und der Carboxylgruppe des Anthranilats scheint das C1-Atom Richtung C2'-Atom in eine Bindung ausbildende Entfernung zu leiten (~2 Å). Wenn die Kondensation des CdRPs stattfindet, wird die entstehende positive Ladung an der NH-Gruppe durch die entstehende Salzbrücke zur Carboxylatgruppe von E159 kompensiert (Abbildung 25 b). Es scheint, als können K53 und K110 aufgrund ihrer langen Seitenketten ihre originalen Wasserstoffbrücken zu CdRP während der Reaktion aufrecht erhalten. Es ist denkbar, dass das dreifache Salzbrücken-Cluster mit K53, E51 (nicht gezeigt) und K110 die Reprotonation der ϵ -NH-Gruppe von K110 herbeiführt, welches in der Umsetzung von CdRP zum Intermediat 1 deprotoniert wurde, um den Rest als allgemeine Säure wieder herzustellen. Die festgestellte Interaktion von K53 mit der Carboxylgruppe von CdRP und dem Intermediat 1 erklärt, warum die Carboxylgruppe von CdRP für die Bildung von IGP notwendig, und K53 katalytisch essentiell ist. Die Pfeile in Abbildung 25 b deuten an, wie die Decarboxylierung des Intermediates 1 katalysiert werden könnte. Die Bewegung von Elektronenpaaren eliminiert die Carboxylgruppe in Form von CO₂, stellt das π -Elektronensystem des Benzenringes wieder her und neutralisiert die positive Ladung der NH-Gruppe (Abbildung 25 c). Sowohl K110, als auch E159 behalten im Intermediat 2 ihre ursprünglichen Wasserstoffbrücken wie im Intermediat 1 und K53 hält die Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des C3' aufrecht. Wie in Abbildung 25 c illustriert, könnte die Dehydratisierung des Intermediates 2 erneut von der Ammoniumgruppe von K110 katalysiert werden, indem es ein Proton an C2' gibt, welches als Wasser abgespalten

wird. Die Carboxylatgruppe von E159 könnte nun eine katalytische Rolle übernehmen, indem es das Proton von C1' akzeptiert, wodurch das π -Elektronensystem des Pyrrolrings generiert wird. Um E159 nach dem dritten Schritt wieder als allgemeine Base zu regenerieren, könnten N180 und möglicherweise S211 an der Deprotonierung beteiligt sein (nicht gezeigt). Diese Reste sind ebenfalls strikt konserviert. Das Produkt IGP wird weiterhin durch die an der Katalyse beteiligten Reste Lysin 53 und Glutamat 159 fixiert. Die Indolbindetasche besteht im Gegensatz zur Anthranilatbindetasche aus F89, K110, F112, I133 und L184. Die Änderung der an der Bindung beteiligten Reste zeigt die Verschiebung des Liganden von der Anthranilat- zur Indolbindungstasche des Enzyms. Dieser plausible Reaktionsmechanismus steht im Einklang mit Mutationsanalysen an eTrpC (Daramont et al., 1998). Die tatsächliche Anzahl der unterschiedlichen katalytischen Schritte der Reaktion sowie ihre Geschwindkeiten sind jedoch weitgehend unbekannt, und auch zu den Assoziations- und Dissoziationsraten von CdRP und IGP gibt es bisher nur wenige Untersuchungen (Merz et al., 2000).

4.2.2 CdRP, rCdRP, IGP und deren möglichen Konformationen

Das Substrat der TrpC-Reaktion CdRP liegt in einem Keto-Enol-Gleichgewicht vor. Bei Hennig et al. (2002) wurde beschrieben, dass ein Wasserstoffatom bei dieser Keto-Enol-Tautomerie zwischen den Kohlenstoffatomen C2' und C1' wandert (Abbildung 26 a, b). Theoretisch möglich ist jedoch auch eine Verschiebung der Wasserstoffatome zwischen C2' und C3' (Abbildung 26 a, c). Da am asymmetrischen C3'-Atom eine Hydroxylgruppe gebunden ist, würden bei Ausbildung der Keto-Form (Abbildung 26 a) zwei optische Isomere entstehen, da der Wasserstoff sowohl von ‚unten‘ als auch ‚oben‘ angreifen könnte (Abbildung 26 d, e). Wäre die Zugänglichkeit an dieser Position von beiden Seiten gleich, würde sich das in einer Racemisierung des Substrates widerspiegeln.

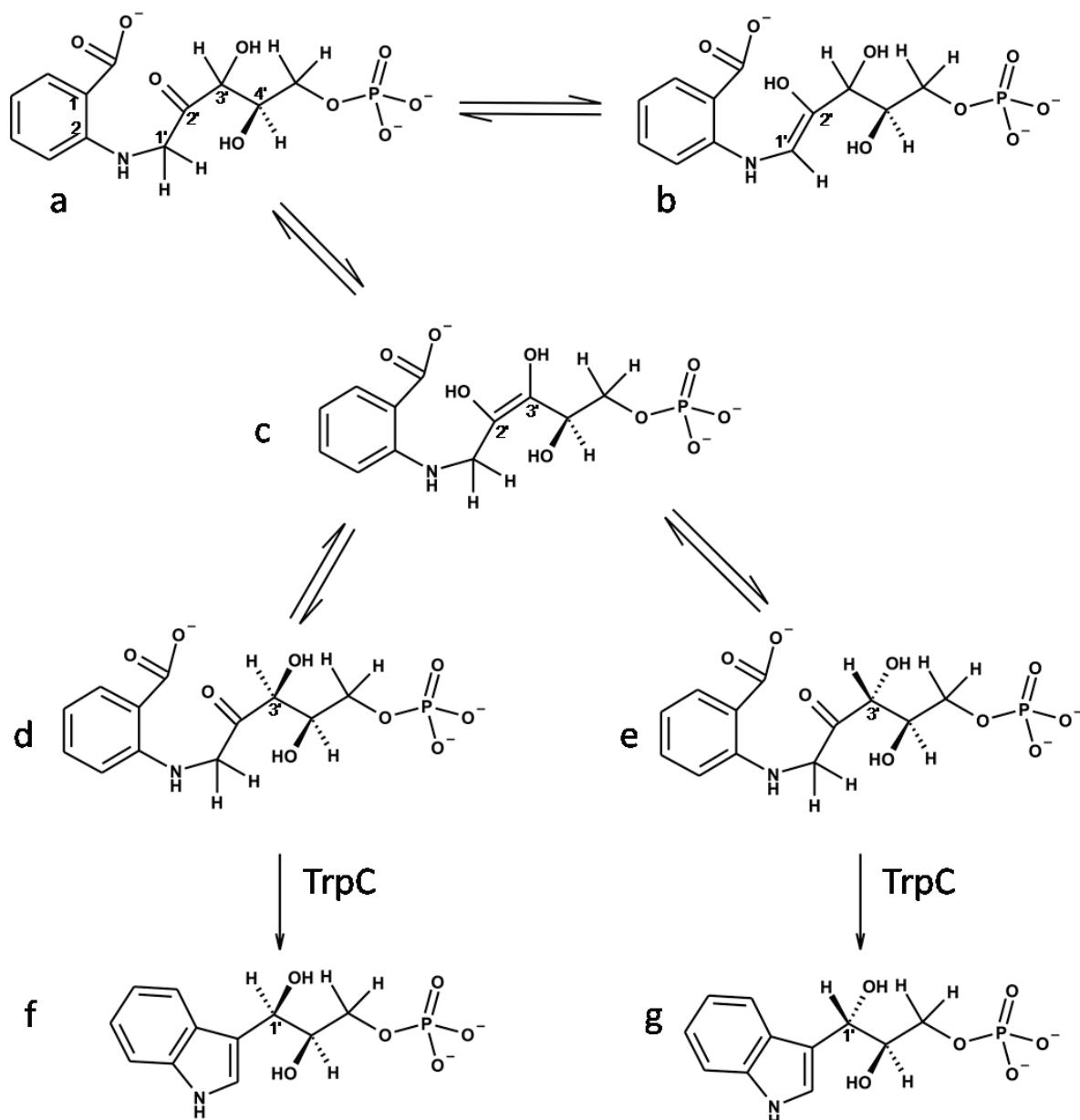


Abbildung 26: Mögliche Keto-Enol-Tautomerisierung des Substrates CdRP und daraus entstehende IGP-Konformere.

a) CdRP in der bindungsfähigen, nicht fluoreszierenden Keto-Form; b) bisher postulierte Enol-Form; c) theoretisch mögliche Endiol-Form mit Doppelbindung zwischen C2' und C3'; d) und e) von der Endiol-Form ausgehende Umlagerung zum Keton mit Bildung eines chiralen Zentrums an C3'; f) und g) IGP-Konformere mit chiralem Zentrum an C1', gebildet aus dem CdRP-Gemisch durch TrpC

TrpC katalysiert die Reaktion von CdRP zu IGP. Die Konformation an C3' bleibt während der Reaktion erhalten und spiegelt sich deshalb auch nach dem Ringschluß zu IGP wider (äquivalent zu C3' in CdRP ist C1' in IGP) (Abbildung 26 f, g). Die Hypothese der zwei Konformere um C3' wird durch die Beobachtung gestützt, dass sowohl vollständig, als auch teilweise enzymatisch hergestelltes IGP durch die Umsetzung der α -Untereinheit des Tryptophan Synthase Komplexes (TrpA), nur etwa zu 50 % in Indol und GA3P gespalten wird (Bolz, 2006). Dies ist ein deutlicher Hinweis auf ein in zwei Konformationen vorliegendes CdRP, welches durch TrpC in

zwei verschiedene, nicht ineinander überführbare IGP-Konformere umgewandelt wird, wovon nur eins ein Substrat von TrpA darstellt.

Das Substratanalogon rCdRP wird aus CdRP durch nicht stereoselektive Reduktion am C2' mittels NaBH₄ gewonnen. Sollte die Keto-Enol-Tautomerie in CdRP auch mit C3' stattfinden (Abbildung 26 d, e), würden durch Reduktion nicht nur zwei Konformere an C2', sondern auch an C3' gebildet werden, insgesamt also eine Mischung aus vier verschiedenen Konformeren entstehen.

Um unterschiedliche Konformere von CdRP, rCdRP und IGP nachzuweisen, eignen sich verschiedene Methoden. Da sich die Formen von rCdRP und IGP nicht ineinander umwandeln können, wäre es möglich, sie über chirale Säulen zu trennen und anschließend vergleichend zu charakterisieren. Zusätzlich würden NMR-Messungen Auskunft über die Anordnung der Substituenten an allen chiralen Zentren geben. Für das Substrat CdRP kann dieser Nachweis nur indirekt über rCdRP erfolgen, da es durch das Keto-Enol Gleichgewicht ständig zu Umlagerungen kommt. Erste Messungen mit rCdRP, welches durch Chromatographie an einer DEAE-Sepharose *Fast-Flow* Säule gereinigt und anschließend lyophilisiert wurde, zeigen eine sehr starke Linienverbreiterung in der ¹H-NMR Spektroskopie, welche vermutlich durch Austauschprozesse und nicht vollständig entferntes Ammoniumacetat verursacht wird. Eine genaue Zuordnung der Signale war unter diesen Bedingungen nicht möglich.

Für weitere NMR-Messungen ist geplant, über HPLC gereinigtes CdRP (3.4.7.2) für die rCdRP-Synthese zu verwenden und das Ammoniumacetat durch mehrfaches Lyophilisieren nahezu vollständig zu entfernen. Ebenso soll mit IGP verfahren werden.

4.2.3 Reinigung des Substrates CdRP mittels RP-HPLC

Durch die chemische Synthese von CdRP aus Anthranilat und Ribose-5-phosphat entstehen neben dem Produkt einige undefinierte Neben- und Abbauprodukte, welche unerwünschte Verunreinigung darstellen (3.4.7.1). Die Herstellung als Bariumsalz soll zu einer Reinheit von 95 % führen (Creighton und Yanofsky, 1970), das nach diesem Protokoll erstellte CdRP erwies sich im Rahmen dieser Dissertation jedoch als nicht reaktiv. Sauberes Substrat ist jedoch eine Voraussetzung um exakte, reproduzierbare *pre-steady-state* Messungen durchführen zu können. Mittels *Reversed-Phase*-Chromatographie an einer HPLC Anlage wurde CdRP erfolgreich von den meisten Neben- und Abbauprodukten, welche bei 278 und 327 nm

nachweisbar sind, befreit. Die Reinigung erfolgte wie in 3.4.7.2 beschrieben über einen Acetonitrilgradienten, mit einer semi-präparativen C18-Säule (Abbildung 27 A).

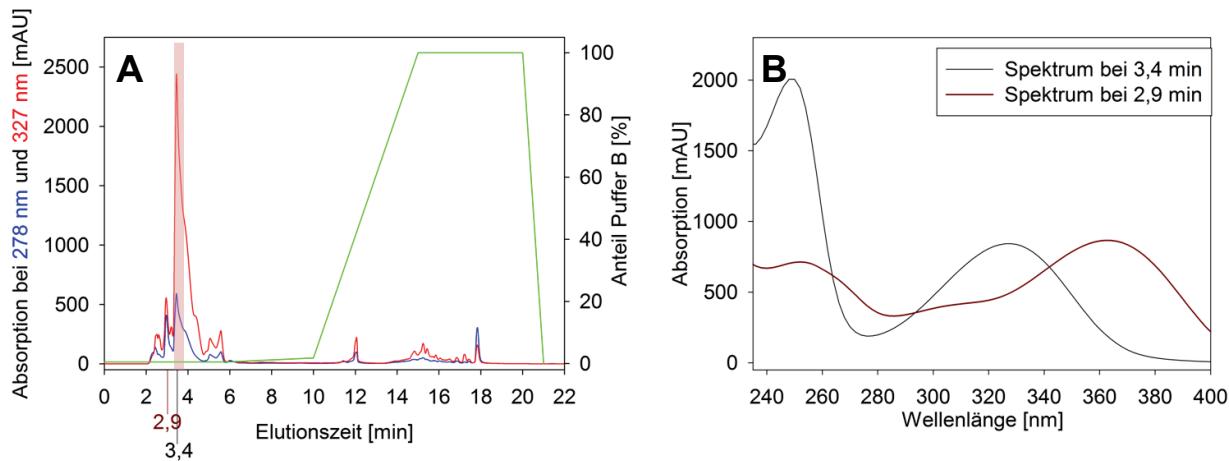


Abbildung 27: Präparativer HPLC-Lauf zur CdRP-Reinigung mit einer HiPAK C18-Säule.

A: In blau ist die Absorption bei 278 nm, in rot die Absorption bei 327 nm gezeigt. Der rot hinterlegte Abschnitt des Elutionsprofils markiert sauberes CdRP. B: In schwarz ist das Spektrum des gesammelten CdRP-Peaks gezeigt, in braun das Spektrum eines Neben- oder Abbauproduktes.

Die zahlreichen Peaks deuten auf starke Verunreinigung hin. Um Elutionsfraktionen mit sauberem CdRP zu sammeln wurden von den ersten Läufen die Peak-zugehörigen Absorptionsspektren aufgenommen und die Reproduzierbarkeit überprüft. CdRP weist Absorptionsmaxima bei 327 und 252 nm und ein Minimum bei 278 nm auf. Beispielhaft ist in Abbildung 27 B ein Spektrum eines der Nebenprodukte (Elutionszeit 2,9 min) und das von CdRP (Elutionszeit 3,4 min) dargestellt, welches in reiner Form zwei Absorptionsmaxima bei 327 und 252 nm und ein Minimum bei 278 nm aufweist. Auffallend ist die frühe Elution von CdRP bevor der Gradient beginnt, somit erfolgt die Trennung im isokratischen Bereich. Die Isolierung des Substrates erfolgte durch manuelles Sammeln der Fraktionen mit sauberem CdRP.

In einem anschließenden analytischen Lauf wurde die Reinheit des isolierten CdRP geprüft. Sowohl das Elutionsprofil, als auch das Absorptionsspektrum weisen auf hoch reines CdRP hin (Abbildung 28).

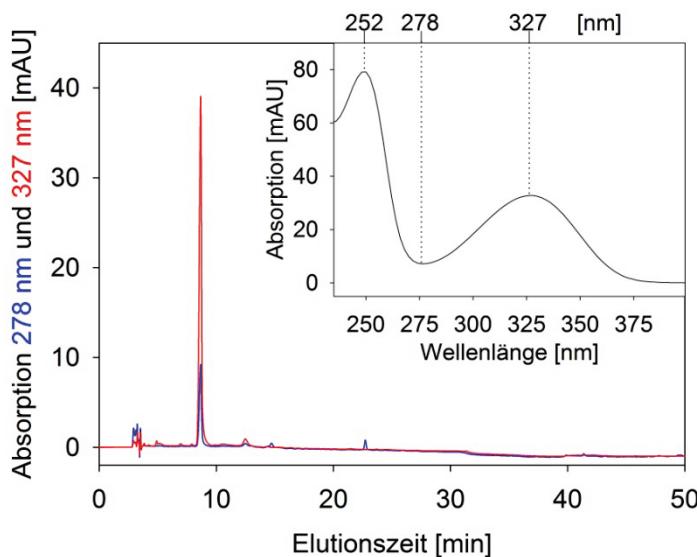


Abbildung 28: Analytischer HPLC-Lauf zur Überprüfung der CdRP-Reinheit mit einer Nucleosil C18-Säule.

In blau ist die Absorption bei 278 nm, in rot bei 327 nm gezeigt. Im Insert ist das Spektrum des dominanten CdRP-Peaks bei 8,7 min gezeigt. Die Verwendung unterschiedlicher Säulen und Gradienten erklären die Unterschiede in der Elutionszeit im Vergleich zu Abbildung 27.

Das so aufgereinigte Substrat wurde einer photometrischen Konzentrationsanalyse (3.5.2.1) unterzogen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert oder zur Herstellung von rCdRP und IGP (3.4.7.3, 3.4.7.4) verwendet.

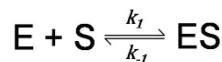
Durch diese Aufreinigungsmethode konnten pro präparativem Lauf etwa 2 ml sauberes CdRP mit einer Konzentration von ungefähr 1,1 mM gewonnen werden. Das hieraus synthetisierte rCdRP hatte eine Konzentration von etwa 1,3 mM. Das Ansteigen der Konzentration ist mit dem Verflüchtigen von Lösungsmittel in der abschließenden Einengung mit der Speedvac zu erklären. Die Konzentration von IGP lag bei etwa 0,9 mM, da die Lösung durch die Zugabe von Puffer und Enzym vor der Umsetzung leicht verdünnt wurde.

4.2.4 Analyse der Kinetik von Ligandenbindung und Umsetzung anhand von intrinsischen Signalen

4.2.4.1 Kinetik der Bindung von Liganden an sTrpC-wt

Durch *pre-steady-state* Messungen können die Ratenkonstanten für die Assoziation und Dissoziation der einzelnen Liganden bestimmt und außerdem Aussagen zur Anzahl der Schritte im Bindungsmechanismus gemacht werden. Betrachtet man

beispielsweise eine einfach bimolekulare Bindungsreaktion eines Enzyms E mit dem Liganden S nach dem Schema



so wird die Akkumulation des ES-Komplexes durch eine einfach exponentielle Funktion beschrieben: $y = A \cdot e^{-kt} + c$, wobei y dem Signal des Enzymkomplex zum Zeitpunkt t entspricht, A die maximale Signaländerung ist, k die observierte Ratenkonstante darstellt, t den Zeitpunkt bestimmt und c den Endwert wiedergibt. Hieraus ergibt sich: $[ES]_t = [ES]_{max} \cdot e^{-kt} + c$. Liegen Bedingungen pseudo-erster Ordnung vor ($[S] \gg [E]$; $[S] \approx [S]_0$) wird ein linearer Zusammenhang zwischen der Ratenkonstanten der Exponentialfunktion (λ) und der Konzentration von S erwartet. Dabei gilt: $\lambda = k_1[S] + k_{-1}$, wobei man aus der Steigung der Geraden die Assoziationskonstante $k_{on} = k_1$ und aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse die Dissoziationskonstante $k_{off} = k_{-1}$ bestimmen kann.

Umfasst die Bindungsreaktion hingegen Vorgleichgewichte der Substrate oder Enzyme, oder an die Bindung angeschlossene Isomerisierungsreaktionen des Enzym-Liganden-Komplexes, und sind diese geschwindigkeitsbestimmend, so sind entweder mehrfach exponentielle Verläufe der Transienten zu erwarten oder eine Auftragung der observierten Ratenkonstante k_{obs} als Funktion der Substratkonzentration ergibt keinen linearen, sondern einen hyperbolischen Verlauf.

4.2.4.1.1 Kinetik der Bindung von rCdRP

Die Bindung des Substratologen rCdRP an sTrpC-wt wurde von Dr. S. Schlee mittels *Stopped-flow* Messungen bei 25 °C über FRET verfolgt (3.5.7.2). Hierzu wurden zwei Messreihen unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung aufgenommen. Bei Überschuss des Enzyms wurden zwei-phasige Transienten (Abbildung 29 A), bei der Messreihe mit einem Überschuss an Ligand drei-phasige Transienten beobachtet (Abbildung 29 B).¹

¹ Die Probenkonzentrationen in den Spritzen werden durch Mischen im *Stopped-flow* Gerät auf die Hälfte verdünnt. Zur Verdeutlichung sind über den Sekundärplots sowohl Spritzen- als auch Zellkonzentrationen nach dem Beispiel 2/1 µM (Spritzen-/Zellkonzentration) angegeben. In der Achsenbeschriftung, den Bildunterschriften, sowie im Text werden nur Zellkonzentrationen angegeben.

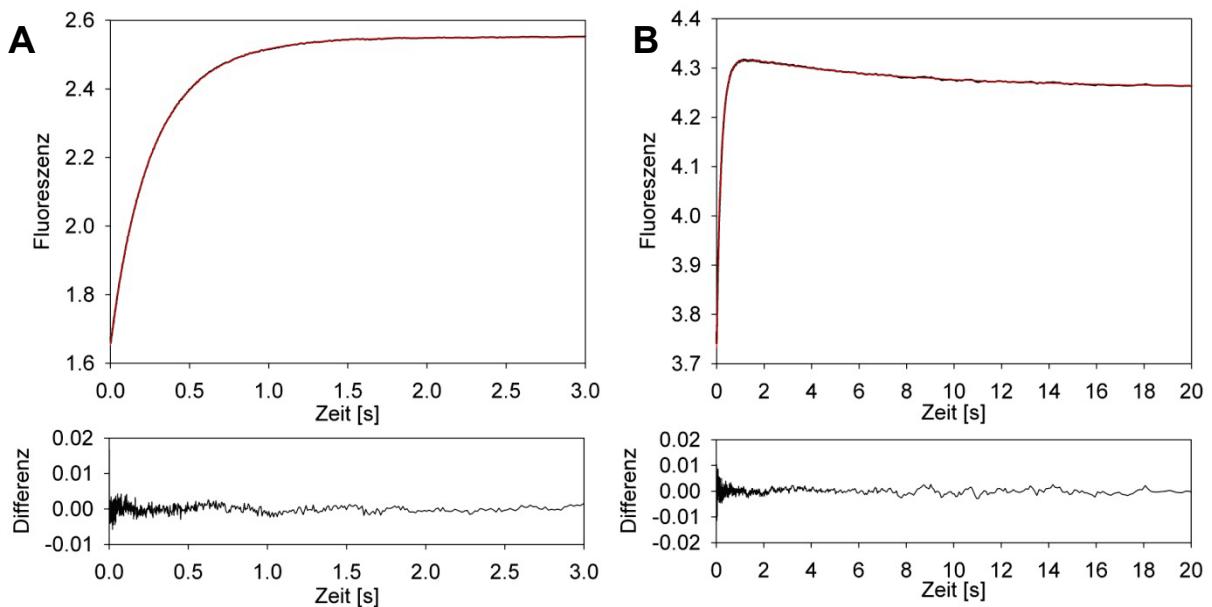


Abbildung 29: Messung der Kinetik der rCdRP-Bindung an sTrpC-wt durch Verfolgung der *Stopped-flow* Transienten.

A: Mischung von 2,5 μM sTrpC-wt mit 0,25 μM rCdRP; B: Mischung von 0,25 μM sTrpC-wt mit 2,5 μM rCdRP. Es wurde der FRET zwischen dem Tryptophan W8 des Enzyms zu rCdRP bei einer Anregung von 295 nm und einem Emissions-Cut-off-Filter von 400 nm bei 25 °C in 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA gemessen.

Die für die verschiedenen Transienten der beiden Messreihen gefitteten Ratenkonstanten (λ) bzw. absoluten Amplituden (A) wurden gegen die eingesetzten Reaktantenkonzentrationen aufgetragen. (Ratenkonstanten λ sind observierte Ratenkonstanten, die durch Angleichung der Transienten an Exponentialfunktionen erhalten werden, k hingegen bezeichnet mikroskopische Ratenkonstanten im Reaktionsmechanismus).

In beiden Fällen korrelieren die beiden schnellen Phasen linear mit der eingesetzten Substrat- bzw. Enzymkonzentration (Abbildung 30).

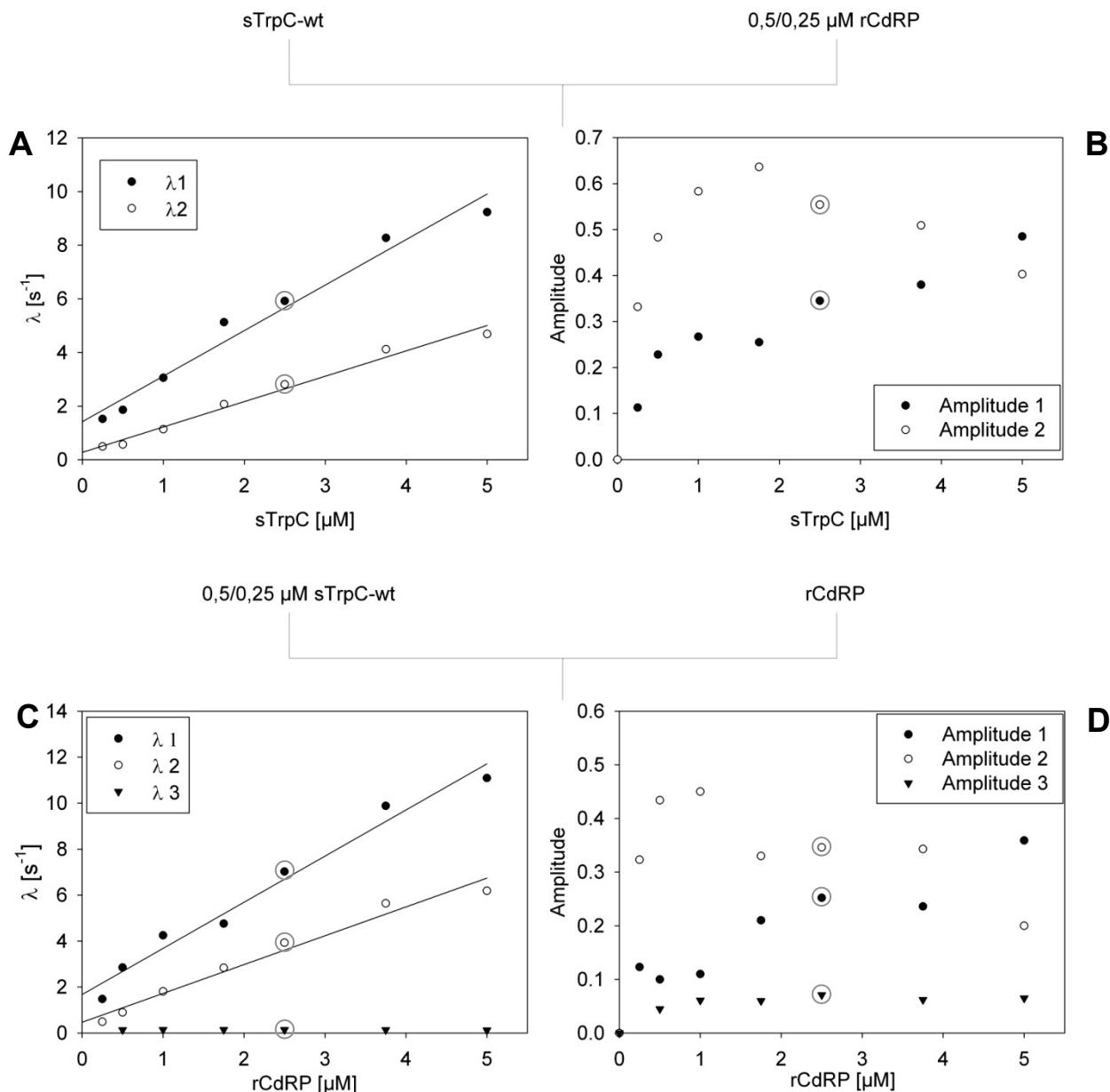


Abbildung 30: Kinetik der Bindung von rCdRP an sTrpC-wt: Sekundärdiagramme der Raten und Amplituden

Messbedingungen: 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA, 25 °C;

Ratenkonstanten und Amplituden wurden durch Fit der Transienten mit einer zweifach exponentiellen (A, B) und einer dreifach-exponentiellen Gleichung (C, D) berechnet. Die aus der Transienten in Abbildung 29 A abgeleiteten Werte sind durch Kreise gekennzeichnet.

Es ist die Abhängigkeit der Ratenkonstanten λ (A) sowie der Amplituden (B) von der sTrpC-Konzentration in der Messzelle gezeigt. Es ist die Abhängigkeit der Ratenkonstanten λ (C) sowie der Amplituden (D) von der rCdRP-Konzentration in der Messzelle gezeigt. Die aus der Transienten in Abbildung 29 B abgeleiteten Werte sind durch Kreise gekennzeichnet.

Die Sekundärdiagramme deuten auf zwei bimolekulare Bindungsschritte hin. Eine Möglichkeit wäre, dass rCdRP als Racemat vorliegt und die beiden Konformere mit unterschiedlichen Assoziations- bzw. Dissoziationsraten an das Enzym binden. Aus Abbildung 26 d, e geht hervor, dass CdRP vermutlich in zwei verschiedenen

Konformeren vorliegt. Selbst wenn jedoch die dort angenommene Enol-Tautomerie nicht stattfindet, entstehen durch die Reduktion zu rCdRP zwei Konformere mit unterschiedlichen Konfigurationen an C2'. Unter Annahme der Tautomerie läge rCdRP gar in vier unterschiedlichen Konformationen vor.

Die *Stopped-flow* Daten wurden einer globalen Analyse mit dem Programm DynaFit unterzogen, unter der Annahme dass rCdRP als racemisches Gemisch zweier Konformere vorliegt. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 31 gezeigt.

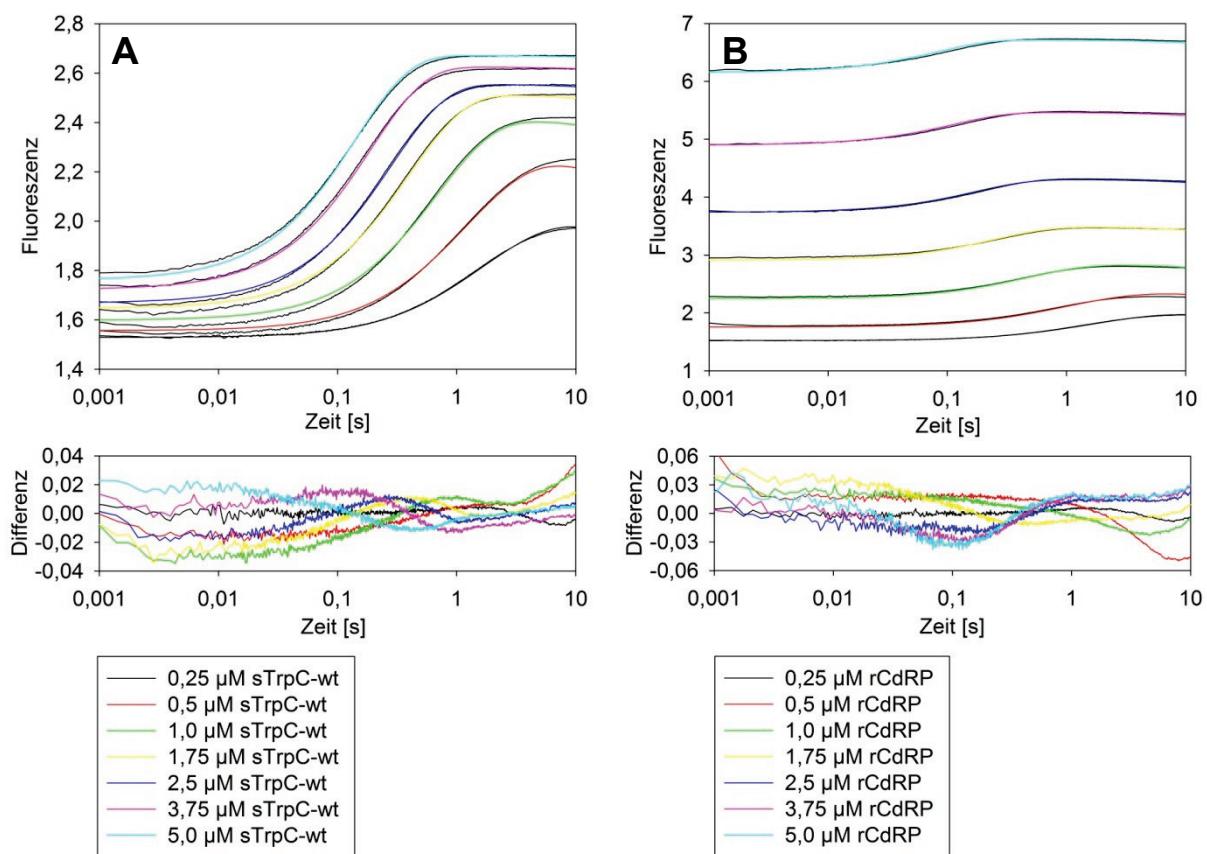


Abbildung 31: Globale Analyse der Bindung von rCdRP an sTrpC-wt mit DynaFit.

Zeitverlauf der *Stopped-flow*-Transienten bei 25 °C in 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA nach Mischung von A: 0,25 - 5,0 µM sTrpC-wt mit 0,25 µM rCdRP und B: 0,25 µM sTrpC-wt mit 0,25 - 5,0 µM rCdRP. Die Transienten sind schwarz, die zugehörigen Annäherungen in Farbe gezeigt. Unterhalb der Graphen sind die Differenzen zwischen Messung und Fit dargestellt.

Die Analyse ergab eine Bindungsaffinität von $K_D1 = 0,003 \mu\text{M}$ ($k_{on} = 3,6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{off} = 0,012 \text{ s}^{-1}$) für den Enzym-Ligand-Komplex des einen Konformers und eine zweite Dissoziationskonstante $K_D2 = 0,02 \mu\text{M}$ ($k_{on} = 1,3 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{off} = 0,03 \text{ s}^{-1}$), die mit dem anderen Konformer assoziiert ist. Außerdem werden den gebildeten Enzym-Ligand-Komplexen unterschiedliche Fluoreszenzkoeffizienten in der globalen Analyse zugeordnet. Dabei ergab die Annäherung, dass der niedrigaffine Komplex (K_D2) eine 14-fach höhere Fluoreszenzemission als der hochaffine Komplex hat. In

einer Fluoreszenztitration würde demnach fast ausschließlich der niedrigaffine Enzym-Ligand Komplex detektiert werden. Tatsächlich liegt der über Fluoreszenztitration bestimmte K_D -Wert bei 0,05 μM (4.1.3.1) und stimmt somit gut mit dem K_D 2 der globalen Analyse überein.

Für die Bindung des Substratanalogs lässt sich daraus folgendes Schema annehmen:



wobei S1 und S2 zwei unterschiedliche Konformere von rCdRP repräsentieren und ES2 wesentlich stärker fluoresziert als ES1.

Unklar ist bisher jedoch, welches chirale C-Atom (C3' oder C2') für die unterschiedliche Bindung von rCdRP an sTrpC verantwortlich ist. Wie bereits erwähnt, kann rCdRP theoretisch in bis zu vier unterschiedlichen Konformationen vorliegen.

4.2.4.1.2 Kinetik der Bindung von IGP

In Merz et al. (2000) wurde die Bindung von IGP an sTrpC-wt über kombinierte *Stopped-Flow*- und Titrations-Analysen bestimmt. In der Veröffentlichung wird eine Messreihe mit IGP im deutlichen Überschuss beschrieben. Die bei 37 °C aufgenommenen Transienten wurden einfach exponentiell ausgewertet und die observierten Geschwindigkeitskonstanten der Exponentialfunktion zeigen im Sekundärdiagramm eine lineare Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration. Aus der Steigung wurde die Assoziationskonstante k_{on} für IGP ermittelt. Der K_D der IGP-Bindung wurde durch Gleichgewichtstitation bestimmt und die Dissoziationskonstante k_{off} aus diesen beiden Werten berechnet. Sie ist mit 0,19 s^{-1} fast identisch mit dem k_{cat} (0,15 s^{-1}), die Freisetzung des IGP scheint somit der ratenlimitierende Schritt der Reaktion zu sein. Um die publizierten Ratenkonstanten zu überprüfen, wurden auch in dieser Arbeit *pre-steady-state* Messungen der Bindung von IGP an sTrpC-wt durchgeführt (3.5.7.4, 3.5.7.5).

Hierzu wurden bei 25 °C zwei Messreihen unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung untersucht. Bei der ersten Messreihe wurde die Konzentration von sTrpC konstant gehalten und die Konzentration des im Überschuss vorliegenden IGP variiert. Es wurde ein einfacher exponentieller Fluoreszenzabfall beobachtet (Abbildung 32 A). Bei Messzeiten > 2 s nimmt die Fluoreszenzemission linear ab. Da dieser Effekt durch zeitweises Schließen des Shuttles verschwindet, ist davon auszugehen, dass es sich um das Ausbleichen von IGP handelt. Die zweite

Messreihe erfolgte mit konstanter IGP-Konzentration und Variation der Konzentration an im Überschuss befindlichen sTrpC. Auch hier kommt es zunächst zu einem exponentiellen Abfall der Fluoreszenz, im Gegensatz zu den Transienten mit Überschuss an IGP, wird in Gegenwart hoher TrpC-Konzentrationen nach ca. 0,3 s jedoch ein leichter Anstieg der Fluoreszenz sichtbar (Abbildung 32 B). Aufgrund der geringen Signalamplitude war es jedoch nicht möglich, die zweite Phase exakt durch eine Exponentialfunktion zu beschreiben.

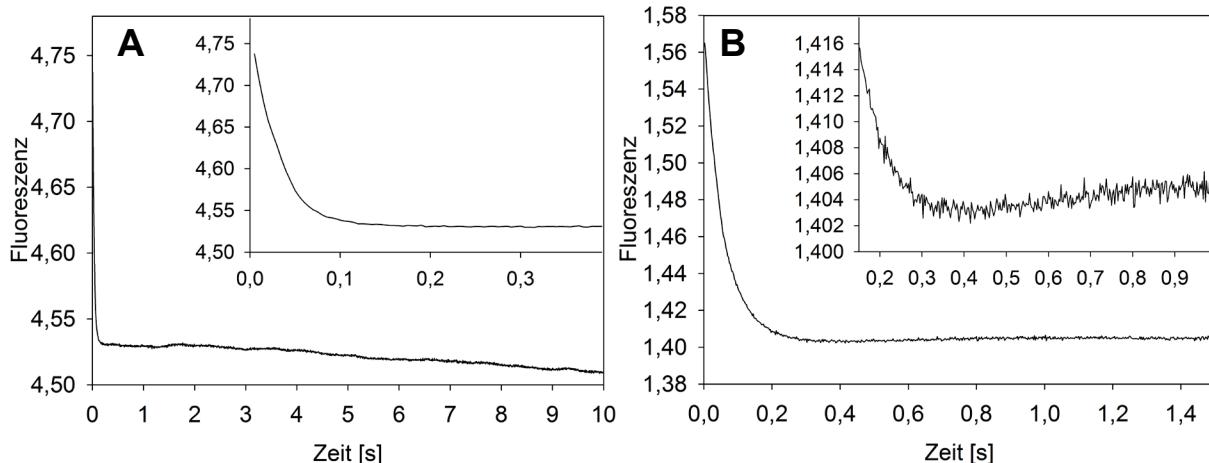


Abbildung 32: Messung der Kinetik der IGP Bindung an sTrpC-wt durch Verfolgung der *Stopped-flow* Transienten.

A: Mischung von 1 μM sTrpC-wt mit 7 μM IGP; Das Insert zeigt den ersten Teil der Transienten. B: Mischung von 5 μM sTrpC-wt mit 1 μM IGP. Das Insert zeigt den zweiten, leicht ansteigenden Teil der Transienten. Die IGP-Fluoreszenz wurde bei 280 nm angeregt und mit einem Cut-off-Filter von 335 nm bei 25 °C in 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA gemessen.

In Abbildung 33 ist die Angleichung durch eine einfach exponentielle Funktion für jeweils die erste Phase der Transienten aus Abbildung 32 gezeigt.

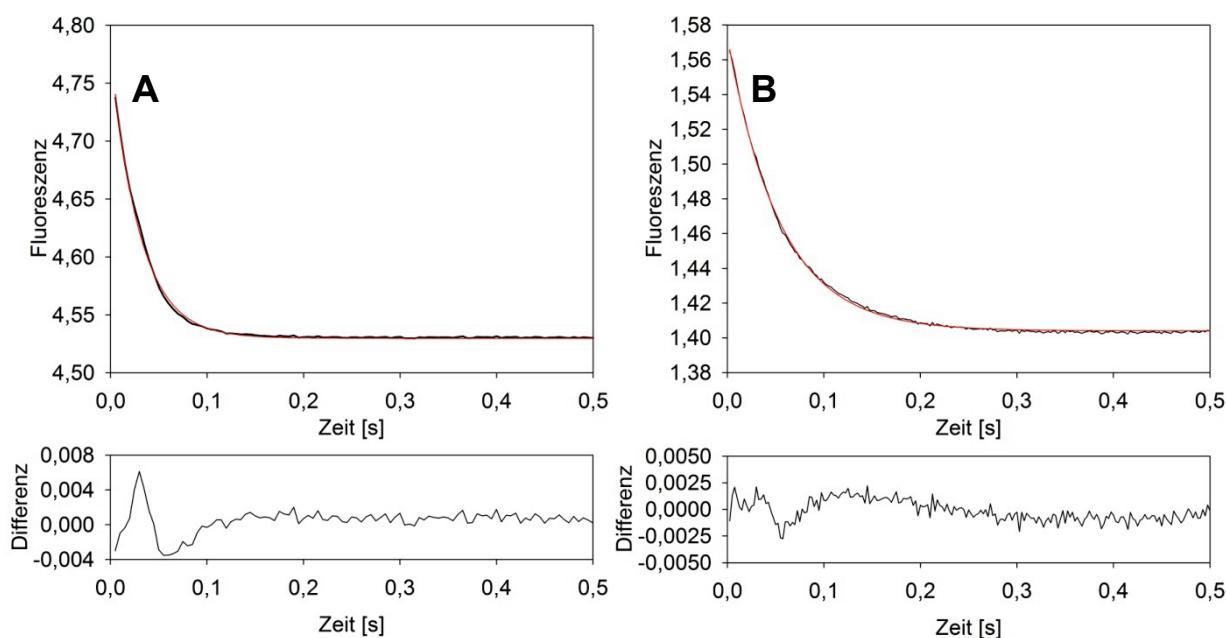


Abbildung 33: Kinetik der IGP-Bindung an sTrpC-wt und Fit der initialen Phase mit einer einfach-exponentielle Gleichung.

A: Mischung von 1 μM sTrpC-wt mit 7 μM IGP in schwarz, der zugehörige Fit in rot dargestellt.
B: Mischung von 5 μM sTrpC-wt mit 1 μM IGP in schwarz, der zugehörige Fit in rot dargestellt.

Die Sekundärdiagramme für beide Messreihen sind in Abbildung 34 gezeigt.

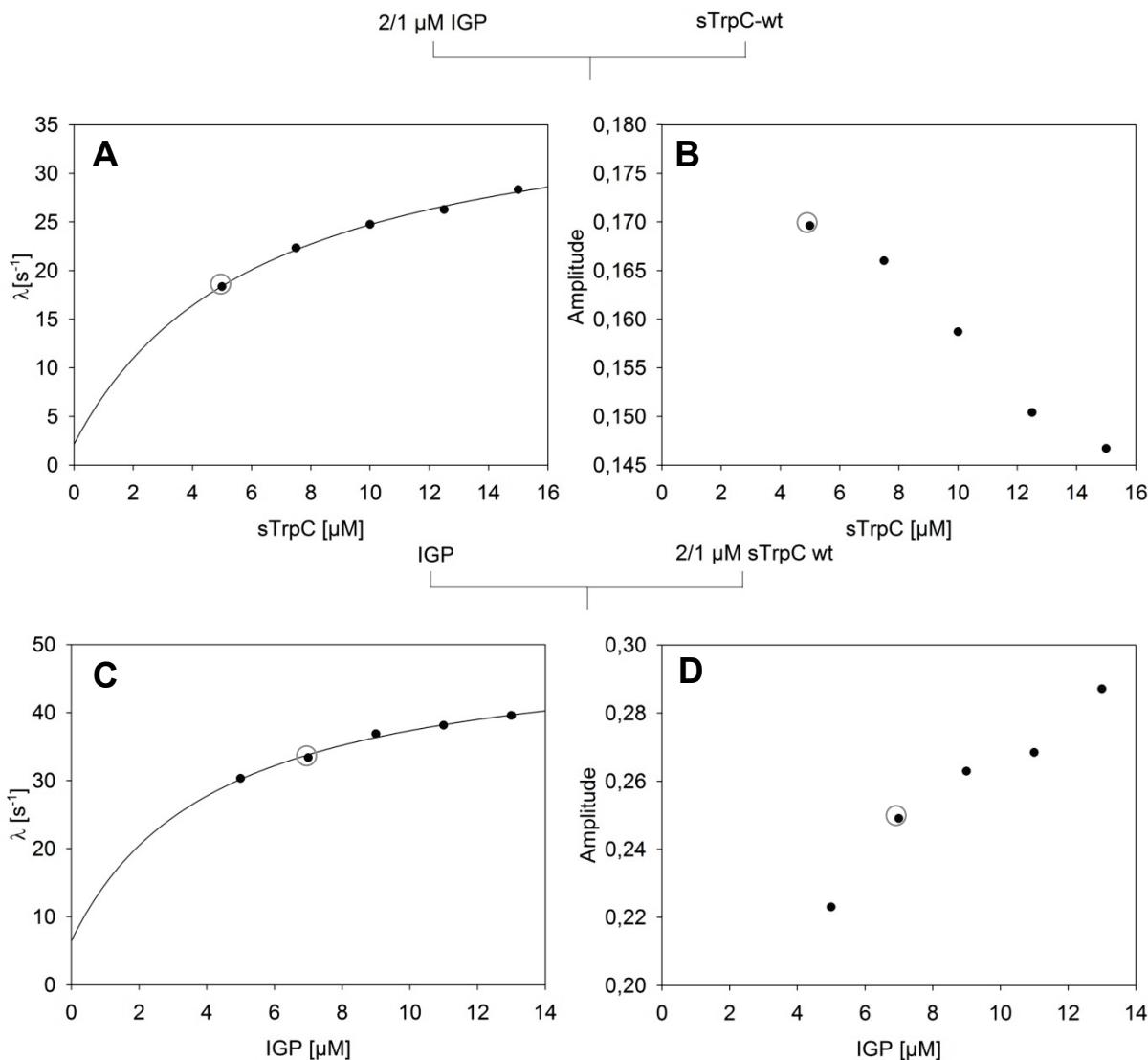


Abbildung 34: Kinetik der Bindung von IGP an sTrpC-wt: Sekundärdiagramme der Raten und Amplituden.

Messbedingungen: 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA, 25 °C;

Ratenkonstanten und Amplituden wurden durch Fit der Transienten beider Messreihen mit einer einfach exponentiellen Gleichung berechnet.

Es ist die Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstanten λ (A) sowie der Amplituden A (B) von der sTrpC-Konzentration in der Messzelle gezeigt. Es ist die Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstanten λ (C) sowie der Amplituden A (D) von der IGP-Konzentration in der Messzelle gezeigt. Die aus den Transienten in Abbildung 33 A bzw. B abgeleiteten Werte sind durch Kreise gekennzeichnet.

In beiden Messreihen zeigt λ eine hyperbolische Abhängigkeit sowohl von der Enzym- als auch von der Substratkonzentration. Die Amplituden sind ebenfalls konzentrationsabhängig, wobei sie mit steigender Enzymkonzentration annähernd linear abnehmen, mit steigender IGP-Konzentration hingegen zunehmen. Ein hyperbolischer Kurvenverlauf der Ratenkonstanten ist häufig ein Hinweis für ein

Vorgleichgewicht des Enzyms bzw. Substrats oder eine an die Bindung angeschlossene Isomerisierungsreaktion.

Zur genaueren Analyse wurden die Messreihen einer globalen Analyse mittels DynaFit unterzogen. Hierfür wurden 11 zusätzliche Messungen in ähnlichen molaren Verhältnissen von Ligand und Enzym durchgeführt, da diese Transienten den Informationsgehalt deutlich erhöhen und DynaFit nicht auf Bedingungen pseudoerster Ordnung angewiesen ist (Klostermeier et al., 1998). Insgesamt wurden 21 Graphen in die Analyse einbezogen und unter anderem mit folgendem Modell 1 analysiert:



Der Ligand S, in diesem Fall IGP, bindet an das Enzym E, hier sTrpC, und der gebildete Enzym-Substrat-Komplex (ES) wird durch eine nachfolgende intramolekulare Transformation zum Komplex ES' umgeformt, wobei ES und ES' unterschiedliche Fluoreszenzemissionen haben können.

Eine globale Analyse mit diesem Bindungsschema führte auf den ersten Blick zu relativ guten Ergebnissen mit geringen Fehlerabweichungen der Ratenkonstanten und Fluoreszenzkoeffizienten, jedoch zeigten die Annäherungen bei höheren Ligandenkonzentrationen deutliche Abweichungen (7.4; IGP Bindung). In Abbildung 35 sind beispielhaft zwei Transienten mit den zugehörigen Angleichungen durch DynaFit gezeigt.

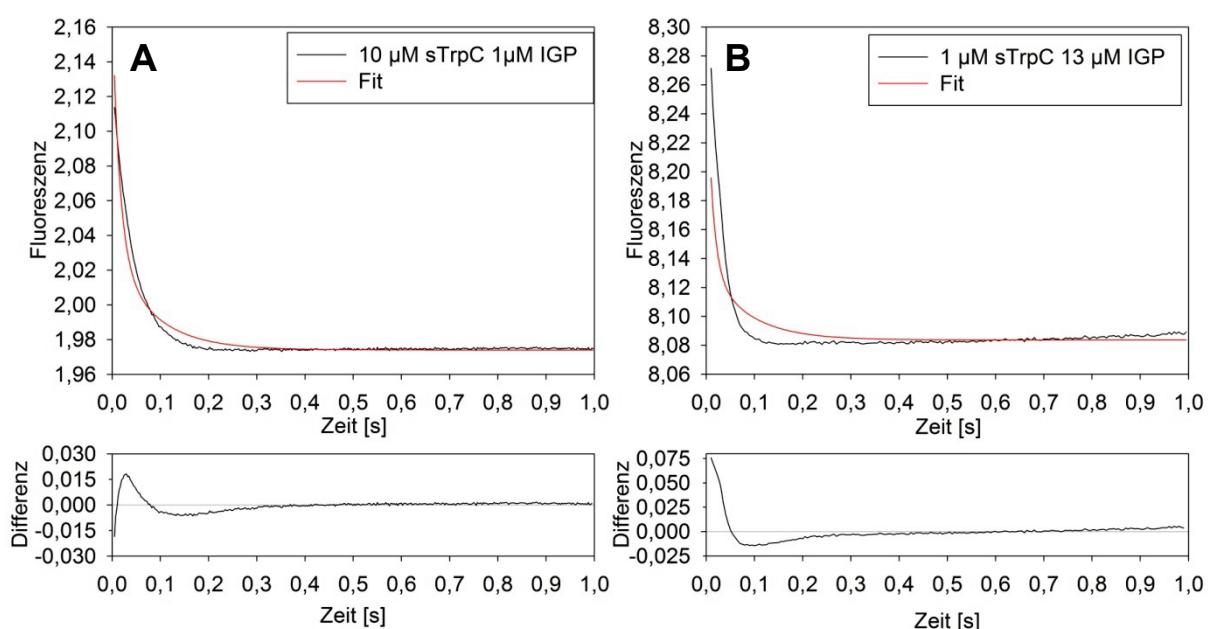


Abbildung 35: Globale Analyse der Bindung von IGP an sTrpC-wt mit DynaFit nach Modell 1 am Beispiel von zwei Transienten.

Zeitverlauf der *Stopped-flow*-Transienten in 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA nach Mischung von A: 10 μ M sTrpC mit 1 μ M IGP und B: 1 μ M sTrpC mit 13 μ M IGP bei 25 °C. Die Transienten sind in schwarz, die zugehörigen Annäherungen in rot dargestellt. Unterhalb der Graphen ist die Differenz zwischen Messung und Fit gezeigt.

In Tabelle 10 sind die aus dem globalen Fit erhaltenen Werte für die verschiedenen Parameter aufgeführt.

Tabelle 10: Globale Analyse der Bindung von IGP an sTrpC-wt mit DynaFit: Ratenkonstanten und differentielle molare Fluoreszenzkoeffizienten für Modell 1.

r(x) ist ein normiertes Fluoreszenzsignal der einzelnen Signalgeber

		Abweichung	Abweichung [%]
k_1	$6,02222 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	0,007937	0,1
k_{-1}	$7,61271 \text{s}^{-1}$	0,013	0,2
k_2	$6,484431 \text{s}^{-1}$	0,01086	0,2
k_{-2}	$6,48996 \text{s}^{-1}$	0,01586	0,2
$r(E)$	0,00081549	$1,5 \times 10^{-5}$	1,9
$r(P)$	0,319468	$2,6 \times 10^{-5}$	0,0
$r(ES)$	0,138202	$8,926 \times 10^{-5}$	0,1
$r(ES')$	0,0652232	$1,271 \times 10^{-4}$	0,2

Auffällig ist, dass alle ermittelten Ratenkonstanten erster Ordnung sehr ähnliche Werte im Bereich von $6,5 - 7,6 \text{ s}^{-1}$ aufweisen und sich die Fluoreszenzkoeffizienten $r(ES)$ und $r(ES')$ nur um den Faktor 2 unterscheiden. Berechnet man die Dissoziationskonstante K_D -Wert mit der für dieses Schema angebrachten Formel

$$(K_D = \frac{K_{D1} \cdot K_{D2}}{1 + K_{D2}} \text{ mit } K_{D1} = \frac{k_{-1}}{k_1} \text{ und } K_{D2} = \frac{k_{-2}}{k_2}; (\text{Olsen et al., 1992}))$$

erhält man einen K_D von $26 \mu\text{M}$, welcher 2 bis 3 Größenordnungen über dem titrierten K_D -Wert von $0,05 \mu\text{M}$ liegt (4.1.3.1). Berücksichtigt man zusätzlich noch die nicht idealen Annäherungen an die Transienten (Abbildung 35), wird deutlich, dass das vorgeschlagene Modell den Bindungsmechanismus von IGP an sTrpC-wt nicht ausreichend beschreibt.

Trotz zahlreicher weiterer Modellierungsversuche, sowohl unter Annahme eines Enzymvorgleichgewichts, als auch unter Zulassung zweier IGP Spezies in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen und nachträglicher erneuter Analyse mit konstantem k_{off} (siehe nachfolgendes Kapitel), konnte bisher kein passender Bindungsmechanismus für die Interaktion zwischen IGP und sTrpC-wt gefunden werden.

4.2.4.1.3 Verdrängung von gebundenem IGP an sTrpC

Um die Dissoziationsrate von IGP aus dem Komplex mit sTrpC-wt trotz des Scheiterns der globalen Bindungsanalyse zu erhalten, wurden Verdrängungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurde der Komplex aus Enzym und Ligand vorgelegt und IGP mit Hilfe eines geeigneten Kompetitors verdrängt. Voraussetzung für eine gut analysierbare Messung ist, dass die Bindung des Kompetitors an das Enzym kein weiteres Fluoreszenzsignal bei den verwendeten Einstellungen hervorruft, da es ansonsten zu Signalüberlagerungen kommen würde. In Vorversuchen wurden für diese Reaktion verschiedene Kompetitoren auf ihre Tauglichkeit untersucht. Als mögliche Reaktanden scheiden die Produktanaloge Indolpropanolphosphat (Dunn et al., 1990) und Indol aufgrund ihrer Fluoreszenz bei den verwendeten Wellenlängen aus. Zusätzlich fand Glycerin-3-Phosphat (G3P) auch schon als IGP-Analogon Verwendung (Dunn et al., 1990). Durch das Fehlen der Indoleinheit fluoresziert dieses Molekül nicht, dennoch vermitteln die Phosphat- und Glycerineinheiten die Bindung an sTrpC-wt. Bei der Zugabe von G3P (20 µM – 1,7 mM) zu sTrpC-wt (1 µM) zeigte sich jedoch im Gegensatz zur Vergleichstiritation von sTrpC mit Puffer unter identischen Bedingungen unerwarteter Weise eine deutliche Signalabnahme bei etwa 340 nm, welche auch durch einen längerwelligen *Cut-off*-Filter nicht eliminiert werden konnte. Daraus lässt sich schließen, dass bereits die Bindung eines kleinen Moleküls wie G3P eine Änderung der Umgebung des einzigen Tryptophans W8 im Enzym hervorruft.

Durch die konservierte Phosphatbindetasche in sTrpC, kann davon ausgegangen werden, dass Orthophosphat durch Bindung an die Phosphatbindetasche als kompetetiver Inhibitor von sTrpC-wt wirkt. Testmessungen (wie oben beschrieben) zeigten, dass die Bindung an das Enzym kaum Signaländerung auslöst, die Verdrängung von gebundenem IGP jedoch ein deutlich detektierbares Signal liefert. Um den Beitrag der Tryptophan-Fluoreszenz von W8 möglichst gering zu halten, wurde ebenso wie bei den Messungen zur IGP-Bindung ein *Cut-off*-Filter von 335 nm statt von 320 nm verwendet.

Da die Bindungskonstante für Orthophosphat an sTrpC-wt nicht bekannt war, wurde am *Stopped-flow*-Spektrometer zunächst eine Verdrängungsreihe mit variabler Phosphatkonzentration durchgeführt. Dazu wurde ein Komplex aus sTrpC (2 µM) und IGP (1 µM) vorgelegt und das IGP mit 0,05 bis 500 mM Phosphat verdrängt. Die Transienten zeigen einen einfach exponentiellen Verlauf. Die observierte

Ratenkonstante λ und die zugehörige Amplitude A wurde in einem Sekundärplot als Funktion der Phosphatkonzentration aufgetragen (Abbildung 36).

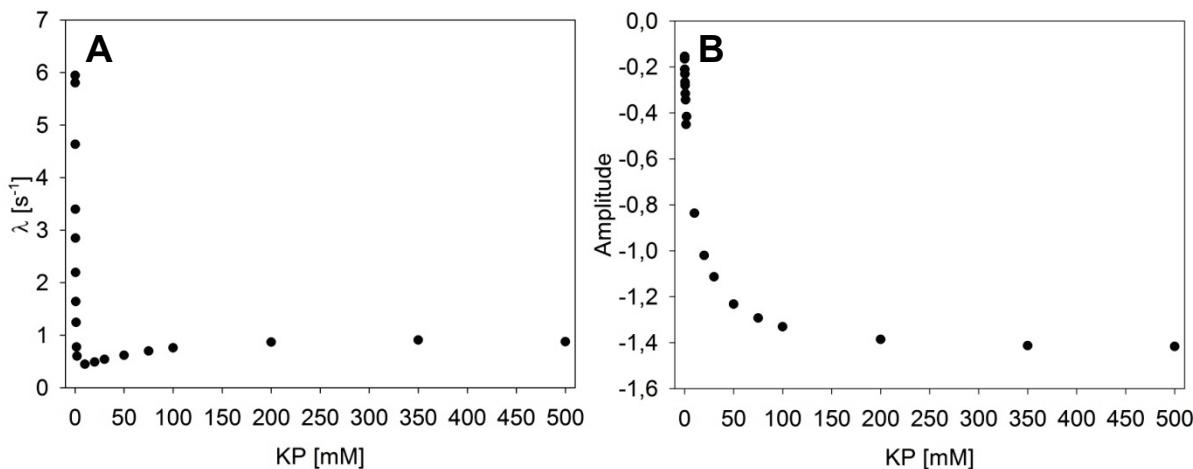


Abbildung 36: Verdrängung von IGP aus dem Komplex mit sTrpC-wt durch Orthophosphat: Sekundärdiagramme der Raten und Amplituden.

Es wurden 2 μ M sTrpC-wt mit 1 μ M IGP vorinkubiert. Das IGP wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen Phosphat verdrängt. Die Messungen fanden bei 25 °C in 50 mM EPPS pH 7,5 und 4 mM EDTA bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einem Emissions-Cut-off-Filter von 335 nm statt. Ratenkonstanten (A) und Amplituden (B) wurden durch Angleichung der Transienten an eine einfach exponentielle Gleichung berechnet.

Bei niedrigen Phosphatkonzentrationen wurden sehr hohe Ratenkonstanten bestimmt, welche bei Erhöhung der Kompetitor-Konzentration absanken. Dies ist möglicherweise auf die Bindung von Phosphat an nicht mit IGP besetztem sTrpC-wt und die damit verbundene geringe Veränderung der Tryptophan-Fluoreszenz zurückzuführen. Etwa ab 2 mM Orthophosphat nahmen die Ratenkonstanten hyperbolisch zu, wobei bei etwa 200 mM Sättigung erreicht wurde. Dieser Teil der Kurve repräsentiert die tatsächliche Verdrängung von IGP aus dem Komplex mit sTrpC-wt. Alle weiteren Messungen wurden mit 250 mM Kaliumphosphat durchgeführt, womit eine vollständige Verdrängung gewährleistet war. Um auszuschließen, dass sich am Enzym gebildetes (intern gebildetes) von außen zugegebenem (extern gebildetes) IGP in der Bindung an sTrpC unterscheiden, wurden die Messungen ebenso mit CdRP durchgeführt, welches durch sTrpC zu IGP umgesetzt wird. Die Ergebnisse unterschieden sich nicht, weswegen weitere Messungen mit extern gebildetem IGP durchgeführt wurden.

Zur Analyse der Verdrängung wurden zwei Messreihen in 50 mM EPPS pH 7,5 mit 4 mM EDTA durchgeführt. Bei der ersten Messreihe wurden sTrpC-wt (2 μ M) mit IGP (0,5 bis 2 μ M) vorinkubiert und das IGP durch Zugabe von 250 mM Kalium-Phosphat aus dem Komplex verdrängt. Bei der zweiten Messreihe wurden IGP (1 μ M) mit

sTrpC (2 bis 10 μ M) vorinkubiert und das gebundene IGP durch Zugabe von 250 mM Kalium-Phosphat verdrängt. Die Auswertung der Transienten erfolgte durch Angleichung an eine einfach exponentielle Funktion, in Abbildung 37 ist beispielhaft eine Transiente mit zugehöriger Annäherung gezeigt.

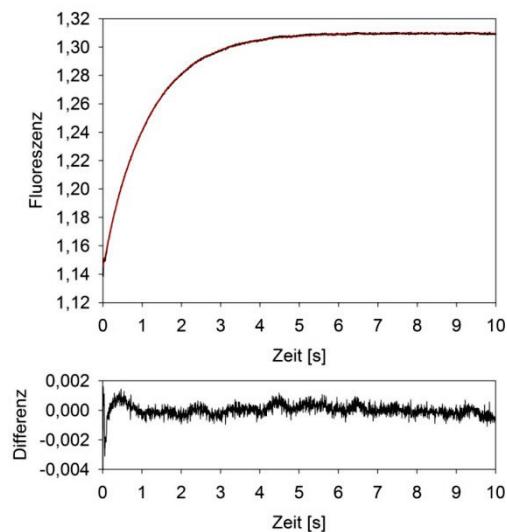


Abbildung 37: Kinetik der IGP-Verdrängung aus dem Komplex mit sTrpC-wt und Fit mit einer einfach exponentiellen Gleichung.

Es wurden 4 μ M sTrpC-wt mit 1 μ M IGP vorinkubiert und das IGP wurde mit 250 mM KP verdrängt. Die Messung erfolgte in 50 mM HEPPS, pH 7,5, 4mM EDTA. Die Transiente ist in schwarz, der zugehörige Fit in rot dargestellt. Die Differenz der beiden Graphen ist darunter gezeigt.

Die Sekundärdiagramme für beide Messreihen sind in Abbildung 38 dargestellt.

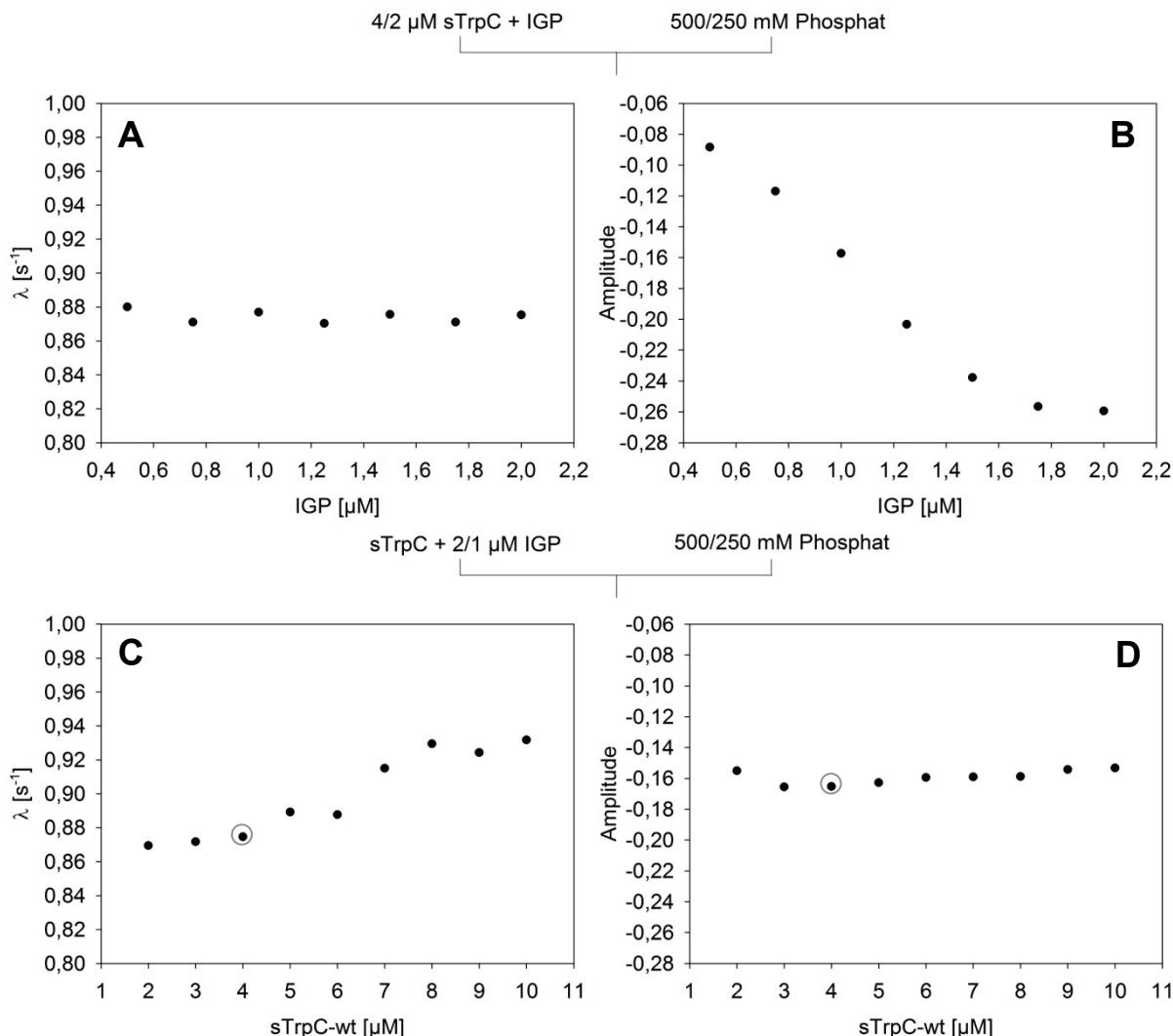


Abbildung 38: Verdrängung von IGP aus einem sTrpC-IGP Komplex durch Phosphat: Sekundärdiagramme der Raten und Amplituden.

Messbedingungen: 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA, 25 °C.

Ratenkonstanten und Amplituden wurden durch Fit der Transienten beider Messreihen mit einer einfach exponentiellen Gleichung berechnet. Es ist die Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstanten λ (A) sowie der Amplituden A (B) von der IGP-Konzentration in der Messzelle gezeigt. Es ist die Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstanten λ (C) sowie der Amplituden A (D) von der sTrpC-Konzentration gezeigt. Die aus der Transienten in Abbildung 37 abgeleiteten Werte sind durch Kreise gekennzeichnet.

Wie Abbildung 38 A zeigt, hat die IGP-Konzentration keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Verdrängung, der k_{off} beträgt $0,87\text{ s}^{-1}$ (Mittelwert $\pm 0,0036$). Die Signaländerung steigt, wie zu erwarten war, mit zunehmender IGP Konzentration (Abbildung 38 B). Mit steigender Enzymkonzentration ist eine minimale Erhöhung der Verdrängungsrate zu beobachten, welche sich eventuell durch eine minimale Signaländerung von an freies Enzym bindendes Orthophosphat erklären lässt (Abbildung 38 C). Die Amplitude wird wie erwartet durch die Enzymkonzentration nicht beeinflusst (Abbildung 38 D).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Verdrängung von IGP aus dem Enzym-Produkt-Komplex mit hohen Konzentrationen von Phosphat möglich ist und bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einem Emissions-Cut-off-Filter mit 335 nm sich ein exponentieller Anstieg des Fluoreszenzsignals zeigt. Die Sekundärplots liefern eine von der Substratkonzentration unabhängige Dissoziationskonstante $k_{off} = 0,87 \text{ s}^{-1}$ und von der Enzymkonzentration leicht abhängige Werte im Bereich von $0,87 - 0,93 \text{ s}^{-1}$. Da die Transienten keine mehrfach exponentiellen Kurvenverläufe aufzeigen, gibt es keinen Hinweis auf zwei verschiedene IGP-Spezies, z.B. optische Isomere, die mit unterschiedlichen Dissoziationsraten verdrängt werden. Es ist außerdem sehr unwahrscheinlich, dass zwei unterschiedliche IGP-Isomere mit identischer Rate dissoziieren. Durch diese Messungen konnte somit der k_{off} von IGP aus dem Komplex mit sTrpC-wt direkt und recht genau bestimmt werden. Der Wert liegt etwa vier- bis fünffach über dem von Merz et al. (2000) bestimmten Wert von $0,19 \text{ s}^{-1}$ bei 37°C . Eine mögliche Ursache in der großen Differenz der beiden Dissoziationskonstanten ist die Bestimmungsmethode. Während in dieser Arbeit der Wert direkt bestimmt wurde, ist er in Merz et al. (2000) aus zwei experimentell ermittelten Daten (K_D und k_{on}) berechnet worden, was zu einem größeren Fehler führt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Orthophosphat IGP nicht nur kompetitiv verdrängt, sondern sTrpC auf andere Weise, wie Konformationsänderungen, Bindung an eine zweite Bindestelle, oder durch die deutlich erhöhte Ionenstärke beeinflusst. Dies würde den nicht linearen Kurvenverlauf der Verdrängung in Abhängigkeit der Phosphatkonzentration eventuell erklären. Dafür spricht auch, dass sich in STO-Messungen in Anwesenheit von geringen Mengen Phosphat mindestens zwei von drei Ratenkonstanten signifikant ändern (Schlee, unpublizierte Daten). Um eine zuverlässige Einschätzung des ermittelten k_{off} zu geben, sollten zuerst in steady-state-Messungen ermittelt werden, ob Orthophosphat ein rein kompetitiver Inhibitor ist, oder ob Mischeffekte bei der Verdrängung auftreten. Unter diesen Voraussetzungen kann man den k_{off}^{IGP} -Wert bei 37°C von Merz et al. (2000) nicht mit dem hier mittels Verdrängung bestimmten k_{off}^{IGP} bei 25°C vergleichen.

4.2.4.2 Pre-steady-state Kinetiken

Pre-steady-state-Analysen können am Anfang von *Multi-turnover-(MTO)* Experimenten in der „burst-Phase“ vor dem Beginn der *steady-state-Phase* gemacht werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Analyse von *Single-turnover-(STO)* Experimenten. Im Gegensatz zu MTO-Bedingungen, wo das Substrat in großem Überschuss vorliegt und jedes Enzimmolekül multiple Umsätze katalysiert, reagiert unter STO-Bedingungen jedes Enzimmolekül mit maximal nur einem Substratmolekül. Die einzelnen Reaktionsschritte der katalytischen Reaktion können daher, bei geeigneten spektrometrischen Signalen der Intermediate, sehr gut charakterisiert werden. Ein Nachteil von STO-Experimenten ist, dass bei hohen Konzentrationen gearbeitet werden muss, um die vollständige Bindung des Substrates an das Enzym zu erreichen. Mit der in 3.5.8.2 angegebenen Formel wurde vor den Messungen die prozentuale Bindung von CdRP an sTrpC in den einzelnen Ansätzen bestimmt, um jeweils sicher von STO-Bedingungen ausgehen zu können. Als Wert der Dissoziationskonstante für die Bindung von CdRP an sTrpC-wt wurde dabei der K_M^{CdRP} bzw. K_D^{rCdRP} verwendet, der jeweils $0,05 \mu\text{M}$ beträgt (Tabelle 8).

4.2.4.3 Single-turnover Umsatz von CdRP durch sTrpC-wt

Erste STO-Messungen unter Verwendung der Absorption bei 327 nm zeigten zeitabhängig eine Abnahme des Signals, welche auf das Verschwinden des Substrates CdRP, das ein Absorptionsmaximum bei dieser Wellenlänge aufweist, schließen lässt (Abbildung 39 A). Bei Betrachtung des Signals bei 278 nm beobachtet man einen deutlichen Anstieg der Absorption, welche die Zunahme des Produktes IGP widerspiegelt (Abbildung 39 B).

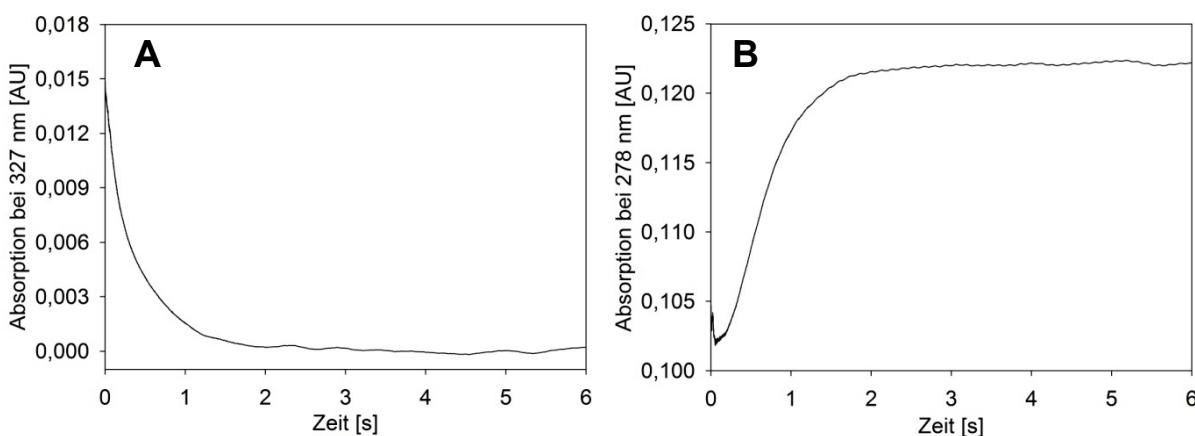


Abbildung 39: STO-Umsatzkurven unter Beobachtung der Absorptionsänderung.

Es wurden $5 \mu\text{M}$ CdRP durch $20 \mu\text{M}$ sTrpC-wt umgesetzt. Die Messungen erfolgten bei 25°C in 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA bei einer Detektionswellenlänge von 327 nm (A) und 278 nm (B). Es wurden jeweils fünf Einzelmessungen durchgeführt, welche anschließend gemittelt wurden.

In beiden Messungen entsprach der Extinktionsunterschied dem Wert, der durch den jeweiligen differentiellen Extinktionskoeffizienten zu erwarten war. Aufgrund der niedrigen Werte dieser Koeffizienten von $\epsilon_{327}^{(\text{CdRP-IGP})} = 3,43 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $\epsilon_{278}^{(\text{IGP-CdRP})} = 4,48 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Creighton und Yanofsky, 1970; Hommel et al., 1995) und der daraus resultierenden geringen Signaländerungen wurden weitere Messungen im Fluoreszenzmodus durchgeführt. Bei der gewählten Anregungswellenlänge von 280 nm und dem Emissions-Cut-off-Filter von 335 nm werden sowohl Änderungen des Signals aufgrund der Tryptophan-Fluoreszenz im Enzym als auch durch die Bildung des Indolrings aufgezeichnet. Dies spiegelte sich in einem komplexen Kurvenverlauf wider (Abbildung 40).

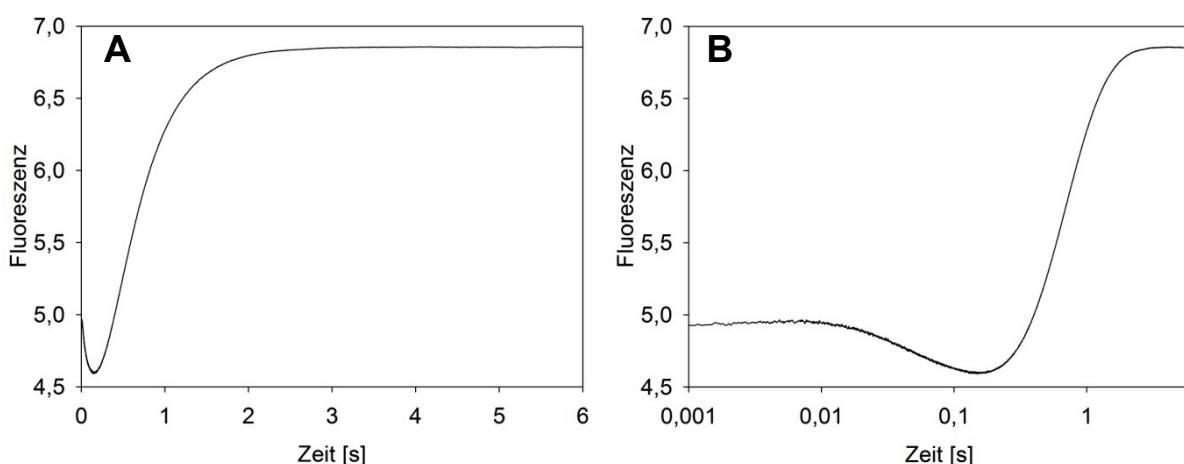


Abbildung 40: STO-Umsatzkurven unter Beobachtung der Fluoreszenzänderung nach einer Anregung bei 280 nm und einem Emissions-Cut-off-Filter von 335 nm .

Es wurden $5 \mu\text{M}$ CdRP von $20 \mu\text{M}$ sTrpC-wt bei 25°C in 50 mM HEPES pH 7,5, 4 mM EDTA umgesetzt. A zeigt den Verlauf der Reaktion mit linearer Zeitachse; in B ist zur besseren Verdeutlichung der einzelnen Phasen eine logarithmische Auftragung der Zeitachse gewählt.

Anfangs war es nicht möglich die Kurven exakt zu reproduzieren, was sich nach näherer Untersuchung auf die mangelnde Reinheit des bis dahin verwendeten Substrates CdRP zurückführen ließ. Durch einen weiteren Reinigungsschritt im Protokoll der Substratherstellung mittels *Reversed-phase* HPLC konnten die Verunreinigungen entfernt werden (3.4.7.2), was zu einer sehr guten Reproduzierbarkeit der Umsatzkurven führte. Die Umsatzkurven umfassen drei erkennbare Phasen. Phase 1 ($< 0,01$ s) ist mit einem minimalen Anstieg des Fluoreszenzsignals verbunden, Phase 2 ($0,01 \sim 0,2$ s) korreliert mit einem kleinen, aber deutlich sichtbaren Abfall des Signals und Phase 3 ($> 0,2$ s) ist gekennzeichnet durch einen starken Anstieg des Fluoreszenzsignals. sTrpC-wt besitzt einen einzigen Tryptophanrest (W8), welcher sich in der N-terminalen Extension befindet und über dem aktiven Zentrum zum Liegen kommt (Abbildung 11). Um zu überprüfen, ob eine der Phasen mit W8 in Zusammenhang steht, wurde mit der Tryptophan-freien Mutante sTrpC-W8A eine Messung unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt. Wegen der wesentlich schwächeren Bindung von CdRP an die Mutante ($K_M^{CdRP} = 1,40 \mu M$; Tabelle 5), war es nicht möglich das Protein vollständig mit Substrat zu sättigen. Dies ist für die Analyse jedoch von geringer Bedeutung, da nur die Anzahl der Reaktionsphasen von Interesse ist. Die Transienten mit sTrpC-W8A zeigten gleiches Phasen- und Amplitudenverhalten wie sTrpC-wt (Daten nicht gezeigt). Somit kann die Signaländerung ausschließlich auf den Liganden zurückgeführt werden.

Um genauere Einblicke in den Reaktionsmechanismus zu erhalten, wurden STO-Messungen bei verschiedenen sTrpC-wt und CdRP Konzentrationen durchgeführt. Es wurde bei drei verschiedenen Enzymkonzentrationen ($6 \mu M$, $10 \mu M$, $20 \mu M$) und drei verschiedenen Substratkonzentrationen ($0,5 \mu M$, $2,5 \mu M$, $5 \mu M$) in jeglicher Kombination gearbeitet und für jedes Konzentrationenpaar sieben Messungen gemittelt. Zusätzlich wurden ebenso Negativkontrollen mit Puffer plus Enzym und Puffer plus Substrat durchgeführt, bei denen sich keine Signaländerung ergab (Daten nicht gezeigt). Die resultierenden *Stopped-flow*-Transienten sind in Abbildung 41 gezeigt.

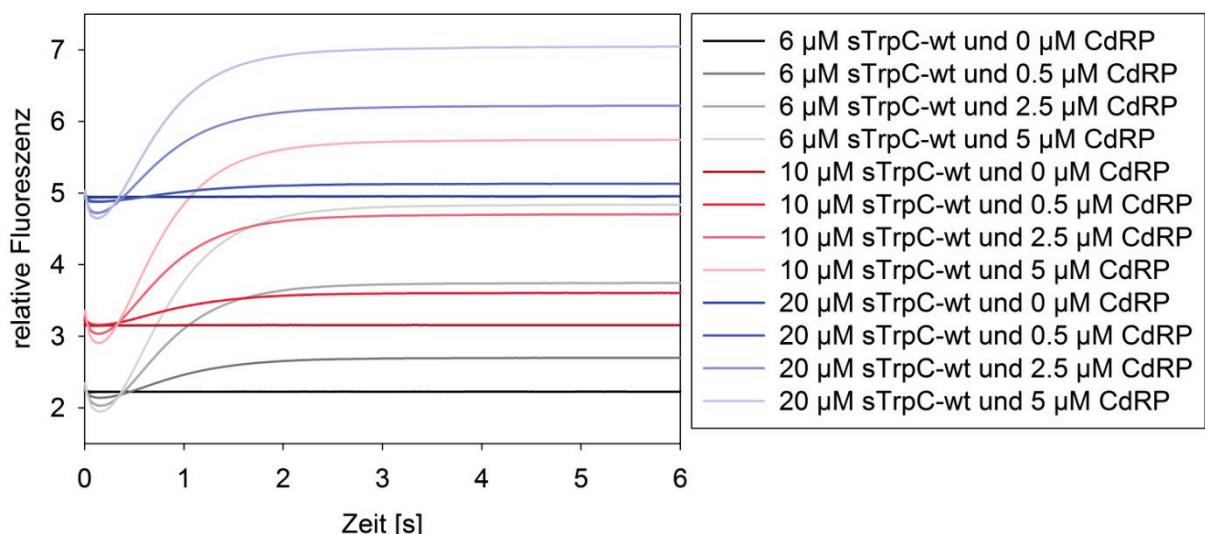


Abbildung 41: STO-Umsatzkurven mit verschiedenen sTrpC-wt und CdRP Konzentrationen

Die Messungen erfolgten in 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA bei 25 °C mit einer Fluoreszenzanregungswellenlänge von 280 nm und einem Emissions-Cut-off-Filter von 335 nm. Die gezeigten Transienten sind das Mittel aus sieben Einzelmessungen.

Der kinetische Verlauf wurde über einen Zeitraum von 10 s im logarithmischen Modus aufgenommen. Es werden jedoch nur die ersten 6 s dargestellt, da danach keine Signaländerung mehr beobachtet wurde. Deutlich zu erkennen ist, dass die Reaktion mehrstufig verläuft. Das Ausgangssignal ist zum großen Teil auf die Fluoreszenz des Enzyms zurückzuführen, da es mit zunehmender Enzymkonzentration deutlich ansteigt. Dennoch nimmt das Ausgangssignal bei konstanter Enzymkonzentration auch mit steigender Substratkonzentration leicht zu, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein Teil des Signals in der Totzeit von etwa 2 ms verloren geht. Eine nicht-lineare *least-square* Angleichung des Kurvenverlaufs an eine mehrfach exponentielle Funktion deutet auf einen Reaktionsmechanismus mit mehreren Intermediaten hin.

In Abbildung 42 ist beispielhaft die Analyse der Messung mit 10 μM sTrpC und 5 μM CdRP dargestellt.

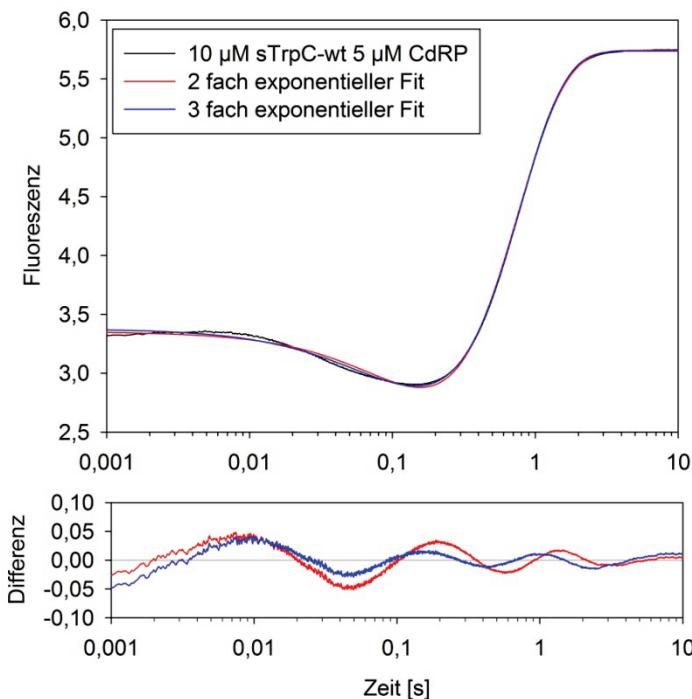


Abbildung 42: Analyse der STO-Umsetzung von CdRP durch sTrpC-wt.

Der zeitliche Verlauf der Umsetzung 5 µM CdRP durch 10 µM sTrpC-wt wurde bei 25 °C in 50 mM HEPES pH 7,5, 4 mM EDTA aufgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm, der Emissions-Cut-off-Filter lag bei 335 nm. Die detektierte Kurve (schwarz) wird durch die Summe zweier Exponentialfunktionen (rot) bzw. durch die Summe dreier Exponentialfunktionen (blau) beschrieben. Das Differenzspektrum zwischen gemessenem und berechnetem Kurvenverlauf zeigt systematische Abweichungen, welche bei Verwendung einer dreifach exponentiellen Gleichung kleiner werden.

Wie die systematischen Abweichungen im Differenzspektrum zeigen, ist eine zweifach exponentielle Funktion nicht ausreichend, um den Kurvenverlauf adäquat zu beschreiben. Die Abweichungen werden bei Verwendung einer dreifach exponentiellen Funktion zur Beschreibung der Transienten geringer. Deutlich zu erkennen ist jedoch, dass auch eine dreifach exponentielle Funktion die Reaktion nicht ideal beschreiben kann. Besonders im Anfangsbereich der Messungen gibt es deutliche Abweichungen, die sich als systematischer Fehler in allen ausgewerteten Messungen in gleicher Form widerspiegeln. Angleichungen mit höher exponentiellen Gleichungen zeigten nur eine leichte Verbesserung, die nicht als signifikant eingestuft wurde. Die Auswertung erfolgte deshalb grundsätzlich mit dreifach exponentiellen Gleichungen.

Eine dreifach exponentielle Funktion zeigt an, dass die Umsetzung von CdRP zu IGP durch sTrpC ein Prozess mit mindestens drei Schritten ist und folglich zwei Intermediate aufweist. Dies steht im Einklang mit dem von Hennig et al. (2002) postulierten Mechanismus (Abbildung 25). Trägt man die erhaltenen

Ratenkonstanten λ und deren Amplituden² als Funktion der Substrat- bzw. Enzymkonzentration auf, erhält man ein Sekundärdiagramm, welches die drei detektierbaren Reaktionsschritte charakterisiert. Beispielhaft sind in Abbildung 43 die apparenten Ratenkonstanten bei konstanten 6 μM sTrpC-wt und variabler CdRP-Konzentration (A/B) sowie bei konstanten 5 μM CdRP und variabler sTrpC-Konzentration (C/D) gezeigt.

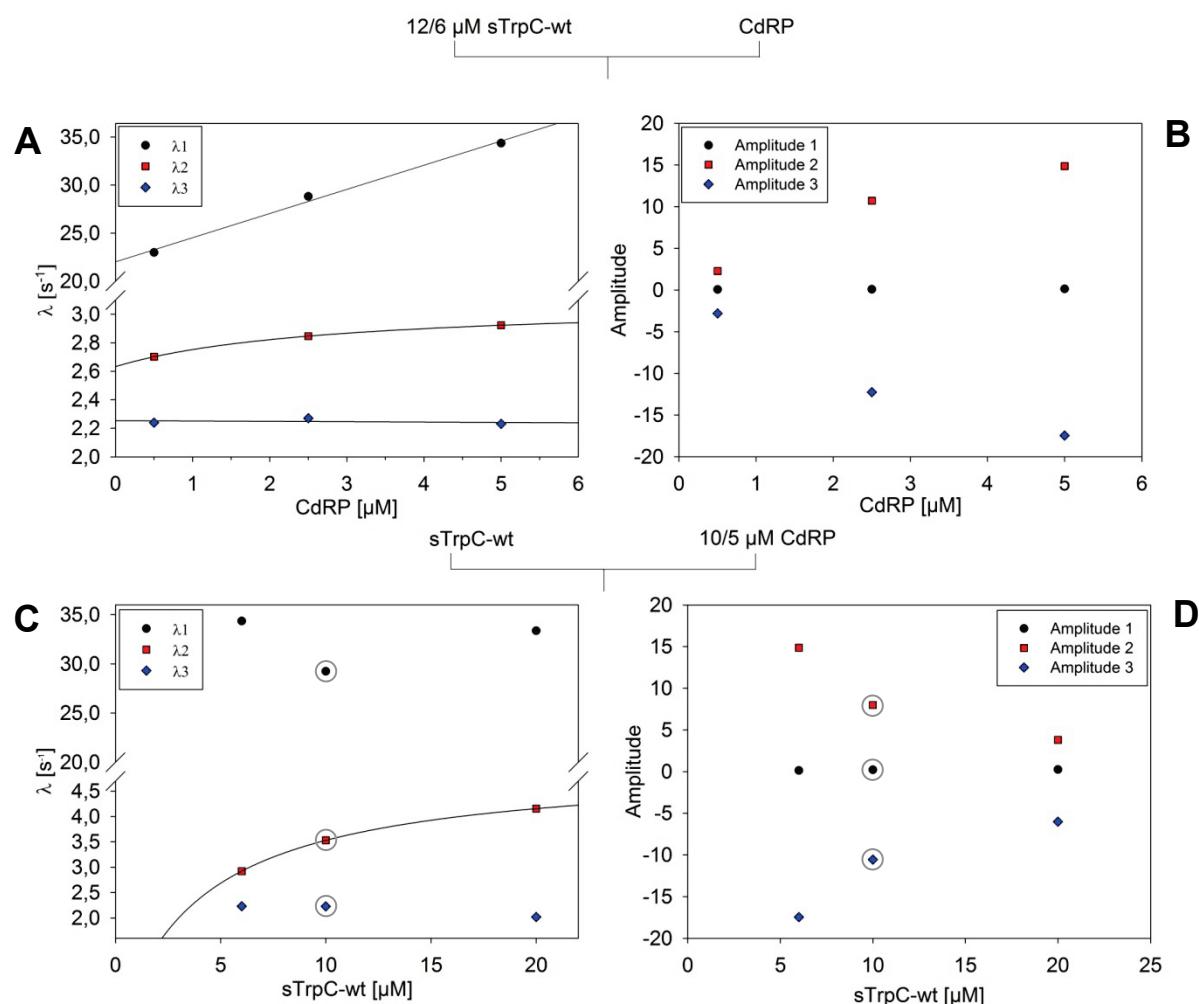


Abbildung 43: STO-Umsetzung von CdRP durch sTrpC: Sekundärdiagramme der Raten und Amplituden.

Messbedingungen: 50 mM HEPES, pH 7,5, 4 mM EDTA, 25 °C. Ratenkonstanten und Amplituden wurden durch Fit der Transienten mit einer dreifach exponentiellen Gleichung berechnet.

Es ist die Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstanten λ (A) und Amplituden (B) von der CdRP-Konzentration unter STO-Bedingungen gezeigt. Es ist die Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstanten λ (C) und Amplituden (D) von der sTrpC-Konzentration unter STO-Bedingungen gezeigt. Die aus der Transienten in Abbildung 42 abgeleiteten Werte sind durch Kreise gekennzeichnet.

² Negative Amplitudenwerte deuten auf einen Anstieg, positive Amplitudenwerte auf eine Abnahme des Signals in den Transienten hin. Dies ergibt sich durch die Angleichung an die Exponentialfunktion $y = A \cdot e^{-kt} + c$; da $y = e^{-t}$ zu einem abnehmenden Kurvenverlauf bei positivem t-Wert führt, wird dies mit einem positiven Koeffizienten A unterstützt, mit einem negativen A steigt die Kurve.

Vergleicht man die ermittelten Ratenkonstanten und Amplituden aus den Sekundärdiagrammen (Abbildung 43) mit einer Transienten (Abbildung 40 B), dann ist die erste Phase charakterisiert durch eine schnelle Rate mit λ_1 von $\sim 30 \text{ s}^{-1}$ und einer sehr kleinen negativen Signalamplitude A 1, erkennbar an einem minimalen Fluoreszenzanstieg. Daran schließen sich zwei langsamere Phasen an, wobei die erste ein abnehmendes Fluoreszenzsignal aufweist, charakterisiert durch λ_2 und der zugehörigen positiven Amplitude 2, während die letzte sichtbare Phase einen deutlichen Fluoreszenzanstieg aufweist und durch λ_3 und die negative Amplitude 3 beschrieben wird.

Abbildung 43 A und B zeigen folgendes Bild: Die Ratenkonstante λ_1 zeigt eine lineare Abhängigkeit von der CdRP Konzentration mit einem Ordinatenschnittpunkt bei 22 s^{-1} . Die zugehörige Amplitude 1 ist sehr klein und kaum von der Substratkonzentration abhängig. Die Ratenkonstante λ_2 steigt mit wachsender CdRP-Konzentration hyperbolisch an und weist einen Ordinatenschnittpunkt bei etwa $2,6 \text{ s}^{-1}$ auf. Die zugehörige Amplitude 2 zeigt ebenfalls einen hyperbolischen Anstieg mit steigender Substratkonzentration. Die Ratenkonstante λ_3 liegt unabhängig von der Substratkonzentration bei etwa $2,2 \text{ s}^{-1}$, was auf einen chemischen Reaktionsschritt hindeutet. Die Signalamplitude wird mit steigender CdRP-Konzentration größer.

Aus Abbildung 43 C und D lassen sich folgende Erkenntnisse gewinnen: λ_1 nimmt unabhängig von der Enzymkonzentration einen konstanten Wert von wiederum etwa 30 s^{-1} an und die kleine Amplitude A 1 nimmt mit der Enzymkonzentration leicht zu. λ_2 zeigt erneut einen hyperbolischen Verlauf, wobei der Schnittpunkt mit der y-Achse weit unterhalb von Null liegt und damit hier nicht auswertbar ist. Die Amplitude A 2 fällt hyperbolisch mit der Enzymkonzentration ab. Die Ratenkonstante λ_3 weist einen nahezu konstanten Wert bei $2,2 \text{ s}^{-1}$ auf, die zugehörige negative Amplitude A 3 sinkt dagegen mit der Enzymkonzentration.

Bei dem durch λ_1 und A 1 beschriebenen schnellen Prozess mit geringer Signaländerung könnte es sich um die Bindung des CdRP bzw. einen chemischen Schritt wie die Ringschlussreaktion oder die CO₂-Abspaltung handeln (Abbildung 25). Die Abhängigkeit der Rate von der Substratkonzentration würde sich allerdings in beiden Fällen nur schwer erklären lassen. Eventuell verbergen sich zwei ähnliche Ratenkonstanten unter λ_1 . Eine Möglichkeit wäre, dass CdRP in zwei verschiedenen Konformationen gebunden und umgesetzt wird. Die entstehenden Intermediate

weisen entgegengesetzte Orientierungen der Hydroxylgruppen an C3' auf (Abbildung 26), was in einer unterschiedlich schnellen Bindung bzw. chemischen Umsetzung resultieren könnte. Die hyperbolischen Kurvenverläufe der Ratenkonstanten λ_2 deuten auf einen mehrstufigen und derzeit schwer zu interpretierenden Prozess hin. λ_3 ist weder von der Substrat- noch von der Enzymkonzentration abhängig und mit etwa $2,2 \text{ s}^{-1}$ relativ langsam. Zusätzlich weist die große Amplitudenänderung auf einen starken Fluoreszenzanstieg hin. Dies sind Hinweise darauf, dass es sich bei diesem chemischen Schritt um die mit der H₂O-Freisetzung gekoppelten Bildung des stark fluoreszierenden konjugierten Indolrings handelt (Abbildung 25). Die Freisetzung des Produktes kann durch die starke Affinität von IGP unter diesen Bedingungen nicht verfolgt werden, somit müssen alle hier detektierten Phasen zwischen der Bindung des Substrates und der Freisetzung des Produktes liegen. Durch die Angleichung einer transienten Kurve an eine exponentielle Funktion muss nicht zwingend die Gesamtzahl der Schritte offenbart werden. So ist es möglich, dass einige Schritte verborgen bleiben, da z.B. zwei Ratenkonstanten oder Amplituden denselben Wert haben oder Teilreaktionen zu schnell ablaufen und nicht aufgelöst werden können. Somit geben Auswertungen von Sekundärdiagrammen nur Hinweise auf mögliche Reaktionsmechanismen. Für die Bestimmung der mikroskopischen Ratenkonstanten k_i und k_{-i} der einzelnen Reaktionsschritte, sowie der molaren Fluoreszenzparameter der verschiedenen Intermediate ist die Analyse der in den *Stopped-flow* Experimenten beobachteten Konstanten λ_i und Amplituden nicht ausreichend.

Mittels globaler Analysen der *Stopped-Flow*-Transienten wurde versucht, die elementaren Ratenkonstanten durch numerische Integration zu bestimmen. Jedoch erbrachten auch die dabei erzielten Resultate, auf deren ausführliche Wiedergabe hier verzichtet wird, keine neuen Einblicke in den Reaktionsmechanismus.

4.2.4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Bindungsstudien von rCdRP an sTrpC-wt geben deutliche Hinweise auf zwei verschiedene Isomere des Substratologons, welche mit unterschiedlichen Raten an das Enzym binden bzw. von diesem dissoziieren. Zusätzlich bilden sie unterschiedlich stark fluoreszierende Komplexe mit dem Enzym. Der stärker fluoreszierende Komplex zeichnet sich durch einen aus den k_2 und k_{-2} -Ratenkonstanten abgeleiteten K_D -Wert von $0,05 \mu\text{M}$ aus, was dem durch Gleichgewichtsttitration ermittelten K_D^{rCdRP} entspricht (4.2.4.1.1).

Durch Bindungsmessungen von IGP an sTrpC konnte nachgewiesen werden, dass die Assoziation vermutlich einen komplexeren Prozess darstellt, der neben der eigentlichen Bindung mindestens einen weiteren Schritt wie z.B. ein Enzym- oder Ligand-Vorgleichgewicht bzw. einen Isomerisierungsschritt aufweist (4.2.4.1.2). Eine Dissoziationskonstante konnte mit Hilfe von Verdrängungsexperimenten zu $0,87 \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden (4.2.4.1.3), jedoch besteht die Möglichkeit, dass diese durch komplexe Interaktionen des Inhibitors mit dem Enzym und durch die sehr hohen Konzentrationen des Inhibitors nicht mit den normalen Messbedingungen verglichen werden kann.

Single-turnover Messungen deuten auf einen mehrstufigen Reaktionsmechanismus mit mindestens zwei Intermediaten hin, der nicht gegen den von Hennig et al. (2002) postulierten spricht (Abbildung 25). So sprechen globale Analysen für mindestens drei unabhängige Schritte vor der Produktfreisetzung. Die erste Phase ist durch eine Rate von ca. 30 s^{-1} und einer niedrigen Fluoreszenzänderung gekennzeichnet und könnte die Bildung eines Intermediats vor oder nach der CO_2 -Abspaltung widerspiegeln. Bei der dritten Phase mit einer Rate von etwa $2,2 \text{ s}^{-1}$ dürfte es sich um den Kondensationsschritt handeln, welcher durch den aromatischen Ringschluss zu einer großen Signaländerung führt. Für die zweite Phase mit abnehmendem Fluoreszenzsignal und hyperbolischer Abhängigkeit von sowohl der Enzym- als auch Substratkonzentration gibt es bisher noch keine plausible Erklärung (4.2.4.3).

Auffallend ist, dass bei keiner der Messungen, weder bei den Bindungsstudien noch bei den STO-Messungen, eine Ratenkonstante in der Größenordnung von $k_{\text{cat}} = 0,06 \text{ s}^{-1}$ gefunden wurde. Dies wirft die Frage nach dem ratenlimitierenden Schritt der Gesamtreaktion auf, welcher früher in der Produktfreisetzung gesehen wurde (Merz et al., 2000).

Um den Reaktionsmechanismus vollständig aufklären zu können, wäre es hilfreich, über die Bindungsanalysen mit globalen Fits die beteiligten mikroskopischen Raten

für die Bindung von CdRP, rCdRP und IGP zu bestimmen, um die Zahl variabler Parameter in den Auswertungen der STO-Messungen zu minimieren. Zusätzlich können weitere Messungen neue Einblicke in den Beginn der Umsetzung geben. Hierbei sollte besonders im Anfangsbereich eine höhere Messpunktedichte, z.B. durch logarithmische Aufzeichnung, neue Ergebnisse liefern. Trotz der hohen benötigten Konzentrationen der Reaktanden, können zusätzlich STO-Messungen, im Absorptionsmodus bei 327 nm durchgeführt werden. So wäre es möglich die Bindung und Umsetzung von CdRP direkt zu messen. Das Tryptophan W8 von sTrpC-wt bewirkt bei einer Anregung von 295 nm einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) auf gebundenes rCdRP. Vermutlich gibt es dieses FRET Signal auch bei der Bindung von CdRP. In diesem Fall gäbe es auch ein fluorimetrisch detektierbares Signal der CdRP-Abnahme bei STO-Messungen. Bezuglich der Bildungsrate des Indolringes könnte die Nutzung des Absorptionssignals bei 278 nm neue Erkenntnisse bringen, da die Umsatzkurven mehrere Phasen aufweisen (Abbildung 39 B). Die Frage ob sTrpC in verschiedenen Konformationen vorliegt, konnte leider nicht geklärt werden, da das Enzym bei STO-Messungen immer im Überschuss vorliegen muß. Dies bedingt, dass immer genug freies reaktives Enzym vorhanden ist. Ein Vorgleichgewicht des Enzyms ist dadurch gekennzeichnet, dass bei Messungen mit Überschuss an Protein weniger Phasen detektierbar sind, als bei Messungen mit hohem Substratüberschuss. Durch *pre-steady-state* Messungen an der *Stopped-flow*, wobei das Substrat in großem Überschuss verwendet wird (MTO-Bedingungen) sollte ein Enzym Vorgleichgewicht detektiert werden können. Durch zusätzliche Zugabe von Glycerin zu den Messansätzen könnten Konformationsänderungen verlangsamt und besser zugeordnet werden.

4.2.5 Analyse der Kinetik von Ligandenbindung und Umsetzung anhand von an sTrpC gekoppelten Farbstoffen

Das Protein sTrpC weist die typische Struktur eines $(\beta\alpha)_8$ -barrels auf. Zusätzlich besitzt es eine etwa 45 Aminosäuren lange N-terminale Extension aus den α -Helices 0 und 00. Die α -Helix 0 legt sich wie ein Deckel über das aktive Zentrum (Abbildung 6). Außerdem sind die $\beta\alpha$ -Loops 1 und 6 deutlich verlängert und ragen über das aktive Zentrum hinaus. Betrachtet man die Röntgenstrukturen von sTrpC mit gebundenem CdRP bzw. rCdRP und vergleicht die Position der Liganden mit der Struktur mit gebundenem Produkt IGP fällt auf, dass die Anthranilateinheit des CdRPs anders in dem Enzym liegt als die Indoleinheit des Produktes IGP, wobei das Phosphat an derselben Stelle fixiert ist (Hennig et al., 2002). Moleküldynamik-Simulationen postulieren für sTrpC temperaturabhängige Bewegungen während der Umsetzung, um die große Entfernung von C1 zu C2' in einen reaktiven Abstand zu verringern (Mazumder-Shivakumar et al., 2004). Dies alles sind Hinweise darauf, dass konformationelle Umlagerungen des Proteins für die von sTrpC katalysierte Reaktion von Bedeutung sein könnten.

4.2.5.1 Auswahl von Positionen in sTrpC für die Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen

Bewegungen in Proteinen können unter anderem über Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) verfolgt werden. In Kooperation mit Prof. Dr. Nina Goodey (Montclair State University, New Jersey, USA) wurden aufgrund postulierter Bewegungen, hoher Lösungsmittelzugänglichkeit, und Abständen zueinander in der α -Helix 0 der Rest R18, und in den verlängerten $\beta\alpha$ -Loops 1 bzw. 6 die Reste D61 bzw. T186 als vielversprechende Positionen für Markierungen ausgewählt (Abbildung 44). Die Entfernung beträgt zwischen den ausgewählten Resten etwa 24 Å, was dem Försterradius für das ausgewählte Farbstoff-Quencherpaar Alexa555/QSY entspricht.

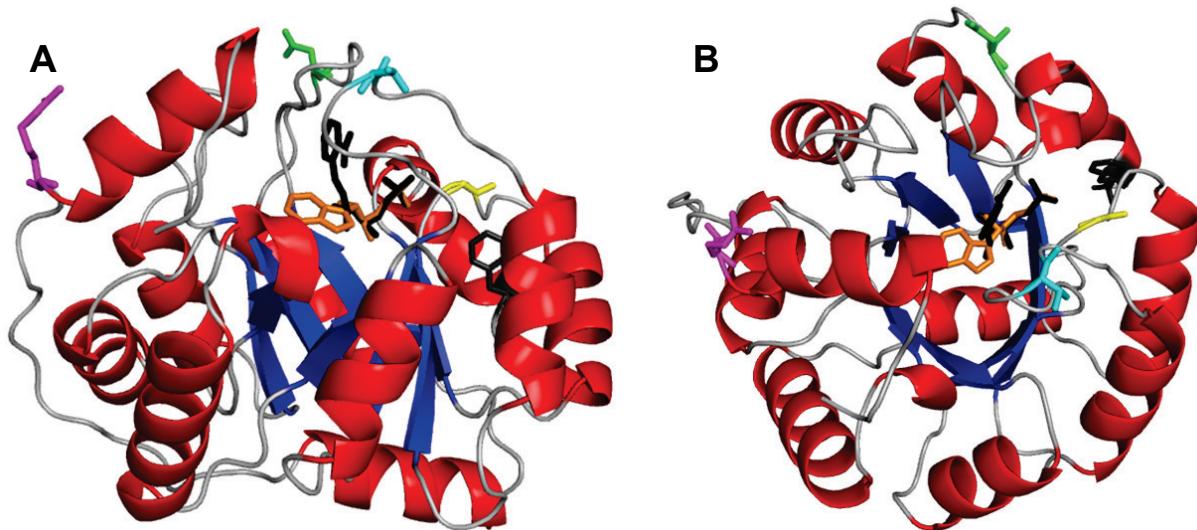


Abbildung 44: Röntgenstruktur von sTrpC-wt mit hervorgehobenen Resten R18, D61, T186, G212 und F246.

Die Seitenkette von R18 ist pink, die von D61 grün und die von T186 cyan dargestellt. Die aktivierenden Positionen G212 und F246 sind in gelb bzw. grau, das gebundene Substrat CdRP in schwarz, das gebundene Produkt IGP in orange gezeigt. A: Seitenansicht des β -Fasses; B: Aufsicht auf das aktive Zentrum.

Durch Punktmutationen gegen Cysteine, sollte eine spätere Markierung mit den Maleimidgruppen des Alexa-Farbstoffes bzw. des Quenchers möglich gemacht werden. Um einen FRET beobachten zu können, wurden immer zwei Positionen zusammen ausgetauscht. Um die sehr geringe Aktivität bei Raumtemperatur zu erhöhen, wurden zu den Doppelcystein-Mutanten noch die Austausche G212E bzw. F246S eingeführt. Diese beiden Austausche führen zu einer erhöhten Enzymaktivität bei Raumtemperatur (Merz et al., 2000).

4.2.5.2 Klonierung, heterologe Genexpression in *E. coli* und Reinigung der Mutanten

Als Grundlage für die Mutagenese diente wie bei allen Mutanten das in pET21a(+) klonierte wildtypische *strpC* Gen (Schneider, 2004). Die Mutationen wurden mittels OE-PCR (3.3.8.2) oder Megaprimer-PCR (3.3.8.1) hergestellt und wie in 4.1.1.2 beschrieben in den Vektor pET21a(+) so kloniert. Als Primerpaare für die PCR wurden jeweils die 5'- und 3'-Oligonucleotide mit den entsprechenden Austauschen (2.3.5) verwendet, die Doppel- und Dreifachmutanten wurden auf Grundlage eines Einfachaustausches bzw. eines Doppelaustausches hergestellt. Insgesamt wurden folgende Konstrukte generiert: sTrpC-R18C, sTrpC-D61C, sTrpC-T186C, sTrpC-R18C+D61C, sTrpC-R18C+T186C, sTrpC-D61C+T186C, sTrpC-R18C+D61C+G212E, sTrpC-R18C+T186C+G212E, sTrpC-D61C+T186C+G212E,

sTrpC-R18C+D61C+F246S, sTrpC-R18C+T186C+F246S, sTrpC-D61C+T186C+F246S. Die Expression und Reinigung erfolgte wie in 4.1.1.3 und 4.1.1.4 beschrieben. Im Unterschied zu den bisherigen Versuchen wurden diese Mutanten nach der Aufreinigung gegen 50 mM KP pH 7,5, mit 2 mM frischem DTT dialysiert. Somit wurde eine Oligomerisierung durch kovalente Verknüpfung der eingeführten Cysteine verhindert.

4.2.5.3 Bestimmung der steady-state enzymkinetischen Parameter

Die Cystein-Austausche wurden so gewählt, dass die Mutationen möglichst keine Auswirkung auf die kinetischen Parameter haben. Dies wurde mittels *steady-state* kinetischer Messungen der TrpC-Aktivität überprüft. Die Ergebnisse der bei 25 °C und 37 °C durchgeführten Messungen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpC-Reaktion: sTrpC-Cystein-Mutanten im Vergleich mit sTrpC-wt^a.

Die Messungen erfolgten in 50 mM EPPS, pH 7,5 mit 4 mM EDTA und 2 mM DTT; ^a: 37 °C-Werte aus Merz et al. (2000); n.b.: nicht bestimmbar.

Protein	25 °C			37 °C		
	k_{cat} [s⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [$\mu M^{-1}s^{-1}$]	k_{cat} [s⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [$\mu M^{-1}s^{-1}$]
sTrpC-wt ^a	0,06	0,05	1,20	0,15	0,05	3,00
sTrpC-R18C+D61C	0,02	0,11	0,18	0,05	0,16	0,31
sTrpC-R18C+T186C	0,07	0,31	0,22	0,17	0,16	1,06
sTrpC-D61C+T186C	0,09	0,15	0,60	0,16	0,20	0,80
sTrpC-R18C+D61C+G212E	0,15	11	0,01	0,65	44	0,01
sTrpC-R18C+T186C+G212E	n.b.		0,05	n.b.		0,12
sTrpC-D61C+T186C+G212E	n.b.		0,03	n.b.		0,17
sTrpC-R18C+D61C+F246S	0,15	0,4	0,38	0,23	0,3	0,77
sTrpC-R18C+T186C+F246S	0,13	7,3	0,02	0,35	5,2	0,07
sTrpC-D61C+T186C+F246S	0,20	3,4	0,06	0,43	3,0	0,14

Die drei Doppel-Cystein-Mutanten sTrpC-R18C+D61C, sTrpC-R18C+T186C und sTrpC-D61C+T186C weichen in ihren kinetischen Parametern nur gering von sTrpC-wt ab. Auffallend ist jedoch, dass der K_M^{CdRP} jeweils leicht erhöht ist.

Durch das Einfügen des aktivierenden Austausches G212E, welcher an der Phosphatbindung beteiligt ist (Hennig et al., 2002), kommt es zwar zu einer Erhöhung der Umsatzrate bei hohen Substratkonzentrationen, jedoch steigt auch der K_M^{CdRP} -Wert nochmals drastisch an. Dies steht in Übereinstimmung mit den

Ergebnissen für die G212E-Einzelmutante, für die bei 37 °C ein k_{cat} -Wert von 0,36 s⁻¹ und ein K_M^{CdRP} -Wert von 5,6 μM ermittelt wurde (Merz et al., 2000).

Da für die Mutanten sTrpC-R18C+T186C+G212E und sTrpC-D61C+T186C+G212E selbst 250 μM CdRP noch nicht sättigend waren, konnte für sie lediglich aus der Steigung des linearen Bereichs der Sättigungskurve die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M^{CdRP} bestimmt werden. Vergleicht man jedoch die Umsatzraten bei 250 μM Substrat, so liegen diese mit 12,5 s⁻¹ bzw. 7,5 s⁻¹ bei 25 °C um den Faktor 200 höher als bei sTrpC-wt. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die durch den G212E-Austausch verursachte Verschlechterung der Produktbindung ($K_P^{IGP} = 2,6 \mu M$) im Vergleich zu sTrpC-wt ($K_P^{IGP} = 0,02 \mu M$) (Merz et al., 2000) durch die beiden Cysteinmutationen weiter verstärkt wird. Nimmt man nun an, dass die Erhöhung des K_P^{IGP} auf eine erleichterte Produktfreisetzung, d.h. einen erhöhten k_{off}^{IGP} zurückgeht und dieser Schritt geschwindigkeitsbestimmend für die Reaktion in sTrpC ist (Merz et al., 2000), dann wäre ein direkter Zusammenhang zwischen dem erhöhten K_M^{CdRP} (bzw. K_P^{IGP}) und dem verbesserten k_{cat} hergestellt. Da die Frage des ratenlimitierenden Schrittes jedoch durch die Ermittlung eines höheren k_{off}^{IGP} bei 25 °C (4.2.4.1.3) wieder offen ist, kann man nur sagen, dass durch die Kombination der drei Austausche die Bindung des Substrates stark beeinflusst wird und es zu einer drastischen Erhöhung der Geschwindigkeit des ratenlimitierenden Schrittes kommt. Ob dieser derselbe wie in sTrpC-wt ist, muss momentan offen bleiben.

Durch das Einfügen des aktivierenden Austausches F246S (Hennig et al., 2002), kommt es zwar wie erwartet, zu einer leichten Erhöhung der Umsatzrate, jedoch steigt auch hier der K_M^{CdRP} -Wert erneut an. Lediglich die Mutante sTrpC-R18C+D61C+F246S zeigt einen moderat verschlechterten K_M^{CdRP} , während sowohl sTrpC-R18C+T186C+F246S als auch sTrpC-D61C+T186C+F246S einen drastisch gestiegenen K_M^{CdRP} aufweisen.

Alle Varianten zeigten bei Zugabe von 2 mM DTT im Messpuffer keine Oligomerisierung über die Cysteine. Dies wurde über Gelfiltrationsanalyse bestätigt.

4.2.5.4 Erste Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten Enzymen

Die Fluoreszenzmarkierungen und die Charakterisierung der gelabelten Mutanten wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nina Goodey (Montclair State University, New Jersey, USA) durchgeführt. Um einen möglichen Einfluss der großen Farbstoffmoleküle auf die katalytische Aktivität zu überprüfen, wurden zunächst die Cysteineinzelmutanten markiert und mittels *steady-state* Enzymkinetik vermessen.

Dabei stellte sich heraus, dass alle drei Einzelmutanten mit hoher Ausbeute mit Alexa555 markiert werden konnten. Die Wechselzahlen und Michaeliskonstanten der markierten Mutanten sTrpC-R18C^{alex}a und sTrpC-D61C^{alex}a entsprachen weitgehend denen von sTrpC-wt, während sTrpC-T186C^{alex}a einen um den Faktor 10 erniedrigten k_{cat} aufwies. Aus diesem Grund wird mit Mutanten, die den Austausch T186C tragen, vorerst nicht weiter gearbeitet. Zusätzlich wird derzeit die Reaktivität der Cysteine bestimmt, um später eine selektive Markierung der Doppel-Cystein Mutanten zu ermöglichen.

Erste *pre-steady-state* Messungen bei denen die Fluoreszenz von an Enzym gebundenem Alexa555 angeregt wurde, zeigten, dass es nach Zugabe von CdRP zu großen Abschirmungsänderungen des Chromophors während der Reaktion kommt. Hierdurch können der Katalyse assoziierte Signaländerungen ohne einen zweiten Farbstoff oder Quencher detektiert und ausgewertet werden. Daraufhin wurden die Varianten sTrpC-R18C und sTrpC-D61C auch mit dem Farbstoff PyMPO markiert und die Mesungen zeigten auch hier eine Änderungen der Abschirmung.

4.2.5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Doppel-Cystein Mutanten sTrpC-R18C+D61C, sTrpC-R18C+T186C und sTrpC-D61C+T186C zeigen bei *steady-state* enzymkinetischen Untersuchungen nahezu wildtypische k_{cat} - und nur moderat erhöhte K_M^{CdRP} -Werte. Sie eignen sich deshalb prinzipiell gut für Fluoreszenzmarkierungen, um Informationen über Bewegungen während der Katalyse zu erhalten. Von den aktivierten Mutanten zeigt nur sTrpC-R18C+D61C+F246S einen akzeptablen K_M^{CdRP} -Wert, die anderen Dreifach-Mutanten können aufgrund der stark verschlechterten Substratbindung nicht für Messungen der Proteindynamik verwendet werden.

Die Cysteineinzelmutanten sTrpC-R18C, sTrpC-D61C und sTrpC-T186C ließen sich mit hoher Effizienz mit Alexa555 markieren, wobei sTrpC-T186C eine deutlich verminderte katalytische Aktivität aufweist und dadurch nicht wie die beiden anderen Einzelmutanten für weitere Messungen verwendet werden soll.

Die markierten Einzelmutanten sTrpC-R18C^{alexa/PyMPO} und sTrpC-D61C^{alexa/PyMPO} zeigten in *pre-steady-state* Analysen eine Signaländerung des Farbstoffes, welche vermutlich auf eine Änderung der Abschirmung der Chromophore während der Reaktion zurückzuführen ist.

In Ligandbindungsstudien (3.5.7.4) und STO-Messungen (3.5.8.2) sollen die Ratenkonstanten der Bewegungen bestimmt und mit den mikroskopischen Ratenkonstanten der Teilschritte der sTrpC Reaktion verglichen werden. Daraus sollen Schlussfolgerungen über die Bedeutung von Loop-Bewegungen für den Mechanismus der Reaktion gezogen werden.

5 Zusammenfassung

Die Indolglycerinphosphat-Synthase aus *Sulfolobus solfataricus* (sTrpC) ist ein gut charakterisiertes Enzym mit einer $(\beta\alpha)_8$ -barrel Struktur, das den vierten Schritt der Tryptophanbiosynthese katalysiert. Dabei wird 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose 5-phosphat (CdRP) zu Indol-3-glycerinphosphat (IGP) umgesetzt, wobei es zur Freisetzung von Wasser und Kohlendioxid kommt. In früheren Untersuchungen wurden durch Mutationsanalysen die katalytisch essentiellen Reste ermittelt und Röntgenstrukturen von sTrpC mit CdRP, dem Substratanalogon reduziertes CdRP (rCdRP) und IGP aufgeklärt. Auf dieser Basis wurde ein Reaktionsmechanismus mit zwei Intermediaten formuliert. Außerdem konnte die niedrige katalytische Aktivität von sTrpC bei niedrigen Temperaturen durch eine Kombination aus Zufallsmutagenese und Selektion *in vivo* erhöht werden.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten weitere Reste mit Bedeutung für die Stabilität und Funktion von sTrpC identifiziert werden. Dazu wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen wurde die Struktur von sTrpC mit der von TrpC aus *Thermotoga maritima* (tmTrpC) überlagert, welches eine deutlich höhere Aktivität und Stabilität besitzt. Auf der Basis dieser Superpositionierung wurden mittels gezielter Mutagenese einige Reste am aktiven Zentrum von sTrpC durch die äquivalenten Reste aus tmTrpC ersetzt. Zum anderen wurden auf der Basis eines bioinformatischen Ansatzes, der auf einem multiplen Sequenzalignment (MSA) sehr vieler TrpC-Sequenzen beruht, potentiell wichtige Reste in sTrpC identifiziert und durch den jeweils im MSA häufigsten ersetzt. Die sTrpC-Mutanten aus beiden Ansätzen wurden in *Escherichia coli* hergestellt, die rekombinanten Proteine gereinigt und ihre Aktivitäten und thermischen Stabilitäten mit denen des wildtypischen sTrpC (sTrpC-wt) verglichen.

Steady-state kinetische Messungen zeigten, dass sich durch die Mutationen R64F bzw. S181A die Wechselzahl (k_{cat}) von sTrpC leicht erhöhte bzw. stark verringerte, während alle anderen Austausche diesbezüglich nur sehr geringe Auswirkungen hatten. Dagegen führten die meisten der eingeführten Mutationen zu einer mehr oder weniger deutlichen Erhöhung der Michaeliskonstante für CdRP (K_M^{CdRP}). Die Ergebnisse sprechen für eine direkte oder indirekte Beteiligung von W8, R54, R55,

R64, I133, L142, S181 und F230 an der Substratbindung. Während dies für W8 bekannt war und I133 als wichtig für die Produktbindung eingestuft worden war, war den anderen Resten bisher keine Bedeutung für die Ligandenbindung zugemessen worden. Thermische Inaktivierung ergab, dass der L187F Austausch zu einer deutlichen Erhöhung und die Mutationen I133A, I133E und 133D zu einer starken Erniedrigung der Halbwertszeit der Inaktivierung bei 75 °C führen. Die restlichen Austausche hatten nur geringe Auswirkungen auf die thermische Stabilität. Sowohl sTrpC-wt, als auch alle untersuchten Mutanten wiesen einen Knick im Arrhenius-Diagramm auf, der jedoch bei recht unterschiedlichen Temperaturen lag. Da Nah-UV und Fern-UV Circulardichroismus keine Hinweise auf temperaturinduzierte Konformationsänderungen von sTrpC-wt erbrachte, ist die beobachtete Nichtlinearität wohl auf eine Änderung des ratenlimitierenden Schrittes der Reaktion zurückzuführen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit, dass die direkte Übertragung von Resten aus tmTrpC sich nicht zur Erhöhung der Aktivität und Stabilität von sTrpC eignet. Dagegen führte ein neuer bioinformatischer Ansatz zur Identifizierung wichtiger Reste des Enzyms, deren Bedeutung durch bisherige Analysen der Sequenz und Struktur des Enzyms nicht erkannt worden war.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Reaktionsmechanismus von sTrpC-wt durch *pre-steady-state* Untersuchungen mittels *Stopped-flow* Techniken kinetisch analysiert. Bindungsstudien mit dem Substratanalogon rCdRP zeigten, dass zwei unterschiedliche Konformere des Liganden mit verschiedenen Raten an das Enzym binden bzw. von ihm dissoziieren. Der Quotient aus den $k_{\text{off}}^{\text{rCdRP}}$ und $k_{\text{on}}^{\text{rCdRP}}$ -Raten einer Spezie deckt sich mit der bei Gleichgewichttitrationen ermittelten Dissoziationskonstante K_D^{rCdRP} . Durch Verdrängungsexperimente mit hohen Konzentrationen an Orthophosphat konnte der Wert für die Dissoziationskonstante des Produktes $k_{\text{off}}^{\text{IGP}}$ ermittelt werden. Die Analyse von *Single-turnover* (STO) Messungen, bei denen CdRP durch einen Überschuss an sTrpC-wt zu IGP umgesetzt wurde, zeigte einen mehrstufigen Verlauf des beobachteten Fluoreszenzsignals. Die Analyse deutet auf mindestens zwei Intermediate hin und steht somit dem in der Literatur postulierten Mechanismus nicht entgegen. Jede der in den STO-Experimenten ermittelten Ratenkonstanten war jedoch, ebenso wie der durch Verdrängungsexperimente bestimmte $k_{\text{off}}^{\text{IGP}}$, deutlich größer als der in *steady-state* Messungen ermittelte k_{cat} -Wert, weshalb der ratenlimitierende Schritt der Reaktion nicht endgültig identifiziert werden konnte.

6 Literaturverzeichnis

Allen, B., Blum, M., Cunningham, A., Tu, G.C., Hofmann, T. (1990). A ligand-induced, temperature-dependent conformational Change in penicillopepsin. Evidence from nonlinear Arrhenius plots and from circular dichroism studies. *J Biol Chem* 265, 5060-5065.

Anantharaman, V., Aravind, L., Koonin, E.V. (2003). Emergence of diverse biochemical activities in evolutionarily conserved structural scaffolds of proteins. *Curr Opin Chem Biol* 7, 12-20.

Andreotti, G., Cubellis, M.V., Palo, M.D., Fessas, D., Sannia, G., Marino, G. (1997). Stability of a thermophilic TIM-barrel enzyme: indole-3-glycerol phosphate synthase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem J* 323 (Pt 1), 259-264.

Arrhenius, S. (1889). Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säure. *Z Phys Chem* 4, 226-248.

Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Pogson, C.I., Wilson, I.A., Corran, P.H., Furth, A.J., Milman, J.D., Offord, R.E., et al. (1975). Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* 255, 609-614.

Biosca, J.A., Travers, F., Barman, T.E. (1983). A jump in an Arrhenius plot can be the consequence of a phase transition. The binding of ATP to myosin subfragment 1. *FEBS Lett* 153, 217-220.

Biro, F.N., Zhai, J., Doucette, C.W., Hingorani, M.M. (2010). Application of stopped-flow kinetics methods to investigate the mechanism of action of a DNA repair protein. *J Vis Exp*.

Bisswanger, H., Kirschner, K., Cohn, W., Hager, V., Hansson, E. (1979). N-(5-Phosphoribosyl)anthranilate isomerase-indoleglycerol-phosphate synthase. 1. A substrate analogue binds to two different binding sites on the bifunctional enzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 18, 5946-5953.

Bolz, C. (2006). Mutationsanalyse zur Identifizierung der strukturellen Grundlage einer spezifischen Protein-Protein Interaktion. Diplomarbeit, Universität Regensburg.

Bork, P., Gellerich, J., Groth, H., Hooft, R., Martin, F. (1995). Divergent evolution of a beta/alpha-barrel subclass: detection of numerous phosphate-binding sites by motif search. *Protein Sci* 4, 268-274.

Brew, K. & Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 1803, 55-71.

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

Caetano-Anolles, G., Kim, H.S., Mittenthal, J.E. (2007). The origin of modern metabolic networks inferred from phylogenomic analysis of protein architecture. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 9358-9363.

Claren, J., Malisi, C., Höcker, B., Sterner, R. (2009). Establishing wild-type levels of catalytic activity on natural and artificial (beta alpha)8-barrel protein scaffolds. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 3704-3709.

Copley, R.R. & Bork, P. (2000). Homology among (betaalpha)(8) barrels: implications for the evolution of metabolic pathways. J Mol Biol 303, 627-641.

Creighton, T.E. & Yanofsky, C. (1966). Indole-3-glycerol phosphate synthetase of Escherichia coli, an enzyme of the tryptophan operon. J Biol Chem 241, 4616-4624.

Creighton, T.E. & Yanofsky, C. (1970). Chorismate to tryptophan (Escherichia coli) - anthranilate synthetase, PR Transferase, PRA isomerase, InGP synthetase, tryptophan synthetase. Methods Enzymol 17A, 365-380.

Cygler, M., Schrag, J.D., Sussman, J.L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M.K., Doctor, B.P. (1993). Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. Protein Sci 2, 366-382.

Darimont, B., Stehlin, C., Szadkowski, H., Kirschner, K. (1998). Mutational analysis of the active site of indoleglycerol phosphate synthase from Escherichia coli. Protein Sci 7, 1221-1232.

Dietrich, S. (2005). Enzymkinetische Untersuchungen zur evolutionären Verwandtschaft der Indolglycerinphosphat Synthase mit der α -Untereinheit der Tryptophan Synthase. . Diplomarbeit, Universität Regensburg.

Dunn, M.F., Aguilar, V., Brzovic, P., Drewe, W.F., Jr., Houben, K.F., Leja, C.A., Roy, M. (1990). The tryptophan synthase bienzyme complex transfers indole between the alpha- and beta-sites via a 25-30 Å long tunnel. Biochemistry 29, 8598-8607.

Eberhard, M. & Kirschner, K. (1989). Modification of a catalytically important residue of indoleglycerol-phosphate synthase from Escherichia coli. FEBS Lett 245, 219-222.

Eberhard, M., Tsai-Pflugfelder, M., Bolewska, K., Hommel, U., Kirschner, K. (1995). Indoleglycerol phosphate synthase-phosphoribosyl anthranilate isomerase: comparison of the bifunctional enzyme from Escherichia coli with engineered monofunctional domains. Biochemistry 34, 5419-5428.

Emsley, J., McEwan, P.A., Gailani, D. (2010). Structure and function of factor XI. Blood 115, 2569-2577.

Fabry, S. & Hensel, R. (1987). Purification and characterization of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the thermophilic archaebacterium *Methanothermus fervidus*. *Eur J Biochem* 165, 147-155.

Fischer, J.D., Mayer, C.E., Soding, J. (2008). Prediction of protein functional residues from sequence by probability density estimation. *Bioinformatics* 24, 613-620.

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

Gerlt, J.A. & Raushel, F.M. (2003). Evolution of function in (beta/alpha)8-barrel enzymes. *Curr Opin Chem Biol* 7, 252-264.

Hammes-Schiffer, S. & Benkovic, S.J. (2006). Relating protein motion to catalysis. *Annu Rev Biochem* 75, 519-541.

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

Hankins, C.N., Largen, M., Mills, S.E. (1975). A rapid spectrophotofluorometric assay for indoleglycerol phosphate synthase. *Anal Biochem* 69, 510-517.

Harcourt, A.V. (1867). On the observation of the course of chemical change *Journal of the Chemical Society* 20, 460-492.

Henn-Sax, M., Höcker, B., Wilmanns, M., Sterner, R. (2001). Divergent evolution of (betaalpha)8-barrel enzymes. *Biol Chem* 382, 1315-1320.

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, 12032-12042.

Hennig, M., Darimont, B., Sterner, R., Kirschner, K., Jansonius, J.N. (1995). 2.0 A structure of indole-3-glycerol phosphate synthase from the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus*: possible determinants of protein stability. *Structure* 3, 1295-1306.

Hennig, M., Darimont, B.D., Jansonius, J.N., 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.

Hennig, M., Schlesier, B., Dauter, Z., Pfeffer, S., Betzel, C., Hohne, W.E., Wilson, K.S. (1992). A TIM barrel protein without enzymatic activity? Crystal-structure of narbonin at 1.8 Å resolution. *FEBS Lett* 306, 80-84.

Hensel, R., Laumann, S., Lang, J., Heumann, H., Lottspeich, F. (1987). Characterization of two D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from the extremely thermophilic archaebacterium *Thermoproteus tenax*. *Eur J Biochem* 170, 325-333.

- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.
- Höcker, B., Jürgens, C., Wilmanns, M., Sterner, R. (2001).** Stability, catalytic versatility and evolution of the (beta alpha)(8)-barrel fold. *Curr Opin Biotechnol* 12, 376-381.
- Holm, L. & Sander, C. (1993).** Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J Mol Biol* 233, 123-138.
- Hommel, U., Eberhard, M., Kirschner, K. (1995).** Phosphoribosyl anthranilate isomerase catalyzes a reversible amadori reaction. *Biochemistry* 34, 5429-5439.
- Hough, D.W. & Danson, M.J. (1999).** Extremozymes. *Curr Opin Chem Biol* 3, 39-46.
- Inoue, H., Nojima, H., 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 U S A* 97, 2962-2964.
- Jaenicke, R. & Bohm, G. (1998).** The stability of proteins in extreme environments. *Curr Opin Struct Biol* 8, 738-748.
- Joerger, A.C., Mayer, S., Fersht, A.R. (2003).** Mimicking natural evolution in vitro: an N-acetylneuraminate lyase mutant with an increased dihydridopicolinate synthase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5694-5699.
- Johnson, K.A. (1998).** Advances in transient-state kinetics. *Curr Opin Biotechnol* 9, 87-89.
- Johnson, W.C., Jr. (1990).** Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* 7, 205-214.
- Jorgensen, W.L. (2009).** Efficient drug lead discovery and optimization. *Acc Chem Res* 42, 724-733.
- Jürgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M., Sterner, R. (2000).** Directed evolution of a (beta alpha)8-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9925-9930.
- Kalinina, O.V., Novichkov, P.S., Mironov, A.A., Gelfand, M.S., Rakhmaninova, A.B. (2004).** SDPpred: a tool for prediction of amino acid residues that determine differences in functional specificity of homologous proteins. *Nucleic Acids Res* 32, W424-428.
- Kirschner, K., Wiskocil, R.L., Foehn, M., Rezeau, L. (1975).** The tryptophan synthase from *Escherichia coli*. An improved purification procedure for the alpha-subunit and binding studies with substrate analogues. *Eur J Biochem* 60, 513-523.

Klostermeier, D., Seidel, R., Reinstein, J. (1998). Functional properties of the molecular chaperone DnaK from *Thermus thermophilus*. *J Mol Biol* 279, 841-853.

Knöchel, T., Ivens, A., Hester, G., Gonzalez, A., Bauerle, R., Wilmanns, M., Kirschner, K., Jansonius, J.N. (1999). The crystal structure of anthranilate synthase from *Sulfolobus solfataricus*: functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9479-9484.

Knöchel, T., Pappenberger, A., Jansonius, J.N., Kirschner, K. (2002). The crystal structure of indoleglycerol-phosphate synthase from *Thermotoga maritima*. Kinetic stabilization by salt bridges. *J Biol Chem* 277, 8626-8634.

Knöchel, T., Pappenberger, A., Jansonius, J.N., Kirschner, K. (2002). The crystal structure of indoleglycerol-phosphate synthase from *Thermotoga maritima*. Kinetic stabilization by salt bridges. *J Biol Chem* 277, 8626-8634.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lakatos, S., Halasz, G., Zavodszky, P. (1978). Conformational stability of lactate dehydrogenase from *Bacillus thermus-aquaticus* [proceedings]. *Biochem Soc Trans* 6, 1195-1197.

Leopoldseder, S., Claren, J., Jürgens, C., Sterner, R. (2004). Interconverting the catalytic activities of (betaalpha)(8)-barrel enzymes from different metabolic pathways: sequence requirements and molecular analysis. *J Mol Biol* 337, 871-879.

Levitt, M. & Gerstein, M. (1998). A unified statistical framework for sequence comparison and structure comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5913-5920.

Martin, L.C., Gloor, G.B., Dunn, S.D., Wahl, L.M. (2005). Using information theory to search for co-evolving residues in proteins. *Bioinformatics* 21, 4116-4124.

Massey, V., Curti, B., Ganther, H. (1966). A temperature-dependent conformational change in D-amino acid oxidase and its effect on catalysis. *J Biol Chem* 241, 2347-2357.

Mazumder-Shivakumar, D., Kahn, K., Bruice, T.C. (2004). Computational study of the ground state of thermophilic indole glycerol phosphate synthase: structural alterations at the active site with temperature. *J Am Chem Soc* 126, 5936-5937.

Mendes, K.R., Martinez, J.A., Kantrowitz, E.R. (2010). Asymmetric Allosteric Signaling in Aspartate Transcarbamoylase. *ACS Chem Biol*.

Merkl R, Z.M. (2008). H2r: identification of evolutionary important residues by means of an entropy based analysis of multiple sequence alignments. In *BMC Bioinformatics*.

Merkl, R. & Zwick, M. (2008). H2r: identification of evolutionary important residues by means of an entropy based analysis of multiple sequence alignments. *BMC Bioinformatics* 9, 151.

- Merz, A., Knöchel, T., Jansonius, J.N., Kirschner, K. (1999a).** The hyperthermostable indoleglycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima* is destabilized by mutational disruption of two solvent-exposed salt bridges. *J Mol Biol* 288, 753-763.
- Merz, A., Knöchel, T., Jansonius, J.N., Kirschner, K. (1999b).** The hyperthermostable indoleglycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima* is destabilized by mutational disruption of two solvent-exposed salt bridges. *J Mol Biol* 288, 753-763.
- Merz, A., Yee, M.C., Szadkowski, H., Pappenberger, G., Crameri, A., Stemmer, W.P., Yanofsky, C., Kirschner, K. (2000).** Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures. *Biochemistry* 39, 880-889.
- Moll, R. & Schäfer, G. (1988).** Chemiosmotic H^+ cycling across the plasma membrane of the thermoacidophilic archaeabacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEBS Lett.* 232, 359-363.
- Moosavi-Nejad, S.Z., Rezaei-Tavirani, M., Padiglia, A., Floris, G., Moosavi-Movahedi, A.A. (2001).** Amine oxidase from lentil seedlings: energetic domains and effect of temperature on activity. *J Protein Chem* 20, 405-411.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.
- Nagano, N., Hutchinson, E.G., Thornton, J.M. (1999).** Barrel structures in proteins: automatic identification and classification including a sequence analysis of TIM barrels. *Protein Sci* 8, 2072-2084.
- Nagano, N., Orengo, C.A., Thornton, J.M. (2002).** One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J Mol Biol* 321, 741-765.
- Olsen, K., Svensson, B., Christensen, U. (1992).** Stopped-flow fluorescence and steady-state kinetic studies of ligand-binding reactions of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Eur J Biochem* 209, 777-784.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T. (1995).** How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4, 2411-2423.
- Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P. (1992).** Numerical recipes in C. Cambridge: Cambridge University Press.
- Pujadas, G. & Palau, J. (2001).** Evolution of alpha-amylases: architectural features and key residues in the stabilization of the (beta/alpha)(8) scaffold. *Mol Biol Evol* 18, 38-54.
- Sambrook, J. (1989).** Molecular cloning: a laboratory Manual New York, Cold Spring Harbour
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.

Sarkar, G. & Sommer, S.S. (1990). The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* 8, 404-407.

Schmid, F.X. (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Proofs of Protein Structure: A practical approach*, T.E. Creighton, ed. (Oxford: IRL Press), pp. 259-295.

Schmidt, D.M., Mundorff, E.C., Dojka, M., Bermudez, E., Ness, J.E., Govindarajan, S., Babbitt, P.C., Minshull, J., Gerlt, J.A. (2003). Evolutionary potential of (beta/alpha)8-barrels: functional promiscuity produced by single substitutions in the enolase superfamily. *Biochemistry* 42, 8387-8393.

Schneider, B. (2004). Die Rolle der N-terminalen Helix α 0 in dem ($\beta\alpha$)₈-Barrel Indolglycerinphosphat Synthase aus *Thermotoga maritima* und *Sulfolobus solfataricus*. Diplomarbeit, Universität Regensburg.

Schneider, B., Knöchel, T., Darimont, B., Hennig, M., Dietrich, S., Babinger, K., Kirschner, K., Sterner, R. (2005a). 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, 16405-16412.

Schneider, B., Knöchel, T., Darimont, B., Hennig, M., Dietrich, S., Babinger, K., Kirschner, K., Sterner, R. (2005b). 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, 16405-16412.

Schneider, T.D. & Stephens, R.M. (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 18, 6097-6100.

Schrank, A., Tempelaars, C., Sims, P.F., Oliver, S.G., Broda, P. (1991). The trpC gene of Phanerochaete chrysosporium is unique in containing an intron but nevertheless maintains the order of functional domains seen in other fungi. *Mol Microbiol* 5, 467-476.

Sears, L.E., Moran, L.S., Kissinger, C., Creasey, T., Perry-O'Keefe, H., Roskey, M., Sutherland, E., Slatko, B.E. (1992). CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques* 13, 626-633.

Sharp, P.A., Sugden, B., Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose--ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12, 3055-3063.

Simonovic, M. & Steitz, T.A. (2009). A structural view on the mechanism of the ribosome-catalyzed peptide bond formation. *Biochim Biophys Acta* 1789, 612-623.

Slatko, B.E. (1994). Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Methods Mol Biol* 31, 35-45.

Smith, O.H. & Yanofsky, C. (1960). 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose 5-phosphate, a new intermediate in the biosynthesis of tryptophan. *J Biol Chem* 235, 2051-2057.

- Stark, G.R. (1965).** Reactions of cyanate with functional groups of proteins. 3. Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry* 4, 1030-1036.
- Stehlin, C., Dahm, A., Kirschner, K. (1997).** Deletion mutagenesis as a test of evolutionary relatedness of indoleglycerol phosphate synthase with other TIM barrel enzymes. *FEBS Lett* 403, 268-272.
- Sternер, R. & Höcker, B. (2005).** Catalytic versatility, stability, and evolution of the (betaalpha)8-barrel enzyme fold. *Chem Rev* 105, 4038-4055.
- Sternер, R., Kleemann, G.R., Szadkowski, H., Lustig, A., Hennig, M., Kirschner, K. (1996).** Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer. *Protein Sci* 5, 2000-2008.
- Sternер, R. & Liebl, W. (2001).** Thermophilic adaptation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36, 39-106.
- Stewart, V. & Yanofsky, C. (1986).** Role of leader peptide synthesis in tryptophanase operon expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 167, 383-386.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Suel, G.M., Lockless, S.W., Wall, M.A., Ranganathan, R. (2003).** Evolutionarily conserved networks of residues mediate allosteric communication in proteins. *Nat Struct Biol* 10, 59-69.
- Vega, M.C., Lorentzen, E., Linden, A., Wilmanns, M. (2003).** Evolutionary markers in the (beta/alpha)8-barrel fold. *Curr Opin Chem Biol* 7, 694-701.
- Wierenga, R.K. (2001).** The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett* 492, 193-198.
- Wilmanns, M., Priestle, J.P., Niermann, T., Jansonius, J.N. (1992).** Three-dimensional structure of the bifunctional enzyme phosphoribosylanthranilate isomerase: indoleglycerolphosphate synthase from *Escherichia coli* refined at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* 223, 477-507.
- Wilson, G.G. & Murray, N.E. (1991).** Restriction and modification systems. *Annu Rev Genet* 25, 585-627.
- Wiltgen, M. & Tilz, G.P. (2009).** Homology modelling: a review about the method on hand of the diabetic antigen GAD 65 structure prediction. *Wien Med Wochenschr* 159, 112-125.
- Wood, B.M., Amyes, T.L., Fedorov, A.A., Fedorov, E.V., Shabila, A., Almo, S.C., Richard, J.P., Gerlt, J.A. (2010).** Conformational changes in orotidine 5'-monophosphate decarboxylase: "remote" residues that stabilize the active conformation. *Biochemistry* 49, 3514-3516.

Wrba, A., Schweiger, A., Schultes, V., Jaenicke, R., Zavodszky, P. (1990). Extremely thermostable D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the eubacterium Thermotoga maritima. Biochemistry 29, 7584-7592.

Yanofsky, C. (1956). Indole-3-glycerol phosphate, an intermediate in the biosynthesis of indole. Biochim Biophys Acta 20, 438-439.

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

Yanofsky, C. (2003). Using studies on tryptophan metabolism to answer basic biological questions. J Biol Chem 278, 10859-10878.

7 Anhang

7.1 Expression und Reinigung des Hilfsenzyms tmTrpC

Zur Bestimmung der CdRP-Konzentration und zum vollständigen Umsatz von CdRP zu IGP bei den *steady-state* Messungen schwach aktiver sTrpC-Mutanten wurde die Indolglycerinphosphat-Synthase aus *Thermotoga maritima* (tmTrpC) benötigt. Das Gen *tmtrpC* lag in der Arbeitsgruppe in pET21a(+) (Schneider, 2004) kloniert vor. Zur Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins wurden *E. coli* T7 Express Rosetta Zellen mit dem Plasmid transformiert und auf entsprechendem LB-Selektionsmedium ausplattiert. Es wurden jeweils zwei einzelne Kolonien für eine Expression im analytischen Maßstab in 5 ml LB-Selektionsmedium angezogen. Das Enzym befand sich nach Induktion mit 0,5 mM IPTG überwiegend in der löslichen Fraktion des Zellextraktes.

Es wurde jeweils derjenige Klon, der zur höchsten Proteinproduktion führte, zur Proteinexpression im präparativen Maßstab verwendet. Diese erfolgte in zwei Litern LB-Medium bei 37 °C über Nacht. Die Expression wurde mit 0,5 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ = 0,6 induziert. Die Zellen wurden nach der Ernte (3.4.1.2) in 100 mM KP, pH 7,5 resuspendiert und anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen. In einem ersten Reinigungsschritt konnte tmTrpC durch Hitzebehandlung des Zellextraktes (15 min, 75 °C) effizient angereichert werden. Die Reinigung mittels einer Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie erfolgte wie in 3.4.2 beschrieben. Saubere Fraktionen wurden vereinigt, Imidazol, Kalium- und Chloridionen durch Dialyse gegen jeweils zweimal fünf Liter 50 mM KP, pH 7,5 entfernt. Anschließend wurde tmTrpC in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80 °C gelagert.

7.2 Nucleotid- und Proteinsequenzen der verwendeten Konstrukte

7.2.1 Nucleotidsequenz von *strpC-wt*

atgccacgttatcttaaggatggcttaaagacgtcgataattatcttaaggaggccctcattagggctcaagacaa
aggccaattatttccttaaacgaaagaatttagaattataagcgcaatatcacagctataatagccgaatataaacg
caaatctccctctggatttagatgtgaaagggatccaatagaatattcaaaattcatggaaaggatgcgcgttaggtctta
gcatattaactgaggagaagtacttaatggatcatgaaacttgagaaagatagccagttcagttcaattcccataact
aatgaaggatttatcgtaaggaatcgcaaattgtatgcataaaccttaggtgctgatactgtattgctaataagtcaa
aatactaactgaaagagaatttagagagttattgaaatatgccagaagttatggatgaaaccattgatgaaattaatg

acgaaaatgatttagatataccctaaggatagggctagattataggaattaattcaagagatctagaacccttga
gataaataaggagaatcagagaaagcttatatccatgataccatccaatgtggtaaagggtgcagaaagtggatt
ctgagaggaatgaaatagaagaattaaggaaatttaggtgttaacgcttcctaattcgatcatactgatgcgaaacc
cagaaaagattaaagaattatactata

7.2.2 Nucleotidsequenz von tmtrpC-wt

atgatcgtaaagaagaaaccacagattctggaggtctcgaaaagagagagtgaagatcatagcggatt
caagaaggcttccatctgctggagatataaacgcgtatgctctgaaagattcataaggatgtacgacgagctgg
cgatgcgtcagcatcctcacggaaaagcactattcaaaggagatcctgcctcgtaagagcggcgagaaacttg
acctgcagaccatttcgctaaggactctatatacgcgtccaggtaactggctccagtgtggagcggac
gccatcctataattgctgaatactcactgcagagcagataaaagagatctatgaagcggcggaaagagctggaaat
ggacagtctcgtagaagtccactccagagaagatctggagaaggctttcggtgatcagaccgaagataatcggtat
caacacgagagatctggacacttcgagataaagaaaaatgtgtggacttctaccactcgtgccggatgatac
ggttgtggcgctgaaagtggcataaaagatcccagagaactcaaggatctgcggggaaagtgaacgcgttctcg
ttggtacatccatcatgaaagccaaaaatccaagaagattctagaagagatgagagcatggtcagagtga

7.2.3 Aminosäuresequenz von sTrpC-wt

MPRYLKGWLKVQLSLRPSFRASRQRPIISLNERILEFNKRNITAIIAEYKRKSPSG
LDVERDPIEYSKFMERYAVGLSILTEEKYFNGSYETLRKIASSVSIPILMKDFIVKESQI
DDAYNLGADTVLLIVKILTERELESLEYARSYGMELIEINDENDLIALRIGARFIGIN
SRDLETLEINKENQRKLISMIPSNVVKVAESGISERNEIEELRKLGVNAFLIGSSLMRN
PEKIKEFIL*

7.2.4 Aminosäuresequenz von tmTrpC-wt

MIVQRRNHRFLEVLSGKERVKIIAEFKKASPSAGDINADASLEDFIRMYDELADAISIL
TEKHYFKGDPAFVRAARNLTCPILAKDFYIDTVQVKLASSVGADAILIIARILTAEQIK
EIYEAAEELGMDSLVEVHSREDLEKVFVIRPKIIGINTRDLDTIEKKNVLWELLPLVP
DDTVVVAESGIKDPRELKDLRGKVNAVLVGTSIMKAENPRRFLEEMRAWSE*

7.3 Analytische Gelfiltration

7.3.1 Kalibrierung der Superdex-75

Die Superdex-75 wurde mit Proteinen mit bekannten molaren Massen bei RT mit 50 mM KP, 300 mM KCl, pH 7,5 kalibriert. Hierzu wurden die Proteine auf die Säule aufgetragen und mit einer Flußrate von 0,5 ml/min eluiert. In Abbildung 45 ist das Retentionsvolumen gegen den Logarithmus der molaren Masse ($\log M_r$) aufgetragen.

Für die Analyse der Cysteinmutanten wurde eine erneute Kalibrierung durchgeführt, jedoch mit 50 mM KP, 300 mM KCl und 2 mM DTT. Dabei zeigte sich keine Änderung in der Kalibrierungsgeraden.

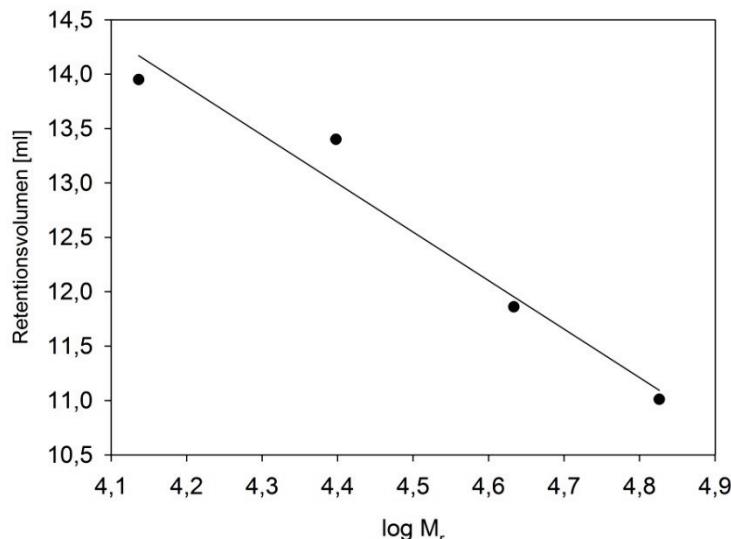


Abbildung 45: Kalibrierungsgerade der Superdex 75 Gelfiltrationssäule

Proteine mit bekanntem Molekulargewicht (Tabelle 12) wurden bei RT auf die mit 50 mM KP, 300 mM KCl, pH 7,5 äquilibrierte Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert. Dargestellt ist das Retentionsvolumen in ml gegen den Logarithmus der molaren Masse ($\log M_r$).

In Tabelle 12 sind die verwendeten Kalibrierungsproteine mit den Molekulargewichten und den zugehörigen Retentionsvolumina aufgelistet.

Tabelle 12: Proteine für die Kalibrierung der Superdex 75 Gelfiltrationssäule.

Lauf	Protein	M_r [Da]	$\log M_r$	Retentionsvolumen
Kalibrierung	Ribonuklease A	13700	4,137	13,95
	Ovalbumin	43000	4,633	11,86
Kalibrierung 2	Chymotrypsinogen	25000	4,398	13,40
	Albumin	67000	4,826	11,01

7.3.2 Analytische Gelfiltrationsläufe von sTrpC-wt und den Mutanten

Um den Oligomerisierungszustand und die Homogenität der Enzymlösung zu ermitteln, wurde mit sTrpC-wt und allen in der Arbeit genannten sTrpC-Mutanten eine analytische Gelfiltration auf einer kalibrierten Superdex-75 Säule durchgeführt. Alle Elutionsprofile zeigten einen symmetrischen Peak, was auf eine homogene Lösung schließen lässt. Verunreinigungen durch andere Proteine waren nicht festzustellen. Das Elutionsvolumen beträgt 13,11 ml, was einer apparenten molaren Masse von

23435 Da entspricht. Dieser Wert ist zu den bisher bestimmten Massen sehr ähnlich (23637 Da; (Dietrich, 2005)), und nur etwas geringer als die aus der Aminosäuresequenz für das Monomer berechnete molare Masse von 28587 Da. Die Cystein-Mutanten für FRET-Messungen wurden in 50 mM KP pH 7,5 mit 2 mM DTT analysiert, um Oligomerisierung durch Disulfid-Brücken zu verhindern. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl sTrpC-wt in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Hennig et al., 1995), als auch alle in dieser Arbeit untersuchten sTrpC-Mutanten monomere Proteine sind.

7.4 Auswertung kinetischer Experimente mit DynaFit

DynaFit benötigt zur globalen Analysen eines Datensatzes eine Gleichungsdatei. Diese enthält das Bindungsmodell (*mechanism*), welches in Differentialgleichungen für die zeitliche Änderung der unterschiedlichen Spezies umgewandelt wird. Die Datei enthält Schätzwerte für zu berechnende Ratenkonstanten (*constants*) und Emissionskoeffizienten der verschiedenen Spezies (*responses*). Parameter die mit einem ,?‘ versehen sind, werden während der Abweichungsminimierung optimiert. Emissionskoeffizienten wurden als differentielle Koeffizienten definiert, d.h. als Differenz zwischen der Fluoreszenz des Reaktanden und des Produkts. Die Programmierzeile „offset auto local?“ bewirkt, dass der erste Datenpunkt jeder Transiente automatisch als Nulllinie gilt, und nachfolgend die Nulllinie für jede Transiente in einer *least-square* Regression optimiert wird.

Das Datenfile „rCdRP Bindung“ enthält die von Dr. S. Schlee gemessenen Transienten (4.2.4.1.1). Das Datenfile „IGP Bindung“ ist das Eingabefile für DynaFit mit den Transienten der IGP-Bindung (4.2.4.1.2).

Datenfile rCdRP Bindung:

```

[task]
  data = progress
  task = fit
[mechanism]
  E + S1 <==> ES1    : k1  k-1
  E + S2 <==> ES2    : k2  k-2
  S1 --> S0           : kb
  S2 --> S0           : kb
[constants]
  k1 = 1.5?      ; x 10(-6) M-1.sec-1
  k-1 = 1.4?     ;
  k2 = 1.0?      ; x 10(-6) M-1.sec-1
  k-2 = 0.3?
  kb = 0.14
[responses]
  ES1 = 3.7?          ; instrument
  units/micromole/liter
  ES2 = 3.8?          ; instrument
  units/micromole/liter
  S0 = -0.01?
[concentrations]
[progress]
  directory ./examples/TrpC/080410/data
  extension txt
  offset auto local?

  file 025sTrpC
    concentration E = 0.25
    concentration S1 = 0.125, S2 = 0.125

  file 050sTrpC
    concentration E = 0.5
    concentration S1 = 0.125, S2 = 0.125

  file 100sTrpC
    concentration E = 1.0
    concentration S1 = 0.125, S2 = 0.125

  file 175sTrpC
    concentration E = 1.75
    concentration S1 = 0.125, S2 = 0.125

  file 250sTrpC
    concentration E = 2.5
    concentration S1 = 0.125, S2 = 0.125

[task]
  data = progress
  task = fit
[mechanism]
  E + S1 <==> ES1    : k1  k-1
  E + S2 <==> ES2    : k2  k-2
  S1 --> S0           : kb
  S2 --> S0           : kb
[constants]
  k1 = 1.5?      ; x 10(-6) M-1.sec-1
  k-1 = 1.4?     ;
  k2 = 1.0?      ; x 10(-6) M-1.sec-1
  k-2 = 0.3?
  kb = 0.14
[responses]
  ES1 = 3.7?          ; instrument
  units/micromole/liter
  ES2 = 3.8?          ; instrument
  units/micromole/liter
  S0 = -0.01?
[concentrations]
[progress]
  directory ./examples/TrpC/080410/data
  extension txt
  offset auto local?

  file 025sTrpC
    concentration E = 0.25
    concentration S1 = 0.125, S2 = 0.125

  file 050sTrpC
    concentration E = 0.5
    concentration S1 = 0.125, S2 = 0.125

  file 100sTrpC
    concentration E = 1.0
    concentration S1 = 0.125, S2 = 0.125

  file 175sTrpC
    concentration E = 1.75
    concentration S1 = 0.125, S2 = 0.125

  file 250sTrpC
    concentration E = 2.5
    concentration S1 = 0.125, S2 = 0.125

[output]
  directory ./examples/TrpC/080410/output3

[end]

```

Datenfile IGP Bindung:

```

[task]                               concentration E = 1, P = 7
  data = progress
  task = fit
[mechanism]
  E + P <--> EP : k1 k2
  EP <--> EM   : k7 k8
[constants]
  k1 = 8 ?
  k2 = 3 ?
  k7 = 1 ?
  k8 = 0.2 ?
[responses]
  E = 0.1 ?
  P = 0.8 ?
  EP = 0.2 ?
  EM = 0.2 ?
[concentrations]
[progress]
  directory C:/data/alldata
  extension txt
  offset auto local ?

file 1IGPbs
  concentration E = 5 , P = 1

file 2IGPbs
  concentration E = 7.5 , P = 1

file 3IGPbs
  concentration E = 10 , P = 1

file 4IGPbs
  concentration E = 12.5 , P = 1

file 5IGPbs
  concentration E = 15 , P = 1

file 6IGPbs
  concentration E = 1 , P = 3

file 7IGPbs
  concentration E = 1 , P = 5

file 8IGPbs

[output]
  directory C:/data/IGPbmodel1gut
[end]

```

Das Ergebnis der Minimierungsprozedur ist eine Parameterdatei, welche die optimierten Parameter und ihre Fehler, sowie die Ausgabe der simulierten Transienten enthält.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Sternér für das Vertrauen, dass er mir mit der Vergabe des interessanten Themas entgegen gebracht hat danken. Seine stets offene Tür und sein fachlicher Rat waren mir eine große Hilfe. Auch möchte ich mich für die Möglichkeit zur Teilnahme am Kurs für transiente Kinetiken bedanken.

Dr. Rainer Merkl danke ich für seine bioinformatischen Hilfestellungen, das Interesse an dem TrpC-Projekt und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Sandra Schlee danke ich für viele informative Diskussionen über Reaktionsmechanismen und mögliche Interpretation von Daten, sowie die netten Gespräche mit fachfremden Themen.

Ein großes Dankeschön geht an die gesamte (erweiterte) Arbeitsgruppe Sternér, inclusive aller Ehemaligen. Ihr habt immer für eine nette Atmosphäre sowohl innerhalb, als auch außerhalb des Labors gesorgt.

Ganz herzlichen Dank an Sonja Fuchs, die mir den Laboralltag mit ihrer ständigen Hilfe sehr erleichtert hat und stets da war, wenn man sie brauchte. Barbara Kellerer, Jeanette Ueckert, Hermine Reisner und Christiane Endres möchte ich für die vielen kleinen und großen Hilfen im Labor danken, durch euch war immer ein reibungsloser Ablauf möglich.

Ein besonderer Dank geht an meine Schrebraumkollegen Tom Schwab, Linn Carstensen, Kathleen Burghardt, Josef Sperl, Nadine Borst und Sandra Schlee, die für einen stets angenehmen und lustigen Ablauf im Labor sorgten und mit wertvollen Ideen zur Seite standen.

Dr. Marco Bocola, Hermann Zellner und Dietmar Birzer danke ich für die bioinformatischen Antworten zu meinen Fragen.

Daniel Schneider und Harald Guldan danke ich für die kompetente Einweisung der manchmal etwas zickigen HPLC und den hilfreichen Diskussionen zur Substrataufreinigung.

Bianca Attenberger danke ich für die unkomplizierte und schnelle Durchführung des ^1H -NMR.

Für eine hilfsbereite und stets angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich auch bei Dr. Tobias Seitz, Dr. Patrick Babinger, Dr. Alexander Ehrmann, Jan-Oliver Janda, Bernd Reisinger, Anke Behr, Monika Meier, David Peterhoff, Helmut Durchschlag, Claudia Pauer, Klaus Tiefenbach, Florian Busch, Dr Felix List und allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern und meinen Praktikanten des Lehrstuhls Biochemie II bedanken.

Ein weiterer Dank gilt meiner Kooperationspartnerin Dr. Nina Goodey und ihren Mitarbeitern, die das Labeln und Vermessen der Cystein-Mutanten übernommen haben und ich freue mich auf eine weitere diskussions und ideenreiche Zusammenarbeit.

Bastian danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit und die wertvolle gemeinsame Zeit.

Meinen Eltern danke ich für ihren Enthusiasmus, ihre Unterstützung und ihr Vertrauen in mich. Dies gilt auch für meinen Bruder Martin, der stets ein offenes Ohr hatte und mir so manche Chemiefrage beantwortete.

9 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen und Abbildungen –, die anderen Werken in Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Fall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Sterner betreut worden.

Regensburg, den 17.05.2010 _____

(Susanne Dietrich)