

# Zusammenhang zwischen Quartärstruktur, Stabilität und katalytischer Aktivität am Beispiel der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase

---

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und vorklinische Medizin –  
der Universität Regensburg



vorgelegt von

**Thomas Schwab**

aus Regensburg

August 2010

Promotionsgesuch eingereicht am: 12. August 2010

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

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Christoph Oberprieler

1. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Sterner

2. Prüfer: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

3. Prüfer: Prof. Dr. Michael Thomm

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2006 bis August 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 durchgeführt.

*Weitermachen, immer weitermachen.*  
*(Oliver Kahn)*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Formelverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1 Tryptophanbiosynthese .....	4
1.2 Phosphoribosyltransferasen (PRTs).....	5
1.2.1 Anthranilat-Phosphoribosyltransferasen (AnPRTs) .....	6
1.2.2 Die Anthranilat-Phosphoribosyltransferase aus <i>Sulfolobus solfataricus</i> .....	8
1.3 Zusammenhang zwischen Quartärstruktur, Stabilität und Aktivität .....	9
1.4 Strukturelle Grundlagen der Proteinstabilität .....	11
1.5 Erhöhung der konformationellen Proteinstabilität .....	12
1.6 <i>Thermus thermophilus</i> als thermophiler Modellorganismus .....	14
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	20
<b>2 Material .....</b>	<b>21</b>
2.1 Geräte .....	21
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	23
2.3 Chemikalien .....	24
2.4 Kits .....	25
2.5 Enzyme .....	25
2.6 Bakterienstämme .....	25
2.6.1 <i>E. coli</i> Stämme .....	25
2.6.2 <i>T. thermophilus</i> Stämme .....	26
2.8 Vektoren .....	27
2.8.1 pQE40 .....	27
2.8.2 pREP4 (pDMI,1) .....	28
2.8.3 pJET 1.2 .....	28
2.8.4 pMK18 .....	29

<b>2.9 Oligodesoxyribonukleotide .....</b>	<b>30</b>
2.9.1 Vektorspezifische Amplifikations- und Sequenzierungsprimer .....	30
2.9.2 Primer zur Amplifikation und Mutagenese von <i>cltrpD</i> .....	30
2.9.3 Primer zur Amplifikation und Mutagenese von <i>rbtrpD</i> .....	31
2.9.4 Primer zur Amplifikation und Mutagenese von <i>satrpD</i> .....	31
2.9.5 Primer zur Amplifikation und Mutagenese von <i>shtrpD</i> .....	31
2.9.6 Primer zur Amplifikation und Mutagenese von <i>sstrpD</i> .....	32
2.9.7 Primer zur Herstellung der <i>T. thermophilus</i> $\Delta trpD$ -Deletionsstämme .....	33
<b>2.10 DNA- und Protein-Längenstandards .....</b>	<b>34</b>
<b>2.11 Puffer und Lösungen .....</b>	<b>34</b>
2.11.1 Arbeiten mit <i>E. coli</i> und <i>T. thermophilus</i> .....	34
2.11.2 Arbeiten mit DNA .....	35
2.11.3 Agarosegelelektrophorese .....	36
2.11.4 Arbeiten mit Proteinen .....	36
2.11.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (12,5 % SDS-Gele) .....	38
<b>2.12 Nährmedien für <i>E. coli</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>2.13 Nährmedien für <i>T. thermophilus</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>2.14 Software .....</b>	<b>40</b>
<b>3 Methoden .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen .....</b>	<b>42</b>
<b>3.2 Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>42</b>
3.2.1 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> Stämmen .....	42
3.2.2 Anzucht und Lagerung von <i>T. thermophilus</i> Stämmen .....	42
3.2.3 Transformation von <i>T. thermophilus</i> Stämmen .....	43
3.2.4 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen (Inoue <i>et al.</i> , 1990) .....	43
3.2.5 Chemische Transformation (Inoue <i>et al.</i> , 1990) .....	44
3.2.6 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen (Dower <i>et al.</i> , 1988) .....	44
3.2.7 Vorbereitung von DNA für die Elektroporation .....	45
3.2.8 Elektroporation (Dower <i>et al.</i> , 1988) .....	45
3.2.9 Bestimmung der Transformationseffizienz .....	45
3.2.10 <i>In vivo</i> Komplementationstest .....	46
<b>3.3 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>47</b>
3.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten .....	47
3.3.2 Kolonie-PCR .....	48
3.3.3 PCR-Methoden zur gerichteten und zufälligen Mutagenese .....	49
3.3.3.1 Megaprimer-PCR (Sarkar und Sommer, 1990) .....	49
3.3.3.2 <i>Overlap Extension</i> -PCR (OE-PCR) .....	50
3.3.3.3 Zufallsmutagenese durch <i>error prone</i> PCR ( <i>epPCR</i> ) .....	50
3.3.4 Agarosegelelektrophorese .....	52
3.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	52

3.3.6 Enzymatische Manipulation von dsDNA .....	53
3.3.6.1 Spaltung von dsDNA mit Restriktionsendonukleasen .....	53
3.3.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten.....	53
3.3.7 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und <i>T. thermophilus</i> .....	54
3.3.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation).....	54
3.3.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Midi/Maxi-Präparation) .....	54
3.3.8 Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>T. thermophilus</i> .....	55
3.3.9 Bestimmung der DNA-Konzentration .....	55
3.3.10 Herstellung von Genbanken .....	56
3.3.11 DNA-Sequenzierung.....	57
<b>3.4 Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>58</b>
3.4.1 Genexpression und Proteinanreicherung .....	58
3.4.1.1 Expression und Anreicherung von Proteinen im analytischen Maßstab .....	58
3.4.1.2 Expression und Anreicherung von Proteinen im präparativen Maßstab .....	59
3.4.2 Proteinreinigung aus der löslichen Zellfraktion.....	60
3.4.2.1 Hitzeschritt.....	60
3.4.2.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie .....	60
3.4.2.3 Abspaltung des N-terminalen His <sub>6</sub> -tags durch Trypsin .....	61
3.4.2.4 Präparative Gelfiltration .....	62
3.4.2.5 Dialyse von Proteinlösungen.....	62
3.4.2.6 Einkonzentrieren von Proteinlösungen.....	62
3.4.2.7 Lagerung von gereinigten Proteinen .....	63
3.4.3 Markieren von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen .....	63
<b>3.5 Analytische Methoden.....</b>	<b>65</b>
3.5.1 Absorptionsspektroskopie.....	65
3.5.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsspektroskopie .....	65
3.5.1.2 Bestimmung des Markierungsgrades von Fluorophor-markierten Proteinproben .....	66
3.5.2 Circular-Dichroismus-Spektroskopie .....	68
3.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	70
3.5.4 Analytische Gelfiltration .....	71
3.5.5 Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe.....	71
3.5.6 Messung der enzymatischen Aktivität unter Fließgleichgewichtsbedingungen ( <i>steady-state</i> Enzymkinetik).....	73
3.5.7 Bestimmung der Anthranilsäurekonzentration.....	74
3.5.8 Bestimmung der PRPP-Konzentration .....	74
3.5.9 Thermische Inaktivierung .....	75
3.5.10 Differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC) .....	75
3.5.11 Bestimmung der Thermostabilität durch schrittweise thermische Denaturierung....	76
3.5.12 Refraktometrie .....	76
3.5.13 Analyse der Proteinlöslichkeit <i>in vitro</i> durch fraktionierte Präzipitation .....	77
3.5.14 Analytische <i>reversed-phase</i> HPLC .....	78
3.5.15 Proteinkristallisation.....	79

<b>4 Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>81</b>
<b>4.1 Identifikation nativ monomerer AnPRTs .....</b>	<b>81</b>
4.1.1 Vorhersage putativer Kandidaten durch bioinformatische Analyse.....	81
4.1.2 Klonierung und Reinigung der putativ monomeren AnPRTs .....	83
4.1.3 <i>In vitro</i> Charakterisierung der gereinigten cl-, sa- und shAnPRT Proteine.....	84
4.1.3.1 Oligomerisierungszustand .....	84
4.1.3.2 Thermische Stabilität .....	86
4.1.3.3 Enzymatische Aktivität unter <i>steady-state</i> Bedingungen .....	87
4.1.3.4 Computermodele .....	88
4.1.4 Versuchte Dimerisierung nativ monomerer AnPRTs durch rationales Design .....	89
4.1.5 Stabilisierung nativ monomerer AnPRTs .....	90
<b>4.2 Etablierung eines Selektionssystems in <i>T. thermophilus</i> zur Stabilisierung thermolabiler Enzyme .....</b>	<b>91</b>
4.2.1 Erstellung von <i>T. thermophilus</i> $\Delta trpD$ -Deletionsstämmen .....	92
4.2.2 Komplementationstests.....	96
4.2.3 Versuch zur Stabilisierung von shAnPRT .....	98
<b>4.3 Stabilisierung monomerer ssAnPRT-Mutanten .....</b>	<b>100</b>
4.3.1 Genbankherstellung.....	100
4.3.2 Selektion der Genbank in <i>T. thermophilus</i> $\Delta trpD$ .....	102
4.3.3 Sequenzanalyse der komplementierenden Klone .....	105
4.3.4 Herstellung und Reinigung der Mutanten.....	107
4.3.5 Thermische Stabilität der gereinigten ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten .....	110
4.3.6 Übertragung der stabilisierenden Mutationen auf weitere ssAnPRT Proteine .....	114
4.3.7 Einfluss der stabilisierenden Mutationen auf die Löslichkeit, Struktur und katalytische Aktivität des aktivierten Monomers von ssAnPRT .....	117
4.3.7.1 Löslichkeit ausgewählter Mutanten .....	118
4.3.7.2 Circular dichroismus ausgewählter Mutanten.....	120
4.3.7.3 Oligomerisierungszustand ausgewählter Mutanten .....	121
4.3.7.4 <i>Steady-state</i> Enzymkinetik.....	122
4.3.7.5 Kristallisation und Röntgenbeugungsmuster von ssAnPRT-T77I+N109S+I169T+F193S+L320M.....	125
4.3.8 Strukturelle Grundlagen der Stabilisierung durch die isolierten Mutationen.....	126
4.3.8.1 Effekt der Mutation T77I.....	127
4.3.8.2 Effekt der Mutation F193S .....	129
4.3.8.3 Effekt der Mutationen N109S, I169T und L320M .....	130
<b>4.4 Vorbereitungen der ssAnPRT-Mutanten für FRET-Messungen.....</b>	<b>132</b>
<b>5 Abschließende Diskussion .....</b>	<b>137</b>
<b>5.1 Identifikation nativ monomerer AnPRTs .....</b>	<b>137</b>
<b>5.2 Selektionssystem zur Erhöhung thermischer Stabilität in <i>T. thermophilus</i> .....</b>	<b>139</b>

<b>5.3 Stabilisierte monomere ssAnPRT-Mutanten als Modellsystem zur Untersuchung der Korrelation von Stabilität, Aktivität und Flexibilität .....</b>	<b>143</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>146</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>165</b>
<b>7.1 Ausbeuten von ausgewählten AnPRT-Mutanten .....</b>	<b>165</b>
<b>7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Fluoreszenz-Spektroskopie .....</b>	<b>166</b>
<b>7.3 Nukleotidsequenzen der verwendeten AnPRTs .....</b>	<b>167</b>
<b>7.4 Multiples Sequenzalignment ausgewählter AnPRTs.....</b>	<b>169</b>
<b>7.5 DNA-Sequenz der Integrationsstelle von <i>T. thermophilus</i> <math>\Delta trpD</math>-Deletionsstämmen (Abbildung 22).....</b>	<b>170</b>
<b>7.6 Kalibrierung der Superdex-75 (16/60) Gelfiltrationssäule .....</b>	<b>172</b>
<b>7.7 Teilprojekt: Versuch der Etablierung der TrpC Aktivität auf dem Gerüst von HisF aus <i>Thermotoga maritima</i> (tmHisF).....</b>	<b>173</b>
<b>7.7.1 Hintergrund .....</b>	<b>173</b>
<b>7.7.2 Rationales Proteindesign.....</b>	<b>174</b>
7.7.2.1 Planung .....	174
7.7.2.2 <i>In vitro</i> Charakterisierung hergestellter tmHisF-Mutanten .....	175
<b>7.7.3 Gelenkte Evolution .....</b>	<b>177</b>
<b>7.7.4 Autokatalyse der CdRP zu IGP-Ringschlussreaktion.....</b>	<b>177</b>
<b>7.7.5 Abschließende Diskussion .....</b>	<b>178</b>
<b>7.8 Teilpublikationen ssAnPRT .....</b>	<b>179</b>
<b>8 Danksagung .....</b>	<b>203</b>
<b>9 Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>205</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Enzyme und Reaktionen der Tryptophan Biosynthese.....	4
Abbildung 2: Reaktion der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (AnPRT).....	6
Abbildung 3: Struktur von ssAnPRT. ....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pQE40. ....	27
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Repressorplasmids pREP-4 (pDMI,1). ....	28
Abbildung 6: Schematische Darstellung des <i>Shuttle</i> -Vektors pMK18. ....	29
Abbildung 7: DNA- und Protein-Längenstandards. ....	34
Abbildung 8: Prinzip der Megaprimer-PCR. ....	49
Abbildung 9: Prinzip der <i>Overlap Extension</i> -PCR. ....	50
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Vorgehens bei einer Probeexpression.....	59
Abbildung 11: Strukturformeln der Alexa-Farbstoffe. ....	63
Abbildung 12: Absorptionsspektren der Alexa-Farbstoffe. ....	67
Abbildung 13: Schema des Enzymassays für die Aktivitätsmessung von AnPRT.....	73
Abbildung 14: Refraktometrische Bestimmung der Ammoniumsulfat-Konzentration.....	77
Abbildung 15: Reinigung von rekombinantem saAnPRT über Metallchelat-Affinitätschromatographie und Reinheit aller rekombinant hergestellten putativ monomeren AnPRTs. ....	83
Abbildung 16: Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration (Superdex 75) von verschiedenen AnPRTs.....	84
Abbildung 17: Thermische Stabilität nativ monomerer AnPRTs untersucht durch thermische Denaturierung (A) und irreversible thermische Inaktivierung (B). ....	86
Abbildung 18: Strukturmodell von saAnPRT.....	88
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Bankenselektion auf thermostabilisierte AnPRT-Mutanten in <i>T. thermophilus</i> $\Delta trpD$ Zellen. ....	92
Abbildung 20: Genomische Organisation des <i>trpD</i> -Gens in <i>T. thermophilus</i> HB27.....	92
Abbildung 21: Schematische Darstellung der in pJET1.2 klonierten $\Delta trpD$ -Deletionskonstrukte. ....	93
Abbildung 22: Strategie zur Herstellung von <i>T. thermophilus</i> $\Delta trpD$ -Deletionsstämmen über homologe Rekombination und Verifizierung über PCR-Analyse. ....	94
Abbildung 23: Schematische Darstellung des zur Verfügung stehenden Selektionsfensters sowie der angestrebten Stabilisierungen von zwei AnPRT Proteinen. ....	98
Abbildung 24: Ergebnisse der Sequenzierung von bei 79 °C komplementierenden Klonen sowie Auswahl der Mutationen für die <i>in vitro</i> Charakterisierung. ....	107
Abbildung 25: Reinigung von rekombinantem ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+F193S über Metallchelate-Affinitätschromatographie. ....	108
Abbildung 26: Vergleichende Expressionsanalyse zur Untersuchung der Kodonoptimierung von <i>sstrpD</i> . ....	109
Abbildung 27: Thermische Auffaltung von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) Einzel- und Mehrfachmutanten.....	110

Abbildung 28: Thermische Auffaltung von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) Einzel- und Kombinationsmutanten. ....	112
Abbildung 29: Thermische Auffaltung ausgewählter ssAnPRT-Mutanten. ....	115
Abbildung 30: <i>In vitro</i> Löslichkeit von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten. ....	118
Abbildung 31: Vergleichende Expressionsanalyse zur Überprüfung einer verbesserten <i>in vitro</i> Löslichkeit von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten mit den N109S- und I169T-Austauschen. ....	119
Abbildung 32: CD-Spektroskopische Untersuchungen zur Sekundär- und Tertiärstruktur verschiedener ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten. ....	120
Abbildung 33: Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration (Superdex 75) von verschiedenen ssAnPRT-Mutanten. ....	121
Abbildung 34: Einfluss des T77I-Austausches auf die Magnesiumabhängigkeit der <i>steady-state</i> Enzymaktivität von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S). ....	123
Abbildung 35: Beugungsbild aus dem ssAnPRT-T77I+N109S+I169T+F193S+L320M Datensatz. ....	125
Abbildung 36: Lage der mutierten Reste in der Röntgenstruktur von wildtypischem ssAnPRT (PDB-Eintrag: 1ZYK). ....	126
Abbildung 37: Darstellung der Umgebung von T77I. ....	127
Abbildung 38: Darstellung der Umgebung von F193S. ....	129
Abbildung 39: Darstellung der Umgebung von N109S (A), I169T (B) und L320M (C). ....	130
Abbildung 40: Struktur von ssAnPRT-N162C+K280C. ....	132
Abbildung 41: Reinigung von ssAnPRT markiert mit Alexa-488 plus Alexa-594 über Anionenaustausch-Chromatographie und Analyse ausgewählter Fraktionen. ....	134
Abbildung 42: Reinigung von ssAnPRT markiert mit Alexa-488 plus Alexa-647 über Anionenaustauschchromatographie in 50 mM Tris/HCl, pH 9,0 (A) und 50 mM KP, pH 7,5 (B). ....	135
Abbildung 43: Korrelation der Wechselzahl bei 37 °C und der thermischen Stabilität von Einzel- und Kombinationsmutanten von monomerem ssAnPRT. ....	143
Abbildung A 1: Kalibrierungskurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration durch Fluoreszenz-Spektroskopie. ....	166
Abbildung A 2: Multiples Sequenzalignment von verschiedenen AnPRTs. ....	169
Abbildung A 3: Kalibrierung der Superdex S-75 Gelfiltrationssäule. ....	172
Abbildung A 4: ( $\beta\alpha$ ) <sub>8</sub> - <i>barrel</i> Enzyme Imidazolglycerinphosphat-Synthase (HisF) und Indolglycerinphosphat-Synthase (TrpC) katalysieren analoge Ringschlussreaktionen in der Histidin- und Tryptophanbiosynthese. ....	173
Abbildung A 5: Superpositionierung der Röntgenstrukturen von ssTrpC (mit gebundenem Substratanalogon rCdRP; PDB Eintrag 1LBF) und tmHisF (PDB Eintrag 2A0N). ....	174

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hyperthermophile ( $T_{\text{opt}} \geq 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und extrem thermophile ( $50 \text{ }^{\circ}\text{C} < T_{\text{opt}} < 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) Modellorganismen. ....	15
Tabelle 2: Komponenten, Volumina und Endkonzentrationen der <i>ep</i> PCR. ....	51
Tabelle 3: Extinktionskoeffizienten und molare Masse (MW) der verwendeten Proteine. ....	66
Tabelle 4: Zusammensetzung 12,5 %iger SDS-PAGE Gele. ....	70
Tabelle 5: Charakterisierung der Aminosäurereste von AnPRTs an den Positionen „36“ und „47“. ....	82
Tabelle 6: Putativ monomere AnPRTs, abgeleitet aus der Analyse eines MSAs. ....	82
Tabelle 7: Apparente und berechnete molare Massen zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes verschiedener AnPRTs. ....	85
Tabelle 8: Übersicht über apparente Schmelztemperaturen ( $T_{\text{M}}^{\text{app}}$ ) und Halbwertszeiten ( $t_{1/2}^{40 \text{ }^{\circ}\text{C}}$ ). ....	86
Tabelle 9: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter nativ monomer AnPRTs bei $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . ....	87
Tabelle 10: Erzeugte und gereinigte Mutanten zur Dimerisierung nativ monomerer AnPRTs. ....	89
Tabelle 11: Stabilisierung nativ monomerer AnPRTs durch gerichtete Mutagenese. ....	90
Tabelle 12: In Abbildung 21 und 22 eingezeichnete Primer zur Herstellung und Überprüfung der <i>T. thermophilus</i> HB27 $\Delta trpD$ -Deletionsstämme. ....	96
Tabelle 13: Ergebnisse der <i>in vivo</i> Komplementation. ....	96
Tabelle 14: Anzahl und Verteilung der Nukleotidaustausche bei 10 zufällig ausgewählten Klonen der <i>shtrpD</i> -Genbanken 1, 2 und 3. ....	99
Tabelle 15: Anzahl und Verteilung der Nukleotidaustausche bei 10 zufällig ausgewählten Klonen der <i>sstrpD</i> -(I36E+M47D+D83G+F149S)-Genbank. ....	101
Tabelle 16: Ergebnisse der Bibliothekenselektion. ....	103
Tabelle 17: Ergebnisse der Komplementation nach Retransformation von <i>T. thermophilus</i> $\Delta trpD\_shble\_77-3$ bei verschiedenen Temperaturen auf SH-Minimalmedium. ....	105
Tabelle 18: Vergleichende Sequenzanalyse der Primärbank und der bei $79 \text{ }^{\circ}\text{C}$ komplementierenden Klone. ....	106
Tabelle 19: Ausbeuten bei vergleichender Expressionsanalyse zur Untersuchungen der Kodonoptimierung von <i>sstrpD</i> . ....	110
Tabelle 20: Übersicht über $T_{\text{M}}^{\text{app}}$ -Werte der Einzel- und Mehrfachmutanten von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) aus <i>in vitro</i> Charakterisierung I. ....	111
Tabelle 21: Übersicht über $T_{\text{M}}^{\text{app}}$ -Werte der Einzel- und Mehrfachmutanten von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) aus <i>in vitro</i> Charakterisierung II. ....	112
Tabelle 22: Überblick über $T_{\text{M}}^{\text{app}}$ -Werte von stabilisierten Einzel- und unterschiedlichen Kombinationsmutanten. ....	113
Tabelle 23: Übertragung der isolierten stabilisierenden Mutationen auf wildtypisches ssAnPRT: Überblick über $T_{\text{M}}^{\text{app}}$ -Werte. ....	116
Tabelle 24: Effekt des T77I-Austausches im Hintergrund unterschiedlicher ssAnPRT Proteine. ....	116



Tabelle 25: Effekt des F193S-Austausches im Hintergrund unterschiedlicher ssAnPRT Proteine .....	117
Tabelle 26: $[L_{1/2}]^{app}$ -Werte der untersuchten ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten. ....	119
Tabelle 27: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter von ssAnPRT-Mutanten bei 37 °C. ...	124
Tabelle 28: Aminosäureverteilung an der Position „77“ von AnPRTs.....	128
Tabelle 29: Überblick über Effekte einzelner Aminosäureaustausche.....	141
Tabelle A 1: Ausbeuten bei der Reinigung ausgewählter AnPRT-Mutanten.....	165
Tabelle A 2: Sequenzidentitäten und Sequenzähnlichkeiten paarweise verglichener AnPRTs.....	170
Tabelle A 3: Zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule Superdex S-75 verwendete Proteine..	172
Tabelle A 4: Erzeugte tmHisF-Mutanten, die basierend auf rationalem Design hergestellt wurden.....	175
Tabelle A 5: rCdRP Bindungsstudien von tmHisF-Mutanten.....	176

## Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Transformationseffizienz. ....	46
Formel 2: Berechnung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids. ....	48
Formel 3: Berechnung der optimalen Anlagerungstemperatur der Primer in einer PCR-Reaktion. ....	48
Formel 4: Berechnung der durchschnittlichen Basenaustausche pro Gen durch <i>ep</i> PCR. ....	52
Formel 5: Bestimmung der DNA-Konzentration. ....	55
Formel 6: Bestimmung der Anzahl der transformierten Zellen. ....	56
Formel 7: Bestimmung der Ligationseffizienz in Prozent. ....	57
Formel 8: Bestimmung der Größe einer Genbank aus Formel 6 und Formel 7. ....	57
Formel 9: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280}$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]. ....	65
Formel 10: Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0,1\%}A_{280}$ . ....	65
Formel 11: Berechnung der Proteinkonzentration mithilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0,1\%}A_{280}$ . ....	65
Formel 12: Berechnung der Konzentration von Alexa-488 bei Doppelmarkierungen nach Abzug der von Alexa-594 stammenden Absorption bei 493 nm. ....	67
Formel 13: Berechnung der Proteinkonzentration in markierten Proben nach Abzug der von Alexa-488 bzw. Alexa-594 stammenden Absorption bei 280 nm. ....	68
Formel 14: Bestimmung des Markierungsgrades $L$ . ....	68
Formel 15: Berechnung der durchschnittlichen Elliptizität pro Aminosäure ( $\theta_{MRW}$ ) aus der über Fern-UV Circular Dichroismus gemessenen Elliptizität. ....	69
Formel 16: Berechnung der molaren Elliptizität ( $\theta$ ) aus der über Nah-UV Circular Dichroismus gemessenen Elliptizität. ....	69
Formel 17: Berechnung des Sedimentationskoeffizienten. ....	72
Formel 18: Berechnung des apparenten Sedimentationskoeffizienten $s_{app}$ . ....	72
Formel 19: Umrechnung von $s_{app}$ auf Standardbedingungen ( $s_{20,W}$ ). ....	72

## Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren wurden gemäß der Einbuchstaben- oder Dreibuchstaben-Schreibweise abgekürzt.

A	Adenosin
AA	Anthranilsäure, Aminosäure
A <sub>x</sub>	Absorption bei x nm
Å	Ångström (10 <sup>-10</sup> m)
<sup>0,1%</sup> A <sub>x</sub>	spezifischer Extinktionskoeffizient bei x nm
A <sub>Basen</sub>	Durchschnittliche Anzahl der Basenaustausche pro Gen
a <sub>Basen</sub>	Anzahl der Basenaustausche pro analysiertem Gen
AICAR	5'-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleotid
Amp	Ampicillin
AnPRT	Anthranilat-Phosphoribosyltransferase
APS	Ammoniumperoxosulfid
AS	Aminosäure, Anthranilat-Synthase
AS-TrpE	Synthase Untereinheit des Anthranilat-Synthase Komplexes
AS-TrpG	Glutaminase Untereinheit des Anthranilat-Synthase Komplexes
ATP	Adenosintriphosphat
<i>bla</i>	Gen für die β-Lactamase
Bleo	Bleomycin
Bleo <sup>R</sup>	Resistenz gegen Bleomycin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin, <i>Crude extract</i> (lösliche Fraktion eines Zellextrakts)
c	Konzentration
ca.	circa
C <sub>α</sub>	zentrales C-2 Kohlenstoffatom von Aminosäuren
C <sub>β</sub>	C-1 Kohlenstoffatom der Seitenkette von Aminosäuren
CD	Circular Dichroismus
CdRP	1-(o-Carboxyphenylamino)-1-Deoxyribulose-5-Phosphat
CV	Säulenvolumen

d	Schichtdicke
D	denaturierter, ungefalteter Zustand eines Proteins
$\Delta G_{xy}$	Differenz der freien Energie zwischen Zustand x und y
$\Delta H_{xy}$	Enthalpie-Differenz zwischen Zustand x und y
$\Delta n$	Differentieller Brechungsindex
Da	Dalton
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
eGFP	<i>enhanced</i> GFP
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
epPCR	<i>error prone</i> PCR
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
f	Verdünnungsfaktor
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
G	Größe einer Genbank, Guanosin, freie Energie
GC%	GC-Gehalt von Nukleotidsequenzen
h	Stunde
His <sub>6</sub>	Anhang von 6 Histidinen an ein Protein
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
I	Intermediat
IGP	Indol-3-Glycerinphosphat
IGPS	Indol-3-Glycerinphosphat-Synthase
ImGP	Imidazol-Glycerinphosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
K	Gleichgewichtskonstante, Kolonien
Kana	Kanamycin
Kana <sup>R</sup>	Resistenz gegen Kanamycin

<i>kat*</i>	Gen für thermostabilisierte Kanamycin-Nukleotidyltransferase
kb	Kilobase
$k_{\text{cat}}$	Wechselzahl
$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$	katalytischer Effizienzparameter
kDa	Kilodalton
$K_{\text{M}}$	Michaeliskonstante
KP	Kaliumphosphat-Puffer
L	Ligationseffizienz
l	Liter
<i>lacZ</i>	Gen für die $\beta$ -Galactosidase
$[L_{1/2}]^{\text{app}}$	Salzkonzentration bei der 50% von zugegebenem Protein präzipitiert
LB	Luria-Bertani (-Medium)
LMW	<i>Low Molecular Weight</i> Protein-Längenstandard
ln	natürlicher Logarithmus
log	dekadischer Logarithmus
M	Molar [mol/l]
mA	Milliampère
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPa	Megapascal
$M_{\text{R}}$	molekulare Masse
MSA	multiple Sequenzalignment
MW	molare Masse
N	nativer, gefalteter Zustand eines Proteins
$n_{\text{Kolonien}}$	Anzahl der Kolonien
$n_{\text{seq}}$	Anzahl sequenzierter Gene
$n_{\text{T}}$	Anzahl an transformierten Zellen
<i>neo</i>	Gen für Kanamycin-Nukleotidyltransferase
nm	Nanometer
$\text{OD}_x$	optische Dichte bei x nm
OE-PCR	<i>Overlap Extension</i> PCR

P	Pellet (unlösliche Fraktion eines Zellextraktes)
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
PRA	Phosphoribosylanthranilat
PRAI	Phosphoribosylanthranilat-Isomerase
PRFAR	N'-5-Phosphoribulosylformimino-5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleotid
PRPP	5-Phosphoribosyl- $\alpha$ 1-Pyrophosphat
PRT	Phosphoribosyltransferase
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
R	Allgemeine Gaskonstante ( $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
ssDNA	einzelsträngige DNA
T	Temperatur, Thymidin
T <sub>A</sub>	<i>Annealing</i> -Temperatur eines <i>Primers</i>
T <sub>E</sub>	Transformationseffizienz
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur eines Oligonukleotids
T <sub>M</sub> <sup>app</sup>	Temperatur bei welcher 50 % des vorliegenden Proteins in nicht nativem Zustand vorliegt
<i>Tag</i>	fusionierter Anhang an ein Protein
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
tm <sub>hisF</sub>	Gen für die Synthase-Untereinheit der Imidazol-Glycerinphosphat-Synthase aus <i>Thermotoga maritima</i>

tmHisF	Synthase-Untereinheit der Imidazol-Glycerinphosphat-Synthase aus <i>Thermotoga maritima</i>
trpC	Gen für Indol-3-Glycerinphosphat-Synthase
trpD	Gen für Anthranilat-Phosphoribosyltransferase
trpE	Gen für Synthase Untereinheit des Anthranilat-Synthase Komplexes
trpG	Gen für Glutaminase Untereinheit des Anthranilat-Synthase Komplexes
Ts	Transitionen
Tv	Transversionen
U	<i>Unit</i>
u. a.	unter anderem
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
$v_i$	Anfangsgeschwindigkeit
Vol	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
(w/v)	Masse pro Volumen
y	Messwert
z.B.	zum Beispiel
$\epsilon_x$	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
$\lambda$	Wellenlänge
$\theta_{MRW}$	durchschnittliche molare Elliptizität pro Aminosäure
$\theta_{obs}$	gemessene Elliptizität
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde der Zusammenhang zwischen der Quartärstruktur, der thermischen Stabilität und der enzymatischen Aktivität der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (AnPRT) untersucht, die in der Tryptophanbiosynthese den  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Umsatz von Anthranilat (AA) und 5-Phosphoribosyl- $\alpha$ 1-pyrophosphat (PRPP) zu Phosphoribosylanthranilat (PRA) und Pyrophosphat ( $\text{PP}_i$ ) katalysiert.

Der erste Teil der Arbeit basiert auf dem bekannten Befund, dass die homodimere AnPRT aus dem hyperthermophilen Archaeon *Sulfolobus solfataricus* (ssAnPRT) durch die beiden Mutationen I36E und M47D am N- und C-Terminus der Helix  $\alpha$ 3 monomerisiert werden kann. Das resultierende ssAnPRT-M36I+M47D Monomer besitzt eine reduzierte thermische Stabilität bei unveränderter katalytischer Aktivität. Diese Resultate legten die Vermutung nahe, dass wildtypische AnPRTs mit geladenen Resten am N- und C-Terminus der Helix  $\alpha$ 3 Monomere bilden.

Auf der Basis dieser Hypothese wurden mittels eines multiplen Sequenzalignments (MSA) aus 220 AnPRT-Sequenzen sieben putativ monomere AnPRTs identifiziert und drei Vertreter aus den mesophilen Bakterien *Chlorobium luteolum* (clAnPRT), *Staphylococcus aureus* (saAnPRT) und *Staphylococcus haemolyticus* (shAnPRT) in rekombinanter Form hergestellt und gereinigt. Ihre Charakterisierung mittels analytischer Gelfiltration und analytischer Ultrazentrifugation bestätigte den vermuteten monomeren Assoziationszustand. *Steady-state* enzymkinetische Messungen bei 25 °C lieferten für diese AnPRTs vergleichbare Wechselzahlen ( $k_{\text{cat}}$ ) und Michaeliskonstanten für Anthranilat ( $K_M^{\text{AA}}$ ) sowie 5-Phosphoribosyl- $\alpha$ 1-pyrophosphat ( $K_M^{\text{PRPP}}$ ). Thermische Auffaltungsexperimente ergaben apparente Schmelztemperaturen ( $T_M^{\text{app}}$ ) von etwa 43 °C (saAnPRT und shAnPRT) bzw. 50 °C (clAnPRT).

In Umkehrung der Monomerisierung von ssAnPRT wurde versucht, die drei nativ monomeren AnPRTs durch den Austausch der geladenen Reste an den Positionen „36“ und „47“ gegen hydrophobe Aminosäuren zu dimerisieren, was jedoch nicht gelang. Um zukünftige Versuche auf eine stabile strukturelle Basis zu stellen, soll die Röntgenstruktur dieser Enzyme bestimmt werden. Die Erfolgsaussichten dafür konnten im Rahmen dieser Arbeit durch die Einführung analoger stabilisierender Punktmutationen (T78I in clAnPRT, V76I in saAnPRT und shAnPRT) erhöht werden.



Dem zweiten Teil der Arbeit lag der frühere Befund zugrunde, dass das durch die zwei Mutationen D83G und F149S in seiner Katalyse aktivierte Monomer ssAnPRT-(I36E+M47D-D83G+F149S) mit einem  $T_M^{app}$ -Wert von 70 °C deutlich weniger stabil ist als das nicht aktivierte ssAnPRT-I36E+M47D Monomer mit einem  $T_M^{app}$ -Wert von 81 °C.

Die thermische Stabilität von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) wurde durch eine Kombination aus Zufallsmutagenese und Selektion *in vivo* erhöht und anschließend die aus der Stabilisierung resultierenden Konsequenzen für den Assoziationszustand und die Aktivität des Enzyms untersucht. Im ersten Schritt wurde mittels *error-prone* PCR eine plasmidkodierte Genbank von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) in *Escherichia coli* hergestellt, die etwa  $9 \cdot 10^6$  unabhängige Klone mit durchschnittlich 12 Nukleotidaustauschen pro Gen umfasste. Zur Selektion auf erhöhte Stabilität wurde das thermophile und genetisch modifizierbare Bakterium *Thermus thermophilus* verwendet, welches bei Temperaturen zwischen 55 °C und 80 °C wächst. Dazu wurde eigens ein *T. thermophilus* Stamm mit einer Deletion der chromosomalen Kopie des *trpD*-Gens hergestellt. Dieser  $\Delta trpD$  Stamm ist auf ein aktives und thermostabiles AnPRT Protein angewiesen, um auf Tryptophan-freiem Medium wachsen zu können. Zur Selektion auf stabilisierte Mutanten wurden Zellen des  $\Delta trpD$ -Stammes mit der ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Genbank transformiert, auf Medium ohne Tryptophan ausplattiert und bei 79 °C inkubiert. Nach 36 Stunden waren etwa 100 Klone zu sichtbarer Größe herangewachsen. Davon wurden 20 zufällig ausgewählt und die Plasmidinserts sequenziert, um die in ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) eingebauten Mutationen zu identifizieren. Anschließend wurden verschiedene Einfach- und Mehrfachmutanten heterolog exprimiert, gereinigt und ihre thermische Stabilität bestimmt.

Es zeigte sich, dass ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) durch fünf Einzelaustausche stabilisiert wird, wobei der induzierte Anstieg des  $T_M^{app}$ -Wertes für T77I etwa 8 °C, für F193S etwa 4 °C und für N109S, I169T und L320M jeweils etwa 1 °C beträgt. Die stabilisierenden Effekte waren additiv, so dass die Kombinationsmutante ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+T77I+N109S+I169T+F193S+L320M einen um ca. 13 °C erhöhten  $T_M^{app}$ -Wert von etwa 83 °C aufwies. Weiter konnte gezeigt werden, dass die beiden effektivsten Austausche T77I und F193S auch im Hintergrund des nicht aktivierten Monomers ssAnPRT-I36E+M47D und des

wildtypischen ssAnPRT-Dimers stabilisierend wirken, wobei jedoch die induzierten  $T_M^{app}$ -Steigerungen weniger deutlich ausfallen. Eine Analyse auf der Basis der Röntgenstruktur von wildtypischem ssAnPRT lässt vermuten, dass der T77I-Austausch die Packung im Inneren des Proteins verbessert, während der Austausch F193S einen benachbarten flexiblen *loop* stabilisieren dürfte.

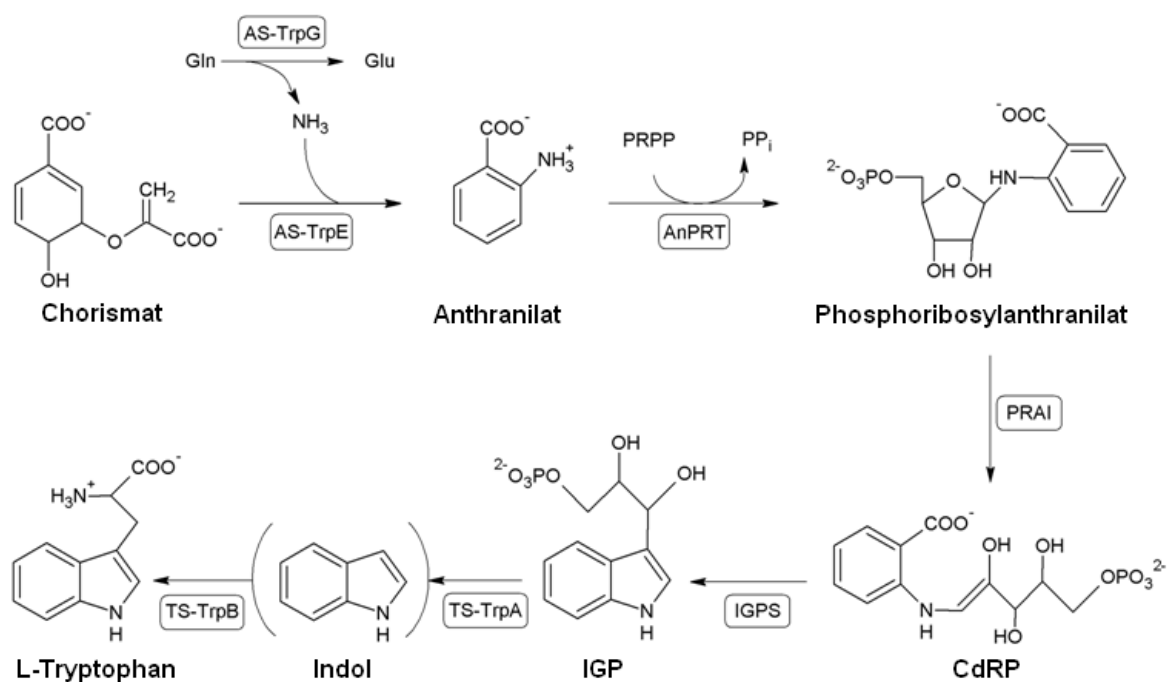
Mittels analytischer Gelfiltration wurde nachgewiesen, dass alle untersuchten ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten weiterhin als Monomer vorliegen, d. h. keiner der Austausche führte zu einer „Redimerisierung“ des Proteins. Während die meisten stabilisierenden Mutationen die katalytische Aktivität nur moderat beeinträchtigten, führte die in der Nähe des aktiven Zentrums gelegene N109S-Mutation zu einer etwa vierfachen Erniedrigung des  $k_{cat}$ -Wertes und einer etwa sechsfachen Erhöhung des Wertes für  $K_M^{AA}$ . Generell wurde eine negative Korrelation zwischen den Werten für  $k_{cat}$  und  $T_M^{app}$  beobachtet, d. h. die Aktivität der ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten nimmt mit zunehmender Stabilität ab. Diese Befunde stützen die Hypothese, dass es im Zuge der Substratbindung und der Produktfreisetzung zu Konformationsänderungen von ssAnPRT kommt, die eine gewisse Flexibilität des Proteingerüsts voraussetzen und durch stabilisierende Austausche beeinträchtigt werden könnten. Derartige Konformationsübergänge sollen in Zukunft über FRET-Untersuchungen nachgewiesen werden, wofür Fluoreszenzfarbstoffe über gezielt eingeführte Cysteinreste an das Protein gekoppelt werden müssen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das dazu verwendete Protokoll soweit optimiert, dass ein Markierungsgrad von etwa 40 % für die verwendeten Farbstoffe Alexa-488 (FRET-Donor) und Alexa-647 (FRET-Akzeptor) erreicht wurde.

Somit sind die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit die experimentelle Verifizierung eines bioinformatisch vorhergesagten Assoziationszustandes eines Proteins und die erstmalig gelungene Stabilisierung eines Enzyms durch metabolische Selektion in einem thermophilen Wirt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Tryptophanbiosynthese

Die Aminosäure Tryptophan ist für Säuger essentiell, wohingegen sie die meisten Bakterien, Archaeen und höheren Pflanzen in einer siebenstufigen Reaktion aus Chorismat *de novo* synthetisieren können (Yanofsky, 1999; Yanofsky, 2001; Abbildung 1).



**Abbildung 1: Enzyme und Reaktionen der Tryptophan Biosynthese.**

AS-TrpE, AS-TrpG: große und kleine Untereinheit der Anthranilat-Synthase; AnPRT: Anthranilat-Phosphoribosyltransferase; PRAI: Phosphoribosylanthranilat-Isomerase; CdRP: 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5-phosphat, IGPS: Indolglycerinphosphat-Synthase; IGP: Indol-3-Glycerinphosphat, TS-TrpA, TS-TrpB: α- und β-Untereinheit der Tryptophan Synthase.

Der erste Reaktionsschritt, die Umwandlung von Chorismat zu Anthranilat (AA), wird durch die Anthranilat-Synthase (AS) katalysiert. Hierbei handelt es sich um einen Enzymkomplex aus der Synthase (TrpE) und der Glutaminase (TrpG). Im Anschluss wird durch die Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (AnPRT) Anthranilat (AA) mit 5-Phosphoribosyl- $\alpha$ -1-Pyrophosphat (PRPP) unter Abspaltung von Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) zu Phosphoribosylanthranilat (PRA) verknüpft.

Die Phosphoribosylanthranilat-Isomerase (PRAI) katalysiert die Isomerisierung von PRA zu 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-Deoxyribulose-5-Phosphat (CdRP), woraus in

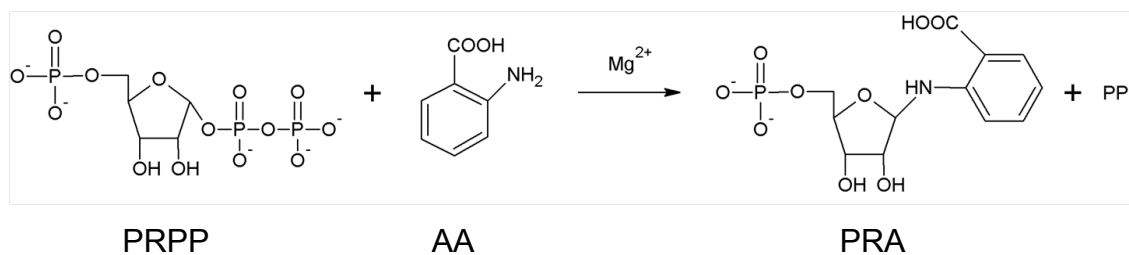
einer von der Indolglycerinphosphat-Synthase (IGPS) unterstützten Ringschlussreaktion unter Abspaltung von Wasser und Kohlendioxid Indol-3-Glycerinphosphat (IGP) entsteht. Daraus wird durch die  $\alpha$ -Untereinheit der Tryptophan Synthase unter Abspaltung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat Indol gebildet. Dieses wandert durch einen hydrophoben Kanal zur  $\beta$ -Untereinheit, wo es mit L-Serin unter Wasserabspaltung zu L-Tryptophan kondensiert.

## 1.2 Phosphoribosyltransferasen (PRTs)

Ein Komplex aus 5-Phosphoribosyl- $\alpha$ 1-Pyrophosphat und Magnesiumion ( $\text{PRPP} \cdot \text{Mg}^{2+}$ ) fungiert innerhalb des Nukleotid- und Aminosäuremetabolismus der Phosphoribosyltransferasen als aktiviertes Intermediat zur Bildung N-glykosidischer Bindungen. Die entsprechenden Reaktionen werden von Phosphoribosyltransferasen (PRTs) katalysiert. Diese übertragen die Ribose-5-Phosphateinheit aus PRPP unter Abspaltung von Pyrophosphat auf verschiedene Akzeptormoleküle wie Adenin, ATP, Xanthin, Orotat oder Uracil, die ein stickstoffhaltiges Nukleophil enthalten (Sinha und Smith, 2001). Aufgrund ihrer Struktur lassen sich die Phosphoribosyltransferasen in drei verschiedene Klassen unterteilen. Bekannte Vertreter der Klasse I sind die Orotat- und Uracil-Phosphoribosyltransferasen (Ozturk *et al.*, 1995, Scapin *et al.*, 1995, Schumacher *et al.*, 2002) sowie die Purin-Phosphoribosyltransferasen, welche für den Transfer von Ribose-5-Phosphat auf Adenin, Guanin, Hypoxanthin oder Xanthin verantwortlich sind. Diese weisen eine Zwei-Domänen-Struktur auf, bestehend aus einer kleinen N-terminalen *hood*-Domäne und einer größeren C-terminalen Domäne, die aus einem fünfsträngigen parallelen  $\beta$ -Faltblatt aufgebaut ist, welches zwischen zwei Schichten von  $\alpha$ -Helices liegt. Quinolot- und Nicotinsäure-Phosphoribosyltransferasen sind Vertreter der Klasse II (Eads *et al.*, 1997, Cao *et al.*, 2002), die wie die Enzyme der Klasse I aus zwei Domänen bestehen. Die N-terminale Domäne wird aus einem viersträngigen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt gebildet, das von  $\alpha$ -Helices umringt wird, während die C-terminale Domäne ein siebensträngiges  $\beta/\alpha$ -*barrel* bildet.

### 1.2.1 Anthranilat-Phosphoribosyltransferasen (AnPRTs)

Die Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (AnPRT) aus der Biosynthese des Tryptophans (Abbildung 1) lässt sich weder der Klasse I noch der Klasse II der PRTs zuordnen und bildet den ersten bekannten Vertreter der Klasse III PRTs (Mayans *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002). Im Fall von AnPRT stellt die Anthranilsäure das Akzeptormolekül für die Ribose-5-Phosphateinheit des PRPP dar. Die Reaktion ist nochmals Abbildung 2 dargestellt.

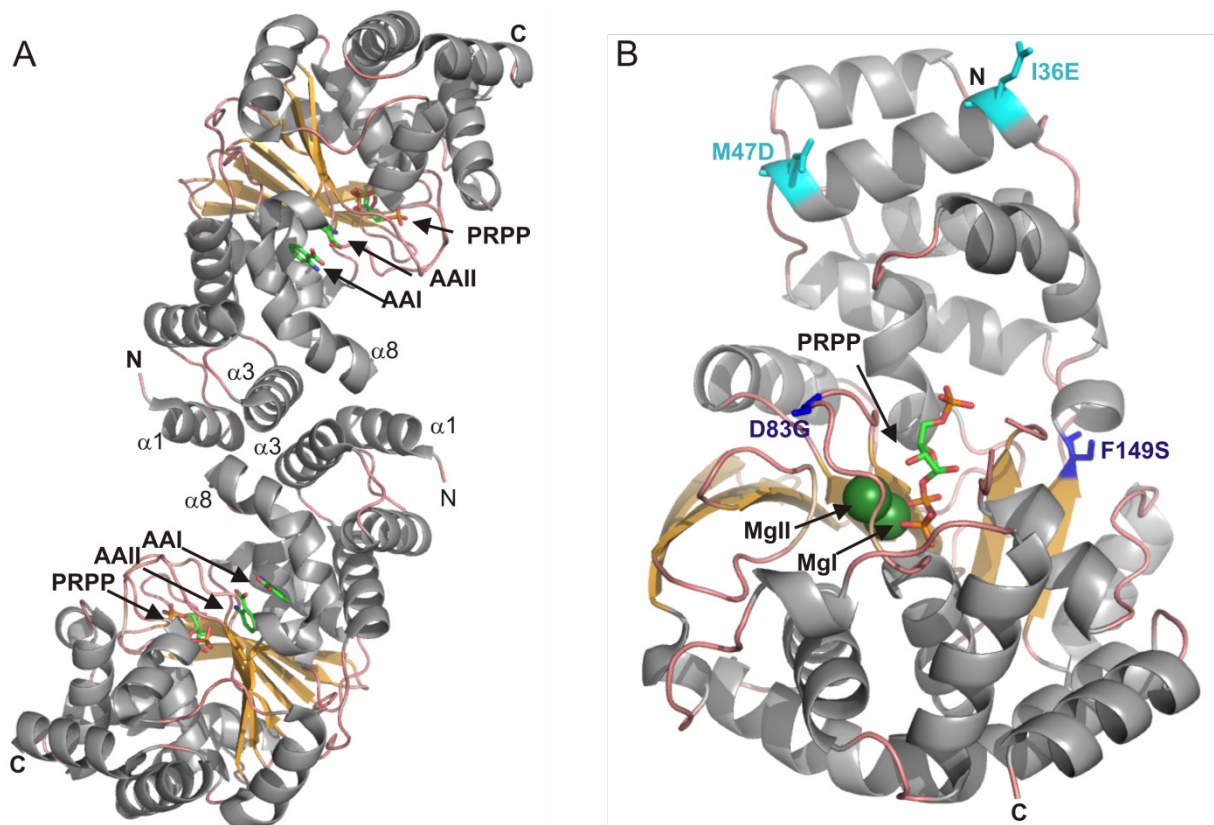


**Abbildung 2: Reaktion der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (AnPRT).**

*Steady-state* enzymkinetische Untersuchungen an AnPRT aus *Sacharomyces cerevisiae* zeigten, dass die Bindung der beiden Substrate nach einem sequentiellen Mechanismus mit zufälliger Bindungsreihenfolge abläuft (Hommel *et al.*, 1989). Ob die anschließende Reaktion der Aminogruppe des Anthranilat mit dem C1-Atom des PRPP eine nukleophile Substitution erster (S<sub>N</sub>1) oder zweiter Ordnung (S<sub>N</sub>2) darstellt, ist unklar und wird auch im Falle anderer PRTs kontrovers diskutiert (Hommel *et al.*, 1989; Craig und Eakin, 2000; Pugmire und Ealick, 2002).

Nachdem im Jahre 2002 zunächst die Röntgenstruktur der AnPRT aus *S. solfataricus* (ssAnPRT) gelöst wurde (Mayans *et al.*, 2002), sind inzwischen auch die Strukturen von AnPRT aus *Pectobacterium carotovorum* (Kim *et al.*, 2002), aus *Mycobacterium tuberculosis* (Lee *et al.*, 2006), *T. thermophilus* HB8 (PDB Eintrag 1V8G) und *Nostoc sp.* (PDB Eintrag 1VQU) bekannt. Diese fünf Enzyme liegen jeweils als Homodimere vor, deren Aufbau im Folgenden am Beispiel von ssAnPRT beschrieben wird. Jedes der beiden Protomere besteht aus einer N-terminalen  $\alpha$ -helikalen Domäne ( $\alpha$ 1 –  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 8 –  $\alpha$ 9) sowie einer C-terminalen  $\alpha/\beta$ -Domäne, welche aus einem zentralem  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ 1 –  $\beta$ 7) und einem Cluster von  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ 5 –  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 10 –  $\alpha$ 15) gebildet wird (Abbildung 3 A). Zwischen den beiden Domänen befindet sich eine Scharnierregion, in der das aktive Zentrum lokalisiert ist. Die Dimerisierung der Protomere erfolgt über die N-terminale  $\alpha$ -helikale Domäne in einer Kopf-zu-Kopf

Anordnung, wobei die Kontaktfläche der Untereinheiten hauptsächlich von hydrophoben Resten der Helices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 8$  gebildet wird (Mayans *et al.*, 2002). Die Faltung der AnPRTs ähnelt der Faltung der Pyrimidin-Nukleosidphosphorylasen aus *Bacillus stearothermophilus* (Pugmire und Ealick, 1998) und *T. thermophilus* HB8 (PDB Eintrag 2DSJ), was auf eine evolutionäre Verwandtschaft beider Enzymklassen hindeutet (Mayans *et al.*, 2002; Marino *et al.*, 2006). Diese Verwandtschaft wurde bereits früher aufgrund eines Sequenzvergleiches dreier ausgewählter Segmentabschnitte postuliert (Mushegian und Koonin, 1994).



### Abbildung 3: Struktur von ssAnPRT.

A: Bänderdarstellung der Kristallstruktur von homodimeren ssAnPRT mit den gebundenen Substraten Anthranilsäure (AAI und AAI) und PRPP (PDB-Eintrag: 1ZYK). Jedes Protomer besteht aus einer großen  $\alpha/\beta$ - und einer kleinen  $\alpha$ -helikalen Domäne, welche die Dimerisierung in einer Kopf-zu-Kopf-Anordnung vermittelt. Die Helices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 8$  bilden dabei die Interaktionsfläche aus.

B: Bänderdarstellung der Kristallstruktur einer Protomereinheit der Doppelmutante ssAnPRT-D83G+F149S mit gebundenen Substrat (PRPP) und den beiden Magnesiumionen Mgl und MglI (PDB-Eintrag: 3GBR). Die als Folge der D83G und F149S Mutationen eingeführten Seitenketten sind in blau dargestellt. Zur Illustration der beiden zum Monomer führenden Mutationen I36E und M47D (cyan) wurden die neuen Seitenketten mithilfe des Programms Pymol™0.99rc6 *in silico* eingefügt.

### 1.2.2 Die Anthranilat-Phosphoribosyltransferase aus *Sulfolobus solfataricus*

*Sulfolobus solfataricus* ist ein hyperthermophiles Archaeon, das zur Ordnung der Sulfolobales in der Klasse der Crenarchaea (Brock *et al.*, 1972) zählt. Dieser Organismus besiedelt schwefelreiche, heiße Quellen mit pH-Werten zwischen 1 und 5 und wächst unter aeroben und anaeroben Bedingungen in einem Temperaturbereich zwischen 50 und 87 °C, wobei das Temperaturoptimum bei 85 °C liegt (Zillig *et al.*, 1981).

In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Olga Mayans (Universität Liverpool) konnte die Struktur der Holo-Form von ssAnPRT mit allen Substraten gelöst werden (Abbildung 3 A; Marino *et al.*, 2006). In dieser Struktur weisen die Stickstoffatome der beiden gebundenen AA-Moleküle eine große Distanz von 14,6 Å bzw. 8,6 Å zum C1-Atom des PRPP auf. Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) in Kooperation mit Dimitri Svergun (EMBL Hamburg) deutete darauf hin, dass die beiden Substrate während der Katalyse durch eine rotationelle Domänenbewegung um 8 ° zu einander in eine reaktive Entfernung gebracht werden.

SsAnPRT besitzt eine Schmelztemperatur ( $T_M$ ) von 91,5 °C und eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von 60 min bei irreversibler thermischer Inaktivierung bei 80 °C und ist somit extrem thermostabil (Schlee *et al.*, 2009). Das Enzym erreicht bei 60 °C eine Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) von 4,2 s<sup>-1</sup>, besitzt jedoch mit einem  $k_{cat}$ -Wert von 0,33 s<sup>-1</sup> nur eine geringe katalytische Aktivität bei 37 °C. Des Weiteren wird ssAnPRT durch Magnesiumkonzentrationen größer als 0,1 mM inhibiert (Schlee *et al.*, 2009). Mithilfe gelenkter Evolution konnte die niedrige katalytische Aktivität von ssAnPRT erhöht und die Magnesiuminhibition aufgehoben werden. Dazu wurde mittels Zufallsmutagenese eine plasmidkodierte Genbank von ssAnPRT hergestellt und durch *in vivo* Selektion in einem Tryptophan-auxotrophen *E. coli* Stamm aktivierte Mutanten über beschleunigtes Kolonienwachstum bei 37 °C isoliert (Schlee *et al.*, 2009). Die Doppelmutante ssAnPRT-D83G+F149S zeigt bei 37 °C im Vergleich zum Wildtyp keine Inhibition durch Magnesiumkonzentrationen von bis zu 2 mM und eine um das 40-fache erhöhte Wechselzahl. Auffällig ist, dass die Michaeliskonstante für das Substrat Anthranilat ( $K_M^{AA}$ ) stark erhöht, die für PRPP ( $K_M^{PRPP}$ ) dagegen signifikant erniedrigt ist. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus zeigten, dass der Aminosäureaustausch D83G für die Aufhebung der Magnesiuminhibition verantwortlich ist, während der destabilisierende Austausch F149S durch eine Erhöhung der konformationellen Flexibilität eine schnellere Freisetzung des Produkts

PRA ermöglicht und damit wesentlich zur Erhöhung der Wechselzahl beiträgt. In Abbildung 3 B ist die Struktur eines Protomers von ssAnPRT-D83G+F149S mit gebundenem PRPP und zwei  $Mg^{2+}$ -Ionen dargestellt. Eine detaillierte Analyse ergab, dass die Affinität des inhibierenden MgII durch die D83G Mutation stark herabgesetzt wird und sich in Folge PRPP im Vergleich zum wildtypischen Enzym in die gezeigte alternative Konformation umlagert (Schlee *et al.*, 2009).

Um die Rolle der Oligomerisierung für die katalytische Aktivität und die Thermostabilität zu untersuchen, wurde das ssAnPRT-Dimer durch den Austausch zweier apolarer Reste am N- und C-Terminus von Helix  $\alpha 3$  durch Reste mit negativer Ladung an der Interaktionsfläche geschwächt. Die resultierende Doppelmutante ssAnPRT-I36E+M47D mit den in Abbildung 3 B markierten Austauschen liegt als Monomer vor und besitzt eine dem Wildtyp vergleichbare katalytische Aktivität bei deutlich verringerter Thermostabilität. Die Schlussfolgerung war, dass die Dimerisierung von ssAnPRT wichtig für die Stabilität, jedoch bedeutungslos für die katalytische Aktivität ist (Schwab *et al.*, 2008).

### 1.3 Zusammenhang zwischen Quartärstruktur, Stabilität und Aktivität

Die nichtkovalente Assoziation von Polypeptidketten zu homo- oder heterooligomeren Komplexen kann wichtige Konsequenzen für die Funktion und die Stabilität haben. So kann das Zusammenspiel von assemblierten Untereinheiten zur Ausbildung des aktiven Zentrums („*shared active sites*“) beitragen (Schliebs *et al.*, 1997; Ottosen *et al.*, 2002; Shallom *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2006), für die Regulation der katalytischen Aktivität wichtig sein (Monod *et al.*, 1965; Marianayagam *et al.*, 2004) und *substrate channeling* (Miles *et al.*, 1999; Raushel *et al.*, 2003) ermöglichen. Darüber hinaus deutet der Vergleich von homologen Enzymen aus mesophilen und hyperthermophilen Organismen daraufhin, dass ein höherer Oligomerisierungsgrad eine verbesserte Resistenz gegen thermische Inaktivierung und Denaturierung vermittelt (Jaenicke und Böhm, 1998; Sterner und Liebl, 2001; Vieille und Zeikus, 2001; Walden *et al.*, 2001). Rationales Proteindesign ermöglicht es, die Auswirkung des Oligomerisierungszustandes auf Funktion und Stabilität zu untersuchen. So wurden durch Aminosäureaustausche an der Kontaktfläche von homodimeren Enzymen wie der Triosephosphatisomerase (Schliebs *et al.*, 1997), der Dihydroorotat-Dehydrogenase (Ottosen *et al.*, 2002), der



$\alpha$ -Glucoronidase (Shallom *et al.*, 2004) und der Glutathion-Transferase (Thompson *et al.*, 2006) monomere Mutanten erzeugt, die eine drastisch verringerte Wechselzahl zeigten. Bei diesen Beispielen ist somit die katalytische Aktivität an die native Quartärstruktur gebunden. Doch auch die Abhängigkeit der konformationellen Stabilität von der Quartärstruktur konnte in einigen Studien nachgewiesen werden. So führten Mutationen an der Kontaktfläche der dodekameren (4 x 3 Untereinheiten) Ornithin-Carbamoyl-Transferase aus *Pyrococcus furiosus* (pfOTCase) zu einer Dissoziation in katalytisch aktive, aber deutlich destabilisierte Trimere (Clantin *et al.*, 2001). Ein vergleichbares Ergebnis lieferte die Monomerisierung der homodimeren Phosphoribosylanthranilat-Isomerase aus *T. maritima* (tmPRAI, Thoma *et al.*, 2000) sowie die bereits beschriebene Monomerisierung von ssAnPRT durch die Mutationen I36E+M47D (Schwab *et al.*, 2008). Im Fall der pfOTCase und tmPRAI liegen homologe Enzyme als Trimer bzw. Monomer vor. Daher wurde in diesen Fällen der höhere Oligomerisierungszustand als typisches Merkmal von Hyperthermophilen eingestuft. Im Gegensatz dazu bilden alle bisher charakterisierten AnPRTs, unabhängig von der Wachstumstemperatur des Organismus und der Position im phylogenetischen Baum, Homodimere aus (Largen *et al.*, 1978; Hommel *et al.*, 1989; Ivens *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006). Der geschilderte Zusammenhang von Quartärstruktur, Stabilität und Aktivität am Beispiel von ssAnPRT-I36E+M47D legt jedoch die Existenz von nativ monomeren AnPRTs mit hoher katalytischer Aktivität bei relativ geringer konformationeller Stabilität nahe.

Für die Funktionsfähigkeit von Enzymen ist es entscheidend, dass sie optimal an ihre Umgebung angepasst sind. Entsprechend sind Enzyme aus Hyperthermophilen in der Regel deutlich thermostabiler als die homologen Enzyme aus Mesophilen, während letztere bei niedrigen Temperaturen wesentlich höhere Aktivitäten aufweisen. Daraus ergibt sich, dass Enzyme aus Hyperthermophilen und Mesophilen bei ihren jeweiligen optimalen Wachstumstemperaturen vergleichbar stabil und aktiv sind (Jaenicke, 2000). Für die bei Raumtemperatur geringe Aktivität hyperthermophiler Enzyme wird eine eingeschränkte konformationelle Flexibilität verantwortlich gemacht (Merz *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005). Im Einklang damit zeigt die Isopropylmalat-Dehydrogenase aus *T. thermophilus* bei 25 °C eine langsamere Austauschrate von Wasserstoffatomen als das homologe *E. coli* Enzym, während der Wasserstoffaustausch im Bereich der jeweils optimalen Wachstumstemperatur vergleichbar schnell abläuft (Zavodszky *et al.*, 1998). Es gibt allerdings auch

hyperthermophile Enzyme, die bei niedrigen Temperaturen katalytisch hoch aktiv sind, vermutlich um die geringe Thermostabilität ihrer Substrate zu kompensieren (Sternier *et al.*, 1996; Henn-Sax *et al.*, 2002). Hohe konformationelle Stabilität und katalytische Aktivität schließen sich somit prinzipiell nicht aus, aber aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks tritt diese Kombination in nativen Enzymen nur selten auf (Miyazaki *et al.*, 2000). Im Labor können jedoch relativ einfach Mutanten evolviert werden, die sowohl hohe katalytische Aktivität bei Raumtemperatur als auch extreme Thermostabilität aufweisen (Giver *et al.*, 1998; Yasugi *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002).

## 1.4 Strukturelle Grundlagen der Proteinstabilität

Proteine sind lineare Polymere, die in der Regel aus 20 unterschiedlichen Aminosäuren aufgebaut sind. Sie liegen im einfachsten Fall in einem Gleichgewicht zwischen dem nativen, gefalteten Zustand (N) und dem denaturierten, ungefalteten Zustand (U) vor (Zwei-Zustands-Modell, Richards, 1992). Die thermodynamische Stabilität  $\Delta G^0$  eines Proteins wird als Differenz der freien Energie von N ( $G_N^0$ ) und der freien Energie von U ( $G_U^0$ ) unter Standardbedingungen definiert (Pace *et al.*, 2004).  $\Delta G^0$ -Werte von in der Natur vorkommenden Proteinen liegen in der Regel nur zwischen 5 und 15 kcal · mol<sup>-1</sup> (Pace, 1990), d. h. stabilisierende und destabilisierende Faktoren gleichen sich fast vollständig aus. Zu den stabilisierenden Faktoren zählen der hydrophobe Effekt, Wasserstoffbrücken, Disulfidbindungen, ionische Bindungen und van-der-Waals Kräfte (Pace *et al.*, 2004). Über einen langen Zeitraum wurde angenommen, dass der hydrophobe Effekt den dominierenden Antrieb für die Proteinfaltung darstellt (Kauzmann, 1959; Pace *et al.*, 2004). Sorgfältig analysierte Mutationsanalysen haben jedoch gezeigt, dass Wasserstoffbrücken und auch van-der-Waals-Kräfte einen vergleichbar wichtigen Beitrag zur Proteinstabilität leisten (Myers und Pace, 1996; Pace *et al.*, 2004). Weitere Analysen ergaben, dass ionische Wechselwirkungen zwischen ungleich geladenen Seitenketten (Salzbrücken) in der Regel einen geringeren Beitrag zur Stabilität leisten, weil ihr vorteilhafter elektrostatischer Effekt sowohl durch ungünstige Dehydratisierung der geladenen Gruppen als auch durch Reduzierung der Seitenkettenentropie größtenteils kompensiert wird (Hendsch und Tidor, 1994; Pace *et al.*, 2000; Bosshard *et al.*, 2004). In speziellen Fällen können allerdings Salzbrücken die Stabilität um mehr als 4 kcal · mol<sup>-1</sup> erhöhen (Anderson *et al.*, 1990;

Pace *et al.*, 2004). Ein Charakteristikum von Proteinen aus Hyperthermophilen ist das Vorkommen von ausgedehnten ionischen Netzwerken (Kelly *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 1995; Korndörfer *et al.*, 1995; Yip *et al.*, 1995; Hennig *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001), so dass in diesen Fällen elektrostatische Interaktionen kooperativ wirken können (Karshikoff und Ladenstein, 2001). Die reduzierte Dielektrizitätskonstante von Wasser bei höheren Temperaturen ( $\epsilon_{\text{Wasser}, 20\text{ °C}} = 80,2 > \epsilon_{\text{Wasser}, 80\text{ °C}} = 60,8$ , Murrell und Jenkins, 1994) ist zudem dafür verantwortlich, dass die Dehydratisierung von geladenen Aminosäuren weniger ungünstig wirkt, was das gehäufte Vorkommen von Salzbrücken bei Proteinen aus Hyperthermophilen im Vergleich zu Mesophilen erklärt (Elcock, 1998; Sterner und Liebl, 2001; Karshikoff und Ladenstein, 2001).

Generell ist die treibende Kraft der Entfaltung die konformationelle Entropie, welche den denaturierten Zustand stabilisiert. Die Rotation um die vielen Einfachbindungen innerhalb einer Polypeptidkette ist im ungefalteten Zustand wesentlich einfacher möglich als im gefalteten Protein (Pace *et al.*, 2004). So begünstigt beispielsweise die konformationelle Entropie den entfalteten Zustand der RNaseA bei 25 °C um ca.  $165 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Pace *et al.*, 1998). Entsprechend sind die einzigen kovalenten Verknüpfungen, die eine Erhöhung der thermodynamischen Stabilität hervorrufen, Disulfidbindungen. Diese senken die konformationelle Entropie des entfalteten Zustands und erhöhen somit seine freie Energie (Pace, 1990).

## 1.5 Erhöhung der konformationellen Proteinstabilität

Zur Erhöhung der konformationellen Stabilität bietet sich rationales Proteindesign an (van den Burg und Eijsink, 2002; Eijsink *et al.*, 2004): Durch Einführung von Disulfidbrücken (Matsumura *et al.*, 1989; Mansfeld *et al.*, 1997; Tigerstrom *et al.*, 2004; Hagihara *et al.*, 2007; Saerens *et al.*, 2008) bzw. von Gly→Ala oder Xxx→Pro Austausch (Matthews *et al.*, 1987) konnte die Rigidität von Proteinen deutlich erhöht werden. All diese Austausche verringern die Entropie des entfalteten Zustands in höherem Maße als die des gefalteten Zustands, wodurch der Entropiegewinn bei Entfaltung vermindert wird. Zur Proteinstabilisierung können ebenfalls Reste beitragen, die eingeführt wurden, um mit einer  $\alpha$ -Helix-Dipol zu interagieren (Nicholson *et al.*, 1988; Nicholson *et al.*, 1991), bzw. auf andere Weise  $\alpha$ -Helices (Serrano *et al.*, 1992; Blaber *et al.*, 1993) oder andere Sekundärstrukturbestandteile wie  $\beta$ -turns (Simpson *et al.*, 2005) optimieren. Durch Verstärkung der Protomer-Interaktionen kann die Quartärstruktur bei oligomeren

Proteinen stabilisiert werden (Kaneko *et al.*, 2005, Thoms *et al.*, 2009). Auch die Optimierung von Salzbrücken-Netzwerken (Sun *et al.*, 1991; Waldburger *et al.*, 1995; Pace, 1990; Makhatadze *et al.*, 2003; Schwehm *et al.*, 2003; Höcker *et al.*, 2004; Gribenko *et al.*, 2009) und die Einführung von Interaktionen zwischen aromatischen Seitenketten (Serrano *et al.*, 1991; Puchkaev *et al.*, 2003) kann zu einer deutlichen Erhöhung der konformationellen Stabilität führen. Oft haben bereits wenige Austausche einen deutlichen Effekt (Mansfeld *et al.*, 1997; Perl *et al.*, 2000; Pedone *et al.*, 2001), wobei die Stabilisierung der Triosephosphat-Isomerase aus *Leishmania mexicana* um 26 °C durch eine einzige Punktmutation das derzeit wohl eindrucksvollste Beispiel darstellt (Williams *et al.*, 1999). Das erworbene Wissen über die strukturellen Grundlagen der Proteinstabilität hat dazu beigetragen, dass auch bioinformatische Methoden etabliert wurden, um stabilisierende Austausche vorherzusagen (Malakauskas und Mayo, 1998; Korkegian *et al.*, 2005; Dantas *et al.*, 2007; Wunderlich *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang wurden u. a. durch die Erhöhung des Anteils an „Konsensus-Resten“ aus multiplen Sequenzalignments (Lehmann *et al.*, 2002; Flores und Ellington, 2005; Polizzi *et al.*, 2006) oder die Übertragung von Resten aus homologen Proteinen hyperthermophiler Organismen (Littlechild *et al.*, 2007) Erfolge erzielt.

Während als Grundlage für rationales Design idealerweise eine 3D-Struktur vorhanden sein sollte, kann man Proteine durch „gelenkte Evolution“ ohne diesbezügliche Informationen im Labor stabilisieren (Zhao *et al.*, 1998; Eijssink *et al.*, 2005; Roodveldt *et al.*, 2005). Das für das Protein kodierende Gen wird dabei zunächst global oder lokal, mittels *error prone* PCR (Leung *et al.*, 1989), DNA-*Shuffling* (Stemmer, 1994 a, b) oder einer PCR mit degenerierten Oligonukleotiden als Primer (Neylon, 2004; Reetz *et al.*, 2008) randomisiert und das dadurch erzeugte Repertoire kloniert. Die resultierenden Genbanken werden dann mithilfe geeigneter Selektions- oder *Screening*-Verfahren auf stabilisierte Mutanten durchsucht. Der Großteil der Strategien zum *Screening* thermostabilsierter Proteine basiert auf der Bestimmung der Restaktivität nach Inkubation bei erhöhter Temperatur auf Nitrocellulosefiltern oder in Microtiterplatten (Cirino und Georgescu, 2003; Robertson und Steer, 2004). Bei einem weiteren System wird die zelluläre Stressantwort auf falsch gefaltete Proteine analysiert. Durch Kopplung dieser Stressantwort an eine Farbreaktion wurden instabile Proteinmutanten erkannt und aussortiert (Lesley *et al.*, 2002). Bei einem anderen Ansatz wird das Signal eines fusionierten Reporterproteins

analysiert. Diesem Verfahren liegt die Annahme zugrunde, dass die Stabilität des Zielproteins die Löslichkeit und somit die zelluläre Funktion des Reporterproteins beeinflusst. Als Reporterproteine wurden  $\alpha$ -LacZ (Wigley *et al.*, 2001), die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT; Maxwell *et al.*, 1999; Sieber *et al.*, 2001; Sieber, 2003; Seitz *et al.*, 2007) oder das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* (Waldo *et al.*, 1999; Waldo, 2003) an Genbanken des Zielproteins fusioniert und mittels Farbreaktion ( $\alpha$ -LacZ), Antibiotikumresistenz (CAT) oder Fluoreszenz (GFP) auf stabilisierte Mutanten gescreent bzw. selektiert. Mithilfe von GFP als Reporterprotein konnten beispielsweise die Nukleosid-Diphosphat-Kinase aus *Pyrobaculum aerophilum* (Pedelacq *et al.*, 2002), das Genprodukt Rv2002 aus *M. tuberculosis* (Yang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003) und die Ligand-Bindungsdomäne des humanen Glucocorticoid-Rezeptors (Seitz, 2009) stabilisiert werden, was die Röntgenstrukturanalyse dieser Proteine ermöglichte. In einem weiteren Ansatz nutzt man die Möglichkeit, die erhöhte Protease-Resistenz eines stabilisierten Proteins an die Infektiosität von Phagen zu koppeln („Proside“; Sieber *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2003; Kather *et al.*, 2008).

Um stabilisierte Proteinmutanten durch gelenkte Evolution zu isolieren, bietet die Selektion in thermophilen Wirten wie z.B. *T. thermophilus* eine weitere Option. Da in dieser Arbeit diese Technik zur Anwendung kam, wird sie im nächsten Kapitel näher vorgestellt.

## **1.6 *Thermus thermophilus* als thermophiler Modellorganismus**

Thermophile Organismen ermöglichen die Untersuchung von Zellprozessen bei hohen Temperaturen und können als Wirt für gerichtete Evolution verwendet werden. Aus dem breiten Spektrum an thermophilen Organismen wurden in der Vergangenheit mehrere Vertreter mit unterschiedlichen Temperaturoptima aus den phylogenetischen Domänen der Archaeen und der Bakterien auf ihre Tauglichkeit als Modellsystem hin untersucht (Tabelle 1). Die Voraussetzung für ein thermophiles Modellsystem sind genetische Modifizierbarkeit und die Möglichkeit zur heterologen Proteinexpression. Dafür sind ein effizientes Transformationssystem in Kombination mit *Shuttle*-Vektoren sowie die Existenz von thermostabilen Selektionsmarkern ausschlaggebend (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Hyperthermophile ( $T_{\text{opt}} \geq 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und extrem thermophile ( $50 \text{ }^{\circ}\text{C} < T_{\text{opt}} < 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) Modellorganismen.**

$T_{\text{opt}}$ : Temperaturoptimum; Transformation: beschriebene Methode der Plasmidaufnahme; EP: Elektroporation; KJ: Konjugation;  $\text{CaCl}_2$ : Calciumchlorid und thermischer Schock; PEG: Spheroplasten- und Polyethylenglykol-vermittelte Transformation; NK: natürliche Kompetenz; Antibiotika: plasmidkodierte Gene für thermostabile Resistenzproteine gegen folgende Antibiotika: Hyg: Hygromycin, Kana: Kanamycin, Cat: Chloramphenicol, Bleo: Bleomycin, Str: Streptomycin, Sim: Simvastatin bzw. Alkohole (Adh); Auxotrophie: plasmidkodierte Komplementation von folgenden Auxotrophien möglich: *pyrE* oder *pyrF*: Uracil, *leu*: Leucin, *trp*: Tryptophan; Reportergen: verwendetes Reportergen; *lacZ*:  $\beta$ -Galaktosidase, *phoA*: Hyperalkaline Phosphatase, *sGFP*: superfolder GFP.

Organismus	$T_{\text{opt}}$	Transformation	Antibiotika	Auxotrophie	Reportergen
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	80	EP <sup>1,2,3,4,5</sup> KJ <sup>6</sup>	Hyg <sup>5</sup> Adh <sup>1</sup>	<i>pyrEF</i> <sup>2,4</sup>	<i>lacZ</i> <sup>2,3,4</sup>
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	80	EP <sup>7,8</sup>	Adh <sup>8</sup>	<i>pyrEF</i> <sup>7</sup>	<i>lacZ</i> <sup>7,8</sup>
<i>Pyrococcus furiosus</i>	96	$\text{CaCl}_2$ <sup>9,12</sup>	Adh <sup>9</sup> Sim <sup>12</sup>	<i>pyrEF</i> <sup>12</sup>	-
<i>Pyrococcus abyssi</i>	103	PEG <sup>10,11</sup>	-	<i>pyrEF</i> <sup>10,11</sup>	-
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	85	$\text{CaCl}_2$ <sup>13,14,15</sup> NK <sup>14</sup>	Sim <sup>15</sup>	<i>pyrF</i> <sup>13,14</sup> <i>trp</i> <sup>13,14</sup>	-
<i>Thermotoga neapolitana</i>	80	PEG <sup>16</sup>	Cat <sup>16</sup>	-	-
<i>Thermus thermophilus</i>	75	NK <sup>17,18,19,21</sup> EP <sup>23,24</sup> KJ <sup>20</sup>	Kana <sup>29,19,23,30,31,24</sup> Bleo <sup>25</sup> Hyg <sup>22</sup> Str <sup>26</sup>	<i>leu</i> <sup>28</sup> <i>trpB</i> <sup>28</sup> <i>pyrEF</i> <sup>21,33,34</sup>	<i>lacZ</i> <sup>27,32</sup> <i>phoA</i> <sup>35</sup> <i>sGFP</i> <sup>35</sup>

Literaturlegende:

<sup>1</sup> Contursi *et al.*, 2003; <sup>2</sup> Jonuscheit *et al.*, 2003; <sup>3</sup> Worthington *et al.*, 2003; <sup>4</sup> Albers *et al.*, 2006; <sup>5</sup> Cannio *et al.*, 2001; <sup>6</sup> Prangishvili *et al.*, 1998; <sup>7</sup> Berkner *et al.*, 2007; <sup>8</sup> Berkner *et al.*, 2010; <sup>9</sup> Aravalli und Garrett, 1997; <sup>10</sup> Watrin *et al.*, 1999; <sup>11</sup> Lucas *et al.*, 2002; <sup>12</sup> Waage *et al.*, 2010; <sup>13</sup> Sato *et al.*, 2003; <sup>14</sup> Sato *et al.*, 2005; <sup>15</sup> Matsumi *et al.*, 2007; <sup>16</sup> Yu *et al.*, 2001; <sup>17</sup> Koyama *et al.*, 1986; <sup>18</sup> Hidaka *et al.*, 1994; <sup>19</sup> Hoseki *et al.*, 1999; <sup>20</sup> Ramirez-Arcos *et al.*, 1998; <sup>21</sup> Angelov *et al.*, 2009; <sup>22</sup> Nakamura *et al.*, 2005; <sup>23</sup> Chautard *et al.*, 2007; <sup>24</sup> de Grado *et al.*, 1999; <sup>25</sup> Brouns *et al.*, 2005; <sup>26</sup> Blas-Galindo *et al.*, 2007; <sup>27</sup> Koyama *et al.*, 1990 b; <sup>28</sup> Koyama *et al.*, 1990 a; <sup>29</sup> Lasa *et al.*, 1992 a; <sup>30</sup> Mather und Fee, 1992; <sup>31</sup> de Grado *et al.*, 1998; <sup>32</sup> Ohta *et al.*, 2006; <sup>33</sup> Tamakoshi *et al.*, 1997; <sup>34</sup> Tamakoshi *et al.*, 1999; <sup>35</sup> Cava *et al.*, 2008 c.

Von den hyperthermophilen Archaeen konnten zwei *Sulfolobus* Stämme (Contursi *et al.*, 2003; Jonuscheit *et al.*, 2003; Worthington *et al.*, 2003; Albers *et al.*, 2006; Berkner *et al.*, 2007; Berkner *et al.*, 2010) und zwei *Pyrococcus* Stämme (Aravalli und Garrett, 1997; Watrin *et al.*, 1999; Lucas *et al.*, 2002; Waage *et al.*, 2010) bis zu

einem gewissen Grad genetisch manipuliert werden, während *Thermococcus kodakarensis* das diesbezüglich am besten etablierte System darstellt (Sato *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2005). Grundlegend dafür waren vor allem die Entwicklung eines effektiven Transformationsystems und einer entsprechenden Selektionsmethode unter Verwendung von Simvastatin als spezifischem Inhibitor der 3-Hydroxyl-3-methylglutaryl Coenzym A Reduktase (Matsumi *et al.*, 2007).

Bei den extrem thermophilen Bakterien wurden Stämme aus der Gattung *Thermotoga* (Yu *et al.*, 2001) genetisch manipuliert, ihre Anwendung als thermophiles Modellsystem jedoch, vermutlich wegen technischer Probleme, nicht weiter verfolgt. Ausgewählte *T. thermophilus* Stämme hingegen eignen sich hervorragend für zahlreiche Anwendungen, beispielsweise als Wirt für heterologe Expression oder zur Selektion thermostabiler Mutanten. Hohe Wachstumsraten und somit hohe Zelldichten, sowie natürliche Kompetenz für DNA-Aufnahme machen *Thermus* Stämme zu geeigneten Kandidaten, um die Grundlagen von Thermophilie zu untersuchen (Cava *et al.*, 2009).

Bei der Auswahl eines thermophilen Modellsystems ist fundiertes Wissen über die physiologischen Eigenschaften des entsprechenden Organismus ein wichtiges Kriterium. Bisher konnten hunderte Stämme der Gattung *Thermus* (Brock und Freeze, 1969) isoliert werden, wobei alle thermophil und gramnegative Bakterien sind, die aerob in einem Temperaturbereich von 50 – 82 °C leben (Oshima, 1974). In Abwesenheit von Sauerstoff wurden bei manchen Stämmen Stickstoffoxide oder Metalle verwendet, um das Wachstum basierend auf anaerober Atmung zu gewährleisten (Cava *et al.*, 2008 a; b). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Zellmorphologie zeigen eine vierschichtige Zellhülle mit einer cytoplasmatischen Membran, einer dünnen Hülle aus Peptidoglykanen, einem intermediären amorphen Bereich mit Sekundärzellwandpolymeren, sowie einem S-layer (Caston *et al.*, 1993). Die Mureinbestandteile sowie die Peptidquervernetzungen in *Thermus* sind ein Charakteristikum grampositiver Bakterien. Jedoch sind der Mureingehalt, der Grad der Peptidquervernetzung und die Länge der Glykanketten eher typisch für gramnegative Bakterien.

In den letzten Jahren wurde das Erbmaterial der *T. thermophilus* Stämme HB8 (Masui *et al.*, 2005) und HB27 (Henne *et al.*, 2004) vollständig sequenziert. In beiden Fällen besteht das Genom aus einem Chromosom mit 1,9 Mbp und einem Megaplasmid mit 0,23 Mbp, wobei sowohl der GC-Gehalt (69 %) als auch die Dichte

kodierender Bereiche (95 %) hoch sind. Darauf aufbauend wurde in Japan das Struktur-Genom-Projekt „Structural and Functional Whole-Cell Project for *T. thermophilus* HB8“ (<http://www.thermus.org>) zur Aufklärung von Proteinstrukturen und zur Entwicklung genetischer Werkzeuge initiiert (Yokoyama *et al.*, 2000). Bisher wurden 1450 der geschätzten 2238 offenen Leserahmen von *T. thermophilus* HB8 in *E. coli* heterolog exprimiert, 944 rekombinante Proteine wurden gereinigt, 682 kristallisiert und die Strukturen von 360 Proteinen konnten gelöst werden. Zusammen mit weiteren bereits bekannten 106 Proteinstrukturen stellt somit *T. thermophilus* aus strukturbioologischer Sicht einen der am besten charakterisierten Organismen dar.

Effektiver Gentransfer ist eine grundlegende Eigenschaft, welche in verschiedenen *Thermus* Stämmen durch das Vorhandensein eines natürlichen Kompetenzsystems gewährleistet wird, wobei es Unterschiede in der Effizienz der Kompetenz- und Restriktionssysteme bei der DNA-Aufnahme gibt (de Grado *et al.*, 1999). Die Analyse der natürlichen Kompetenz in sechs verschiedenen Stämmen hat ergeben, dass der natürliche Transformationsprozess von zweiwertigen Kationen und dem pH-Wert abhängig ist (Koyama *et al.*, 1986; Hidaka *et al.*, 1994). Weitere Untersuchungen identifizierten dafür mindestens 16 verantwortliche Gene in *T. thermophilus* HB27, wobei für vier Genprodukte keine Homologen in anderen Organismen gefunden wurden (Friedrich *et al.*, 2001; Friedrich *et al.*, 2002). Mithilfe von Immunolokalisationsexperimenten konnte für den natürlichen Transformationsprozess ein plausibles Modell erstellt werden (Averhoff, 2004). Für effektive Transformationen wurden *E. coli* - *T. thermophilus* Shuttle-Vektoren entwickelt, wobei das Plasmid pMK18 (de Grado *et al.*, 1999) die breiteste Anwendung fand.

Neben der Transformierbarkeit mit genetisch stabilen Shuttle-Vektoren benötigt man auch Selektionsmarker. Bei der Transformation der Zellen mit Vektoren wurden zunächst Gene für die Komplementation von Defizienzen in der Biosynthese von Leucin oder Tryptophan als Marker verwendet (Koyama *et al.*, 1990 a, b). Aufgrund von hohen Sequenzidentitäten kam es jedoch häufig zu homologen Rekombinationen der Vektor-DNA mit der chromosomalen DNA der transformierten Zelle. Der entscheidende Durchbruch war die Entwicklung thermostabiler Antibiotikaresistenzmarker und die Verwendung thermostabiler Antibiotika. Zwei Gruppen gelang es nahezu zeitgleich und unabhängig voneinander, thermostabile Mutanten der Kanamycin-Nukleotidyltransferase aus *S. aureus* durch Selektion in



thermophilen Wirtsorganismen zu isolieren (Matsumura und Aiba, 1985; Liao *et al.*, 1986). In beiden Fällen konnten die Autoren zwei Mutationen (Asp80Tyr und Thr130Lys) identifizieren, die ausreichende Thermostabilität vermitteln, damit *B. stearothermophilus* bei 61 bzw. 63 °C auf Kanamycin-haltigem Medium wachsen konnte. Die Kombination beider Mutationen führte zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Kanamycin bis 70 °C (Liao *et al.*, 1986). Die Doppelmutante wurde in der Folge als Selektionsmarker für die Plasmidaufnahme (Lasa *et al.*, 1992 a; Mather und Fee, 1992; de Grado *et al.*, 1998; pMK18, de Grado *et al.*, 1999) und für die Herstellung von Deletionsstämmen in *T. thermophilus* (Lasa *et al.*, 1992 b) verwendet. In der jüngeren Vergangenheit konnten weitere Antibiotikaresistenzmarker entwickelt werden, wobei die Thermoadaptation mesophiler Resistenzproteine gegen Bleomycin (Brouns *et al.*, 2005) und Hygromycin (Nakamura *et al.*, 2005) durch Selektion in *T. thermophilus* HB27 gelang. Bei der Herstellung von Deletionsstämmen kann die Integration von Selektionsmarkern ins Genom jedoch zu polaren Effekten bei den stromabwärts gelegenen Genen in einem Operon führen. Daher wurden in *T. thermophilus* Systeme zur Herstellung markerfreier Deletionstämmen entwickelt, bei denen entweder *pyrE* (Tamakoshi *et al.*, 1997; Tamakoshi *et al.*, 1999) oder ein dominantes *rpsL* Allel (Blas-Galindo *et al.*, 2007) als intermediäre Selektionsmarker dienen, die im abschließenden Schritt wieder entfernt werden können.

Die bisherigen Ergebnisse von Struktur-Genom Projekten thermophiler Bakterien und Archaeen haben gezeigt, dass ein großer Teil ihrer Proteine (> 40 %) in *E. coli* nicht oder nur in einer inaktiven Form heterolog exprimiert werden kann (Jenney und Adams, 2008). Eine Lösung dieses Problems könnte die Nutzung thermophiler Organismen wie *T. thermophilus* als Wirtsorganismus sein. Es gibt bereits einige Beispiele konstitutiver und induzierbarer Überexpression bei der Gattung *Thermus* (Koyama *et al.*, 1990 b; Lasa *et al.*, 1992 a; Park *et al.*, 2004; Hidalgo *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2005). Um *T. thermophilus* HB27 als Klonierungs- und Expressionswirt für große DNA-Fragmente sowie als Wirtsorganismus für funktionelles *Screening* von Metagenom-Genbanken zu etablieren, wurde ein *E. coli* - *T. thermophilus* Fosmidvektor-System entwickelt, mit dem Fosmidgenbanken in *E. coli* hergestellt und anschließend in *T. thermophilus* einem *Screening* unterzogen werden können (Angelov *et al.*, 2009).

Die erfolgreichen Versuche zur Selektion von stabilisierten Proteinmutanten aus plasmidkodierten Genbanken in *T. thermophilus* HB27 beschränkten sich bisher auf Antibiotikaresistenzproteine, wobei die Thermostabilitäten der Kanamycin-Nukleotidyltransferase aus *S. aureus* (Hoseki *et al.*, 1999) sowie des Bleomycin-Bindeproteins Ble aus *Streptoalloteichus hindustanus* (Brouns *et al.*, 2005) gelangen. Weiterführend wurde mit einer hitzestabilen Kanamycin-Nukleotidyltransferase (Matsumura und Aiba, 1985) ein Reportersystem zur Selektion von stabilisierten Mutanten in *T. thermophilus* entwickelt (Chautard *et al.*, 2007). Diese Technik basiert auf dem Prinzip des Faltungsreporters (Maxwell *et al.*, 1999; Sieber *et al.*, 2001; Wigley *et al.*, 2001; Sieber, 2003), wobei in diesem Fall die Stabilität des N-terminalen Zielproteins die Faltung der C-terminal fusionierten Kanamycin-Nukleotidyltransferase reguliert. Dabei konnten durch Randomisierung des Zielgens mittels *massive mutagenesis* (Saboulard *et al.*, 2005) und anschließender Selektion der mit dem Reporter gen fusionierten plasmidkodierten Genbank in *T. thermophilus* in Gegenwart von Kanamycin stabilisierte Mutanten von drei humanen Interferonen, einer Lipase aus *Bacillus subtilis* sowie einer Formate-Dehydrogenase aus *Pseudomonas sp. 101* isoliert werden (Chautard *et al.*, 2007).

Die Stabilisierung von metabolischen Enzymen durch Selektion in *T. thermophilus* HB27 ist hingegen eine anspruchsvollere Aufgabe, da dafür der Organismus zunächst genetisch manipuliert werden und anschließend das Wachstum während der Selektion von der Aktivität und damit indirekt auch von der Stabilität des Zielproteins abhängig gemacht werden muß. Das erste publizierte Beispiel dafür war die Thermoadaptation der 3-Isopropylmalat-Dehydrogenase (LeuB) aus *E. coli*. Dabei wurde das *leuB* Gen aus *E. coli* in das Genom eines *T. thermophilus* Stammes anstelle des wirtstypischen *leuB* Gens integriert und bei 79 °C stabilisierende Spontanmutanten isoliert (Tamakoshi *et al.*, 1995). In einem nächsten Schritt wurden stabilisierte Spontanmutanten der plasmidkodierten 3-Isopropylmalat-Dehydrogenase aus *S. cerevisiae* über ihre Fähigkeit zur Komplementation eines auxotrophen *T. thermophilus* Stammes bei schrittweiser Erhöhung der Wachstumstemperatur von 50 °C auf 70 °C isoliert (Tamakoshi *et al.*, 2001). Ein weiteres Beispiel ist die Thermoadaptation, einer plasmidkodierten  $\alpha$ -Galaktosidase aus *B. stearothermophilus* in einem *T. thermophilus*  $\Delta$ *agaT* Stamm, ebenfalls durch Spontanmutationen (Fridjonsson *et al.*, 2002). Bisher gelang es jedoch in keinem

Fall, eine plasmidkodierte Genbank eines metabolischen Enzyms zu erzeugen und diese in *T. thermophilus* zur Selektion thermostabilisierter Mutanten einzusetzen.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte am Beispiel der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase der Zusammenhang zwischen Quartärstruktur, Stabilität und enzymatischer Aktivität getestet werden.

In diesem Zusammenhang sollten zunächst mithilfe bioinformatischer Methoden potentielle nativ monomere AnPRTs identifiziert, gereinigt und bezüglich Assoziationszustand, Stabilität und katalytischer Aktivität charakterisiert werden (Kapitel 4.1).

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Stabilisierung einer monomeren ssAnPRT-Mutante durch Bibliothekenselektion in *T. thermophilus* HB27. Das Experiment sollte zeigen inwieweit sich *T. thermophilus* HB27 als Wirt für metabolische Selektion von in *E. coli* hergestellten großen plasmidkodierten Genbanken eignet (Kapitel 4.2).

Im Anschluss daran sollten der stabilisierende Effekt der eingeführten Mutationen auf struktureller Basis erklärt und die Konsequenzen für die Aktivität untersucht werden (Kapitel 4.3).

Die von mir durchgeführten Experimente und Ergebnisse zur Monomerisierung und zur Aktivierung von ssAnPRT sind in zwei Publikationen dokumentiert (Schwab *et al.*, 2008; Schlee *et al.*, 2009), welche im Anhang angefügt (7.8) sind.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Abbé Refraktometer	Carl Zeiss, Jena
Autoklaven	
München 25	MMM, München
VE-40	SYSTEC GmbH, Wettenberg
Brutschränke	BINDER GmbH, Tuttlingen
Chromatographieanlagen:	
ÄKTA™ basic better	GE HEALTHCARE, München
ÄKTA™ purifier 10	GE HEALTHCARE, München
FPLC LCC-501 plus	GE HEALTHCARE, München
HPLC Agilent 1200	Agilent Technologies, Böblingen
verwendete Säulen:	
HisTrap FF 5 ml	GE HEALTHCARE, München
HisTrap FF Crude 1 ml	GE HEALTHCARE, München
HiTrap Q 1 ml	GE HEALTHCARE, München
Superdex 75 HR 10/30	GE HEALTHCARE, München
Superdex 75 pg HiLoad 26/60	GE HEALTHCARE, München
Jupiter 5 µm C5 300A 250x2 mm	PHENOMENEX, Aschaffenburg
Cell Densitiy Meter Ultrospec 10	GE HEALTHCARE, München
Circular Dichroismus Spektropolarimeter J-815	JASCO GmbH, Groß-Umstadt
Computer	Dell Optiplex Systems
Elektroporator 2510	EPPENDORF, HAMBURG
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
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, Banskuduz, Schweiz
Heizblock-Thermostat HBT-2 131	HLC, Bovenden
Inkubationsschüttler:	
GFL 3033	GFL, Burgwedel
Certomat H	BRAUN Biotech, Melsungen
Certomat BS-1	BRAUN Biotech, Melsungen
Wärmeschrank für Plattformschüttler	MYTRON, Heilbad Heiligenstadt
Kühlschrank Privileg de luxe (8 °C)	PRIVILEG, Fürth
Magnetrührer:	
MR0, MR2000	HEIDOLPH, Kehlheim
MR1, MR3001 (beheizbar)	HEIDOLPH, Kehlheim
Microliterpipetten: Research 2, 10, 100, 1000	EPPENDORF, Hamburg
Mikrowelle HMT 842C	BOSCH, Nürnberg
Multi-Doc-It Digital Imaging System	UVP Inc., USA
Nano Differential Scanning Calorimetrie	
CSC 5100	CALORIMETRY Sciences Corporation, 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, Laborgeräte, Eberstadt
Quarzküvetten:	
21/Q/1/CD (Schichtdicke 1 mm)	STARNA GmbH, Pfungstadt
31/Q/B/CD (Schichtdicke 0,2 mm)	STARNA GmbH, Pfungstadt
QS 165 (Schichtdicke 50 mm)	HELLMA GmbH & Co. KG, Müllheim

Schütteltisch Rocking Platform	BIOMETRA, Göttingen
Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage	MILLIPORE, Eschborn
Ultraschallgerät Branson Sonifier 250D	HEINEMANN, Schwäbisch Gmünd
UV-Leuchttisch Reprostar	CAMAG Chemie Erzeugnisse, Berlin
UV-Vis Spektralphotometer Cary 100 Bio	VARIAN, Darmstadt
UV-Vis Spektralphotometer V650	JASCO GmbH, Groß-Umstadt
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
Zentrifugen:	
Centrifuge 5810R	EPPENDORF, Hamburg
Centrifuge 5415D	EPPENDORF, Hamburg
Centrifuge 5415R	EPPENDORF, Hamburg
Sorvall RC 2B, 5C plus	DU PONT Instruments, Bad Homburg
mit SS34- bzw. GS3-Rotoren	

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschlauch: Visking, Typ 27/32, 14 kDa	ROTH GmbH +Co, Karlsruhe
Einwegspritzen Omnifix® 2 ml, 5 ml und 60 ml	BRAUN Biotech, Melsungen
Elektroporationsküvetten 2 mm	PEQLAB, Erlangen
Faltenfilter	MACHEREY-NAGEL, Düren
Filterpapier	WHATMAN, Maidstone, England
Konzentratoren:	
Amicon Ultra 4 bzw. 15 (mwco: 10 kDa)	MILLIPORE, Bedford, USA
Kunststoffküvetten: ½ Mikroküvetten	SARSTEDT, Nümbrecht
Kunststoffröhrchen:	
15 ml, 50 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Latex-Handschuhe Sempermed	SEMPERIT Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich
Membranfilter ME24 Ø47 mm; 0,2 µm	SCHLEICHER&SCHUELL, Dassel

Mineralwasser: Aqua Purania	TSI Gmbh, Zeven
Nitrocellulosefilter	MILLIPORE, Eschborn
NAP5, NAP10 und NAP25 Säulen	GE HEALTHCARE, München
Nickel-Sepharose	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
Petrischalen 150/25, 94/16 und 60/15	GREINER bio-one, Nürtingen
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 0,22 µm, 0,45 µm	RENNER GmbH, Daunstadt

## 2.3 Chemikalien

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

AMERSHAM PHARMACIA Biotech	(Freiburg)
BECTON DICKINSON (BD)	(Heidelberg)
BIO101 Inc.	(Carlsbad, USA)
BIORAD LABORATORIES	(München)
BIOZYM	(Hess. Oldendorf)
BOEHRINGER MANNHEIM	(Mannheim)
DIFCO	(Dreieich)
FLUKA	(Neu-Ulm)
GERBU Biotechnik GmbH	(Gailberg)
GIBCO/BRL	(Eggstein)
INVITROGEN	(Darmstadt)
MERCK	(Darmstadt)
LUCERNA-CHEM AG	(Luzern, Schweiz)
NATIONAL DIAGNOSTICS	(Simerville, NJ, USA)
OXOID	(Wesel)
QIAGEN	(Hilden)

RIEDEL-DE HAEN	(Seelze)
ROCHE DIAGNOSTICS	(Mannheim)
ROTH	(Karlsruhe)
SERVA	(Heidelberg)
SIGMA-ALDRICH	(Deisenhofen)

## 2.4 Kits

Gel Filtration <i>Calibration</i> Kit	GE Healthcare, München
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
<i>Genomic</i> DNA <i>Purification</i> Kit	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
NeXtal DWBlock <i>Classics II Suite</i>	QIAGEN, Hilden
NucleoBond®PC100/500 DNA- <i>Extraction</i> Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
NucleoSpin® <i>Extract</i> II	MACHEREY-NAGEL, Düren
Instant Blue SDS-Gel Färbelösung	EXPEDEON, Lucerna-Chem AG

## 2.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	NEW ENGLAND BIOLABS, Bad Schwalbach
T4-DNA-Ligase	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
	MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot
DNA-Polymerasen:	
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
GoTaq® DNA-Polymerase	PROMEGA, Mannheim
Phusion HF Polymerase	NEW ENGLAND BIOLABS, Bad Schwalbach
Trypsin (aus Rinderpankreas)	MERCK, Darmstadt

## 2.6 Bakterienstämme

Es wurde sowohl mit *E. coli*, als auch mit *T. thermophilus* Stämmen gearbeitet.

### 2.6.1 *E. coli* Stämme

***E. coli* DH5α** (Hanahan, 1983)

F<sup>-</sup>, *endA1*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>-</sup>*), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA* (NaI<sup>r</sup>), *relA1*,  $\Delta(lacZYA-argF)$   
U169,  $\phi 80$ , *lacZ*ΔM15



***E. coli* 5α** (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt am Main)

*fhuA2*,  $\Delta(\text{argF-lacZ})\text{U169}$ , *phoA*, *glnV44*,  $\Phi 80$ ,  $\Delta(\text{lacZ})\text{M15}$ , *gyrA96*, *recA1*, *relA1*, *endA1*, *thi-1*, *hsdR17*

Bei diesen Zellen handelt es sich um ein *E. coli* DH5α Derivat. Durch die Deletion des Gens *fhuA2* fehlt der Eisen-Hydroxamat-Aufnahme-Rezeptor auf der Zelloberfläche, was verhindert, dass der Bacteriophage T1, der an diesen Rezeptor bindet, die Zellen befällt. Somit sind diese Zellen resistent gegen T1-Phagen.

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

F', *proA*<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, *lacI*<sup>q</sup>,  $\Delta(\text{lacZ})\text{M15}/\text{fhuA2}$ ,  $\Delta(\text{lac-proAB})$ , *glnV*, *gal* R(*zgb-210::Tn10*), Tet<sup>s</sup>, *endA1*, *thi-1*,  $\Delta(\text{hsdS-mcrB})5$

*E. coli* Turbo Zellen sind wie *E. coli* 5α-Zellen T1-phagenresistent. Diese Resistenz ist mit einem langsameren Zellwachstum verbunden. Dieser Nachteil wird bei *E. coli* Turbo Zellen kompensiert, wodurch sie innerhalb von 8 h bei Inkubation bei 37 °C sichtbare Kolonien bilden können.

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

*trpR*, *tna2*,  $\Delta\text{trpEA2}$

Expressionsstamm mit deletiertem Trp-Operon, der zur Expression von Konstrukten mit T5-Promotor (pQE40, siehe 2.8.1) verwendet wird.

**2.6.2 *T. thermophilus* Stämme**

***T. thermophilus* HB27** (Oshima und Imahori, 1974, freundliche Gabe von Dr. Angel Angelov, TU Freising-Weihenstephan)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Tryptophan-auxotrophe  $\Delta\text{trpD}$ -Deletionsstämme hergestellt:

***T. thermophilus* HB27  $\Delta\text{trpD\_kat}^*$** 

*trpD::kat\** (*trpD*, wurde durch eine thermostabilisierte Kanamycin-Resistenz-Kassette *kat\** ersetzt: Kanamycin-Nukleotidyltransferase saKNTase\_D80Y+T130K, Liao *et al.*, 1986; 4.2.1)

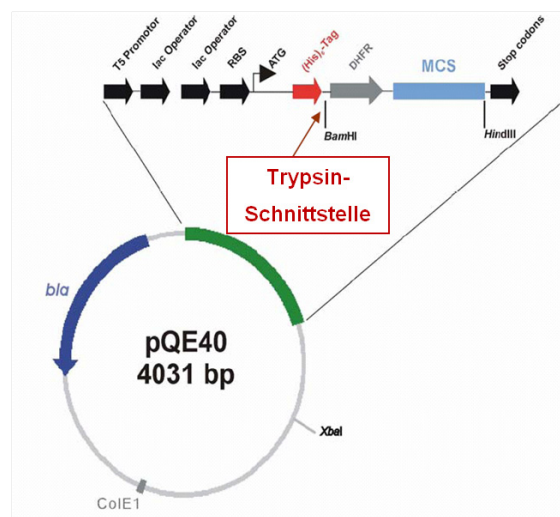
### ***T. thermophilus* HB27 $\Delta trpD\_shble\_77-3$**

*trpD::shble\_77-3* (*trpD*, wurde durch das kodierende Gen für das thermostabilisierte Bleomycinbindeprotein ersetzt: shBle\_D32V+L63Q, Brouns *et al.*, 2005; 4.2.1)

## **2.8 Vektoren**

### **2.8.1 pQE40**

Bei dem pQE40 Vektor handelt es sich um einen zur Familie der pDS-Vektoren gehörigen Expressionsvektor (Bujard *et al.*, 1987; Stüber *et al.*, 1990), der kommerziell von der Firma QIAGEN erhältlich ist. Er besitzt einen Col E1 Replikationsursprung (*ori*), einen T5-Promotor, der durch zwei *lac*-Operatorsequenzen reguliert wird, und eine synthetische Ribosomenbindestelle (RBS), die eine effiziente Translation ermöglicht. Die Selektion erfolgt über eine Ampicillin-Resistenz, die durch Expression des  $\beta$ -Lactamase-Gens (*bla*) ausgeprägt wird. Ein vektorkodierter (His)<sub>6</sub>-tag wird N-terminal an das rekombinante Protein angefügt, um eine Reinigung mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie zu ermöglichen. Er kann durch Verdau mit Trypsin abgespalten werden (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pQE40.**

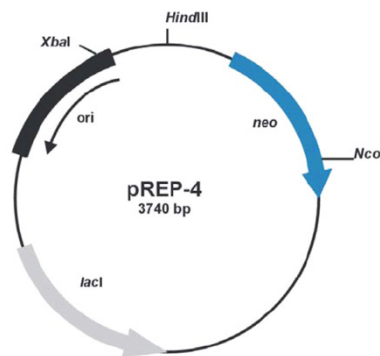
*bla*:  $\beta$ -Lactamase-Gen, DHFR: Dihydrofolatreduktase-Gen, MCS: multiple cloning site

Es wurde berichtet, dass bei pDS-Vektoren Teile der Promotorsequenz durch homologe Rekombination mit benachbarten Abschnitten des Vektors deletiert werden (Kawe *et al.*, 2009; Burghardt, 2010). Dies kann durch Bindung des Repressors an den *lac*-Operator verhindert werden. Daher empfiehlt es sich bereits die Plasmidvermehrung in *lacI*<sup>q+</sup> Stämmen (*E. coli* Turbo, 2.6.1) durchzuführen und so

sicherzustellen, dass der Repressor bis zur Induktion mit IPTG in genügender Menge vorliegt (2.8.2).

### 2.8.2 pREP4 (pDMI,1)

Das Plasmid pDMI,1 (Certa *et al.*, 1986) ist ebenfalls kommerziell von der Firma QIAGEN als pREP-4 erhältlich. Es kodiert für den lac-Repressor, dessen konstitutive Synthese die Expression eines in den Vektor pQE40 klonierten Gens durch Bindung an den lac-Operator unterdrückt. Durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 1 mM kann die Expression gezielt induziert werden. Das Plasmid besitzt einen p15A-Replikationsursprung (ori) und das Kanamycin-Resistenzgen (*neo*) als Selektionsmarker (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Repressorplasmids pREP-4 (pDMI,1).**

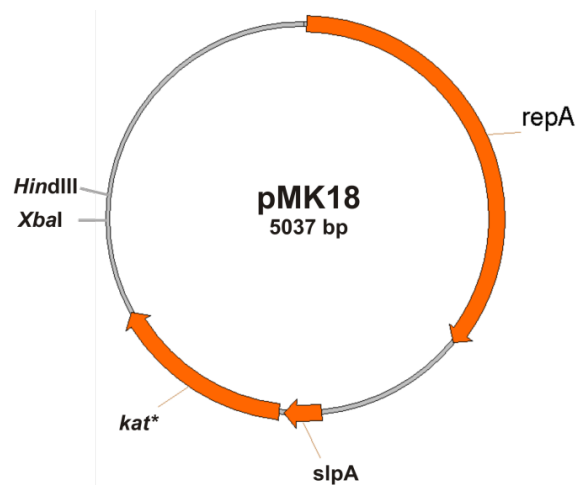
Neo: Gen für Kanamycin-Nukleotidyltransferase, *lacI*: lac-Repressorgen, ori: p15A-Replikationsursprung.

### 2.8.3 pJET 1.2

Der Vektor pJET1.2 ist Bestandteil des CloneJET PCR Cloning Kit der Firma MBI FERMENTAS (St. Leon-Rot) und fand bei der Herstellung der Deletionsstämme in *T. thermophilus* Verwendung. An der Insertionsstelle innerhalb des *eco47IR* Gens liegt ein *blunt end* Schnitt vor, in den beliebige PCR-Produkte kloniert werden können, ohne dass ein Verdau über Restriktionsenzyme nötig ist. Religation von Vektoren ohne Insert wird zuverlässig dadurch verhindert, dass das Genprodukt von *eco47IR* letal für die Zellen ist. Daneben enthält der Vektor eine Ampicillin-Resistenz-Kassette und einen T7 Promoter für *in vitro* Transkriptionsexperimente. In der vorliegenden Arbeit wurde der Vektor für die Erstellung von Konstrukten für die homologe Rekombination in *T. thermophilus* verwendet.

### 2.8.4 pMK18

Das Plasmid pMK18 (de Grado *et al.*, 1999) ist ein kleiner *Shuttle*-Vektor, der sowohl in *E. coli*, als auch in *T. thermophilus* repliziert werden kann. In dem Abschnitt *repA* befindet sich ein pUC18 Anteil mit einem voll funktionsfähigen *lacZ*-Gen, der Replikationsursprung von pBM1 für die Replikation in *E. coli* und der minimale Replikationsursprung eines kryptischen *Thermus* Plasmids (de Grado *et al.*, 1998) für die Replikation in *T. thermophilus*. Die Selektion auf Plasmidaufnahme erfolgt in beiden Organismen durch Expression einer bis 70 °C stabilisierten Kanamycin-Nukleotidyltransferase (*kat\**; Liao *et al.*, 1986), die eine Resistenz gegenüber Kanamycin in einer Konzentration von 30 µg/ml ermöglicht. Der starke Promoter *slpA* stellt die Expression der Resistenz-Kassette sowie der wiederum mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Hind*III einklonierten *trpD*-Mutanten sicher (Abbildung 6). Damit die Translation der *trpD*-Mutanten mit hoher Effizienz stattfindet, wurde im Rahmen dieser Arbeit die von *T. thermophilus* favorisierte Ribosomenbindestelle (RBS-Sequenz: -10bp: GGAGG, Castan *et al.*, 2001) bei der Einklonierung mithilfe der 5'*trpD Hind*III pMK-Primer (2.9) 10 Basenpaare vor dem *trpD*-Startcodon eingeführt.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Shuttle-Vektors pMK18.**

*Kat\**: Gen einer bis 70 °C stabilisierten Kanamycin-Nukleotidyltransferase; *repA*: Replikationsursprung für *E. coli* und *T. thermophilus*; *slpA*: Promoter.

## 2.9 Oligodesoxyribonukleotide

Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen sind unterstrichen. Bei Mutationsprimern sind diejenigen Basen, die von der Originalsequenz abweichen, blau markiert.

### 2.9.1 Vektorspezifische Amplifikations- und Sequenzierungsprimer

T7 Promotor	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
T7 Terminator	5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3'
CyRI	5'- TCA CGA GGC CCT TTC GTC TT -3'
CyPstI	5'- TCG CCA AGC TAG CTT GGA TTC T -3'
M13 <i>forward</i>	5'- GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TA -3'
<i>reverse</i> M13	5'- TTG TGA GCG GAT AAC AA -3'

### 2.9.2 Primer zur Amplifikation und Mutagenese von *cltrpD*

5' <i>Bam</i> HI- <i>cltrpD</i>	5'- CAC CAT CAT CAC <u>GGA TCC</u> CTG GTT CCG CGT GGC AGC ATG CCG CAT AAG GAA TTA CTT GAA AAA CTG CAA -3'
3' <i>Hind</i> III- <i>cltrpD</i>	5'- T ATT <u>AAG CTT</u> TCA GTC GCT CTC CCT GCG GTA TCT -3'
5' <i>cltrpD</i> E36I	5'- CTG TTT TCC GAA <b>ATT</b> GCC ATC ATC GCC -3'
3' <i>cltrpD</i> E36I	5'- GGC GAT GAT GGC <b>AAT</b> TTC GGA AAA CAG -3'
5' <i>cltrpD</i> D47M	5'- ACC CTC ATG CAG <b>ATG</b> AAC GGC ATT ACC -3'
3' <i>cltrpD</i> D47M	5'- GGT AAT GCC GTT <b>CAT</b> CTG CAT GAG GGT -3'
5' <i>cltrpD</i> E35P/E36I	5'- CTG TTT TCC <b>CCG ATT</b> GCC ATC ATC GCC -3'
3' <i>cltrpD</i> E35P/E36I	5'- GGC GAT GAT GGC <b>AAT CGG</b> GGA AAA CAG -3'
5' <i>cltrpD</i> E35Q/E36I	5'- CTG TTT TCC <b>CAG ATT</b> GCC ATC ATC GCC -3'
3' <i>cltrpD</i> E35Q/E36I	5'- GGC GAT GAT GGC <b>AAT CTG</b> GGA AAA CAG -3'
5' <i>cltrpD</i> T78I	5'- CGC GCA GTA GAC <b>ATC</b> TGC GGC ACC GGC -3'
3' <i>cltrpD</i> T78I	5'- GCC GGT GCC GCA <b>GAT</b> GTC TAC TGC GCG -3'

### 2.9.3 Primer zur Amplifikation und Mutagenese von *rbtrpD*

5' <i>Bam</i> HI- <i>rbtrpD</i>	5'- CAC CAT CAT CAC <u>GGA TCC</u> CTG GTT CCG CGT GGC AGC ATG ACT GAT TCT TCG ACT GAC CCT -3'
3' <i>Hind</i> III- <i>rbtrpD</i>	5'- T ATT <u>AAG CTT</u> CTA CTC AGC GAG CTG TTT CAG TTT -3'

### 2.9.4 Primer zur Amplifikation und Mutagenese von *satrpD*

5' <i>Bam</i> HI- <i>satrpD</i>	5'- CAC CAT CAT CAC <u>GGA TCC</u> CTG GTT CCG CGT GGC AGC ATG ACA TTA CTA ACA AGA -3'
3' <i>Hind</i> III- <i>satrpD</i>	5'- T ATT <u>AAG CTT</u> TTA TTC ACC TCT CAT TTG A -3'
5' <i>satrpD Hind</i> III pMK	5'- ATA <u>AAG CTT</u> GGA GGA AGC ATG ACA TTA CTA ACA -3'
3' <i>satrpD Xba</i> I	5'- A <u>TCT AGA</u> TTA TTC ACC TCT CAT TTG -3'
5' <i>satrpD D33</i> I	5'- CCT AGT ATT GGA ACT <b>ATC</b> ATT AAA TAT GAA -3'
3' <i>satrpD D33</i> I	5'- TTC ATA TTT AAT <b>GAT</b> AGT TCC AAT ACT AGG -3'
5' <i>satrpD E44</i> M	5'- AGT TAT TCG <b>ATG</b> CGA GAA ATC CAA CAA C -3'
3' <i>satrpD E44</i> M	5'- G TTG TTG GAT TTC TCG <b>CAT</b> CGA ATA GGA ACT -3'
5' <i>satrpD D33</i> I/E37A	5'- ACT <b>ATC</b> ATT AAA TAT <b>GCG</b> TTA CTT AGT TCC -3'
3' <i>satrpD D33</i> I/E37A	5'- ACT AAG TAA <b>CGC</b> ATA TTT AAT <b>GAT</b> AGT -3'
5' <i>satrpD D33</i> I/Y36S/E37A	5'- ACT <b>ATC</b> ATT AAA TAT <b>GCG</b> TTA CTT AGT TCC -3'
3' <i>satrpD D33</i> I/Y36S/E37A	5'- GGA ACT AAG TAA <b>CGC GCT</b> TTT AAT <b>GAT</b> AGT -3'
5' <i>satrpD V76</i> I	5'- GGG GCT ATG TGT <b>ATT</b> TGC GGC ACA GGT -3'
3' <i>satrpD V76</i> I	5'- ACC TGT GCC GCA <b>AAT</b> ACA CAT AGC CCC -3'

### 2.9.5 Primer zur Amplifikation und Mutagenese von *shtrpD*

5' <i>Bam</i> HI- <i>shtrpD</i>	5'- CAC CAT CAT CAC <u>GGA TCC</u> CTG GTT CCG CGT GGC AGC ATG AGA TTA TTA AAA CAA TTG GAT -3'
3' <i>Hind</i> III- <i>shtrpD</i>	5'- T ATT <u>AAG CTT</u> TCA CTT AAT ATC GTC ACA GAT -3'
5' <i>shtrpD Hind</i> III pMK	5'- ATA <u>AAG CTT</u> GGA GGA AGC ATG AGA TTA TTA AAA -3'
3' <i>shtrpD Xba</i> I	5'- A <u>TCT AGA</u> TCA CTT AAT ATC GTC ACA -3'
5' <i>shtrpD E33</i> I	5'- GAA ATT AAT GTG <b>ATT</b> GAC AAA GTC GAC -3'
3' <i>shtrpD E33</i> I	5'- GTC GAC TTT GTC <b>AAT</b> CAC ATT AAT TTC -3'

5'shtrpD K44M	5'- ACG CAA TTT ACG <b>ATG</b> AAG GAA ATT AAA -3'
3'shtrpD K44M	5'- TTT AAT TTC CTT <b>CAT</b> CGT AAA TTG CGT -3'
5'shtrpD E33I/D37F	5'- G <b>ATT</b> GAC AAA GTC <b>TTT</b> TTA TTA ACG CAA -3'
3'shtrpD E33I/D37F	5'- TTG CGT TAA TAA <b>AAA</b> GAC TTT GTC <b>AAT</b> C -3'
5'shtrpD E33I/D34L	5'- GAA ATT AAT GTG <b>ATT CTG</b> AAA GTC GAC -3'
3'shtrpD E33I/D34L	5'- GTC GAC TTT <b>CAG AAT</b> CAC ATT AAT TTC -3'
5'shtrpD E33I/D34L/D37A	5'- <b>ATT CTG</b> AAA GTC <b>GCG</b> TTA TTA ACG CAA -3'
3'shtrpD E33I/D34L/D37A	5'- TTG CGT TAA TAA <b>CGC</b> GAC TTT <b>CAG AAT</b> -3'
5'shtrpD E33I/D34L/D37S	5'- <b>ATT CTG</b> AAA GTC <b>AGC</b> TTA TTA ACG CAA -3'
3'shtrpD E33I/D34L/D37S	5'- TTG CGT TAA TAA <b>GCT</b> GAC TTT <b>CAG AAT</b> -3'
5'shtrpD V76I	5'- GGA AGT ATA TGT <b>ATT</b> TGC GGT ACA GGA -3'
3'shtrpD V76I	5'- TCC TGT ACC GCA <b>AAT</b> ACA TAT ACT TCC -3'

### 2.9.6 Primer zur Amplifikation und Mutagenese von *sstrpD*

5' <i>Bam</i> HI- <i>sstrpD</i>	5'- TT <u>GGA TCC</u> CTG GTT CCG CGT GGC AGC ATG AAC ATT AAC GAA ATT CTG -3'
3' <i>Hind</i> III- <i>sstrpD</i>	5'- ATT <u>AAG CTT</u> TTA ACC ACT ACT TTT -3'
5' <i>sstrpD Hind</i> III pMK	5'- ATA <u>AAG CTT</u> GGA GGA AGC ATG AAC ATT AAC GAA -3'
3'shtrpD <i>Xba</i> I	5'- A <u>TCT AGA</u> TTA ACC ACT ACT TTT CAC -3'
5' <i>sstrpD</i> T77I	5'- AAC GCA ATA GAC <b>ATC</b> GCT GGT ACG GGT -3'
3' <i>sstrpD</i> T77I	5'- ACC CGT ACC AGC <b>GAT</b> GTC TAT TGC GTT -3'
5' <i>sstrpD</i> D83G	5'- ACA GGT GGC <b>GGC</b> GGA TTA GGG -3'
3' <i>sstrpD</i> D83G	5'- CCC TAA TCC <b>GCC</b> GCC ACC TGT -3'
5' <i>sstrpD</i> N109S	5'- GCC AAA CAT GGT <b>AGT</b> AGG GCA GTA AGT -3'
3' <i>sstrpD</i> N109S	5'- ACT TAC TGC CCT <b>ACT</b> ACC ATG TTT GGC -3'
5' <i>sstrpD</i> S109N*	5'- GCA AAA CAT GGT <b>AAT</b> CGT GCA GTT AGC -3'
3' <i>sstrpD</i> S109N*	5'- GCT AAC TGC ACG <b>ATT</b> ACC ATG TTT TGC -3'
5' <i>sstrpD</i> F149S	5'- TTC GTT TTC CTC <b>TCT</b> GCA CAA TAC TAT -3'
3' <i>sstrpD</i> F149S	5'- ATA GTA TTG TGC <b>AGA</b> GAG GAA AAC GAA -3'
5' <i>sstrpD</i> N162C	5'- AAG AAC GTT GCC <b>TGT</b> GTA AGA AAA ACT -3'
3' <i>sstrpD</i> N162C	3'- AGT TTT TCT TAC <b>ACA</b> GGC AAC GTT CTT -3'
5' <i>sstrpD</i> I169T	5'- AAA ACT TTG GGG <b>ACC</b> AGG ACT ATT TTC -3'
3' <i>sstrpD</i> I169T	5'- GAA AAT AGT CCT <b>GGT</b> CCC CAA AGT TTT -3'

5'sstrpD F193S	5'- TTA ATG GGA GTA <b>AGC</b> TCG AAA GAT CAC -3'
3'sstrpD F193S	5'- GTG ATC TTT CGA <b>GCT</b> TAC TCC CAT TAA -3'
5'sstrpD R239G	5'- ATA GTA AGT AAG <b>GGC</b> GGT ATA GAG GAA -3'
3'sstrpD R239G	5'- TTC CTC TAT ACC <b>GCC</b> CTT ACT TAC TAT -3'
5'sstrpD R239H	5'- ATA GTA AGT AAG <b>CAC</b> GGT ATA GAG GAA -3'
3'sstrpD R239H	5'- TTC CTC TAT ACC <b>GTG</b> CTT ACT TAC TAT -3'
5'sstrpD K280C	5'- GCA TTT CTG GGT <b>TGT</b> GAT GAA CAC GTG -3'
3'sstrpD K280C	5'- CAC GTG TTC ATC <b>ACA</b> ACC CAG AAA TGC -3'
5'sstrpD L320M	5'- ATA GAA AAA TCC <b>ATG</b> GAT AAA TTA AAT -3'
3'sstrpD L320M	5'- ATT TAA TTT ATC <b>CAT</b> GGA TTT TTC TAT -3'
5'sstrpD N324I	5'- GAT AAA TTA <b>ATT</b> GAG ATA ATC -3'
3'sstrpD N324I	5'- GAT TAT CTC <b>AAT</b> TAA TTT ATC -3'
5'sstrpD K337E	5'- GTA ACT AAA CTG <b>GAA</b> ACG ATA GTG GTG -3'
3'sstrpD K337E	5'- CAC CAC TAT CGT <b>TTC</b> CAG TTT AGT TAC -3'
3'sstrpD V341E <i>HindIII</i>	5'- ATT <u>AAG CTT</u> TTA ACC ACT ACT TTT <b>CTC</b> CAC TAT CGT -3'

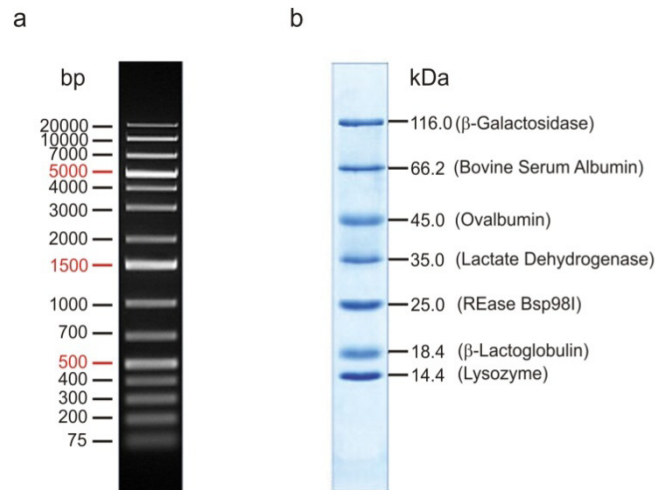
### 2.9.7 Primer zur Herstellung der *T. thermophilus* $\Delta trpD$ -Deletionsstämme

5'EcoRI+Kana <sup>R</sup>	5'- A AAA <u>GAA TTC</u> GGA GTA TAA CAG AAA CCT -3'
3'EcoRI+Kana <sup>R</sup>	5'- A AAA <u>GAA TTC</u> TCA AAA TGG TAT GCG TTT -3'
3'ppd-sufD_thermus	5'- CTC CTC TAC ACG GGG AGG AGG TCT -3'
5'slpshble EcoRI	5'- TAT <u>GAA TTC</u> TTA AGG CCC GAC CGC TTG ACA -3'
3'shble_EcoRI	5'- ATA <u>GAA TTC</u> CGG TCA GTC CTG CTC CTC -3'
3'sufD_SphI	5'-TAA <u>GCA TGC</u> GTA CCT CTC CTT GGA CCT CCC -3'
5'tttrpD HindIII pMK	5'- ATA <u>AAG CTT</u> GGA GGA CCC ATG GAC GCG GTG -3'
3'tttrpD XbaI	5'- A <u>TCT AGA</u> CTA GGC CCT GAG AAA GGC -3'
5'trpG_HindIII	5'- AT <u>AAG CTT</u> CCA CGG TGG AGG GCA TCT TGG CCG -3'
5'ttc1491_EcoRI	5'- CAG TTT <u>GAA TTC</u> ATA CCG CTA GAG GTC CAG GAG GAC GGT GTC CCC -3'
3'trpE_EcoRI	5'- CGG TAT <u>GAA TTC</u> AAA CTG TCA CCG CGT CCA CGG GTC CTC CAG -3'
5'trpE_thermus	5'- TAC TCC CAC GTG ATG CAC CTG GTC -3'



## 2.10 DNA- und Protein-Längenstandards

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurde der *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder* (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot) verwendet (Abbildung 7a), zur Größenbestimmung von Proteinen bei SDS-PA Gelen der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (MBI FERMENTAS) (Abbildung 7b).



**Abbildung 7: DNA- und Protein-Längenstandards.**

a: *GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder* (MBI FERMENTAS) für Agarosegelele.

b: *Unstained Protein Low Molecular Weight-Marker* (MBI FERMENTAS) für SDS-PAGE (12,5 %).

## 2.11 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben wurden die verwendeten Puffer sterilfiltriert und bei Raumtemperatur gelagert. Es wurde MILLIPORE bzw. bidestilliertes Wasser verwendet.

### 2.11.1 Arbeiten mit *E. coli* und *T. thermophilus*

#### Antibiotika

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

Ampicillin (1000 x):	150 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser gelöst und sterilfiltriert.
Bleomycin (1000 x):	10 mg/ml Bleomycin in Wasser gelöst und sterilfiltriert.

Kanamycin (1000 x):	50 mg/ml Kanamycin in Wasser gelöst und sterilfiltriert.
Glucose-Stammlösung:	20 % (w/v) Glucose in Wasser gelöst und sterilfiltriert.
Glycerin (87 %)	
IPTG-Stammlösung	1 M IPTG in Wasser gelöst, sterilfiltriert, bei -20 °C gelagert.
KCl-Stammlösung:	1 M KCl in Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei RT gelagert.
MgCl <sub>2</sub> -Stammlösung:	1 M MgCl <sub>2</sub> in Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei RT gelagert.
MgSO <sub>4</sub> -Stammlösung:	1 M MgSO <sub>4</sub> in Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei RT gelagert.
TFB I-Puffer:	100 mM KCl, 50 mM MnCl <sub>2</sub> , 30 mM KOAc, 10 mM CaCl, 15 % Glycerol; Die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden bei 4 °C gelagert. Der Puffer wurde direkt vor der Verwendung frisch angesetzt.
TFB II-Puffer:	100 mM Tris/HCl, pH 7,0, 10 mM KCl, 75 mM CaCl <sub>2</sub> ; Die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden bei 4 °C gelagert. Der Puffer wurde direkt vor der Verwendung frisch angesetzt.

### 2.11.2 Arbeiten mit DNA

dNTP-Lösung für PCR:	je 2 mM dNTP (N = A, C, G oder T) in Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.
MgCl <sub>2</sub> für <i>ep</i> PCR:	50 mM MgCl <sub>2</sub> Stammlösung von Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (NEW ENGLAND BIOLABS); bei -20 °C gelagert.
MnCl <sub>2</sub> für <i>ep</i> PCR:	1 M MnCl <sub>2</sub> in Wasser gelöst, autoklaviert und bei -20 °C gelagert.

### 2.11.3 Agarosegelelektrophorese

Agarose (1 %):	Eine entsprechende Menge an Agarose in 0,5 x TBE gelöst, aufgeköcht und bei 60 °C aufbewahrt.
Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml)	
TBE (5 x):	445 mM Borsäure, 12,5 mM EDTA, 445 mM Tris (pH-Wert automatisch bei 8,15)

### 2.11.4 Arbeiten mit Proteinen

Ammoniumsulfat-Lösung zur fraktionierten Präzipitation:	3,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; Die exakte Konzentration wurde refraktrometrisch bestimmt (3.5.9).
Aufschlusspuffer bei Protein-Herstellung im analytischen Maßstab:	50 mM KP, pH 7,5
bei präparativer Proteinreinigung:	50 mM KP, pH 7,5
Dialyse- /Lagerungspuffer	10 mM / 50mM / 100mM KP pH 7,5 oder 50 mM Hepes, pH 7,5
EDTA-Stammlösung:	500 mM EDTA unter Zugabe von ca. 20 Plätzchen KOH in 1 l Wasser gelöst und anschließend mit 1 M KOH den pH-Wert auf 7,5 eingestellt.
Hepes-Puffer Stammlösung	1 M Hepes mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert.
Kaliumphosphat-Puffer (KP) Stammlösung	1 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (Base) und 1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Säure), durch Mischen wurde der gewünschte pH-Wert eingestellt (i.d.R. pH 7,5).

## Labelpuffer für Metallchelate-

Affinitätschromatographie: 50 mM EDTA, 1 M NaCl zum Herunterwaschen der alten  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen; 250 mM  $\text{NiCl}_2$  zum Beladen der Säule mit frischen  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen; 500 mM NaCl zum Herunterwaschen unspezifisch gebundener Metallionen.

## Puffer für Ionenaustauschchromatographie:

Laufpuffer: 50 mM KP, pH 7,5 oder 50 mM Tris/HCl, pH 9,0  
Elutionspuffer: 50 mM KP, 1 M KCl, pH 7,5 oder 50 mM Tris/HCl, 3 M KCl, pH 9,0

## Puffer für Markierungsversuche

mit Alexa-Farbstoffen: 50 mM KP, 0,5 mM TCEP, pH 7,0

## Puffer für Metallchelate-Affinitätschromatographie:

Laufpuffer: 50 mM KP, 300 mM KCl, 10 mM Imidazol, pH 7,5  
Elutionspuffer: 50 mM KP, 300 mM KCl, 500 mM Imidazol, pH 7,5

Puffer für Gelfiltration: 50 mM KP, 300 mM KCl, pH 7,5

## Puffer für HPLC

polares Laufmittel:  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 % TFA  
unpolares Laufmittel: Acetonitril, 0,0857 % TFA

Puffer für *steady-state* enzymkinetische Messungen:

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

Tris/HCl-Puffer Stammlösung: 1 M Tris mit HCl auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert.

### 2.11.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (12,5 % SDS-Gele)

Ammoniumperoxodisulfid (APS)-

Stammlösung (25 % und 40 %): 25 % bzw. 40 % (w/v) APS in Wasser  
gelöst, sterilfiltriert, 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.

Protogel™: 30 % (v/v) Acrylamid, 0,8 % (v/v)  
Bisacrylamid, in Wasser gelöst und bei 4 °C  
gelagert.

SDS-PAGE Trenngelpuffer: 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: 0,1 % (w/v) SDS, 0,025 M Tris, 0,2 M Glycin  
(pH-Wert automatisch bei 8,5)

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

SDS-PAGE Probenpuffer (5x): 5 % (w/v) SDS, 25 % (w/v) Glycerin,  
12,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 5 % (w/v)  
SDS, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau, 1,25 M  
Tris/HCl, pH 6,8

### 2.12 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 weitgehendem Abkühlen der Medien, in Form von sterilfiltrierten 1000-fach konzentrierten Stammlösungen zugegeben.

Luria-Bertani-(LB)-Medium: 0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
1 % (w/v) Trypton  
1 % (w/v) NaCl

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

SOB-Medium:	0,5 % Hefeextrakt 2 % (w/v) Trypton 0,05 % NaCl Nach dem Autoklavieren wurden 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 10 mM MgCl <sub>2</sub> und 2,5 mM KCl steril hinzugefügt.
SOC-Medium:	SOB-Medium plus Zugabe von zusätzlich 20 mM Glucose (sterilfiltriert) nach dem Autoklavieren.
SOC-Agar:	SOC-Medium plus 1,5 % (w/v) Bacto-Agar

### 2.13 Nährmedien für *T. thermophilus*

TB-Medium:	0,8 % (w/v) Trypticase Pepton 0,4% (w/v) Bacto Hefeextrakt 0,3 % (w/v) NaCl Aqua Purania Mineralwasser ad 1000 ml, pH mit NaOH auf 7,5 einstellen und autoklavieren.
------------	--

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

Synthetisches SH-Minimalmedium [modifiziert von Hettwer (2001) nach

Orginalvorschrift von Koyama *et al.*, (1986)]:

Saccharose	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,75 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
NaCl	2,0 g
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	2,5 g
Casaminosäuren	5,0 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 996,5 ml, pH mit NaOH auf 7,2 einstellen und autoklavieren.

#### Sterile Zugabe:

Lösung B	1,0 ml
Lösung C	100 µl
100 µg/ml Biotin	1,0 ml
1 mg/ml Thiamin	1,0 ml
Molybdänlösung	100 µl
Vanadiumlösung	100 µl

Manganlösung 100 µl

Kupfer/Zinklösung 100 µl

Lösung B:

MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 12,5 g

CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 2,5 g

ddH<sub>2</sub>O ad 100ml, autoklavieren

Lösung C:

FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 6,0 g

CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 0,8 g

NiCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 20 mg

0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ad 100ml

Molybdänlösung:

1,2 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O in 100 ml H<sub>2</sub>O gelöst.

Vanadiumlösung:

0,1 g VOSO<sub>4</sub> x 3 H<sub>2</sub>O in 100 ml H<sub>2</sub>O gelöst.

Manganlösung:

0,5 g MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O in 100 ml 0,01 N HCl gelöst.

Kupfer / Zinklösung:

60 mg ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O + 15 mg CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O in 100 ml H<sub>2</sub>O gelöst.

SH<sup>Trp</sup>-Minimalmedium: SH-Medium plus 5 µg / ml Tryptophan.

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

## 2.14 Software

ÄKTA Unicorn Version 5.01 (318)

© GE HEALTHCARE

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

Corel Draw Version 12

© 2003 COREL Corp.

CpCalc, Version 2.1

© Calorimetry Sciences Corporation 1995

Deep View Swiss PDB Version 3.7

© Guex & Peitsch 1997

<http://www.expasy.org/spdbv>

Endnote Version X2	© 2000 WINTERTREE Software Inc. <a href="http://www.endnote.com">http://www.endnote.com</a>
PyMOL™ 0.99rc6	© 2006 DELANO SCIENTIFIC LCC. <a href="http://www.pymol.org/">http://www.pymol.org/</a>
SigmaPlot 8.0/11.0	© 2004/2008 SPSS INC.
Spectra Manager 2.06	© JASCO GmbH, Groß-Umstadt 2007
VectorNTI 10	INVITROGEN

### **Frei zugängliche, servergestützte Anwendungen**

Blastp	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
DaliLite	<a href="http://www.ebi.ac.uk./DaliLite">http://www.ebi.ac.uk./DaliLite</a>
I-TASSER	<a href="http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/">http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/</a>
ProtParam	<a href="http://www.expasy.ch/tools/protparam.html">http://www.expasy.ch/tools/protparam.html</a>
T-Coffee	<a href="http://www.igs.cnrsMrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi">http://www.igs.cnrsMrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi</a>



## 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 0,22 µm filtriert. Puffer für die analytische oder präparative Gelfiltration sowie die differentielle Scanning Kalorimetrie wurden 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 150 rpm (1 Liter Kultur) bzw. 220 rpm (5, 10 bzw. 50 ml Kultur) angezogen. Die Anzucht erfolgte in der Regel in LB-Medium. Bei plasmidtragenden Stämmen wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum (150 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin) aus einer tausendfach konzentrierten, sterilfiltrierten Stammlösung zugegeben. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurde die Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und üN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur kurzzeitigen Lagerung wurden die Platten oder Suspensionen gut verschlossen und im Kühlschrank bei 8 °C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden Glycerinkulturen hergestellt, welche bei -80 °C aufbewahrt wurden. Hierzu wurde ein Aliquot einer üN-Kultur im Verhältnis 1:1 in 87 % Glycerin in einem sterilen Schraubdeckelgefäß aufgenommen.

#### 3.2.2 Anzucht und Lagerung von *T. thermophilus* Stämmen

Die Anzucht und Lagerung von *T. thermophilus* Kulturen erfolgte analog zu der beschriebenen Weise für *E. coli*, jedoch wurde zur Anzucht TB-Medium verwendet. Bei plasmidtragenden Stämmen wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum (30 µg/ml Kanamycin) zugesetzt. Die Inkubationstemperatur wurde hier auf 68 °C

eingestellt, während Stämme ohne Plasmid bei 70 °C inkubiert wurden. Bei Arbeiten mit Deletionsstämmen, wurde nach Inokulation und einstündiger Kur das entsprechende Antibiotikum (10 µg/ml Bleomycin oder 30 g/ml Kanamycin) zugegeben und bei 68 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C als Glycerinkultur.

### 3.2.3 Transformation von *T. thermophilus* Stämmen

*T. thermophilus* ist ein natürlich kompetentes Bakterium, d. h. es ist in der Lage, ohne weitere Vorbehandlung DNA aufzunehmen (Koyama *et al.*, 1986). Für die Transformation wurden 5 ml TB-Medium mit einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde frisches TB-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,7 bei 70 °C angezogen. Sodann wurde 0,5 ml der Kultur in ein neues Kulturröhrchen überführt, mit 0,5 ml frischem TB-Medium verdünnt, eine Stunde bei 70 °C inkubiert, mit der DNA versetzt, und dann eine weitere Stunde bei 70 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Transformationsansatz durch Zentrifugation (EPPENDORF Centrifuge 5415D, 3 min, 4000 rpm, RT) eingeengt und Aliquots auf TB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden i.d.R. bei 68 °C im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (Inoue *et al.*, 1990)

Zur Präparation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde 1 Liter LB-Medium mit dem entsprechenden Stamm auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 150 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen. Die Kultur wurde 15 min auf Eis gekühlt, in 50 ml-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation (EPPENDORF Centrifuge 5810R, 4000 rpm, 10 min, 4 °C) geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in 100 ml eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert, erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert und das erhaltene Pellet in 10 ml eiskaltem TFB II-Puffer aufgenommen. Sofort nach der Resuspendierung wurden 100 µl Aliquots der Zellsuspension in Eppendorf-Reaktionsgefäße auf Eis überführt und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.5 Chemische Transformation (Inoue *et al.*, 1990)

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde ein 100 µl Aliquot der Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit etwa 100 ng Plasmid-DNA (maximales Volumen: 20 µl) versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für 45 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Danach wurde der Ansatz nochmals für fünf Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium folgte eine Kur von einer Stunde bei 37 °C im Brutschrank, um die Antibiotikaresistenz auszubilden. Bei Transformation eines gereinigten Plasmids wurden 100 µl der Zellsuspension auf Selektivagar ausplattiert. Bei Transformation eines Ligationsansatzes wurde die komplette Zellsuspension kurz abzentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5415D, 4000 rpm, 1 min, RT), in ca. 100 µl LB-Medium resuspendiert und anschließend ausplattiert.

### 3.2.6 Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen (Dower *et al.*, 1988)

Zur Präparation elektrokompenter *E. coli* Zellen wurden 50 oder 200 ml SOB-Medium mit den entsprechenden Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 150 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen. Die Kultur wurde 30 min auf Eis gekühlt und die Zellen anschließend in 50 ml-Röhrchen abzentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5810R, 4000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 50 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und erneut 15 min auf Eis gehalten. Nach nochmaliger Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert, daraufhin erneut 15 min auf Eis gehalten, zentrifugiert und schließlich in 10 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Nach einem letzten Inkubations- und Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vollständig abgegossen und die Zellen auf Eis gestellt. Das erhaltene Zellpellet wurde in 2 – 3 ml sterilem Wasser bei sofortiger Verwendung bzw. in 10 % Glycerin bei Lagerung der Zellen aufgenommen und zu je 100 µl Aliquots in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die so erhaltenen elektrisch kompetenten Zellen wurden entweder sofort zur Transformation verwendet oder bei -80 °C gelagert.

### 3.2.7 Vorbereitung von DNA für die Elektroporation

Bei einer Elektroporation muss die verwendete DNA-Lösung eine möglichst geringe Konzentration an Ionen enthalten, da diese beim elektrischen Puls in der Küvette einen Kurzschluss auslösen können. Deshalb muss jede DNA-Lösung, die in einem salzhaltigen Puffer vorliegt (z.B. Ligationsansatz), gegen Wasser dialysiert werden. Hierfür wurden 10 - 20 µl der DNA-Lösung für mindestens 1 h auf einen Nitrocellulosefilter (Millipore) aufgebracht, der in einer kleinen Petrischale auf sterilem Wasser aufgelegt wurde.

### 3.2.8 Elektroporation (Dower *et al.*, 1988)

Für die Transformation wurden 100 µl der frischen elektrokompetenten *E. coli* Zellen mit maximal 20 µl salzfreier DNA-Lösung versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm) überführt. Nach dem elektrischen Puls (2500 V, 25 µF, 200 Ω) im Elektroporator (bei erfolgreicher Elektroporation lag die Zeitkonstante zwischen 5,0 und 6,0 ms) wurden die Zellen sofort in 1,5 ml SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C im Schüttler (220 rpm) inkubiert. Danach wurden Aliquots auf Selektivagar ausplattiert bzw. zur Beimpfung von SOC-Selektivmedium benutzt. Die Inkubation erfolgte jeweils üN bei 37 °C.

### 3.2.9 Bestimmung der Transformationseffizienz

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz ( $T_E$ ) bei Transformationen von *E. coli* Zellen wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen wie oben beschrieben (3.2.5 / 3.2.8) mit 100 ng Plasmid-DNA transformiert. Nach dem Kuren wurden je 100 µl einer Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) auf LB-Selektivagar ausplattiert. Bei der Bestimmung der Transformationseffizienz ( $T_E$ ) bei Transformationen von *T. thermophilus* wurde ein Transformationsansatz wie oben beschrieben (3.2.3) mit mindestens 1 µg Plasmid-DNA durchgeführt und anschließend wurden je 100 µl einer Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:10, 1:100 und optional 1:1000) auf TB-Selektivagar ausplattiert.

Die Transformationseffizienz wurde in beiden Fällen folgendermaßen berechnet:

$$T_E = \frac{n_{\text{Kolonien}} \cdot f}{m_{\text{DNA}}}$$

**Formel 1: Berechnung der Transformationseffizienz.**

$T_E$  : Transformationseffizienz [Kolonien pro  $\mu\text{g}$  DNA]

$n_{\text{Kolonien}}$  : Anzahl der Kolonien

$f$  : Verdünnungsfaktor

$m_{\text{DNA}}$  : eingesetzte DNA-Menge [ $\mu\text{g}$ ]

**3.2.10 *In vivo* Komplementationstest**

*In vivo* Komplementationstests wurden in Tryptophan-auxotrophen *T. thermophilus* Stämmen (2.6.2) durchgeführt. Die *T. thermophilus*  $\Delta trpD$ -Deletionsstämme wurden mit pMK18-*trpD*-Konstrukten bzw. pMK18-*trpD*-Genbanken transformiert (3.2.3). Vor dem Ausplattieren wurden die Zellen durch dreimaliges Zentrifugieren (EPPENDORF Centrifuge 5415D, 3min, 4000 rpm, RT) und Resuspendieren in 1 ml 1 % (w/v) NaCl gewaschen, um das Vollmedium aus der Kur vollständig zu entfernen. Zum Testen wurden die Zellen anschließend auf SH-Minimalmediumplatten mit Kanamycin ( $\Delta trpD\_kat^*$  Stamm) bzw. Bleomycin plus Kanamycin ( $\Delta trpD\_shble\_77-3$  Stamm) bzw. ausgestrichen. Um die Transformationseffizienz zu bestimmen, wurde ein Aliquot der Zellen zusätzlich auf Kontrollplatten mit TB-Medium und den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Polymerasekettenreaktion (PCR; Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988) ermöglicht die Vervielfältigung definierter DNA-Fragmente *in vitro*. Dies geschieht über zyklisches Wiederholen von Denaturierung der doppelsträngigen DNA, gefolgt von Anlagerung (*Annealing*) zweier Primer (synthetische Oligonukleotide, die das zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren) und enzymatischer DNA-Synthese (*Extension*). Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgt exponentiell. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 - 200  $\mu\text{l}$  in einem Thermocycler (Deckeltemperatur 110 °C) durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten mit je 5 – 100 ng zu amplifizierender DNA-Matrize, 0,025 U/ $\mu\text{l}$  GoTaq<sup>®</sup> DNA-Polymerase, 5× Green GoTaq<sup>®</sup> Reaktionspuffer [enthält 7,5 mM  $\text{MgCl}_2$  (Endkonzentration: 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) und Auftragspuffer], je 0,2 mM dNTPs und jeweils 1  $\mu\text{M}$  der beiden Primer. Zur fehlerfreien Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde zu diesem Ansatz noch 2,5 U *Pwo*-Polymerase zugegeben, da diese im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase eine 3'  $\rightarrow$  5'-*Proofreading*-Aktivität besitzt. Ein Standard PCR-Programm setzte sich wie folgt zusammen.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1. Denaturierung	95	5 min
2. Denaturierung	95	45 s
3. Primer-Anlagerung	$T_A$	45 s
4. Extension	72	1 min/kb
5. Finale Extension	72	10 min
7. Lagerung	4	$\infty$

Die Schritte 2 bis 4 wurden 35-mal wiederholt.

Die optimale Anlagerungstemperatur ( $T_A$ ) wurde nach Chester und Marshak (1993) auf Basis der berechneten Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der beiden Primer ermittelt (Formel 2 und 3):

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

**Formel 2: Berechnung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids.**

$T_M$ : Schmelztemperatur des Primers [°C]  
%GC: GC-Gehalt des Primers [%]  
n: Anzahl der Nukleotide des Primers

$$T_A = \left( \frac{T_{M1} + T_{M2}}{2} \right) - 3^\circ\text{C}$$

**Formel 3: Berechnung der optimalen Anlagerungstemperatur der Primer in einer PCR-Reaktion.**

$T_A$ : Anlagerungstemperatur [°C]  
 $T_{M1}$  &  $T_{M2}$ : Schmelzpunkte der eingesetzten Primer

Die optimale Anlagerungstemperatur wurde zum Teil auch experimentell bestimmt. Hierfür wurden mehrere PCR-Ansätze im Gradienten-Cycler (EPPENDORF Mastercycler gradients) parallel angesetzt. Mittels Agarosegelelektrophorese (3.3.4) konnte anschließend ermittelt werden, welche *Annealing*-Temperatur die höchste Ausbeute an spezifischem Amplifikationsprodukt lieferte. Die Spanne des Gradienten lag zumeist im Bereich einer Anlagerungstemperatur zwischen 50 °C und 70 °C.

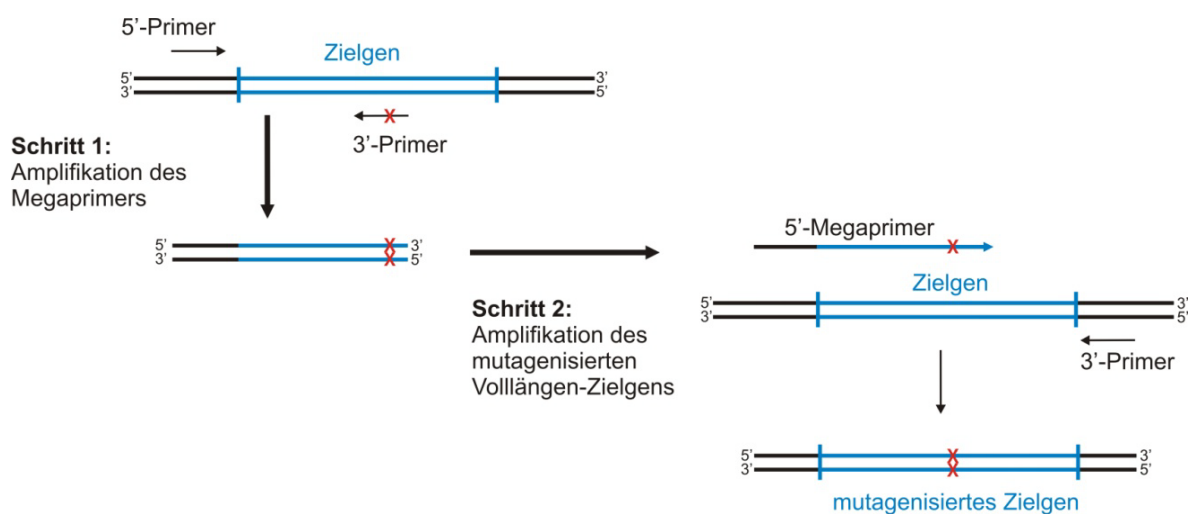
**3.3.2 Kolonie-PCR**

Zur Überprüfung der korrekten Insertion eines Gens in die multiple Klonierungsstelle eines Vektors wurde ein Insert-*Screening* mittels Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden auf Selektivplatten gewachsene Einzelkolonien dem PCR-Ansatz hinzugefügt und bei dem Denaturierungsschritt von 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. Das Volumen des Ansatzes betrug jeweils 20 µl. Im Ansatz waren je 0,5 U GoTaq® DNA-Polymerase, Green GoTaq® Reaktionspuffer, 0,1 mM dNTPs und je 0,5 µM der beiden Primer enthalten. Die Amplifikation erfolgte mittels Standard-Protokoll wie in 3.3.1 beschrieben.

### 3.3.3 PCR-Methoden zur gerichteten und zufälligen Mutagenese

#### 3.3.3.1 Megaprimer-PCR (Sarkar und Sommer, 1990)

Die Megaprimer-PCR (MP-PCR) ist eine Form der DNA-Manipulation, mit der gezielt Punktmutationen eingeführt werden können. In einer ersten PCR wird mithilfe eines genflankierenden Primers und eines Primers, der die Mutation enthält, ein Fragment (der Megaprimer) amplifiziert. Je nach Lage der Mutation wird diese über einen fehlerhaften 3'-Primer in Kombination mit einem genflankierenden 5'-Primer oder über einen fehlerhaften 5'-Primer in Kombination mit einem genflankierenden 3'-Primer eingeführt. Der Megaprimer wurde mittels präparativer Gelelektrophorese (3.3.5) gereinigt und diente zusammen mit dem das Gen auf der gegenüberliegenden Seite flankierenden Primer zur Amplifikation des gesamten Gens in einer zweiten PCR (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Prinzip der Megaprimer-PCR.**

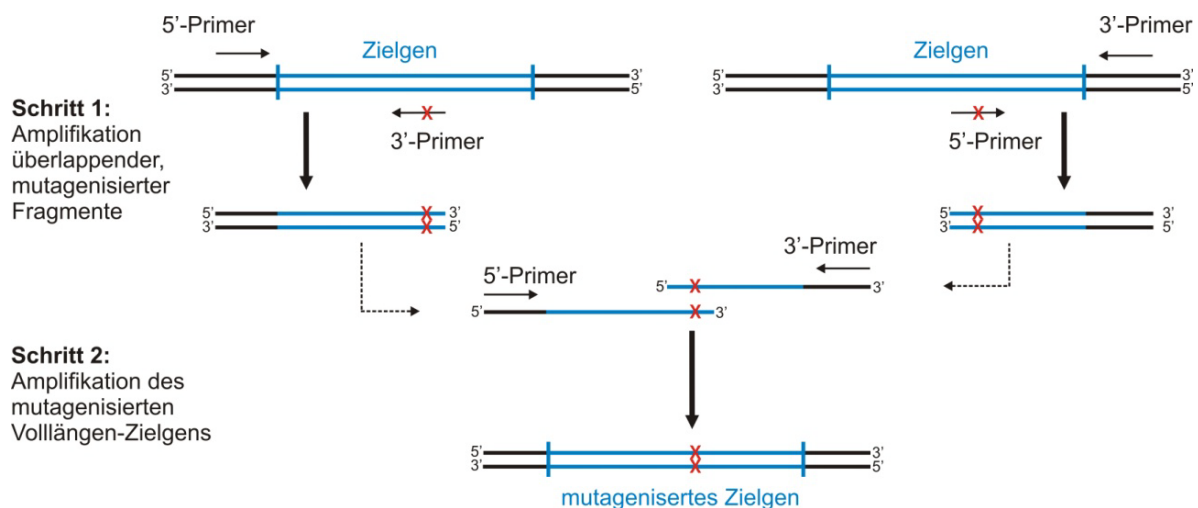
Gezielte Mutationen werden im 1. Schritt durch zum Zielgen komplementäre fehlerhafte Primer eingeführt.

Der entstehende Megaprimer sollte möglichst kurz sein, um eine effektive Anlagerung an die Matrize im 2. Schritt gewährleisten zu können. Die erste und zweite PCR wurden nach beschriebener Methode (3.3.1) durchgeführt, wobei jedoch bei der Amplifikation des Volllängen-Zielgens die Dauer der Primer-Anlagerung auf 1 min erhöht wurde. Die optimale Anlagerungstemperatur in der 2. PCR wurde wenn nötig experimentell ermittelt.



### 3.3.3.2 *Overlap Extension–PCR (OE-PCR)*

Bei der *Overlap Extension–PCR (OE-PCR)* zur gerichteten Mutagenese werden zwei zueinander komplementäre Mutationsprimer von 25 bis 35 bp Länge definiert, die komplementär zum Zielgen sind und im zentralen Bereich den gewünschten Nukleotidaustausch tragen. Im ersten Schritt werden in getrennten PCR-Ansätzen mit diesen Primern in Kombination mit je einem genflankierenden Primer von der gleichen Matrize zwei überlappende Genfragmente amplifiziert und mittels präparativer Gelelektrophorese gereinigt (3.3.5). 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 (Abbildung 9). Die Amplifikationsschritte erfolgten mittels Standard-Protokoll wie in 3.3.1 beschrieben.



**Abbildung 9: Prinzip der *Overlap Extension–PCR*.**

In zwei getrennten Ansätzen, in denen das Zielgen jeweils als Matrize dient, werden zwei Fragmente amplifiziert, die in einem überlappenden Bereich den gewünschten Austausch tragen. Im 2. Schritt dienen diese Fragmente als Matrize, um mithilfe genflankierender Primer das mutagenisierte Volllängen-Zielgen zu amplifizieren.

### 3.3.3.3 Zufallsmutagenese durch *error prone PCR (epPCR)*

Zur Einführung zufälliger Punktmutationen in ein Gen wurde die Methode der *error-prone PCR (epPCR)* benutzt (Leung *et al.*, 1989). Hierbei wird die GoTaq® DNA-Polymerase verwendet. Diese besitzt keine 3' → 5'-*Proofreading*-Aktivität, wodurch es im Schnitt zu  $8 \cdot 10^{-6}$  bis  $2 \cdot 10^{-4}$  Fehlern pro Nukleotid kommt (Eckert und Kunkel, 1990; Cline *et al.*, 1996). Die Fehlerrate kann durch Verwendung ungleicher Konzentrationen der verschiedenen Desoxynukleotide (Fromant *et al.*, 1995;

Vanhercke *et al.*, 2005) sowie durch den Zusatz von  $\text{MnCl}_2$  weiter gesteigert werden (Beckman *et al.*, 1985; Leung *et al.*, 1989). Ein Standardansatz für eine *epPCR* ist in Tabelle 2 gezeigt.

**Tabelle 2: Komponenten, Volumina und Endkonzentrationen der *epPCR*.**

Das Gesamt-Volumen eines Reaktionsansatzes beträgt 50  $\mu\text{l}$ .

Komponente	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Konzentration bzw. Menge im <i>epPCR</i> -Ansatz
DNA-Matrize (25 ng/ $\mu\text{l}$ )	1	25 ng
5'-Primer (50 $\mu\text{M}$ )	1	1 $\mu\text{M}$
3'-Primer (50 $\mu\text{M}$ )	1	1 $\mu\text{M}$
dATP (10 mM)	1,75	0,35 mM
dCTP (10 mM)	2	0,4 mM
dGTP (10 mM)	1	0,2 mM
dTTP (50 mM)	1,35	0,27 mM
$\text{MnCl}_2$ (5 mM)	10	1,00 mM
$\text{MgCl}_2$ (50 mM)	1	1,00 mM
5xGreen GoTaq® Puffer	10	enthält 1,5 mM $\text{MgCl}_2$
GoTaq® DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	1	5 U
$\text{H}_2\text{O}$	18,9	

Die angegebenen Mengen der dNTPs wurden in Fromant *et al.* (1995) beschrieben und bereits erfolgreich zur Erstellung von Genbanken verwendet (Drummond *et al.*, 2005).

Es wurden drei Ansätze parallel durchgeführt, wobei die Ansätze vereinigt und die Menge an amplifiziertem Fragment mittels Agarosegelelektrophorese (3.3.4) überprüft wurden.

Um die Effizienz der *epPCR* zu überprüfen, wurden von jeder Genbank 10 Klone vollständig sequenziert und hinsichtlich der Zahl der Mutationen und des Verhältnisses von Transitionen zu Transversionen ( $T_s/T_v$ ) analysiert. Durch die Wahl des oben beschriebenen *epPCR*-Ansatzes sollte das Verhältnis von  $T_s/T_v$  deutlich ausgeglichener sein als bei einer *epPCR*, in der nur  $\text{MnCl}_2$  zur Mutagenese zugesetzt wird (Fromant *et al.*, 1995). Die Anzahl der Basenaustausche pro Gen wurde nach Formel 4 berechnet:

$$A_{\text{Basen}} = \frac{\sum a_{\text{Basen}}}{n_{\text{Seq}}}$$

**Formel 4: Berechnung der durchschnittlichen Basenaustausche pro Gen durch epPCR.**

$A_{\text{Basen}}$  : durchschnittliche Anzahl der Basenaustausche pro Gen.

$a_{\text{Basen}}$  : Anzahl der Basenaustausche pro analysiertem Gen.

$n_{\text{Seq}}$  : Anzahl der sequenzierten Gene.

### 3.3.4 Agarosegelelektrophorese

Im Agarosegel werden DNA-Fragmente ihrer Länge entsprechend aufgetrennt. Durch Zugabe des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes 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 Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml) pro ml Agarose hinzugegeben, die Lösung in eine Gelkammer gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt, der nach dem Erstarren wieder entfernt wurde. Das fertige Gel wurde mit 0,5 % TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden nun bei Bedarf mit 10 x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 190 V für etwa 20 min durchgeführt. Die negativ geladene DNA wandert durch die angelegte Spannung zur Anode, wobei verschieden lange DNA-Fragmente durch das Agarosenetz unterschiedlich stark gebremst werden.

Mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm wurden die DNA-Fragmente detektiert und mithilfe des Imager Multi-Doc-It Digital Imaging System die Gele dokumentiert. Als Größenstandard wurden 5 µl des *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder* von Fermentas verwendet.

### 3.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach kurzer Exposition unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm wurden gewünschte Fragmentbanden gekennzeichnet, mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA erfolgte mithilfe des Nucleospin®II-Kits von Macherey-Nagel laut Anleitung des Herstellers. Die isolierte DNA wurde in 40 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 TypII verwendet (Sambrock *et al.*, 1989; Wilson und Murray, 1991), die eine palindromische Erkennungssequenz besitzen. Diese erzeugen einzelsträngige Überhänge, sogenannte *sticky-ends* mit 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden. Für analytische Spaltungen wurde etwa 1 µg DNA mit 20 U von jedem Restriktionsenzym für 2 – 3 h in einem Volumen von ca. 20 µl in entsprechendem Puffer bei 37 °C inkubiert. Für präparative Spaltungen zur späteren Ligation von Fragmenten wurde die gesamte Menge an erhaltenem PCR-Produkt bzw. 2 µg Vektor-DNA mit 10 – 30 U von jedem Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von je 50 µl verdaut. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 2 h bzw. üN. Die Reaktionen wurden in dem jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Der Anteil der Restriktionsenzyme im Reaktionsansatz sollte nicht mehr als 10 % des Volumens betragen, da die glycerinhaltige Lösung, in der die Enzyme gelagert werden, deren Aktivität beeinflussen kann. 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 Fragment 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 (Fermentas) im entsprechenden Puffer üN bei 16 °C im Thermocycler oder 1 h bei RT. Nach erfolgter Ligation wurde die T4-DNA-Ligase durch eine zehnminütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Danach wurden kompetente *E. coli* Zellen mit dem Ansatz chemisch (3.2.3) transformiert.

Zur Ligation von Genbanken wurde geschnittener Vektor und randomisiertes Fragment ebenfalls in einem abgeschätzten molaren Verhältnis von 1 zu 4 gemischt. Die Reaktion erfolgte stets in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 U T4-DNA-Ligase (Roche) im entsprechenden Puffer üN bei 16 °C im Thermocycler. Danach wurde ebenfalls die Inaktivierung der Ligase durch eine zehnminütige Inkubation bei 65 °C durchgeführt. Nach der Entfernung von Salz aus dem Ligationsansatz (3.2.7) wurden kompetente *E. coli* Zellen mit dem Ansatz elektrisch transformiert (3.2.8).

### **3.3.7 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *T. thermophilus***

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Zellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Le Gouill *et al.*, 1994). Durch Zugabe von SDS und Natriumhydroxid werden zunächst die Zellen aufgeschlossen. Anschließend werden die Proteine und die genomische DNA durch Neutralisation der Suspension unter Zugabe von Ammoniumacetat gefällt, während die zirkuläre Plasmid-DNA in Lösung bleibt.

#### **3.3.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation)**

Die analytische Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *T. thermophilus* erfolgte mithilfe des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas. Dazu wurden aus einer frischen üN Kultur 5 ml Zellsuspension abzentrifugiert (EPPENDORF 5810R, 4000 rpm, 5 min, RT). Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte anschließend nach den Angaben des Herstellers. Zur Elution wurden stets 50 µl steriles Wasser verwendet. Die gewonnene DNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### **3.3.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Midi/Maxi-Präparation)**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* zu präparativen Zwecken erfolgte durch das NucleoBond®PC 100 (Midi-Präparationen) oder NucleoBond®PC 500 Kit (Maxi-Präparationen) von Macherey-Nagel.

Für Midi-Präparationen wurden 50 ml einer *E. coli* üN-Kultur abzentrifugiert (EPPENDORF 5810R, 4000 rpm, 10 min, 4 °C). Die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der AX100 Säulen, wobei die final erhaltene Plasmid-DNA in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen wurde. Die Plasmidpräparation wurde bei -20 °C gelagert.

Maxi-Präparationen wurden zur Gewinnung von Plasmid-Genbanken durchgeführt. Dazu wurden die auf großen Platten (Ø 14,5 cm) gewachsenen Zellen mithilfe von flüssigem LB-Medium (5 ml pro Platte) und einem sterilen Spatel abgeschabt. Die so gewonnene Zellmasse wurde abzentrifugiert (EPPENDORF 5810R 4000 rpm,

10 min, 4 °C) und das Plasmidgemisch im präparativen Maßstab nach Angaben des Herstellers isoliert, wobei die erhaltene Plasmid-DNA in 300 µl sterilem Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert wurde. Pro Maxi-Präparation wurden maximal 5 g Zellmasse verwendet.

### 3.3.8 Isolierung von chromosomaler DNA aus *T. thermophilus*

Die Isolierung von chromosomaler DNA aus *T. thermophilus* zu präparativen Zwecken erfolgte durch das *Genomic DNA Purification* Kit der Firma Fermentas. Dazu wurden aus einer frischen üN Kultur 5 ml Zellsuspension abzentrifugiert (EPPENDORF 5810R, 4000 rpm, 5 min, RT). Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte anschließend nach den Angaben des Herstellers. Nach dem schonenden Abbau der Bakterienzellwand durch Lysozym und der proteolytischen Zersetzung der Zellproteine durch das Enzym Proteinase K wurden die Proteine durch eine Phenol-Extraktion aus dem Präparat entfernt. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt, in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 3.3.9 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz entspricht eine OD<sub>260</sub> 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:

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

**Formel 5: Bestimmung der DNA-Konzentration.**

$C_{\text{dsDNA}}$ :	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 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> Quotienten von mindestens 1,8 aufweisen.

### 3.3.10 Herstellung von Genbanken

Zunächst wurde das Gen, von dem eine Bank angelegt werden sollte, mithilfe von *epPCR* (3.3.3.3) in drei parallelen Ansätzen randomisiert und die vereinigten Amplifikationsprodukte sowie 2 µg des Zielvektors pMK18 (2.8.4) mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten (3.3.6.1). Die Produkte der *epPCR* und des Restriktionsverdaus wurden jeweils über Agarosegelelektrophorese (3.3.4) aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt (3.3.5), wobei die DNA jeweils in 50 °C warmen sterilen Wasser eluiert wurde, um eine optimale DNA-Ausbeute zu gewährleisten. Die Ligation (3.3.6.2) erfolgte in 8 - 10 Ansätzen à 20 µl bei 16 °C üN. Frisch hergestellte (3.2.6) elektrokompente *E. coli* Turbo Zellen (2.6.1) wurden mit jeweils 5 µl des dialysierten Ligationsansatzes (3.2.7) transformiert (3.2.8), d. h. pro Genbank wurden 32 - 40 Transformationen durchgeführt. Nach Inkubation der in je 1,5 ml SOC-Medium aufgenommenen Transformationsansätze (siehe 3.2.8) in 15 ml Röhrchen für 1 h bei 37 °C und 220 rpm wurden die Zellen vereinigt, abzentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5810R, 4000 rpm, 10 min, 25 °C) und danach in 8 ml SOC-Medium resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension in Aliquots à 200 µl auf großen SOC-Agarplatten mit Kanamycin (Ø 14,5 cm, 40 Stück) ausgestrichen. Nach dem Anwachsen der Zellen bei 37 °C üN im Brutschrank wurden die SOC-Platten mit einem sterilen Spatel und LB-Medium abgeschabt und die dabei entstehende Bakteriensuspension vereinigt und abzentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5810R, 4000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde gewogen und die Plasmidgenbank über Maxi-Präparationen (3.3.7.2) isoliert.

Um die Anzahl der Transformanten zu bestimmen, wurden 100 µl Aliquots der in SOC-Medium resuspendierten Zellen  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$  fach verdünnt und auf kleinen SOC-Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert. Nach Inkubation bei 37 °C üN wurden die Kolonien ausgezählt und die Anzahl der transformierten Zellen nach Formel 6 bestimmt:

$$n_T = n_K \cdot f \cdot V_s$$

**Formel 6: Bestimmung der Anzahl der transformierten Zellen.**

$n_T$ : Anzahl der transformierten Zellen

$n_K$ : Anzahl der Kolonien auf der Agarplatte

$f$ : Verdünnungsfaktor

$V_s$ : Volumenfaktor 80 (Volumen der nach der Transformation insgesamt ausplattierten Zellsuspension = 8 ml, geteilt durch ausplattiertes Volumen = 100 µl)

Anschließend wurden 20 Einzelkolonien zufällig ausgewählt und über eine Kolonie-PCR (3.3.2) die Ligationseffizienz (L) nach Formel 7 bestimmt.

$$L = \frac{n_V}{n_G} \cdot 100$$

**Formel 7: Bestimmung der Ligationseffizienz in Prozent.**

$n_V$ : Anzahl der Kolonien mit Vollängenkonstrukt

$n_G$ : Anzahl der analysierten Kolonien

Die Größe der Genbank (G) berechnet sich demnach nach Formel 8 aus dem Produkt der Anzahl an transformierten Zellen ( $n_T$ ) und der Ligationseffizienz (L).

$$G = n_T \cdot \frac{L}{100}$$

**Formel 8: Bestimmung der Größe einer Genbank aus Formel 6 und Formel 7.**

Um die erzeugte Plasmidgenbank zu vervielfältigen, wurden frisch hergestellte elektrokompetente *E. coli* Turbo erneut mit der erzeugten Plasmidgenbank transformiert und der Transformationsansatz nach einer einstündigen Kur zum Animpfen von 500 ml SOC-Medium mit Kanamycin verwendet. Nach dem üN Wachstum der Zellen bei 37 °C wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert und das erhaltene Zellpellet zur Isolierung der Plasmidgenbank über Maxi-Präparationen verwendet.

### 3.3.11 DNA-Sequenzierung

Alle in dieser Arbeit klonierten Gene wurden vollständig mit vektorspezifischen bzw. genflankierenden Primern sequenziert. Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen erfolgte durch die Firma Geneart (Regensburg, [www.geneart.com](http://www.geneart.com)). Es wurde das Kettenabbruch-Verfahren von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) auf einem ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer von Applied Biosystems 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 gelelektrophoretisch aufgetrennt werden können. Die Nukleotidsequenz kann anschließend einfach abgelesen werden. 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 den Programmen BioEdit analysiert.

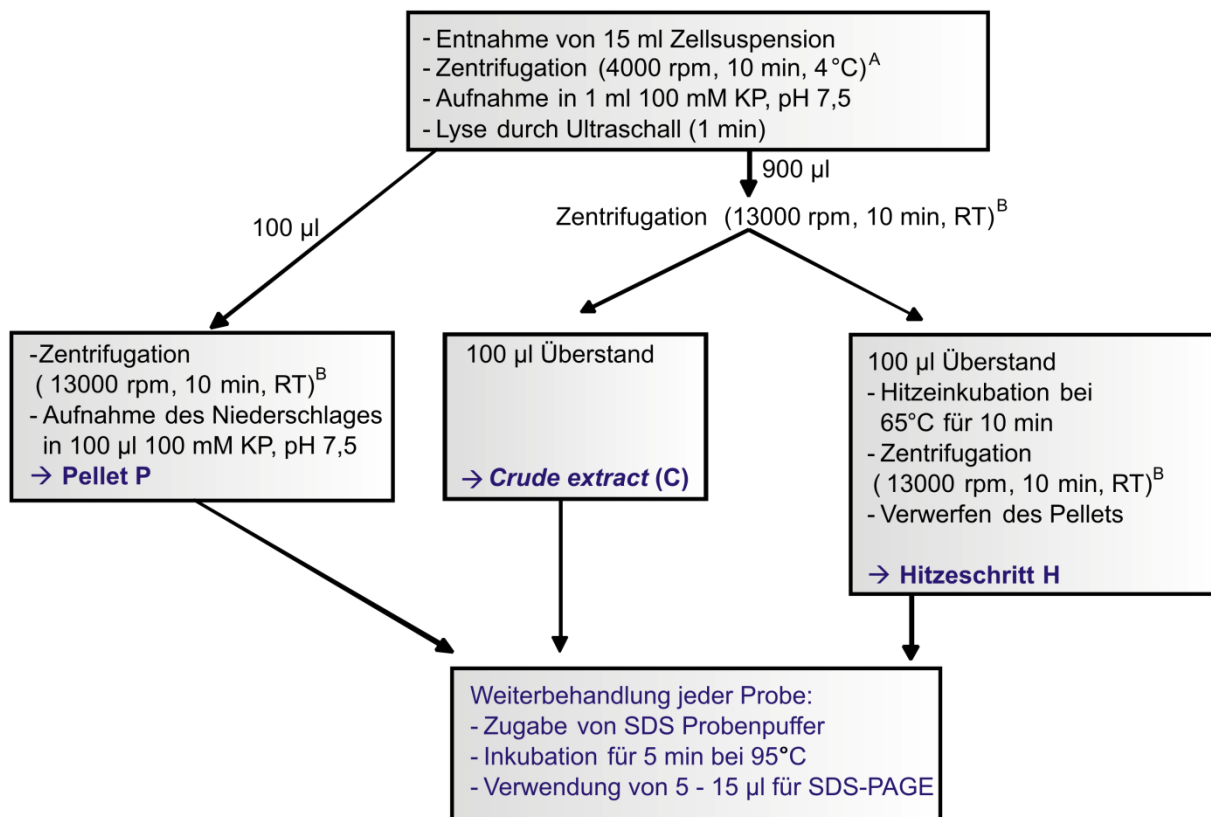
## 3.4 Proteinchemische Methoden

### 3.4.1 Genexpression und Proteianreicherung

#### 3.4.1.1 Expression und Anreicherung von Proteinen im analytischen Maßstab

Um zu überprüfen ob die Expression der klonierten Gene induziert werden kann und in welcher Fraktion des Zellextraktes sich die rekombinanten Proteine befinden, wurde eine Expression im analytischen Maßstab durchgeführt. *E. coli* KK8 (pREP-4)-Zellen wurden mit einer pQE40-*trpD*-Mutante transformiert. Von einem auf LB<sub>Amp,Kana</sub> gewachsenen Einzelklon wurde eine üN-Kultur angelegt und damit zweimal 50 ml LB<sub>Amp,Kana</sub>-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C mit 220 rpm geschüttelt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,6 wurde jeweils die Expression in einer Kultur mit 0,5 mM IPTG induziert, während die zweite uninduziert blieb. Bei Expression verschiedener monomerer AnPRT-Mutanten wurde versucht nach der Induktion durch Absenkung der Inkubationstemperatur auf 20 °C den Anteil an löslichem Protein zu erhöhen. Nach Inkubation üN bei 37 °C und 220 rpm wurden je 15 ml der beiden Kulturen abzentrifugiert (Centrifuge 5810 R EPPENDORF, 4000 rpm, 15 min, 4 °C) und das Zellpellet in 1 ml 100 mM KP, pH 7,5 aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen unter Eiskühlung mittels Ultraschall (Branson Sonifier 250D HEINEMANN) aufgeschlossen (Amplitude 20%, Dauer 1 min). Von der Zellsuspension wurden 100 µl abgenommen, abzentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5415R, 13000 rpm, 10 min) und das Pellet in 100 µl 100 mM KP, pH 7,5 resuspendiert (Probe P = Pellet). Die restlichen 900 µl wurden ebenfalls abzentrifugiert und zum Test der löslichen Fraktion wurden 100 µl des Überstandes entnommen (Probe C = *crude extract*). Bei diesem Teil der untersuchten Proteinmutanten wurden 100 µl des Überstandes bei 65 °C für 10 min einem Hitzeschritt unterzogen und erneut abzentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5415R, 13000 rpm, 10 min). Der jeweilige Überstand (Probe H = *heat step*) wurde aufbewahrt. Sämtliche Aliquots wurden 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und

5 min bei 95 °C erhitzt. Die weitere Analyse der Proben P, C und H erfolgte mittels SDS-PAGE (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des Vorgehens bei einer Probeexpression.**

<sup>A</sup>: EPPENDORF Centrifuge 5810R; <sup>B</sup>: EPPENDORF Centrifuge 5415R

### 3.4.1.2 Expression und Anreicherung von Proteinen im präparativen Maßstab

Zur Aufreinigung der Proteine wurden 2 - 10 l LB-Medium (je 1 l in einem 3 l Glaskolben) mit Ampicillin und Kanamycin mit einer frischen Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 150 rpm im Schüttler inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde die Expression mit 0,5 mM IPTG induziert, nach 2 h bei 37 °C wurde die Inkubationstemperatur für 4 h auf 30 °C gesenkt und wiederum danach üN auf 25 °C herabgesetzt.

Nach der Zellernte (Varifuge 20 RS, 12500 Rotor, 4000 rpm, 20 min, 4 °C) wurde das Pellet in 100 mM KP, pH 7,5 (25 ml pro 1 l Bakterienkultur) aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810R, 4000 rpm, 4 °C, 30 min) und Resuspendierung in 25 ml 100 mM KP, pH 7,5 wurden die Zellen durch Sonifikation auf Eis (Amplitude 50 %; Gesamtpulsdauer: 2 min, abwechselnd 2 s Puls und 2 s Pause) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor,

15000 rpm, 30 min, 4 °C) wurde der lösliche Überstand zur weiteren Entfernung von Schwebeteilchen mithilfe von Spritzenfiltern (Porengröße: 0,45 µm) filtriert, um anschließend weiterverarbeitet werden zu können.

### **3.4.2 Proteinreinigung aus der löslichen Zellfraktion**

#### **3.4.2.1 Hitzeschritt**

Proteine, bei denen die Probeexpression (3.4.1.1) einen Hitzeschritt nahelegte oder deren apparente Schmelztemperatur oberhalb von 85 °C liegt, wurden jeweils 10 min bei 65 °C inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor, 14000 rpm, 4 °C, 30 - 60 min) wurden die ausgefallenen Wirtsproteine abgetrennt und das rekombinante Protein aus dem Überstand mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie weiter angereichert.

#### **3.4.2.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie**

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie wurde an der Chromatographie-Anlage ÄKTA™ Basic 10 better oder ÄKTA™ Purifier 10 (GE HEALTHCARE) mit der Säule HisTrap™ FF crude [GE HEALTHCARE; Säulenvolumen (CV): 5 ml; max. Druck: 0,5 MPa] durchgeführt. Diese Säule besteht aus Sepharose 6 (FastFlow) Medium und dem daran gebundenem Chelator Iminodiacetische-Säure (IDA). IDA besitzt sechs Koordinationsstellen, wobei an drei Koordinationsstellen Metallionen ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$ ) immobilisiert werden können, während die anderen drei zur Komplexierung von Stickstoff- und Schwefelatomen von Histidinen, Tryptophanen oder Cysteinen zur Verfügung stehen. Proteine, die gentechnisch mit einem N- oder C-terminalem (His)<sub>6</sub>-tag fusioniert wurden, binden nach Beladung der Säule mit Metallionen (in dieser Arbeit wurde stets  $\text{Ni}^{2+}$  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 Histidinseitenketten des Proteins um die Bindestellen an der Säule konkurrieren. In den Auftragspuffern dürfen sich keine größeren Mengen an EDTA oder DTT befinden. EDTA würde die gebundenen Nickelionen komplexieren und damit von der Säule entfernen, während DTT die Ionen zu elementarem Nickel reduzieren würde.

Die Reinigungen wurden an der Chromatografie-Anlage ÄKTA™ Purifier 10 (GE HEALTHCARE) nach folgender Methode durchgeführt:

<b>Flussrate:</b>	5 ml/min
<b>Äquilibration:</b>	2 CV 50 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl, 5 mM Imidazol
<b>Beladen:</b>	30-60 ml Proteinlösung in 50 mM KP, pH 7,5 Flussrate: 3 ml/min
<b>Waschen:</b>	15 CV 50 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl, 5 mM Imidazol
<b>Eluieren:</b>	20 CV 50 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl, Gradient von 10 - 500 mM Imidazol; es wurden Fraktionen à 2 ml gesammelt.
<b>Reinigung der Säule:</b>	5 CV 50 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl, 500 mM Imidazol
<b>Reäquilibration:</b>	5 CV 50 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl, 5 mM Imidazol
<b>Spülen und Lagerung der Säule:</b>	5 CV H <sub>2</sub> O, 3 CV Ethanol (20 %);

Die Elution der Proteine wurde über die Messung der Absorption bei 280 und 260 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (3.5.3). Saubere Fraktionen wurden vereinigt und in der Regel gegen dreimal 5 l 50 mM KP, pH 7,5 dialysiert, um Imidazol und KCl aus dem Puffer zu entfernen. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch (Visking) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 14 kDa verwendet, welcher das Protein zurückhält, während niedermolekulare Substanzen die Membran passieren können. Die Dialysedauer betrug mindestens dreimal 4 h.

#### 3.4.2.3 Abspaltung des N-terminalen His<sub>6</sub>-tags durch Trypsin

In der vorliegenden Arbeit diente der Trypsinverdau der Abspaltung des N-terminalen His<sub>6</sub>-tags von ssAnPRT-Mutanten, die zur Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen (3.4.3) verwendet wurden. Der Trypsinverdau erfolgte dabei nach der Reinigung über eine Nickel-Chelat-Säule und anschließender Dialyse. Die Proteinkonzentration wurde mittels Absorptionsspektroskopie (3.5.1.1) bestimmt und Trypsin in einem

molaren Verhältnis von 1:100 gegenüber dem Protein zugegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei RT inkubiert und der vollständige Verdau über SDS-PAGE kontrolliert.

#### **3.4.2.4 Präparative Gelfiltration**

Diese Methode beruht auf dem Prinzip eines umgekehrten Molekularsiebes (Ausschluss-Chromatographie). Die auf die Säule aufgetragenen Moleküle wandern bei konstanter Flussrate durch das poröse Säulenmaterial. Kleine Moleküle wandern aufgrund des für sie größer vorhandenen Diffusionsraumes langsamer als große Moleküle. Aufgetragene Proteine werden somit im präparativen Maßstab ihrer Größe nach aufgetrennt. Die präparative Gelfiltration wurde im Kühlraum bei 4 °C an einer FPLC LCC-501 - Anlage (GE HEALTHCARE) durchgeführt. Die verwendete Säule Superdex 75 pg HiLoad 26/60 (GE HEALTHCARE; CV: 320 ml) besteht aus quervernetzter Agarose und Dextran mit einer Partikelgröße von 24 - 44 µm. Das Volumen der aufgetragenen Probe durfte nicht mehr als 10 ml betragen, so dass diese gegebenenfalls einkonzentriert werden musste (3.4.2.6), bevor sie mithilfe eines Superloops auf die mit entgastem Laufpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen wurde. Die präparative Gelfiltration wurde als finaler Reinigungsschritt für ssAnPRT-Mutanten genutzt, die noch DNA-Kontaminationen enthielten oder zur Entfernung von Trypsin und des N-terminalen His<sub>6</sub>-tags nach dessen proteolytischer Abspaltung (3.4.2.3). Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 4 ml gesammelt und über SDS-PAGE analysiert.

#### **3.4.2.5 Dialyse von Proteinlösungen**

Falls bei einer Proteinlösung der Puffer gewechselt oder Salze entfernt werden mussten, wurde gegen einen ausreichenden Volumenüberschuss des Puffers bei 4 °C 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.

#### **3.4.2.6 Einkonzentrieren von Proteinlösungen**

Die Proteinlösungen wurden mithilfe von Amicon<sup>®</sup> Zentrifugenröhrchen (Amicon Ultra 4 bzw. 15; molekulare Ausschlussgrenze: je 10 kDa) über eine semipermeable

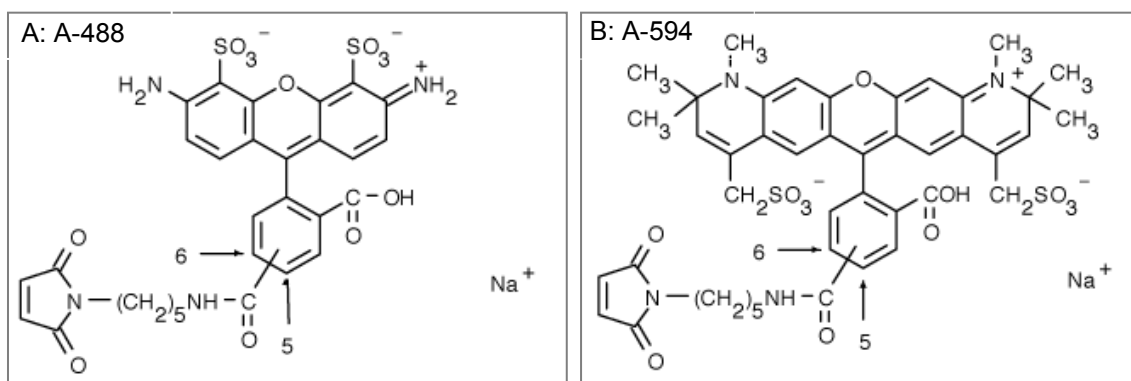
Membran nach Herstellerangaben (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4 °C) einkonzentriert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach dem Volumen des einzukonzentrierenden Proteins.

### 3.4.2.7 Lagerung von gereinigten Proteinen

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

### 3.4.3 Markieren von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die Markierung von ssAnPRT mit FRET-Farbstoffen erfolgte über ihre Kopplung an zuvor durch gezielte Mutagenese über OE-PCR (3.3.3.2) eingebrachte Cysteinreste. Hierbei bildet die Maleimidgruppe (Abbildung 11) der Farbstoffe eine kovalente Bindung mit der Thiolgruppe des Cysteins aus.



**Abbildung 11: Strukturformeln der Alexa-Farbstoffe.**

A: Strukturformel von Alexa-488, C5-Maleimid.

B: Strukturformel von Alexa-594, C5-Maleimid.

Die Strukturformel für Alexa-647, einem C2-Maleimid, ist nicht verfügbar.

Die Farbstoffe Alexa-488, Alexa-594 und Alexa-647 wurden in DMSO, die Proteine in Markierungspuffer (2.11.4) gelöst. Anschließend wurden in einem Gesamtansatz von 2 ml 20 – 30 µM ssAnPRT Protein mit einem jeweils 3 - 10-fachen molaren Überschuss der Farbstoffe Alexa-488 oder Alexa-594, bzw. eine Kombination aus Alexa-488 plus Alexa-594 oder Alexa-488 plus Alexa-647 in Markierungspuffer üN bei 4 °C oder für 20 – 60 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde mithilfe von Amicon MW 10 Konzentratoren durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4 °C) schrittweise aus der Proteinlösung

ausgewaschen. Anschließend wurde mithilfe von Anionenaustausch-Chromatographie an einer HiTrapQ 1 ml-Säule das markierte Protein gereinigt.

Anionenaustausch-Chromatografie beruht dabei auf der kompetitiven Wechselwirkung von geladenen Molekülen, wobei Proteine mit Salzionen um die Positionen auf einer Ionenaustauschmatrix konkurrieren. Zuerst bindet das geladene Molekül an die fixierten Ladungen des Trägermaterials. Im Anschluss daran erfolgt die Verdrängung und Elution des Proteins durch eine steigende Salzkonzentration. Die Ladung des markierten Proteins wird hauptsächlich von den Aminosäuren mit geladenen Seitenketten sowie der Ladung des Fluorophors bestimmt. Die Reinigung wurde an der Chromatografie-Anlage ÄKTA™ Purifier 10 (GE HEALTHCARE) nach folgender Methode durchgeführt:

<b>Flussrate:</b>	1 ml/min
<b>Equilibrierung:</b>	4 CV Laufpuffer <sup>a</sup>
<b>Beladen:</b>	ca. 2 ml Markierungsansatz in 50 mM KP, 0,05 M TCEP, pH 7,0
<b>Waschen:</b>	5 CV Laufpuffer <sup>a</sup>
<b>Eluieren:</b>	20 CV Elutionspuffer <sup>b</sup> , Gradient von 0 – 0,75 M KCL; es wurden Fraktionen à 0,3 ml gesammelt.
<b>Reinigung der Säule:</b>	5 CV Elutionspuffer <sup>b</sup>
<b>Equilibrierung:</b>	3 CV Laufpuffer <sup>a</sup>
<b>Spülen und Lagerung der Säule:</b>	5 CV H <sub>2</sub> O, 3 CV 20 % Ethanol;

<sup>a</sup>: 50 mM KP, pH 7,5 oder 50 mM Tris/HCl, pH 9,0

<sup>b</sup>: 50 mM KP, 1 M KCL, pH 7,5 oder 50 mM Tris/HCl, 1 M KCl, pH 9,0

Die Elution der Proteine und Fluorophore wurde über die Messung der Absorption bei 280 nm, 493 nm und 588 nm bzw. 650 nm verfolgt.

Durch Absorptionsspektroskopie wurde das Verhältnis von Protein zu gebundenem Farbstoff in den einzelnen Fraktionen abgeschätzt, woraus der Markierungsgrad bestimmt wurde (3.5.1.2). Daraufhin wurden die Fraktionen mit dem höchsten Anteil an markiertem Protein durch eine *reversed phase* HPLC analysiert, wodurch die Homogenität der Markierung ermittelt wurde (3.5.14). Die markierten Proteine wurden in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80 °C gelagert (3.4.2.7).

## 3.5 Analytische Methoden

### 3.5.1 Absorptionsspektroskopie

#### 3.5.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsspektroskopie

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  $\epsilon_{280}$  (Formel 9) und daraus, unter Einbeziehung der molaren Masse (MW), der spezifische Extinktionskoeffizient ( $^{0,1\%}A_{280}$ ) (Formel 10) errechnet werden:

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

**Formel 9: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{280}$  [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ].**

$$^{0,1\%}A_{280} = \epsilon_{280} / \text{MW}$$

**Formel 10: Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten  $^{0,1\%}A_{280}$ .**

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

MW: Molare Masse des Proteins [ $\text{g/mol}$ ]

Damit kann mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt werden (Formel 11):

$$A_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d$$

$$\rightarrow c = A_{280} / (\epsilon_{280} \cdot d)$$

**Formel 11: Berechnung der Proteinkonzentration mithilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten  $^{0,1\%}A_{280}$ .**

$A_{280}$ : gemessene Absorption bei 280 nm

$c$ : Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]

$d$ : Schichtdicke der Küvette [ $\text{cm}$ ]

$\epsilon_{280}$ : molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [ $\mu\text{M}$ ]

Es wurden Spektren von 220 – 350 nm aufgenommen, wobei sich das Absorptionsmaximum des Proteins bei 280 nm befinden sollte. Der Quotient  $A_{280}/A_{250}$



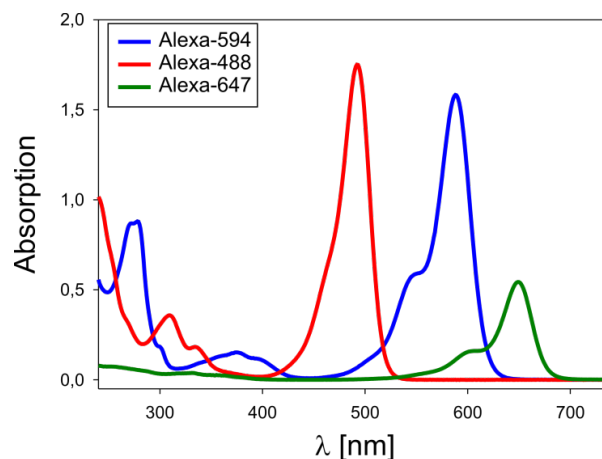
sollte mindestens 1,8 betragen und es sollte keine Absorption oberhalb von 300 nm auftreten, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch auf Aggregatbildung zurückgehende Lichtstreuung ausschließen zu können. Bei deutlicher Absorption oberhalb von 300 nm wurde als erste Näherung eine lineare Zunahme der Lichtstreuung mit abnehmender Wellenlänge angenommen und die ermittelte Proteinkonzentration entsprechend korrigiert. In Tabelle 3 sind die molaren Extinktionskoeffizienten, molaren Massen und spezifischen Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit verwendeten Proteine zusammengefasst. Für Proteinmutanten wurden die entsprechenden Koeffizienten stets neu berechnet.

**Tabelle 3: Extinktionskoeffizienten und molare Masse (MW) der verwendeten Proteine.**

Protein	Molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280}$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	MW [g/mol]	Spezifischer Extinktionskoeffizient $0,1\% A_{280}$ [cm/mg]
clAnPRT	16305	39762	0,41
saAnPRT	20985	38535	0,55
shAnPRT	19620	39374	0,50
ssAnPRT	11920	39582	0,31
tmPRAI	29400	49600	0,64
tmIGPS	22585	28674	0,78

### 3.5.1.2 Bestimmung des Markierungsgrades von Fluorophor-markierten Proteinproben

Nach Markierung der Proteine mit Alexa-Farbstoffen (3.4.3) wurden Spektren von 240 – 700 nm aufgenommen, wobei sich das Absorptionsmaximum des Proteins (Tyrosinabsorption) bei 280 nm, das von Alexa-488 bei 493 nm, das von Alexa-594 bei 588 nm und das von Alexa-647 bei 650 nm befindet (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Absorptionsspektren der Alexa-Farbstoffe.**

Absorptionsspektren von 22  $\mu\text{M}$  Alexa-488 (rot), 16  $\mu\text{M}$  Alexa-594 (blau) und 2  $\mu\text{M}$  Alexa-647 (grün) in 50 mM KP pH 7,5.

Die Konzentration des Proteins sowie der Farbstoffe wurde nach Formel 11 unter Verwendung der jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten (Alexa-488:  $\epsilon_{493\text{nm}} = 71000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; Alexa-594:  $\epsilon_{588\text{nm}} = 96000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; Alexa-647:  $\epsilon_{650\text{nm}} = 239000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) spektroskopisch bestimmt.

Bei Doppelmarkierungsexperimenten mit den Farbstoffen Alexa-488 und Alexa-594 wurde zunächst die Absorption bei 493 nm um den von Alexa-594 stammenden Anteil korrigiert (Abbildung 12). Auf dieser Basis wurde dann die Konzentration von Alexa-488 nach Formel 12 bestimmt:

$$A_{493\text{nm}}^{\text{kor}} = A_{493\text{nm}} - A_{588\text{nm}} \cdot \left( \frac{\epsilon_{493}}{\epsilon_{588}} \right)_{\text{Alexa-594}}$$

$$C_{\text{A488}} = A_{493\text{nm}}^{\text{kor}} / (d \cdot \epsilon_{493, \text{Alexa-488}})$$

**Formel 12: Berechnung der Konzentration von Alexa-488 bei Doppelmarkierungen nach Abzug der von Alexa-594 stammenden Absorption bei 493 nm.**

$A_{493\text{nm}}^{\text{kor}}$ : korrigierte Absorption bei 493 nm  
 $A_{493\text{nm}}$ : gemessene Absorption bei 493 nm  
 $A_{588\text{nm}}$ : gemessene Absorption bei 588 nm  
 $\left( \frac{\epsilon_{493}}{\epsilon_{588}} \right)_{\text{Alexa-594}}$ : Korrekturfaktor, basierend auf dem Verhältnis der Absorption von Alexa-594 bei 493 nm und 588 nm  
 $\epsilon_{493, \text{Alexa-488}}$ : molarer Extinktionskoeffizient für Alexa-488

Zur Konzentrationsbestimmung des markierten Proteins wurde die Absorption bei 280 nm um den von den Farbstoffen stammenden Anteil korrigiert (Abbildung 12). Auf dieser Basis wurde dann die Proteinkonzentration nach Formel 13 bestimmt:

$$A_{280\text{nm}}^{\text{kor}} = A_{280\text{nm}} - (A_{493\text{nm}}^{\text{kor}} \cdot \left(\frac{\epsilon_{280}}{\epsilon_{493}}\right)_{\text{Alexa-488}} + A_{588\text{nm}} \cdot \left(\frac{\epsilon_{280}}{\epsilon_{588}}\right)_{\text{Alexa-594}})$$

$$\rightarrow C_{\text{Protein}} = A_{280\text{nm}}^{\text{kor}} / (\epsilon_{280} \cdot d)$$

**Formel 13: Berechnung der Proteinkonzentration in markierten Proben nach Abzug der von Alexa-488 bzw. Alexa-594 stammenden Absorption bei 280 nm.**

$A_{280\text{nm}}^{\text{kor}}$ :	korrigierte Proteinabsorption bei 280 nm
$A_{280\text{nm}}$ :	gemessene Absorption bei 280 nm
$\epsilon_{280}$ :	molarer Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm
$\left(\frac{\epsilon_{280}}{\epsilon_{493}}\right)_{\text{Alexa-488}}$ :	Korrekturfaktor, basierend auf dem Verhältnis der Absorption von Alexa-488 bei 280 nm und 493 nm
$\left(\frac{\epsilon_{280}}{\epsilon_{588}}\right)_{\text{Alexa-594}}$ :	Korrekturfaktor, basierend auf dem Verhältnis der Absorption von Alexa-594 bei 280 nm und 588 nm

Das Verhältnis der Konzentrationen von gebundenen Farbstoffen zu markierbaren Cysteinen wird als Markierungsgrad L definiert. Dieser wurde nach Formel 14 berechnet:

$$L = \frac{1}{n_c} \cdot \frac{\overbrace{C_{\text{Farbstoff A-488}} + C_{\text{Farbstoff A-594/-647}}}^{C_{\text{Farbstoff}}}}{C_{\text{Protein}}} \cdot 100$$

**Formel 14: Bestimmung des Markierungsgrades L.**

L:	Markierungsgrad [%]
$C_{\text{Farbstoff}}$ :	Gesamtkonzentration an gebundenen Farbstoffen [ $\mu\text{M}$ ]
$C_{\text{Protein}}$ :	Konzentration des Proteins [ $\mu\text{M}$ ]
$n_c$ :	Anzahl markierungsfähiger Cysteine in einem Protomer

### 3.5.2 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 eine Phasenverschiebung  $\phi$  zur Folge hat. 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 ( $\theta_{\text{obs}}$ ) wird bei CD-Messungen als Signal verwendet.

Die CD-Spektroskopie eignet sich besonders zu Untersuchungen von Proteinkonformationen. Die Absorption im Wellenlängenbereich von 170 - 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  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -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  $\alpha$ -Helices die anderen Strukturelemente in der Signalintensität dominieren. Als charakteristische Merkmale eines Fern-UV CD-Spektrums gelten Maxima, Nulldurchgang und Minima. Die Absorption im Bereich von 250 - 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.

Für das Fern-UV CD-Signal wurde eine Normierung auf die durchschnittliche molare Elliptizität pro Aminosäure ( $\theta_{MRW}$ ) nach Formel 15 vorgenommen (Schmid, 1997).

$$\theta_{MRW} = \frac{\theta_{obs} \cdot 100 \cdot MRW}{\beta \cdot d} = \frac{\theta_{obs} \cdot 100 \cdot MW}{\beta \cdot d \cdot N_A} = \frac{\theta_{obs} \cdot 10^5}{c \cdot d \cdot N_A}$$

**Formel 15: Berechnung der durchschnittlichen Elliptizität pro Aminosäure ( $\theta_{MRW}$ ) aus der über Fern-UV Circular Dichroismus gemessenen Elliptizität.**

$\theta_{MRW}$  : durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure [ $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ]  
 $\theta_{obs}$  : gemessene Elliptizität [mdeg]  
 MRW : mittlere Molmasse der Aminosäurereste (*mean residue weight*) [kDa]  
 $\beta$  : Konzentration der Proteinlösung [mg/ml]  
 c : Konzentration der Proteinlösung [ $\mu\text{mol/l}$ ]  
 d : Schichtdicke der Küvette [cm]  
 MW : molare Masse des Proteins [kDa]  
 $N_A$  : Anzahl der Aminosäuren

Für Daten in der aromatischen Region (Nah-UV) wurde die molare Elliptizität nach Formel 16 angegeben.

$$\theta = \frac{\theta_{obs} \cdot 10^5}{c \cdot d}$$

**Formel 16: Berechnung der molaren Elliptizität ( $\theta$ ) aus der über Nah-UV Circular Dichroismus gemessenen Elliptizität.**

$\theta$  : molare Elliptizität pro Aminosäure [ $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ]

Alle CD-Messungen wurden in Quarzküvetten durchgeführt, wobei bei den Fern-UV Spektren Rundküvetten mit einer Schichtdicke von 0,2 mm und bei den Nah-UV Spektren Rundküvetten mit einer Schichtdicke von 50 mm verwendet wurden. Zur

Aufnahme von Fern-UV und Nah-UV CD-Spektren wurde das CD-Signal, gemessen als Elliptizität  $\theta_{\text{obs}}$ , in Abständen von 0,5 nm aufgenommen (Scan-Geschwindigkeit: 20 nm/min). Jede Messung wurde mindestens 5-mal wiederholt, die Spektren anschließend gemittelt und mit der Savitzky-Golay-Methode geglättet (Stufe 11). Zusätzlich wurde stets ein reines Pufferspektrum aufgenommen, welches vom Proteinspektrum subtrahiert wurde. Die Werte wurden anschließend wie oben beschrieben in molare Elliptizität pro Aminosäure  $\theta_{\text{MRW}}$  bei Fern-UV CD- und in molare Elliptizität  $\theta$  bei Nah-UV CD-Spektroskopie umgewandelt.

### 3.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine werden durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und negativ geladen. Dabei bindet SDS an das Protein gewöhnlich 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 zeigen. Die Auftrennung beruht daher allein auf dem Siebeffekt, wobei die Laufgeschwindigkeit dem Logarithmus der Masse umgekehrt proportional ist (Laemmli, 1970). Tabelle 4 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten 12,5 %igen SDS-Gele.

**Tabelle 4: Zusammensetzung 12,5 %iger SDS-PAGE Gele.**  
Die Mengenangaben gelten für 13 Gele.

	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (12,5 %)
Trenn-/Sammelgel-Puffer	19,5 ml	7,38 ml
Acryamid-SL (30 %)	26,2 ml	5,9 ml
H <sub>2</sub> O	31,58 ml	15,95 ml
TEMED	0,089 ml	0,029 ml
APS (10 %)	0,195 ml	0,089 ml

Die Proben wurden mit 2 x oder 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Es wurden je 5 – 25 µl der Proben mit *Gelloader*-Spitzen in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 40 mA und 300 V 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/mm<sup>2</sup> beträgt. Die Gele wurden 15 min in der Färbelösung geschwenkt und im Anschluss wurde durch wiederholtes Aufkochen in Wasser (Mikrowelle 900 W) die Hintergrundfärbung entfernt.

### 3.5.4 Analytische Gelfiltration

Durch analytische Gelfiltration lässt sich die apparente molare Masse eines Proteins und damit, bei bekannter molarer Masse 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 50 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl äquilibrierte Säule wurden jeweils 100 µl einer Proteinlösung der Konzentration 1 – 15 µM über einen Auftragsloop injiziert. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Zur Bestimmung der apparenten molaren Masse wurde die Säule mit Proteinen bekannter Größe kalibriert (siehe Anhang 7.6), wobei die Elution über Absorptionsspektroskopie bei 280 nm verfolgt wurde. Da für globuläre Proteine ein linearer Zusammenhang zwischen dem dekadischen Logarithmus der molaren Masse und der Elutionszeit besteht, lässt sich mithilfe der Kalibrierungsgerade die molare Masse eines untersuchten Proteins abschätzen.

### 3.5.5 Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe

Mittels analytischer Ultrazentrifugation kann der Sedimentationskoeffizient bestimmt werden, welcher für jedes Protein, abhängig von molarer Masse, Dichte und Form charakteristisch ist (Howlett *et al.*, 2006). Dazu wird die Ultrazentrifuge mit verhältnismäßig hohen Umdrehungszahlen betrieben, wodurch Proteine in den radial ausgerichteten Sektorzellen bis zum Zellenboden wandern. Im Verlauf der Zentrifugation kommt es zur Ausbildung einer Trennlinie zwischen reinem Lösungsmittel ohne Makromoleküle und demjenigen Lösungsmittelanteil, in dem noch sedimentierende Proteine enthalten sind. Diese Grenzlinie wandert mit der Zeit, wobei ihre Wanderungsgeschwindigkeit die Sedimentationsgeschwindigkeit der Makromoleküle widerspiegelt. Die Sedimentation wird in regelmäßigen Zeitabständen

über die Messung des Absorptionsverlaufes in der Sektorzelle verfolgt. Der Sedimentationskoeffizient  $s$  entspricht dem Quotienten aus der Sedimentationsgeschwindigkeit und der Zentrifugalbeschleunigung:

$$s = \frac{\text{Sedimentationsgeschwindigkeit}}{\text{Zentrifugalbeschleunigung}} = \frac{dr/dt}{\omega^2 r} \text{ [S]}$$

**Formel 17: Berechnung des Sedimentationskoeffizienten.**

$r$ : Abstand des Meßpunktes zum Rotationszentrum [cm]

$t$ : Zeit [s]

$\omega$ : Winkelgeschwindigkeit ( $2 \cdot \pi \cdot \text{Upm}/60$ ) [ $\text{s}^{-1}$ ]

1 S (Svedberg) =  $1 \cdot 10^{-13}$  s

Die logarithmische Auftragung des Abstandes  $r$  gegen die Zeit  $t$  ergibt eine Gerade, aus deren Steigung der apparente Sedimentationskoeffizient ( $s_{\text{app}}$ ) berechnet werden kann:

$$s_{\text{app}} = \frac{2,303}{\omega^2} \cdot \frac{d \log r}{dt}$$

**Formel 18: Berechnung des apparenten Sedimentationskoeffizienten  $s_{\text{app}}$ .**

Der Wert für den Quotienten  $\frac{2,303}{\omega^2}$  lässt sich für die jeweilige Drehzahl aus Tabellen entnehmen, z.B. Chervenka (1973). Die Umrechnung von  $s_{\text{app}}$  auf Standardbedingungen ( $T = 293,15$  K, Lösungsmittel = Wasser) erfolgt nach Formel 19:

$$s_{20,w} = s_{\text{app}} \cdot \frac{\eta_{T,w}}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{\eta_{T,LM}}{\eta_{T,w}} \cdot \frac{1 - \bar{v} \cdot \rho_{20,w}}{1 - \bar{v}_{T,LM} \cdot \rho_{T,LM}}$$

**Formel 19: Umrechnung von  $s_{\text{app}}$  auf Standardbedingungen ( $s_{20,w}$ )**

$T$ : Temperatur [K]

$\eta$ : relative Viskosität

$\bar{v}$ : partielles spezifisches Volumen des Proteins [ $\text{cm}^3/\text{g}$ ]

$\rho$ : Dichte des Lösungsmittels [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]

Die Werte für die Temperaturabhängigkeiten der Viskosität, des partiellen spezifischen Volumens und der Lösungsmitteldichte lassen sich ebenfalls aus

Tabellen entnehmen:  $\frac{\eta_{T,w}}{\eta_{20,w}}$  wurde als 1,015 und  $\frac{1 - \bar{v} \cdot \rho_{20,w}}{1 - \bar{v}_{T,LM} \cdot \rho_{T,LM}}$  als 1,000 angenommen,

während  $\frac{\eta_{T,LM}}{\eta_{T,w}} = 1,032$  gesetzt wurde. Die Durchführung erfolgte an einer Beckman

Spinco Model E Ultrazentrifuge in einem An-G Rotor mit einer Geschwindigkeit von 52000 rpm unter Verwendung von 12 mm Doppelsektorzellen mit Saphir-Fenstern.

Für die Bestimmung von T wurde die Temperatur im Gerät vor und nach dem Lauf bestimmt und gemittelt. Die Detektion erfolgte bei 277 nm. Die proteinhaltigen Lösungen wurden zuvor durch Dialyse in einem gemeinsamen Dialysebehälter in den gleichen Puffer (50 mM KP, pH 7,5) gebracht, der auch als Referenz diente, und vor dem Sedimentationslauf zentrifugiert (Eppendorf 5415 D, 13000 Upm, 20 min, 4 °C). Die Proteinkonzentration im Überstand betrug 15 µM.

### 3.5.6 Messung der enzymatischen Aktivität unter Fließgleichgewichtsbedingungen (*steady-state* Enzymkinetik)

Die Aktivitätsbestimmung für die AnPRT-Reaktion erfolgte unter Fließgleichgewichtsbedingungen (*steady-state*) (Ivens *et al.*, 2001; Schlee *et al.*, 2009). In den Messungen wurde der enzymatische Umsatz von Anthranilsäure und PRPP zu PRA und PP<sub>i</sub> an einem Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse (VARIAN, Darmstadt) bei 25 °C (nativ monomere AnPRTs) bzw. bei 37 °C (ssAnPRT-Mutanten) verfolgt. Der Umsatz führt zu einer Abnahme der Fluoreszenzemission bei 400 nm nach Anregung bei 310 nm. Zur Vermeidung einer Produktinhibition durch das entstehende PRA wurden die Hilfsenzyme Phosphoribosylanthranilat-Isomerase (PRAI) und Indolglycerinphosphat-Synthase (IGPS) aus *T. maritima* (Sternner *et al.*, 1996; Merz *et al.*, 1999) zugegeben, wodurch PRA weiter zu CdRP und Indol-3-Glycerinphosphat umgesetzt wird (Abbildung 13).

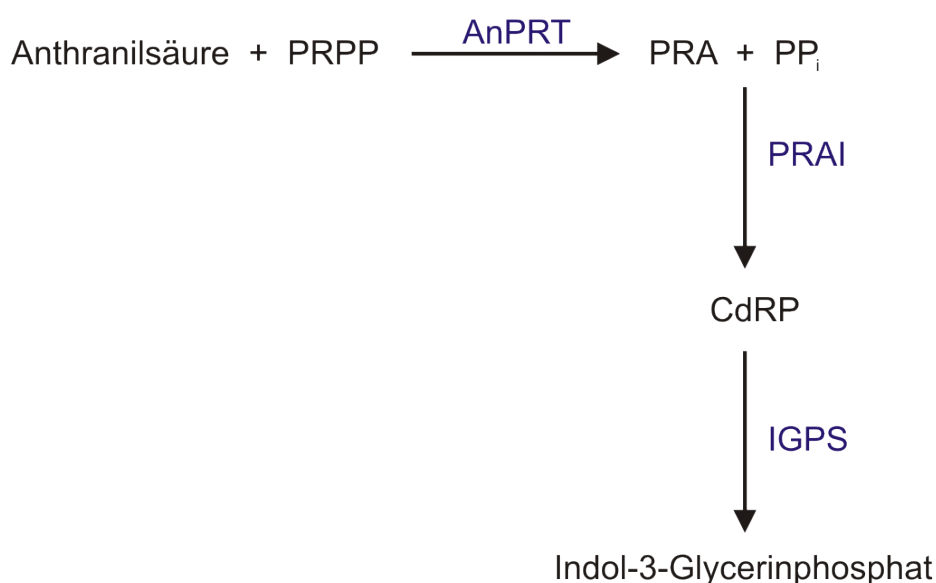


Abbildung 13: Schema des Enzymassays für die Aktivitätsmessung von AnPRT.



Die Messungen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1 ml 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, wobei die Reaktion durch die Zugabe von Enzym gestartet wurde. Es wurden zunächst Messungen in Anwesenheit von 0 – 30 mM  $\text{MgCl}_2$  durchgeführt und in der Folge bei der jeweils optimalen  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration gearbeitet.

Die Anfangsgeschwindigkeiten  $v_i$  der Reaktion wurden für verschiedene Konzentrationen an Anthranilsäure (0,01 – 140  $\mu\text{M}$ ) und PRPP (0,001 – 3 mM) graphisch aus den Anfangssteigungen der Reaktion ermittelt, wobei das jeweils zweite Substrat in sättigender Konzentration vorlag ( $> 10 \cdot K_M$ ). Zur Normierung des Fluoreszenz-Signals wurden alle Reaktionen bis zum vollständigen Umsatz der Anthranilsäure zu PRA verfolgt. Aus den resultierenden Sättigungskurven wurden die Maximalgeschwindigkeit  $V_{\max}$  und die Michaeliskonstanten  $K_M^{\text{AA}}$  bzw.  $K_M^{\text{PRPP}}$  durch einen Fit mit einer hyperbolischen Funktion (Programm Sigma Plot 11.0) ermittelt. Mithilfe der bekannten Konzentration an aktiven Zentren ( $[\text{E}_0]$ ) wurde die Wechselzahl  $k_{\text{cat}} = V_{\max}/[\text{E}_0]$  ermittelt.

### 3.5.7 Bestimmung der Anthranilsäurekonzentration

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

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

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

### 3.5.8 Bestimmung der PRPP-Konzentration

Die PRPP-Konzentration wurde indirekt über den Abbau von Anthranilsäure photometrisch bei 25 °C bestimmt. Eingewogenes und gelöstes PRPP wurde dazu mit einem molaren Überschuss an Anthranilsäure bekannter Konzentration enzymatisch durch ssAnPRT-D83G+F149S in PRA und  $\text{PP}_i$  umgesetzt, wobei PRAI und IGPS aus *T. maritima* als Hilfsenzyme verwendet wurden (3.5.6). Die Reaktion erfolgte in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ .

### 3.5.9 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 der nativ monomeren AnPRTs in 50 mM KP, pH 7,5 bei 40 °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 Anthranilsäure und PRPP durchgeführt (3.5.6). 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. Die Substrat- und Enzymkonzentrationen wurden in allen Messungen einer Messreihe konstant gehalten.

### 3.5.10 Differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC)

Bei der differentiellen Scanning Kalorimetrie werden Proben elektrisch mit einer vorgegebenen Heizrate schrittweise erwärmt. Dabei werden eine Probenzelle (Protein in Puffer) und eine Referenzzelle (Puffer) simultan aufgeheizt. Infolge einer temperaturinduzierten Reaktion in der Messzelle kommt es zu einer minimalen Temperaturdifferenz  $\Delta T$ , welche von dem Gerät erkannt und durch Variation des Heizstroms ( $\Delta I$ ) ausgeglichen wird. Durch Registrierung von  $\Delta I$  lässt sich auf die Wärmekapazität  $C_p$  (kJ/mol/K) bei der jeweiligen Temperatur schließen. Hierbei handelt es sich um die Energie, die zur Erwärmung einer Proteinelösung um 1 K bei konstantem Druck notwendig ist. Entfaltet das Protein reversibel und ohne Populierung von Intermediaten (Zwei-Zustands-Modell, Richards, 1992), dann gibt die Analyse der Daten Aufschluss über den Schmelzpunkt  $T_M$  (Temperatur, bei der jeweils die Hälfte des Proteins in gefaltetem und ungefaltetem Zustand vorliegt, Freire, 1995), über die Enthalpieänderung während der thermischen Denaturierung und die freie Energie der Auffaltung  $\Delta G_{NU}$  als Funktion der Temperatur (Pace *et al.*, 1998). Ist die Auffaltung irreversibel (z.B. wegen Aggregation des thermisch denaturierten Proteins) oder reichern sich partiell gefaltete Zwischenstufen an, dann ist eine strenge thermodynamische Analyse nicht bzw. nur eingeschränkt möglich. In

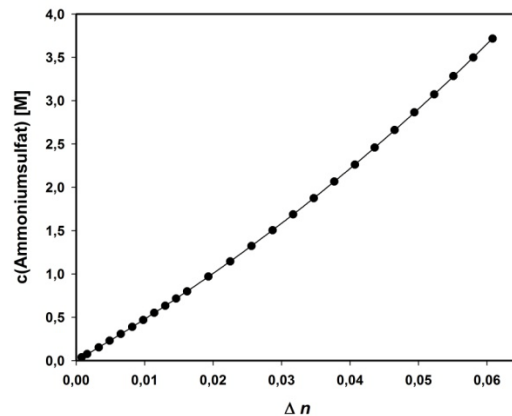
einem solchen Fall sind die apparenten Werte von  $T_M$  und  $\Delta H$  jedoch immer noch als operationelles Maß für die Thermostabilität bzw. die mit der Auffaltung vorhandene Enthalpieänderung zu verwenden. Die Messungen wurden an einem CSC 5100 Nano Differential Scanning Calorimeter mit einer Scanrate von 1 °C/min durchgeführt und  $C_P$  in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet. In der Messzelle befand sich 10 – 150 µM Protein in 50 mM KP, pH 7,5. In der Referenzzelle befand sich der identische Puffer ohne Protein.

### **3.5.11 Bestimmung der Thermostabilität durch schrittweise thermische Denaturierung**

Thermische Denaturierungen von 10 µM Protein in 50 mM KP pH 7,5 erfolgten in einer verschließbaren, zylindrischen Quarzküvette (Schichtdicke: 1 mm) durch Messung des Fern-UV CD-Signals (3.5.2). Es wurde ein Temperaturgradient von 20 °C bis 105 °C in Schritten von 1 °C/min durchlaufen. Die Auffaltung wurde stets bei der für  $\alpha$ -Helices typischen Wellenlänge von 220 nm verfolgt, da dort der Signalunterschied zwischen nativem und aufgefaltetem Protein sehr groß ist. Die Kurve wurde mit dem Programm *Denatured Protein* (Spectra Manager 2.06) analysiert und die apparente Schmelztemperatur  $T_M^{app}$  als operationelles Maß für die Proteinstabilität bestimmt.

### **3.5.12 Refraktometrie**

Die genaue Konzentration der Ammoniumsulfat-Stammlösung wurde vor deren Verwendung bei fraktionierten Präzipitationsexperimenten (3.5.13) bestimmt. Hierfür wurde mithilfe eines Abbé Refraktometers (Carl Zeiss, Jena) die Differenz der Brechungsindizes ( $\Delta n$ ) der Lösungen mit und ohne Salz bestimmt. Die Ammoniumsulfat-Konzentration konnte aus der tabellarischen Auflistung von konzentrationsabhängigen  $\Delta n$  –Werten aus dem CRC Handbook of Chemistry and Physics (Weast, 1982-1983) über einen polynomischen Fit ( $y = a \cdot x + b \cdot x^2 + c \cdot x^3$ ) (Abbildung 14) abgeleitet werden.



$$c(\text{Ammoniumsulfat}) [\text{M}] = 45,624 \cdot \Delta n + 226,389 \cdot (\Delta n)^2 + 476,336 \cdot (\Delta n)^3$$

**Abbildung 14: Refraktometrische Bestimmung der Ammoniumsulfat-Konzentration.**

Datenpunkte wurden aus Weast (1982-1983) entnommen.  $\Delta n$ : Differenz der Brechungsindizes der Lösung mit und ohne Ammoniumsulfat.

### 3.5.13 Analyse der Proteinlöslichkeit *in vitro* durch fraktionierte Präzipitation

Die Löslichkeit von Proteinen wird durch Protein-Protein-, Protein-Wasser-, Protein-Ion- und Ion-Wasser-Interaktionen bestimmt. Bei Zugabe von Salzen in hoher Konzentration hydratisieren die geladenen Salzionen, wodurch den Proteinen ihre Hydrathülle entzogen wird. Durch hydrophobe Wechselwirkungen kommt es zur Aggregation und schließlich zur Präzipitation der Proteine. Im Gegensatz zu chaotropen Reagenzien (z.B. Harnstoff oder Guanidiniumchlorid), welche den entfalteten Zustand eines Proteins stabilisieren, werden Proteine durch anti-chaotrope (kosmotrope) Salze wie Ammoniumsulfat nicht denaturiert. Die native Struktur und Funktion der Proteine bleibt demnach im aggregierten Zustand erhalten (Trevino *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit sollte die Löslichkeit verschiedener ssAnPRT-Proteinmutanten *in vitro* bestimmt werden. Hierfür wurde aus einer Proteinlösung, einer Pufferstammlösung und einer hochkonzentrierten Ammoniumsulfat-Lösung in gleichem Puffer eine Messreihe mit gleich bleibender Proteinkonzentration und ansteigenden Ammoniumsulfat-Konzentrationen von 0 – 2,5 M erstellt. Die Präzipitationsexperimente fanden bei Raumtemperatur statt. Nach 5 min Inkubation wurden alle Proteinproben 60 min zentrifugiert (EPPENDORF 5415D, 13000 rpm, RT), um das präzipitierte Protein zu pelletieren. Die Konzentration an löslichem Protein im Überstand der verschiedenen Proben wurde mithilfe einer zuvor erstellten

Eichgerade durch Fluoreszenz-Spektroskopie ermittelt. Hierfür wurde nach Anregung bei 280 nm (Tyrosinfloureszenz) die Signalintensität des 1:8 verdünnten Überstands beim Emissionsmaximum von 308 nm für 1 min gemessen und die Werte gemittelt (Schichtdicke der Küvette: 1cm; Photomultiplier-Spannung: 990 V). Die Lage des Emissionsmaximums wird von den Chromophoren des Proteins bestimmt, wobei ssAnPRT über acht Tyrosin- und keine Tryptophanreste verfügt. Diese Methode zur Konzentrationsbestimmung stellte sich als sehr genau heraus, wobei stets sichergestellt wurde, dass im untersuchten Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenz-Signal und Proteinkonzentration besteht und somit ein innerer Filtereffekt ausgeschlossen werden kann (siehe Anhang 7.2).

Die Proteinkonzentration im löslichen Überstand der unterschiedlichen Proben wurde jeweils prozentual auf die nach Inkubation mit 0 M Ammoniumsulfat erhaltene Konzentration an löslichem Protein normiert und als Funktion der Salz-Konzentration aufgetragen. Als operationelles Maß für die Proteinlöslichkeit wurde der  $[L_{1/2}]^{app}$ -Wert eingeführt, welcher der Ammoniumsulfat-Konzentration entspricht bei der die Hälfte des eingesetzten Proteins präzipitiert.

#### 3.5.14 Analytische *reversed-phase* HPLC

Mit der HPLC Analytik kann die Homogenität von mit Fluorophoren-markierten Proteinproben (3.4.3) untersucht werden. Dabei werden die Komponenten einer Probe chromatographisch auf einer Säule getrennt und durch Messung der Absorption oder Fluoreszenz die Elution verfolgt. Es wurde dabei eine *reversed phase* Säule verwendet. Bei dieser handelt es sich um Kieselgel, welches mit langen Kohlenwasserstoffketten modifiziert wurde. Dadurch erhält man eine sehr unpolare Oberfläche, woran 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 früher von der Säule lösen als unpolare. Zur Analyse der Bestandteile von Fluorophor-markierten ssAnPRT-Proben wurde eine 2x250 mm Jupiter-C5-Säule mit 5 µm Partikelgröße (PHENOMENEX) benutzt.

Dabei wurde folgendes Programm verwendet:

Laufmittel A: 0,1 % (w/v) TFA in Millipore-Wasser

Laufmittel B: 0,085 % (w/v) TFA in Acetonitril

Flussrate: 0,2 ml/min

Säulentemperatur: 45 °C

Injektionsvolumen: 50 – 80 µl in Puffer

Zeit [min]	% Laufmittel B
0,00	5,0
3,00	5,0
50,0	90,0
55,0	5,0

Die Elution wurde mit einem Diodenarraydetektor über die Absorption der Peptidbindung bei 210 nm, die Tyrosin-Absorption bei 280 nm, sowie die Absorption von Alexa-488 bei 493 nm, von Alexa-594 bei 588 nm bzw. von Alexa-647 bei 650 nm verfolgt. Zusätzlich wurde die ssAnPRT-Tyrosin-Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{Ex}} = 274 \text{ nm}/\lambda_{\text{Em}} = 308 \text{ nm}$ ) oder die Fluoreszenz von Alexa-594 ( $\lambda_{\text{Ex}} = 588 \text{ nm}/\lambda_{\text{Em}} = 617 \text{ nm}$ ) detektiert.

### 3.5.15 Proteinkristallisation

Für die Kristallisation wurden eine clAnPRT-Mutante (16 mg/ml), saAnPRT-Mutanten (2-5 mg/ml), shAnPRT-Mutanten (3-10 mg/ml) und mehrere ssAnPRT-Mutanten (5-11 mg/ml) in einem 1:1-, 1:2-, und 2:1-Verhältnis mit der Reservoirlösung nach der Dampfdiffusionsmethode mit hängendem Tropfen angesetzt. Es wurden 15-*well*-Platten (GREINER, Nürtingen) mit 1 ml Reservoirlösung verwendet. Die Tropfengröße betrug 2 - 3 µl, wobei jeweils 1 bzw. 2 µl Proteinlösung und 1 bzw. 2 µl Reservoirlösung auf ein silikonisiertes Deckglas pipettiert, das Deckglas umgedreht und auf den gefetteten Rand der Vertiefung gelegt wurden, so dass ein geschlossenes System entstand. Die Platten wurden regelmäßig mithilfe eines Mikroskops (ZEISS) auf Kristallbildung untersucht.

Parallel dazu erfolgten Ansätze mit ssAnPRT-Mutanten in 96-*well*-Platten mithilfe eines Pipettierroboters an der *High Throughput-Screening facility* am EMBL in Hamburg (Müller-Dieckmann, 2006). Der Kristallisationsverlauf wurde dabei über mehrere Wochen durch eine automatische Kamera verfolgt. Für jeden Ansatz wurde 2 µl Proteinlösung (6 - 10 mg/ml) mit 1 µl Mutterlösung gemischt.

Getestet wurden folgende Kombination aus kommerziell erhältlichen Kristallisations-Sets mit je 96 verschiedenen Bedingungen und Proteinen:

Crystal Screen (HAMPTON RESEARCH) <sup>1,2</sup>

NeXtal DWBlock *Classics II Suite* <sup>1,2,3,4,5</sup>

QIA-Optisalt (QIAGEN) Grundlage: QIA-Classic Bedingung #65 <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ssAnPRT-I36E+M47D+T77I+D83G+N109S+F149S+I169T+F193S+L320M

<sup>2</sup> ssAnPRT-T77I+N109S+I169T+F193S+L320M

<sup>3</sup> saAnPRT

<sup>4</sup> shAnPRT

<sup>5</sup> clAnPRT-T78I

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Identifikation nativ monomerer AnPRTs

Aus der erfolgreichen Monomerisierung von ssAnPRT durch gerichtete Mutagenese mithilfe der Aminosäureaustausche I36E+M47D, konnte geschlossen werden, dass die Oligomerisierung ausschließlich der Stabilisierung dient, während sie für die katalytische Aktivität ohne Bedeutung ist (Schwab *et al.*, 2008). Alle bisher untersuchten AnPRTs bilden Homodimere, unabhängig von der Wachstumstemperatur des Organismus (Largen *et al.*, 1978; Hommel *et al.*, 1989; Ivens *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006). Dies deutet darauf hin, dass AnPRT bereits in der frühen und vermutlich bei hohen Temperaturen ablaufenden Phase der Evolution (Di Giulio, 2003) zum Zwecke der Stabilisierung dimerisierte und diesen Assoziationszustand bei der Entwicklung mesophiler Lebensweise beibehielt. Es ist jedoch durchaus vorstellbar, dass im Laufe der Evolution mesophiler Organismen eine Monomerisierung von AnPRT erfolgte, da dabei der Selektionsdruck auf hohe Stabilität wegfiel. Im Rahmen dieser Arbeit sollten nativ monomere AnPRTs anhand einfacher bioinformatischer Methoden unter der Zuhilfenahme der bisherigen Erkenntnisse identifiziert und bezüglich katalytischer Aktivität und thermischer Stabilität charakterisiert werden.

#### 4.1.1 Vorhersage putativer Kandidaten durch bioinformatische Analyse

Die Monomerisierung von ssAnPRT durch die Aminosäureaustausche I36E+M7D war die Grundlage für die Überlegung, dass diese Positionen am N- bzw. C-Terminus der Helix  $\alpha_3$  Schlüsselpositionen für die Interaktion der Protomere von AnPRTs sind. Ein multiples Sequenzalignment (MSA) von 220 zufällig ausgewählten AnPRT-Sequenzen ergab, dass an den Positionen, die I36 und M47 in ssAnPRT entsprechen, hauptsächlich hydrophobe Reste auftreten (Position „36“: 70 %, Position „47“: 80 %). Die Analyse des MSAs wurde in der Folge modifiziert, d. h. es erfolgte eine paarweise Betrachtung der Positionen „36“ und „47“ (Tabelle 5).



**Tabelle 5: Charakterisierung der Aminosäurereste von AnPRTs an den Positionen „36“ und „47“.**

Mithilfe des blastp Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) wurde ein Datensatz von AnPRT Sequenzen ausgewählt. Die Sequenzen wurden dann einem paarweisen Vergleich unterzogen und nur solche Sequenzen ausgewählt, die mindestens 20 % und maximal 96 % identische Reste enthielten. Anhand der verbliebenen 220 Sequenzen wurde ein MSA mithilfe des Programms T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) erstellt. Anschließend wurden die Seitenketten an den beiden Positionen „36“ und „47“ für jede Sequenz gemäß ihres hydropathischen Charakters (Kyte und Doolittle, 1982) kategorisiert. N gibt die Anzahl der gezählten Pärchen mit entsprechendem Charakter an, was zur Berechnung der relativen Häufigkeit  $f_{ij}$  verwendet wird. Unter den 19 gezählten Sequenzen, die an Position „36“ und „47“ über einen hydrophilen Rest verfügen, liegen in sieben Fällen an beiden Positionen geladene Aminosäureseitenketten vor.

Position „36“	Position „47“	Anzahl N	rel. Häufigkeit $f_{ij}$ [%]
hydrophob	hydrophob	121	55,0
hydrophob	hydrophil	27	12,3
hydrophil	hydrophob	53	24,1
hydrophil	hydrophil	19	8,6
geladen	geladen	7	3,2

Die vereinfachende Annahme, basierend auf den Ergebnissen der Monomerisierung von ssAnPRT besagt, dass geladene Reste (Asp, Glu, Lys, Arg) an beiden Positionen einen monomeren Assoziationszustand zur Folge haben. Es fanden sich sieben AnPRT Sequenzen, die diese Voraussetzungen erfüllten (Tabelle 5). Diese wurden als putativ monomere AnPRTs eingestuft. Sie stammen aus mesophilen Organismen, deren Wachstumsoptimum im Bereich zwischen 20 °C und 37 °C liegt (Tabelle 6).

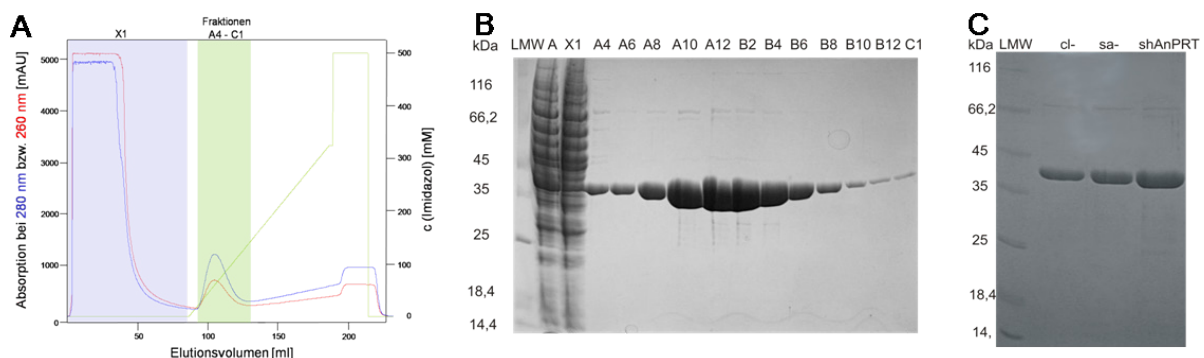
**Tabelle 6: Putativ monomere AnPRTs, abgeleitet aus der Analyse eines MSAs.**

Angegeben sind die Organismen der putativ monomeren AnPRTs sowie deren Abkürzung (*code*). Die Aminosäurekomposition an den Positionen „36“ und „47“ sowie der optimale Wachstumsbereich des Organismus sind aufgelistet. Die blau hinterlegenden AnPRTs aus *S. haemolyticus*, *S. aureus*, *C. luteolum* und *R. baltica* wurden für eine *in vitro* Charakterisierung ausgewählt, wobei rbAnPRT nicht aus dem löslichen Zellextrakt gereinigt werden konnte (4.1.2) und deswegen nicht weiter untersucht wurde.

Organismus	code	Position „36“	Position „47“	optimaler Wachstumsbereich
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	sh	E	K	30 - 37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	sa	D	E	30 - 37 °C
<i>Chlorobium luteolum</i>	cl	E	D	20 - 25 °C
<i>Rhodopirellula baltica</i>	rb	E	E	20 - 25 °C
<i>Erythrobacter litoralis</i>	el	E	E	25 - 30 °C
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	sp	E	E	30 - 37 °C
<i>Zymomonas mobilis</i>	zm	D	K	22 - 28 °C

#### 4.1.2 Klonierung und Reinigung der putativ monomeren AnPRTs

Die Auswahl der AnPRTs für die *in vitro* Charakterisierung (Tabelle 6) beschränkte sich auf vier Proteine (cl-, rb-, sa- und shAnPRT), deren genomische DNA von anderen Arbeitsgruppen erhältlich war. Die Gene wurden mittels PCR amplifiziert und dabei durch Verwendung spezifischer Primer Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III eingefügt (3.3.1). Dies ermöglichte die Klonierung in den pQE40-Expressionsvektor (2.8.1), wodurch die Genprodukte mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-tag versehen werden. Die erzeugten Konstrukte wurden in *E. coli* KK8 (2.6.1) heterolog exprimiert (3.4.1.2) und die rekombinanten Proteine mittels Nickelchelate-Metallaffinitätschromatographie aus der löslichen Zellfraktion gereinigt (3.4.2.2). Für die AnPRT aus *Rhodospirellula baltica* (rbAnPRT) war dies nicht möglich, da das Protein vollständig unlöslich war. In Abbildung 15 A, B ist die Aufreinigung exemplarisch für saAnPRT gezeigt. Aus Abbildung 15 C geht hervor, dass auch clAnPRT und shAnPRT zu mindestens 95 % in reiner Form gewonnen werden konnten.



**Abbildung 15: Reinigung von rekombantem saAnPRT über Metallchelate-Affinitätschromatographie und Reinheit aller rekombinant hergestellten putativ monomeren AnPRTs.**

A: Elutionsprofil der Reinigung von saAnPRT, mit Detektion der Absorption bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Die Elution erfolgte durch einen Imidazolgradienten von 0 – 375 mM Imidazol (grün).

B: SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) verschiedener Fraktionen der Chromatographie (Auftrag von je 15 µl Probe). LMW: *Low Molecular Weight*-Marker (Auftrag von 3 µl), A: Auftrag = lösliche Fraktion des Zellextrakts, X1: Fraktion des Auftrags- und Waschdurchflusses, A4 – C1: Elutionsfraktionen.

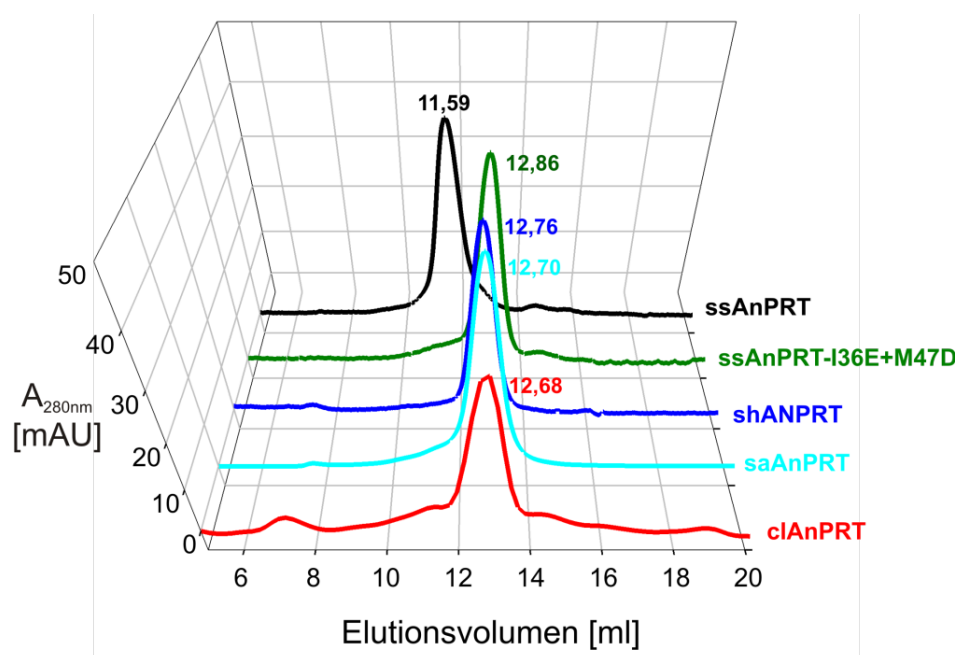
C: SDS-PAGE der gereinigten cl-, sa- und shAnPRT Proteine. Es wurden jeweils 15 µl einer Lösung mit 10 µM Protein und 3 µl LMW-Marker aufgetragen.

Auf eine Abspaltung des N-terminalen His<sub>6</sub>-tag wurde in allen Fällen verzichtet. Die Proteine wurden einkonzentriert, ihre Konzentration bestimmt (3.5.1.1), in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80 °C gelagert. Es konnten 3 mg clAnPRT, 40 mg saAnPRT und 15 mg shAnPRT aus jeweils 1 l Bakterienkultur gereinigt werden (siehe Tabelle A 1).

### 4.1.3 *In vitro* Charakterisierung der gereinigten cl-, sa- und shAnPRT Proteine

#### 4.1.3.1 Oligomerisierungszustand

Zur Abschätzung der Homogenität und zur Bestimmung des Assoziationszustandes der putativ monomeren AnPRTs wurden diese mittels analytischer Gelfiltration an einer Superdex S75 Säule untersucht (3.5.4). In Abbildung 16 sind die Elutionsprofile für die drei gereinigten AnPRTs sowie für wildtypisches ssAnPRT und monomeres ssAnPRT-I36E+M47D (Schwab *et al.*, 2008) gezeigt.



**Abbildung 16: Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration (Superdex 75) von verschiedenen AnPRTs.**

Die Elution wurde bei 280 nm verfolgt; die Flussrate betrug 0,5 ml/min in 50 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl. Die aufgetragene Proteinmenge lag zwischen 4 und 6,5 µg.

In Tabelle 7 sind die mithilfe einer Kalibrierungsgerade (Anhang 7.6) abgeleiteten apparenten molaren Massen den berechneten molaren Massen für das jeweilige Homodimer bzw. Monomer gegenübergestellt.

**Tabelle 7: Apparente und berechnete molare Massen zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes verschiedener AnPRTs.**

Aufgelistet sind die Retentionsvolumina ( $V_R$ ) der analytischen Gelfiltrationsläufe aus Abbildung 16 sowie die daraus abgeleiteten molaren Massen ( $M_R^{app}$ ) und im Vergleich dazu die aus der Aminosäuresequenz berechneten molaren Massen ( $M_R^{cal}$ ) der Monomere bzw. des Dimers (wildtypisches ssAnPRT). Zusammen mit den ermittelten Sedimentationskoeffizienten ( $s_{20,w}$ ) konnten daraus die jeweiligen Oligomerisierungszustände eindeutig abgeleitet werden. Die Sedimentationskoeffizienten wurden aus Sedimentationsläufen in einer analytischen Ultrazentrifuge bestimmt. Die Läufe wurden bei 24 °C in 100 mM KP, pH 7,5 mit einer Proteinkonzentration von 15  $\mu$ M durchgeführt.

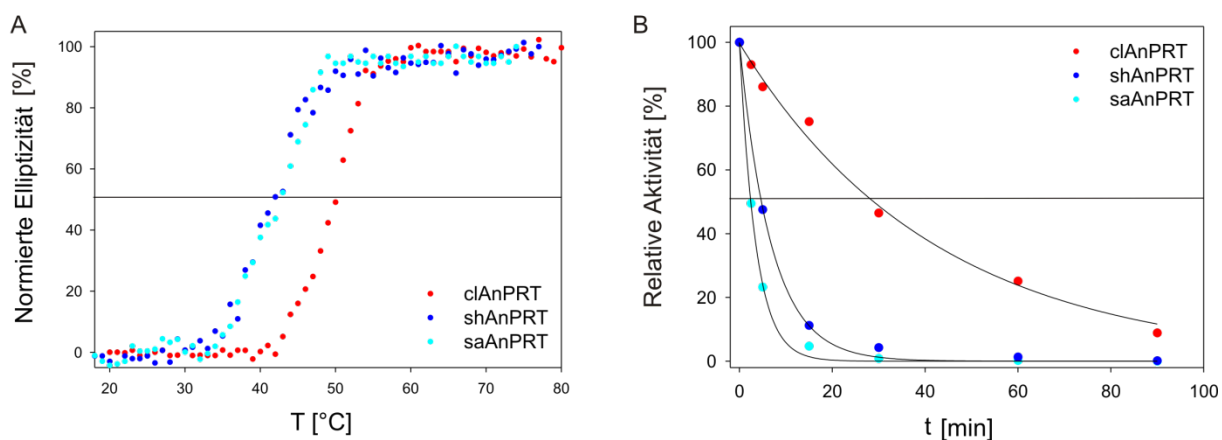
Mutante	$V_R$ [ml]	$M_R^{app}$ [kDa]	$M_R^{cal}$ [kDa]	$s_{20,w}$ [S]	Oligomerisierungs- zustand
clAnPRT	12,68	36,4	39,8	3,0	monomer
saAnPRT	12,70	36,1	39,4	3,2	monomer
shAnPRT	12,76	34,9	38,5	3,2	monomer
ssAnPRT-I36E+M47D	12,86	33,2	38,8	3,2	monomer
ssAnPRT-wt	11,59	64,5	78,9	4,2	dimer

Die gereinigten AnPRTs und ssAnPRT-I36E+M47D zeigen praktisch identisches Laufverhalten. Dies spiegelt sich in den apparenten molaren Massen wider, die jeweils einem Monomer entsprechen. Das Elutionsverhalten der drei gereinigten AnPRTs war darüber hinaus unabhängig von der aufgetragenen Proteinkonzentration (5 – 50  $\mu$ M). Dagegen eluiert wildtypisches dimeres ssAnPRT deutlich früher.

Um die Ergebnisse der analytischen Gelfiltration zu bestätigen, wurde der Oligomerisierungsgrad der AnPRTs durch analytische Ultrazentrifugation untersucht. In Zusammenarbeit mit Dr. H. Durchschlag (Lehrstuhl Biochemie II, Universität Regensburg) wurden dazu Sedimentationsläufe durchgeführt (3.5.5), um die Sedimentationskoeffizienten  $s_{20,w}$  zu bestimmen. Die  $s_{20,w}$ -Werte für cl-, sa-, shAnPRT und ssAnPRT-I36E+M47D sind im Rahmen der experimentellen Genauigkeit identisch (Tabelle 7). Obwohl aus den Sedimentationskoeffizienten nicht direkt auf die molare Masse geschlossen werden kann (Kar und Aune, 1974), stützen die im Vergleich zum  $s_{20,w}$ -Wert des homodimeren ssAnPRT-wt signifikant erniedrigten  $s_{20,w}$ -Werte die Ergebnisse der analytischen Gelfiltration, wonach ssAnPRT-I36E+M47D, sowie cl-, sa- und shAnPRT als homogene Monomere vorliegen. Somit war die Identifikation von nativ monomeren AnPRTs mithilfe eines MSAs erfolgreich.

#### 4.1.3.2 Thermische Stabilität

Die thermische Denaturierung der gereinigten nativ monomeren AnPRTs wurde über die Abnahme des Fern-UV CD-Signals bei 220 nm (3.5.11) sowie durch differentielle Scanning Kalorimetrie (3.5.10) verfolgt, wodurch apparente Schmelztemperaturen ( $T_M^{\text{app}}$ ) bestimmt werden konnten. Zusätzlich wurden Kinetiken der irreversiblen thermischen Inaktivierung bei 40 °C aufgenommen, woraus Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) ermittelt wurden (3.5.9). In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der thermischen Denaturierung gemessen anhand des Fern-UV CD-Signals bei 220 nm und die Kinetik der irreversiblen Inaktivierung dargestellt.



**Abbildung 17: Thermische Stabilität nativ monomerer AnPRTs untersucht durch thermische Denaturierung (A) und irreversible thermische Inaktivierung (B).**

A: Die thermische Denaturierung von jeweils 10  $\mu\text{M}$  Proteinlösung erfolgte mit einer Rate von 1 °C/min von 20 – 100 °C in 50 mM KP, pH 7,5 und wurde über das Fern-UV CD-Signal bei 220 nm verfolgt.

B: Irreversible thermische Inaktivierung bei 40 °C. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  in 50 mM KP, pH 7,5 inkubiert, nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen, auf Eis inkubiert und die katalytische Restaktivität unter Substratsättigung bei 25 °C in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2 mM  $\text{MgCl}_2$  bestimmt. Dargestellt ist die Restaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Die ermittelten  $T_M^{\text{app}}$ - und  $t_{1/2}$ -Werte sind in Tabelle 8 aufgelistet.

**Tabelle 8: Übersicht über apparente Schmelztemperaturen ( $T_M^{\text{app}}$ ) und Halbwertszeiten ( $t_{1/2}^{40\text{ °C}}$ ).** Gezeigt sind  $T_M^{\text{app}}$ -Werte, ermittelt über das Fern-UV CD-Signal bei 220 nm (Abbildung 17 A) sowie über differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC). Für die DSC-Messungen wurden 25  $\mu\text{M}$  Protein, bei der CD-Spektroskopie 10  $\mu\text{M}$  Protein in 50 mM KP, pH 7,5 eingesetzt und in beiden Fällen ein Temperaturgradient von 20 – 100 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min gefahren. Die Halbwertszeiten  $t_{1/2}^{40\text{ °C}}$  der irreversiblen thermischen Inaktivierung (Abbildung 17 B) wurden mittels Computerfit (Sigma Plot 11.0) aus dem exponentiellen Abfall der Restaktivität bestimmt.

Mutante	$T_M^{\text{app}}_{\text{CD}}$ [°C]	$T_M^{\text{app}}_{\text{DSC}}$ [°C]	$t_{1/2}^{\text{app}}$ [min]
clAnPRT	49,8	51	24
saAnPRT	42,4	43	2
shAnPRT	42,5	43	5

Sh- und saAnPRT zeigen niedrige  $T_M^{app}$ -Werte von 42 - 43 °C und geringe  $t_{1/2}^{40\text{ °C}}$ -Werte von 5 bzw. 2 min, d. h. beide Enzyme sind thermolabil. Im Fall von clAnPRT liegt dagegen eine etwas höhere thermische Stabilität vor ( $T_M^{app} = 50 - 51\text{ °C}$ ,  $t_{1/2}^{40\text{ °C}} = 24\text{ min}$ ).

#### 4.1.3.3 Enzymatische Aktivität unter *steady-state* Bedingungen

Bei der Bestimmung der *steady-state* enzymkinetischen Parameter bei 25 °C (3.5.6) wurde zunächst die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der zugegebenen Konzentration an Magnesiumionen bestimmt. Es zeigte sich bei den drei nativ monomeren AnPRTs eine ähnliche Abhängigkeit wie bei ssAnPRT-D83G+F149S (Schlee *et al.*, 2009) mit einer optimalen Magnesiumkonzentration von 2 mM. Anschließend wurden in Anwesenheit von 2 mM  $Mg^{2+}$  mittels Sättigungskurven Werte für die Michaeliskonstanten für PRPP ( $K_M^{PRPP}$ ), für Anthranilat ( $K_M^{AA}$ ), sowie für die Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) und die Effizienzparameter ( $k_{cat}/K_M^{AA}$  und  $k_{cat}/K_M^{PRPP}$ ) bestimmt. In Tabelle 9 sind die ermittelten Parameter bei 25 °C aufgelistet.

**Tabelle 9: *Steady-state* enzymkinetische Parameter nativ monomer AnPRTs bei 25 °C.**

Die Bestimmung der katalytischen Parameter erfolgte durch die Aufnahme von Sättigungskurven in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 bei 25 °C mit variablen Konzentrationen der Substrate AA bzw. PRPP in Gegenwart optimaler  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen.  $k_{cat}$ : Wechselzahl;  $K_M$ : Michaeliskonstante für das jeweilige Substrat;  $k_{cat}/K_M$ : katalytischer Effizienzparameter. Bei der Bestimmung von  $K_M^{PRPP}$  und  $K_M^{AA}$  lag das jeweils zweite Substrat in sättigender Konzentration ( $> 10 \cdot K_M$ ) vor. Werte für  $K_M$  bzw.  $V_{max}$  wurden aus den erhaltenen Sättigungskurven mithilfe einer hyperbolischen Funktion (Sigma Plot 11.0) gefittet. Angegeben sind für  $k_{cat}$  ( $= V_{max}/[E_0]$ ) jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen, während für  $K_M$  jeweils der Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen angegeben ist.

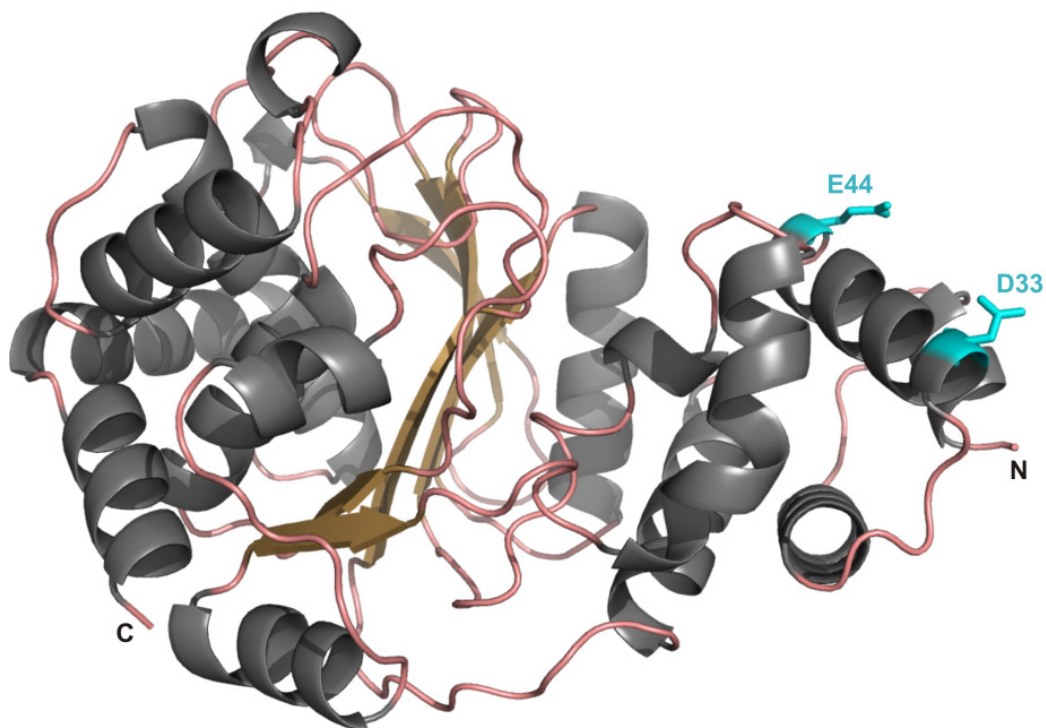
Mutante	$Mg^{2+}$ - Optimum [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_M^{AA}$ [μM]	$K_M^{PRPP}$ [μM]	$k_{cat}/K_M^{AA}$ [s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M^{PRPP}$ [s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]
clAnPRT	2	0,28 ± 0,03	0,10	86	2,8 · 10 <sup>6</sup>	3,3 · 10 <sup>3</sup>
saAnPRT	2	0,43 ± 0,01	0,07	150	6,1 · 10 <sup>6</sup>	2,9 · 10 <sup>3</sup>
shAnPRT	2	0,42 ± 0,05	0,09	116	4,7 · 10 <sup>6</sup>	3,6 · 10 <sup>3</sup>

Die nativ monomeren AnPRTs zeigen im Rahmen experimenteller Genauigkeit identische katalytische Parameter, wobei  $k_{cat}$  recht gering ist und  $K_M^{AA}$  um etwa drei Größenordnungen niedriger liegt als  $K_M^{PRPP}$ . Die ermittelten Werte für  $k_{cat}/K_M^{AA}$  und  $k_{cat}/K_M^{PRPP}$  lassen den Schluss zu, dass bei den jeweiligen Wachstumstemperaturen in allen Fällen eine halbwegs effiziente Enzymkatalyse stattfindet.

#### 4.1.3.4 Computermodelle

Für eine exakte Strukturbetrachtung wurde angestrebt mindestens eine nativ monomere AnPRT zu kristallisieren und die Röntgenstruktur zu lösen. Leider war es bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich geeignete Kristallisierungsbedingungen (3.5.15) zu finden, was wahrscheinlich an der geringen intrinsischen Stabilität der Proteine liegt.

Alternativ wurden Strukturen basierend auf Homologie-Modellierungen (I-TASSER, Zhang, 2008) generiert. In Abbildung 18 ist exemplarisch die modellierte Struktur von saAnPRT dargestellt.



**Abbildung 18: Strukturmodell von saAnPRT.**

Bänderdarstellung der über Homologie-Modellierung (I-TASSER, Zhang, 2008) generierten Struktur. Die gezeigten Aminosäurereste D33 und E44 am N- und C-Terminus von Helix  $\alpha_3$  (cyan) entsprechen den Resten I36 und M47 von ssAnPRT (siehe Abbildung 3 B).

Das Modell zeigt, dass die negativ geladenen Seitenketten von Asp33 und Glu44 ins Lösungsmittel zeigen und dadurch vermutlich die monomere Struktur stabilisieren. Die entsprechenden Reste Ile36 und Met47 in ssAnPRT sind hydrophob und stabilisieren das Dimer.

#### 4.1.4 Versuchte Dimerisierung nativ monomerer AnPRTs durch rationales Design

Analog zur Monomerisierung der dimeren ssAnPRT (Schwab *et al.*, 2008) sollten im Rahmen dieser Arbeit die nativ monomeren AnPRTs durch rationales Proteindesign dimerisiert werden. Die mittels I-TASSER erzeugten Strukturmodelle dienten als Grundlage für die gezielte Einführung von Aminosäuren, um eine Dimerisierungsfläche zu erzeugen. Vereinfachend wurde dabei angenommen, dass die Anordnung der Helices  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  und  $\alpha_8$  im Monomer identisch ist zu der Anordnung in homodimeren AnPRTs. In allen drei identifizierten nativ monomeren AnPRTs wurden die Reste an den beiden Schlüsselpositionen „36“ und „47“ sowie weitere exponierte und sterisch anspruchsvolle Reste gegen Aminosäureseitenketten ausgetauscht, die entweder bei ssAnPRT an der entsprechenden Position vorkommen oder im MSA konserviert vorliegen.

Die Nukleotidaustausche wurden schrittweise durch OE-PCR (3.3.3.2) in die verschiedenen *trpD*-Gene eingeführt. Die erzeugten Vollängenkonstrukte wurden mithilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III in den pQE40-Vektor kloniert und dienten gegebenenfalls als Templat für die nächste OE-PCR, bei welcher ein zusätzlicher Austausch eingefügt wurde. Nach jeder Klonierung wurde die beabsichtigte Nukleotidabfolge durch Sequenzierung mit den vektorspezifischen Primern *Cy*RI und *Cy*PstI bestätigt. In Tabelle 10 sind die erzeugten Mutanten aufgelistet, die nach heterologer Expression in *E. coli* KK8 Zellen (3.4.2) aus der löslichen Zellfraktion durch Metallchelate-Affinitätschromatographie (3.4.2.2) gereinigt werden konnten.

**Tabelle 10: Erzeugte und gereinigte Mutanten zur Dimerisierung nativ monomerer AnPRTs.**

Mutanten wurden durch zielgerichtete Mutagenese erzeugt, heterolog in *E. coli* hergestellt und gereinigt. Untersuchungen mit analytischer Gelfiltration zeigten, dass alle Mutanten monomer sind, wobei blau markierte Mutanten eindeutig symmetrische *peaks* lieferten, während rot markierte Mutanten deutliche Aggregationstendenzen zeigten.

clAnPRT	saAnPRT	shAnPRT
E36I+D47M	E44M	K44M
E35P+E36I+D47M	D33I+E44M	E33I+K44M
E35Q+E36I+D47M	D33I+E37A+E44M	E33I+D37F+K44M
	D33I+Y36S+E37A+E44M	E33I+D34L+K44M
		E33I+D34L+D37A+K44M
		E33I+D34L+D37S+K44M



Die Homogenität und der Oligomerisierungszustand der Mutanten wurden mithilfe von analytischer Gelfiltration (3.5.4) untersucht. Entgegen der Intention des Experiments konnte in keinem Fall ein Dimer nachgewiesen werden. Einige Mutanten lagen als homogenes Monomer vor (blau markiert), andere zeigten deutliche Anzeichen von Aggregation (rot markiert).

#### 4.1.5 Stabilisierung nativ monomerer AnPRTs

Um die Röntgenstruktur einer der nativ monomeren AnPRTs zu lösen und damit eine zuverlässigere Basis für die Dimerisierung zu schaffen, bedarf es einer Erhöhung der geringen intrinsischen Proteinstabilität (siehe Tabelle 8). Deshalb wurden die Erkenntnisse aus den Experimenten zur Stabilisierung von ssAnPRT (siehe 4.3) genutzt, um die nativ monomeren AnPRTs zu stabilisieren. Der T77I-Austausch führt zu einer dramatischen Erhöhung der konformationellen Stabilität von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) (siehe 4.3.5, Tabelle 22). An der korrespondierenden Position befindet sich bei sa- und shAnPRT jeweils ein Valin, während bei clAnPRT ein Threonin vorliegt. In allen drei Fällen wurde eine Mutation des Restes zu einem Isoleucin durchgeführt und der Effekt auf die Stabilität untersucht. Im Falle des Austausches T78I bei clAnPRT wurde dies von der Bachelorstudentin Alexandra Perras unter meiner Anleitung durchgeführt. Die Effekte der Austausche auf die thermische Stabilität der nativ monomeren AnPRTs sind in Tabelle 11 angegeben.

**Tabelle 11: Stabilisierung nativ monomerer AnPRTs durch gerichtete Mutagenese.**

Gezeigt sind  $T_M^{\text{app}}$ -Werte für die Einzelmутanten im Vergleich zum jeweiligen wildtypischen Protein (Werte stammen aus Tabelle 8), jeweils ermittelt über die Abnahme des Fern-UV CD-Signals bei 220 nm. Es wurden 10  $\mu\text{M}$  Protein in 50 mM KP, pH 7,5 eingesetzt und ein Temperaturgradient von 20 – 100 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min gefahren.

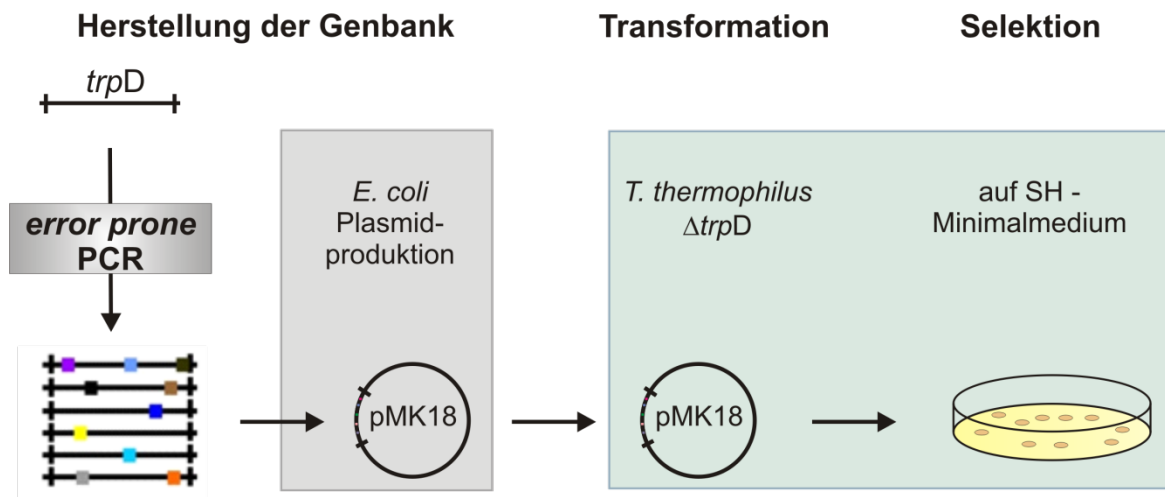
Mutanten	$T_M^{\text{app}}$ [°C]	$T_M^{\text{app}}$ (wt) [°C]	$\Delta T_M^{\text{app}}$ [°C]
clAnPRT-T78I	55,3	49,8	5,5
saAnPRT-V76I	43,7	42,4	1,3
shAnPRT-V76I	43,7	42,5	1,2

Der Austausch Valin gegen Isoleucin bei sa- und shAnPRT bewirkt eine moderate Stabilisierung um etwas mehr als 1 °C, während der Austausch Threonin gegen Isoleucin bei clAnPRT analog zum T77I-Austausch in ssAnPRT (4.3.4) einen deutlichen Effekt zeigt und den  $T_M^{\text{app}}$ -Wert um 5,5 °C heraufsetzt. Diese Mutante

wurde zusätzlich durch differentielle Scanning Kalorimetrie untersucht, wobei ein  $T_M^{\text{app}}$ -Wert von 58 °C gemessen wurde. Trotzdem gelang es nicht cAnPRT-T78I zu kristallisieren. Zur Identifikation weiterer stabilisierender Austausche wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Rainer Merkl (Lehrstuhl Biochemie II, Universität Regensburg) das von ihm entwickelte und noch unveröffentlichte Programm Neicons herangezogen. Die biochemische Evaluation dieser bioinformatischen Vorhersagen wird derzeit von der Bachelorstudentin Alexandra Perras durchgeführt.

## **4.2 Etablierung eines Selektionssystems in *T. thermophilus* zur Stabilisierung thermolabiler Enzyme**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte am Beispiel von AnPRT ein System zur Enzymstabilisierung in *T. thermophilus* mittels Bankenselektion etabliert werden. Dazu wurde zunächst das chromosomale *trpD*-Gen von *T. thermophilus* HB27 deletiert, wodurch sein Wachstum bei hohen Temperaturen in Abwesenheit von Tryptophan an die Anwesenheit eines Plasmides mit einem *trpD*-Gen gekoppelt wird, das für eine aktive und thermostabile AnPRT kodiert. Dieser Stamm kann dann mit einem in den *Shuttle*-Vektor pMK18 klonierten und in *E. coli* propagierten Repertoire an randomisierten *trpD*-Genen transformiert und auf Selektionsmedium bei hohen Temperaturen ausplattiert werden. Durch Isolierung der Plasmide aus den gewachsenen Zellen und Sequenzierung der Inserts werden dann die für die *in vivo* Komplementation verantwortlichen stabilisierenden Aminosäureaustausche identifiziert (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Schematische Darstellung der Bankenselektion auf thermostabilisierte AnPRT-Mutanten in *T. thermophilus*  $\Delta trpD$  Zellen.**

Zur Herstellung der Genbank wird zunächst ein *trpD*-Gen durch *error prone* PCR (3.3.3.3) randomisiert und über passende Restriktionsschnittstellen mit dem *E. coli* - *T. thermophilus* Shuttle-Vektor pMK18 ligiert (3.3.6). Anschließend werden elektrokompetente *E. coli* Zellen mit dem dialysierten Ligationsansatz transformiert und auf SOC<sub>Kana</sub>-Platten ausgestrichen (3.2.8). Aus den gewachsenen *E. coli* Zellen wird die Plasmid-Genbank isoliert (3.3.7.2). Auxotrophe *T. thermophilus*  $\Delta trpD$  (siehe 4.2.1) Zellen werden mit der Genbank transformiert (3.2.3) und auf SH-Minimalmedium (2.13) auf AnPRT-Aktivität bei der entsprechenden Temperatur selektiert.

#### 4.2.1 Erstellung von *T. thermophilus* $\Delta trpD$ -Deletionsstämmen

Zur Herstellung eines Tryptophan-auxotrophen *T. thermophilus* HB27  $\Delta trpD$  Stammes wurde das vollständige *trpD* Gen (*gene identifier* tk1491) aus dem Genom entfernt und durch einen Selektionsmarker ersetzt, der eine Antibiotikaresistenz vermittelt. Die Abbildung 20 gibt die genomische Organisation des *trpD*-Gens wieder.



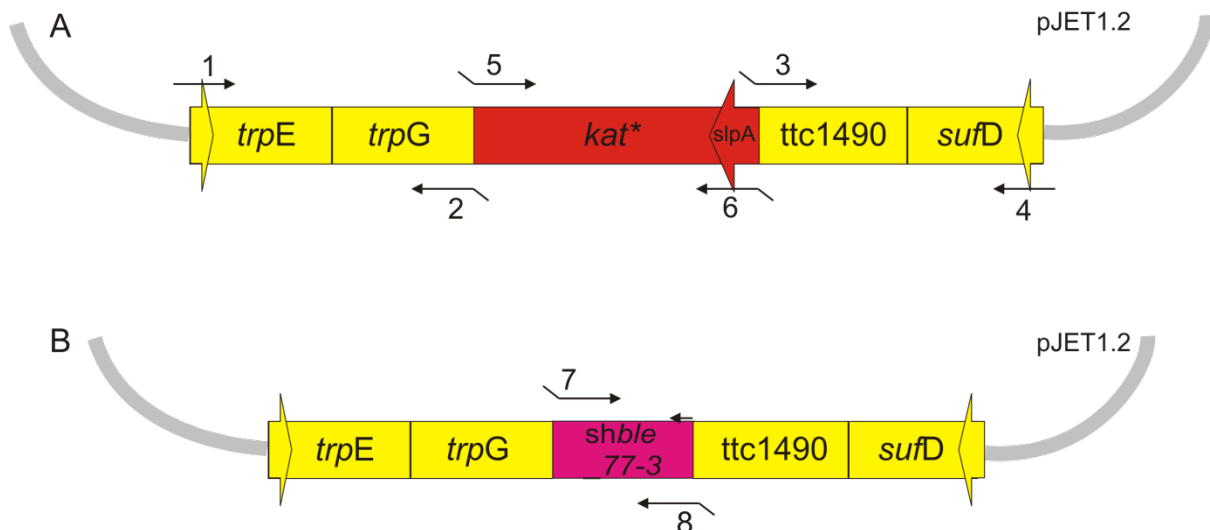
**Abbildung 20: Genomische Organisation des *trpD*-Gens in *T. thermophilus* HB27.**

Schematische Darstellung des 3'-Endes des Tryptophan Operons in *T. thermophilus* HB27 mit angrenzenden Bereichen: *trpE*, *trpG* und *trpD*: Gene für den Anthranilat-Synthase Komplex und AnPRT; *ttc1490*: Gen unbekannter Funktion, *suflD*: Gen für ATP-Bindeprotein eines ABC-Transporters.

Als vorteilhaft erwies sich dabei die Tatsache, dass sich das Zielgen am Ende des Tryptophan-Operons befindet. Dadurch können bei der Integration eines anderen Gens bzw. eines alternativen Promotors keine polaren Effekte auf die restlichen Gene des Operons auftreten. Nachdem die stromabwärts befindlichen Gene in

umgekehrter Leserichtung vorliegen, sind für diese Gene ebenfalls keine polaren Effekte zu erwarten.

An die 5'- und 3'-Enden der verwendeten Selektionsmarker *kat\** (vermittelt Resistenz gegenüber Kanamycin bis 70 °C, Liao *et al.*, 1986) bzw. *shble*\_77-3 (vermittelt Resistenz gegenüber Bleomycin bis 72 °C, Brouns *et al.*, 2005) wurden jeweils unmittelbar stromaufwärts bzw. stromabwärts des zu entfernenden *trpD*-Anteils gelegenen Sequenzbereiche (je ca. 1 kb) fusioniert. Sie entsprechen den 3'-terminalen Bereichen von *trpE* plus *trpG* bzw. *ttc1490* plus *sufD* (Abbildung 21). Die resultierenden Fusionskonstrukte wurden durch *blunt end* Ligation mit dem Vektor pJET1.2 (2.8.3) verbunden und das resultierende Konstrukt in *E. coli* Turbo (2.6.1) Zellen propagiert.



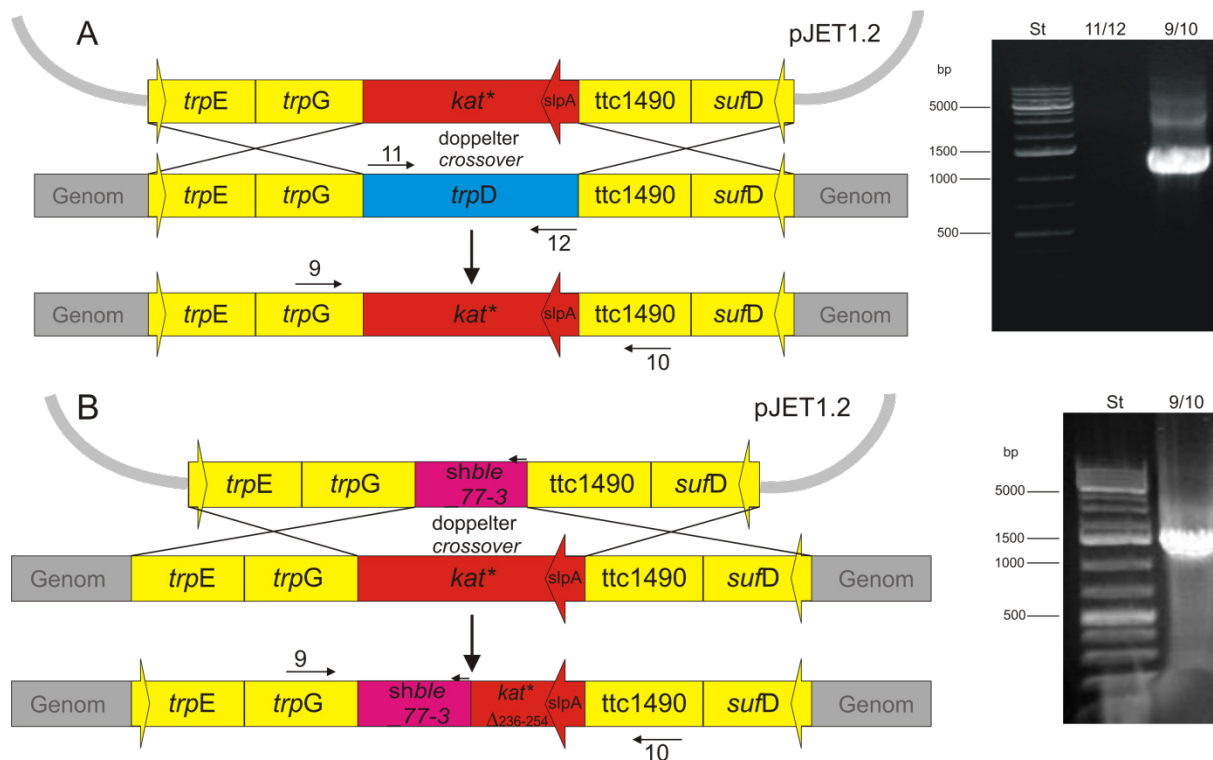
**Abbildung 21: Schematische Darstellung der in pJET1.2 klonierten  $\Delta trpD$ -Deletionskonstrukte.**

Herstellung des in A gezeigten Konstruktes pJET1.2\_trpEG/*kat\**/ttc1490*sufD*: Durch PCR auf genomischer DNA von *T. thermophilus* wurden über die Primerpaare 1/2 und 3/4 überlappende Fragmente erzeugt. Diese wurden über OE-PCR (3.3.3.2) zusammengefügt und das Fusionskonstrukt in den Vektor pJET1.2 ligiert (3.3.6.2). In dieses Fusionskonstrukt konnte mittig der Selektionsmarker *kat\** über die mit den Primern 2 und 3 eingebrachte *EcoRI*-Schnittstelle eingefügt werden. Der Genabschnitt *kat\** wurde mithilfe des Primerpaares 5/6 aus dem Plasmid pMK18 (de Grado *et al.*, 1999) über PCR amplifiziert und dabei an beiden Enden eine *EcoRI*-Schnittstelle eingebracht. Die Leserichtung des *kat\**-Gens wurde durch den gleichzeitig eingebrachten starken *slpA*-Promotor festgelegt.

Herstellung des in B gezeigten Konstruktes pJET1.2\_trpEG/*shble*\_77-3/ttc1490*sufD*: Analog zu A wurde über die *EcoRI*-Schnittstelle der Selektionsmarker *shble*\_77-3 in das Konstrukt integriert. Dieser wurde zuvor aus dem von Prof. Dr. van der Oost (Wageningen University) zur Verfügung gestellten pMK18-*shble*\_77-3-Konstrukt mit dem Primerpaar 7/8 über PCR amplifiziert. Nachdem der Marker ohne eigenständigen Promotor kloniert wurde, sollte die Expression unter Verwendung eines genomischen Promoters erfolgen. Das Startcodon des Gens wird durch den kleinen Pfeil dokumentiert.

Für die beiden klonierten Deletionskonstrukte wurde die Nukleotidabfolge durch DNA-Sequenzierung bestimmt (3.3.11). Die Bezeichnungen der verwendeten Primer sind in Tabelle 12 erläutert, wobei deren Nukleotidabfolge in Abschnitt 2.9.7 dokumentiert ist.

Die erzeugten pJET1.2-Konstrukte wurden verwendet, um durch homologe Rekombination über doppelten *crossover* die gewünschten  $\Delta trpD$ -Deletionstämme herzustellen (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Strategie zur Herstellung von *T. thermophilus*  $\Delta trpD$ -Deletionsstämmen über homologe Rekombination und Verifizierung über PCR-Analyse.**

A: Herstellung von  $\Delta trpD_{kat^*}$ : Durch einen doppelten *crossover* über die flankierenden Regionen wird *trpD* durch *kat\** (inklusive des konstitutiv aktiven Promotors *slpA*) ersetzt. Dieses Rekombinationsereignis führt zu einer Tryptophan-Auxotrophie sowie einer Resistenz gegen Kanamycin, auf die selektiert werden kann. Durch PCR-Analyse mit den Primerpaaren 9/10 bzw. 11/12 wurde die Integration des *kat\**-Gens bzw. der Verlust des *trpD*-Gens überprüft. Das Ergebnis ist auf dem rechts dargestellten 1 % igen Agarosegel gezeigt. St: *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder* (2.10). Die beabsichtigte Nukleotidabfolge an der Integrationsstelle wurde durch DNA-Sequenzierung des mit dem Primerpaar 9/10 erzeugten PCR-Produktes verifiziert (siehe Anhang 7.5).

B: Herstellung von  $\Delta trpD_{shble\_77-3}$ : Durch einen doppelten *crossover* über die flankierenden Regionen wird *kat\** teilweise durch *shble\_77-3* ersetzt. Dieses Rekombinationsereignis führt zu einer Resistenz gegenüber Bleomycin, auf die selektiert werden kann, und zu einem Verlust der Kanamycin-Resistenz. Durch PCR-Analyse mit dem Primerpaar 9/10 und anschließender Sequenzierung des auf dem rechts dargestellten 1 % igen Agarosegel gezeigten PCR-Produktes konnte die Integration von *shble\_77-3* und die Deletion der C-terminalen 54 bp von *kat\** eindeutig belegt werden (siehe Anhang 7.5). Die Genfragmente *kat\** <sub>$\Delta 236-254$</sub>  und *shble\_77-3* befinden sich dabei nicht in einem Leserahmen, d. h. es wird kein Fusionsprotein exprimiert. Der vorliegende Stamm  $\Delta trpD_{shble\_77-3}$  zeigt neben der Tryptophan-Auxotrophie eine Resistenz gegen Bleomycin (15  $\mu$ g/ml) und wurde in der Folge für *in vivo* Komplementationen (4.2.2) verwendet.

Die Bezeichnungen der verwendeten Primer sind in Tabelle 12 erläutert, wobei deren Nukleotidabfolge in Abschnitt 2.9.7 dokumentiert ist.

Nach Transformation von *T. thermophilus* Zellen (3.2.3) mit 5  $\mu$ g des Konstruktes pJET1.2\_*trpEG/kat\*/ttc1490sufD* wurde durch homologe Rekombination über einen

doppelten *crossover* eine vollständige Deletion des *trpD*-Gens erreicht (Abbildung 22 A). Transformierte Zellen mit dem gewünschten Genaustausch wurden durch Selektion auf TB<sub>Kana</sub>-Mediumplatten bei 68 °C über den Erwerb der Antibiotikaresistenz identifiziert, wobei die selektierten Zellen zusätzlich auf SH<sub>Kana</sub>-Minimalmedium auf Tryptophan-Auxotrophie getestet wurden. Die genomische DNA der selektierten  $\Delta trpD\_kat^*$  Zellen wurde isoliert (3.3.8) und durch PCR-Analyse mit den Primerpaaren 9/10 sowie 11/12 untersucht. Das Primerpaar 9/10 liefert ein Konstrukt mit einer erwarteten Größe von 1450 bp, während das Primerpaar 11/12 *trpD*-spezifisch ist und bei erfolgreicher Deletion des *trpD*-Gens kein Produkt entsteht (Abbildung 22 A). Des Weiteren konnte über DNA-Sequenzierung des mit dem Primerpaar 9/10 erzeugten PCR-Produktes der erwartete Genaustausch verifiziert werden. In einer ersten Phase wurden die *in vivo* Komplementationsexperimente (siehe 4.2.2) mit diesem Stamm durchgeführt, wobei bei der Transformation mit den pMK18-Konstrukten keine Antibiotikaselektion auf Plasmidaufnahme durchgeführt werden konnte, da der  $\Delta trpD\_kat^*$  Stamm den identischen Kanamycin-Resistenzmarker trägt wie pMK18.

Daher wurden die  $\Delta trpD\_kat^*$  Zellen mit 5 µg pJET1.2\_*trpEG/shble\_77-3/ttc1490sufD* transformiert, um mithilfe homologer Rekombination über einen doppelten *crossover* den alternativen Bleomycin-Resistenzmarker *shble\_77-3* ins Genom zu integrieren (Abbildung 22 B). Die Selektion auf transformierte Zellen mit dem gewünschten Genaustausch erfolgte bei 68 °C auf TB<sub>Bleo</sub>-Mediumplatten, wobei die selektierten Zellen anschließend auf den Verlust der Kanamycin-Resistenz getestet wurden. Die genomische DNA der selektierten  $\Delta trpD\_shble\_77-3$  Zellen (Bleo<sup>R+</sup>, Kana<sup>R-</sup>) wurde über PCR-Analyse mit dem Primerpaar 9/10 und Sequenzierung des Amplifikationsproduktes überprüft. Es zeigte sich eine Deletion von 54 bp am 3'-Ende des *kat*<sup>\*</sup>-Gens und eine vollständige Integration des *shble\_77-3* Gens ins Genom (Abbildung 22 B). Aufgrund der geringeren Insertgröße von *shble\_77-3* (396 bp) im Vergleich zu dem Konstrukt *slpA+kat*<sup>\*</sup> (956 bp) war die nur teilweise erfolgte Deletion der Kanamycin-Resistenzkassette vorhersehbar. Dennoch konnten durch die Selektion auf Bleomycin-Resistenz und anschließendem Screening auf Verlust der Kanamycin-Resistenz, Zellen mit dem gewünschten Phänotyp isoliert werden. Durch die Deletion des 3'-Endes von *kat*<sup>\*</sup> wird die Expression einer vollständigen, thermostabilen Kanamycin-Nukleotidyltransferase verhindert, während die Expression des thermostabilisierten Bleomycinbindepoteins

in einem ausreichenden Maße stattfindet. Es ist ferner an diesem Punkt anzunehmen, dass die Expression des Bleomycinbindeproteins durch den Promotor *slpA* gewährleistet wird.

Die verwendeten Primer zur Erstellung der Konstrukte und zur Überprüfung der Deletionen sind in Tabelle 12 aufgelistet.

**Tabelle 12: In Abbildung 21 und 22 eingezeichnete Primer zur Herstellung und Überprüfung der *T. thermophilus* HB27  $\Delta trpD$ -Deletionsstämme.**

Die Sequenzen der aufgelisteten Primer finden sich unter 2.9.7.

1:	5' <i>trpG_HindIII</i>	7:	5' <i>slpshble EcoRI</i>
2:	3' <i>trpE_EcoRI</i>	8:	3' <i>shble_EcoRI</i>
3:	5' <i>ttc1491_EcoRI</i>	9:	5' <i>trpE_thermus</i>
4:	3' <i>sufD_SphI</i>	10:	3' <i>ppd-sufD_thermus</i>
5:	5' <i>EcoRI+Kana<sup>R</sup></i>	11:	5' <i>tttrpD HindIII pMK</i>
6:	3' <i>EcoRI+Kana<sup>R</sup></i>	12:	3' <i>tttrpD XbaI</i>

#### 4.2.2 Komplementationstests

Durch *in vivo* Komplementation (3.2.10) mit dem wildtypischen *trpD*-Gen aus *T. thermophilus* (*tttrpD*), kodiert auf dem pMK18 Plasmid, wurde die Funktionalität der beiden  $\Delta trpD$ -Deletionsstämme überprüft. Transformierte Zellen beider Stämme wuchsen nach 48 h Inkubation bei 70 °C auf SH-Minimalmediumplatten (2.13) zu sichtbaren Kolonien heran, d. h. plasmidkodiertes ttAnPRT konnte den Verlust des chromosomalen Gens komplementieren. Die Fähigkeit zur *in vivo* Komplementation von  $\Delta trpD_{kat^*}$  Zellen wurde auch mit weiteren pMK18-*trpD*-Konstrukten getestet (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Ergebnisse der *in vivo* Komplementation.**

Die aufgelisteten AnPRT Proteine wurden als pMK18-Konstrukte auf *in vivo* Komplementation von  $\Delta trpD_{kat^*}$  bei 70 °C getestet. Die Zeit bis zum Erscheinen sichtbarer Kolonien auf SH-Minimalmediumplatten betrug in erfolgreichen Fällen jeweils 48 h. Die Fähigkeit zur Komplementation korreliert mit der apparenten Schmelztemperatur  $T_M^{app}$  der Proteine, wobei bei ttAnPRT keine *in vitro* Charakterisierung durchgeführt wurde und folglich kein  $T_M^{app}$  bekannt ist. n.b.: nicht bestimmt.

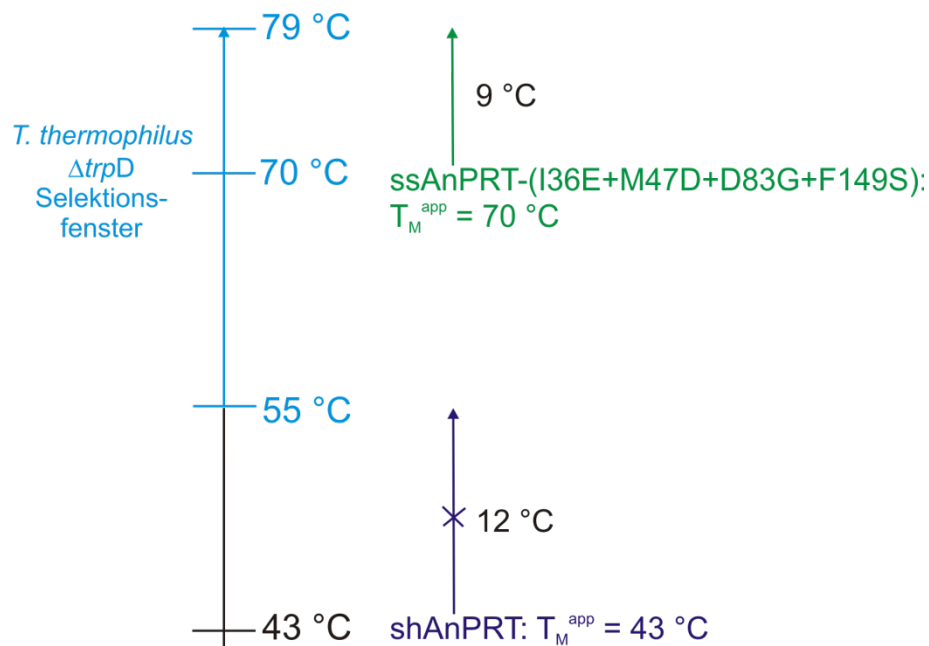
Protein	Komplementation	$T_M^{app}$ [°C]
ttAnPRT	+	n.b.
ssAnPRT	+	92
ssAnPRT-I36E+M47D	+	80
ssAnPRT-D83G+F149S	+	82
ssAnPRT-I36E+M47D+D83G+F149S	+	70
saAnPRT	-	42
shAnPRT	-	42

Bei allen Ansätzen wurden 5 µg Plasmid-DNA für die Transformation (3.2.3) eingesetzt. In allen Fällen wurde Wachstum auf Kontrollplatten mit supplementiertem Tryptophan (SH<sup>Trp</sup>-Minimalmedium) nach 48 h beobachtet. Auf SH-Minimalmedium konnten die Gene für wildtypisches, für monomeres (I36E+M47D) und für aktiviertes (D83G+F149S) ssAnPRT die Tryptophandefizienz der  $\Delta trpD\_kat^*$  Zellen bei 70 °C komplementieren, während die Zellen mit thermolabilen, nativ monomeren AnPRTs (sa- und shAnPRT, 4.1.3.2) kein Wachstum zeigten (Tabelle 13) und als Negativkontrolle dienten. Die Variation der Temperatur bei dem Experiment mit der pMK18-kodierten ssAnPRT-D83G+F149S-Mutante ergab Wachstum der *T. thermophilus*  $\Delta trpD$  Zellen auf SH-Minimalmedium in einem Temperaturbereich von 55 – 79 °C. Dabei korrelierte die Komplementationsdauer mit der Inkubationstemperatur (Komplementation bei 55 °C nach 72 d, bei 70 °C nach 48 h und bei 79 °C nach 36 h).

Aufgrund der unterschiedlichen Antibiotikaresistenz von Vektor und Selektionsstamm bei Verwendung der  $\Delta trpD\_shble\_77-3$  Zellen wurde bei erfolgreicher Transformation neben dem Test auf *in vivo* Komplementation, auch die Transformationseffizienz bestimmt (3.2.9). Dabei wurden Verdünnungen des Transformationsansatzes auf TB<sub>Kana,Bleo</sub>-Platten ausgebracht. Die Effizienzen des beschriebenen Transformationsvorgangs mit i.d.R. 5 µg Plasmid-DNA lagen in einem Bereich von  $3 \cdot 10^3 - 8 \cdot 10^4$  Kolonien/µg DNA.

Die Erkenntnisse der *in vivo* Komplementationen waren die Grundlage für die Selektion von thermostabilen AnPRT-Mutanten in dem in Abbildung 19 beschriebenen System. Als Zielproteine für eine derartige Stabilisierung wurden das aktivierte Monomer ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) und shAnPRT ausgewählt, da es sich von den drei nativ monomeren AnPRTs am besten handhaben lässt. Das Protein ist sehr löslich und lässt sich gut aufreinigen, obwohl die apparente Schmelztemperatur nur bei 43 °C liegt (Tabelle 8). Daher wurde die Selektion der *shtrpD*-Genbank im untersten Temperaturbereich des *T. thermophilus* Wachstums bei 55 – 60 °C durchgeführt. Bei der Stabilisierung von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S), welches eine apparente Schmelztemperatur von 70 °C hat (Tabelle 13), wurde die Selektion bei 79 °C durchgeführt. Die in beiden Fällen zu überwindende Temperaturbarriere von der apparenten Schmelztemperatur bis zur Selektionstemperatur ist in Abbildung 23 dargestellt.





**Abbildung 23: Schematische Darstellung des zur Verfügung stehenden Selektionsfensters sowie der angestrebten Stabilisierungen von zwei AnPRT Proteinen.**

Die *T. thermophilus*  $\Delta trpD$  Zellen sind in einem Temperaturbereich von 55 – 79 °C zum Wachstum auf SH-Minimalmedium nach Komplementation der Tryptophan-Defizienz durch eine in diesem Temperaturbereich stabile und aktive AnPRT-Mutante fähig. Bei der Stabilisierung von shAnPRT ( $T_M^{app} = 43\text{ °C}$ ) muss somit eine Temperaturbarriere von mindestens 12 °C überwunden werden. Dies konnte in mehreren Versuchen nicht erzielt werden (siehe 4.2.3). Bei der Stabilisierung von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) ( $T_M^{app} = 70\text{ °C}$ ) liegt eine Barriere von maximal 9 °C vor (siehe 4.3.2).

#### 4.2.3 Versuch zur Stabilisierung von shAnPRT

Zunächst wurde versucht shAnPRT mithilfe der beschriebenen Methodik zu stabilisieren. Die Genbanken wurden in *E. coli* Zellen erzeugt (3.3.10) und zur Transformation von (3.2.3) und Selektion in (3.2.10) *T. thermophilus* Zellen verwendet. Am Beispiel der Stabilisierung von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) wird in Abschnitt 4.3.1 die Auswertung einer erstellten Genbank sowie in Abschnitt 4.3.2 eine detaillierte Beschreibung der Transformation und Selektion gezeigt.

Zur Stabilisierung von shAnPRT wurden drei verschiedene Genbanken hergestellt (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Anzahl und Verteilung der Nukleotidaustausche bei 10 zufällig ausgewählten Klonen der *shtrpD*-Genbanken 1, 2 und 3.**

Um die Diversität der *shtrpD*-Mutanten zu maximieren, wurden drei verschiedene Genbanken mit einer hohen Mutationsrate in pMK18 hergestellt. Es wurde jeweils das komplette *shtrpD*-Gen durch *epPCR* randomisiert, wobei die vektorspezifischen Primer M13 *forward* und *reverse* M13 und das Templat pMK18-*shtrpD* verwendet wurden. Die anschließende Klonierung des Fragmentgemisches in pMK18 erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *XbaI*. Die Präparationen der Genbank wurden nach dem in 3.3.10 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

	<b><i>shtrpD</i>-Genbank 1</b>	<b><i>shtrpD</i>-Genbank 2</b>	<b><i>shtrpD</i>-Genbank 3</b>
<b>Transitionen (Ts)</b>	<b>53,2 %</b>	<b>62,5 %</b>	<b>65,2 %</b>
T/C	15,6 %	10,3 %	18,8 %
C/T	6,5 %	10,3 %	5,8 %
A/G	23,4 %	25,0 %	33,3 %
G/A	7,8 %	16,9 %	7,2 %
<b>Transversionen (Tv)</b>	<b>46,8 %</b>	<b>37,5 %</b>	<b>34,8 %</b>
A/T	23,4 %	15,4 %	11,6 %
T/A	5,2 %	15,4 %	10,1 %
G/T	2,6 %	0,7 %	1,4 %
T/G	2,6 %	0,7 %	0,0 %
A/C	9,1 %	2,9 %	5,8 %
C/A	2,6 %	2,2 %	4,3 %
G/C	1,3 %	0,0 %	0,0 %
C/G	0,0 %	0,0 %	1,4 %
Ts/Tv	1,1	2	1,9
AT-Austausche	79,2	69,9	79,7
GC-Austausche	20,8	30,1	20,3
Mutationen/Gen (Mittelwert)	9,6 (4 - 15)	15,1 (10 - 20)	11,5 (7 - 18)
Größe der Genbank (G)	$\sim 7 \cdot 10^5$	$\sim 5 \cdot 10^7$	$\sim 2 \cdot 10^7$

Nachdem zu diesem Zeitpunkt die *T. thermophilus*  $\Delta trpD\_shble\_77-3$  Zellen noch nicht hergestellt waren, wurden  $\Delta trpD\_kat^*$  Zellen mit den erzeugten Plasmid-Genbanken transformiert und verschiedene Selektionsansätze auf SH-Minimalmediumplatten mit Kanamycin bei 55 – 60 °C durchgeführt. Da die transformierten  $\Delta trpD\_kat^*$  Zellen ebenso wie die verwendeten pMK18-Plasmidkonstrukte über eine Kanamycin-Resistenz verfügen, konnte in dieser Phase des Projekts keine Bestimmung der Transformationseffizienz (3.2.9) erfolgen. Nach 10 d Inkubationsdauer konnte bei keiner Selektionstemperatur Koloniewachstum beobachtet werden. Es konnten somit aus den Genbanken keine stabilisierten shAnPRT-Mutanten durch *in vivo* Komplementation isoliert werden, was wahrscheinlich an der zu hohen Stabilisierungsbarriere von 12 °C liegen dürfte (Abbildung 23).

### 4.3 Stabilisierung monomerer ssAnPRT-Mutanten

Die Mutante ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) vereint durch die vier Punktmutationen folgende Eigenschaften. Die Austausche I36E+M47D führen zur Monomerisierung von ssAnPRT bei gleichbleibender Aktivität (Schwab *et al.*, 2008), während D83G die Magnesiuminhibition aufhebt und F149S die Flexibilität des Enzyms erhöht, wodurch die Wechselzahl deutlich gesteigert wird (Schlee *et al.*, 2009). Die Kombination dieser vier Mutationen führt zu einer drastischen Reduktion der Thermostabilität. Die apparente Schmelztemperatur nimmt im Vergleich zum wildtypischen ssAnPRT von 91,5 auf 70,1 °C, d. h. um 21,5 °C ab (siehe Tabelle 24). Mithilfe der in Abschnitt 4.2 beschriebenen Strategie wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Stabilisierung dieser Vierfachmutante durch Bankenselektion durchgeführt. Kontrollexperimente zeigten, dass die Tryptophan-Defizienz von *T. thermophilus*  $\Delta trpD$  Zellen durch diese Mutante bei 70 °C komplementiert wird, während bei höheren Temperaturen (72,5, 75, 77,5 und 79 °C) i.d.R. kein Wachstum festgestellt wurde. Wie in 4.2.3 beschrieben, korreliert die apparente Schmelztemperatur mit der Fähigkeit der Komplementation bei gegebener Temperatur. Daher wurde die Selektion auf thermostabilere Mutanten von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) zwischen 75 und 79 °C durchgeführt.

#### 4.3.1 Genbankherstellung

Für die Erstellung einer Genbank (3.3.10) wurde das komplette *sstrpD*-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Gen durch *ep*PCR (3.3.3.3) randomisiert. Nach Transformation von *E. coli* Turbo (2.6.1) Zellen mit der erzeugten Genbank und Ausplattierung auf 29 großen SOC-Agarplatten mit Kanamycin wurden ca.  $1,1 \cdot 10^7$  Kolonien erhalten. Kolonie-PCR (3.3.2) von 20 Klonen ergab, dass die Ligationseffizienz bei 85 % lag. Daraus errechnet sich eine Genbank-Größe von  $9 \cdot 10^6$  unabhängigen Mutanten. Zur Bestimmung der Anzahl und Verteilung der Mutationen wurde bei zehn Klonen das pMK18-Insert vollständig sequenziert und mit der Ausgangssequenz verglichen (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Anzahl und Verteilung der Nukleotidaustausche bei 10 zufällig ausgewählten Klonen der *sstrpD*-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Genbank.**

Es wurde das komplette *sstrpD*-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Gen durch *ep*PCR randomisiert, wobei die vektorspezifischen Primer M13 *forward* und *reverse* M13 und das Templat pMK18-*sstrpD*-(I36E+M47D+D83G+F149S) verwendet wurden. Die anschließende Klonierung des Fragmentgemisches in pMK18 erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *Hind*III und *Xba*I. Die Präparationen der Genbank wurden nach dem in 3.3.10 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

<b><i>sstrpD</i>-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Genbank</b>	
<b>Transitionen (Ts)</b>	<b>58,3 %</b>
T/C	14,2 %
C/T	15,0 %
A/G	14,2 %
G/A	15,0 %
<b>Transversionen (Tv)</b>	<b>41,7 %</b>
A/T	19,2 %
T/A	14,2 %
G/T	2,5 %
T/G	0,8 %
A/C	0,0 %
C/A	4,2 %
G/C	0,8 %
C/G	0,0 %
Ts/Tv	1,4
AT-Austausche	62,5 %
GC-Austausche	37,5 %
Mutationen/Gen (Mittelwert)	12,0 ± 3,9
Mutationen/Gen (Medianwert)	11,0 (6 – 17)
Größe der Genbank (G)	~ 9 · 10 <sup>6</sup>

Wie in der Literatur beschrieben (Vanhercke *et al.*, 2005), ist die Verteilung der Basenaustausche bei Zufallsmutagenese in Gegenwart von MnCl<sub>2</sub> sehr ungleichmäßig. Mit einem Verhältnis von 62,5 % versus 37,5 % überwiegen bei der Genbank AT-Austausche deutlich gegenüber GC-Austauschen, was die Vielfalt des Genrepertoires einschränkt. Das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen war mit 1,4 relativ ausgeglichen. Die Wahrscheinlichkeit, dass durch einen Basenaustausch eine Aminosäure ausgetauscht wird, beträgt an Position 1 eines Codons 96 %, an Position 2 99 % und an Position 3 32 %. Durchschnittlich ergibt das eine Wahrscheinlichkeit von 75 %, dass ein Basenaustausch den Austausch einer Aminosäure zur Folge hat. Das bedeutet, dass mit den erzielten 12 Nukleotidaustauschen pro Gen im Durchschnitt neun Aminosäureaustausche pro Protein zu erwarten sind. Dabei ist zu berücksichtigen, dass ssAnPRT insgesamt 344

Aminosäuren enthält. Einschränkend ist anzumerken, dass aus der Genbank mit  $9 \cdot 10^6$  Varianten lediglich 10 Sequenzen zur Analyse herangezogen wurden. Deshalb sind die vorliegenden Ergebnisse nicht unbedingt repräsentativ für die gesamte Genbank und können nur eine grobe Abschätzung geben. Wie in 3.3.10 beschrieben, wurde diese Plasmidgenbank durch erneute Transformation von *E. coli* Turbo Zellen vervielfältigt, um genug Material für mehrere Selektionen bei verschiedenen Temperaturen zu erhalten.

#### 4.3.2 Selektion der Genbank in *T. thermophilus* $\Delta trpD$

Zur Selektion thermostabilisierter ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten wurden  $\Delta trpD\_shble\_77-3$  Zellen mit der Plasmidgenbank transformiert. Durch Kenntnis der durchschnittlichen Transformationseffizienz ( $3 \cdot 10^3 - 8 \cdot 10^4$  Kolonien/ $\mu$ g DNA; 4.2.2) sowie der Größe des Genbankrepertoires ( $9 \cdot 10^6$ ) wurde die benötigte Masse an Plasmid abgeschätzt, um das vollständige Genrepertoire in den Zellen zu repräsentieren. Diese betrug 0,4 mg pMK18-DNA. Da die DNA-Masse pro Anzahl an *T. thermophilus* Zellen bei der beschriebenen Methode der Transformation (3.2.3) nicht beliebig erhöht werden kann (Koyama *et al.*, 1986), wurde die Zellzahl heraufgesetzt. Zu diesem Zweck wurde das Volumen der Zellen von 1 ml auf 200 ml erhöht, wobei vier Kolben mit jeweils 50 ml Zellsuspension mit je 0,1 mg Plasmidgenbank versetzt wurden. Nach der Transformation wurden die Zellen dreimal mit je 50 ml 1 % NaCl gewaschen und in einem Endvolumen von 9 ml in 1 % NaCl aufgenommen. Dann wurden die Zellen auf 30 große SH-Minimalmediumplatten unverdünnt ausplattiert, wobei für jede Platte 300  $\mu$ l Zellsuspension verwendet wurden. Anschließend erfolgte die Inkubation der Platten bei der gewählten Temperatur. Die ausplattierte Zelldichte auf den SH-Minimalmediumplatten war vergleichbar wie bei den Versuchen zur Stabilisierung von shAnPRT (4.2.3). Da bei diesen Ansätzen kein Koloniewachstum erkennbar war, ist es unwahrscheinlich, dass die ausplattierte Zelldichte zu *cross-feeding* (Smith-Keary, 1971) der Zellen führt und *in vivo* Komplementation nur vorgetäuscht wird. Es ist ferner anzumerken, dass den SH-Minimalmediumplatten kein Antibiotikum zugegeben wurde, da bei den verwendeten Temperaturen (75, 77,5 und 79 °C) die Antibiotikamarker nicht funktional sind. Eine Selektion auf Plasmidaufnahme ist an diesem Punkt nicht nötig, da die Selektion auf AnPRT-Aktivität bei entsprechender Temperatur ausreichend ist. Zusätzlich wurden Aliquots von Verdünnungen (1:10,

1:100 und 1:1000) der transformierten Zellsuspension auf TB-Selektivagarplatten (TB<sub>Kana,Bleo</sub>) ausplattiert und bei 68 °C inkubiert, um die Transformationseffizienz zu bestimmen (3.2.9). Als Negativkontrolle wurde nicht randomisiertes pMK18-*sstrpD*- (I36E+M47D+D83G+F149S) gewählt, wobei in keinem Fall Wachstum auf den SH-Minimalmediumplatten zu beobachten war. Auf eine Positivkontrolle wurde verzichtet, um eine Kontamination der Selektion mit derselben auszuschließen.

Das beschriebene Prozedere wurde zweimal durchgeführt, wobei die Selektionstemperatur der Platten variiert wurde (Ansatz 1: 30 Platten bei 75 °C; Ansatz 2: 10 Platten bei 77,5 °C und 20 Platten bei 79 °C). Nach 36 – 48 h wurde Wachstum auf den Selektionsplatten beobachtet, wobei kein Unterschied in der Größe der einzelnen Kolonien festgestellt werden konnte. In Tabelle 16 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

**Tabelle 16: Ergebnisse der Bibliothekenselektion.**

T<sub>Sel</sub>: Temperatur während der Selektion; Klon/Platte: durchschnittliche Anzahl von komplementierenden Klonen pro großer Selektionsplatte;  $\Sigma$  Klone: Summe der komplementierenden Klone bei der jeweiligen Selektionstemperatur.

T <sub>Sel</sub> [°C]	Klone/Platte	$\Sigma$ Klone
75	200	~6000
77,5	17	170
79	5	100

Je höher der Selektionsdruck, in diesem Fall die Temperatur, desto weniger Klone wuchsen auf den Selektionsplatten. Durch Auszählung des Koloniewachstums auf den TB<sub>Kana,Bleo</sub>-Agarplatten konnte die Transformationseffizienz (Ansatz 1:  $T_E = 2,3 \cdot 10^4$  Kolonien/ $\mu$ g DNA, Ansatz 2:  $T_E = 7,6 \cdot 10^4$  Kolonien/ $\mu$ g DNA) und die Anzahl der insgesamt transformierten  $\Delta trpD\_shble\_77-3$  Zellen abgeschätzt werden (Ansatz 1:  $4,0 \cdot 10^6$ , Ansatz 2:  $3,0 \cdot 10^7$ ). Bei Ansatz 2 kann daher angenommen werden, dass das vollständige Repertoire der Genbank ( $9 \cdot 10^6$  unabhängige Varianten) beim Komplementationstest repräsentiert war. Ferner konnte durch den Vergleich der Anzahl der insgesamt in den Transformationsansatz eingesetzten Zellen mit der eingesetzten Plasmid-Menge berechnet werden, dass 0,05 % aller DNA-Moleküle von den Zellen aufgenommen wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei der Transformation von *E. coli* Zellen mit einer typischen  $T_E = 1,0 \cdot 10^7$

Kolonien/ $\mu\text{g}$  DNA im Vergleich dazu ca. 7 % aller DNA-Moleküle von den Zellen aufgenommen.

Es wurden in der Folge Klone analysiert, die unter den stringentesten Bedingungen bei Ansatz 2 mit einer Selektionstemperatur von 79 °C isoliert wurden. Dazu wurden von den 100 unter diesen Bedingungen gewachsenen Klonen (Tabelle 16) 20 zufällig ausgewählt, mit 5 ml  $\text{TB}_{\text{KanaBleo}}$ -Medium versetzt und bei 68 °C für 48 h inkubiert. Aus den Zellen wurde durch Mini-Präparationen (3.3.7.1) die Plasmid-DNA isoliert. Die *trpD*-Insertsequenz der pMK18-Konstrukte wurde durch PCR-Amplifizierung (3.3.1) mit den Primern M13 *forward* und *reverse* M13 vervielfältigt und die Nukleotidabfolge des PCR-Produktes durch Sequenzierung bestimmt. (Die Qualität der Plasmid-DNA, die durch Mini-Präparationen aus den *T. thermophilus* Zellen isoliert wurde, war nicht ausreichend, um verlässliche Sequenzierungen durchzuführen.) Dabei zeigte sich, dass die 20 isolierten Klone nur insgesamt 16 unterschiedliche Sequenzen enthielten. Die detaillierten Ergebnisse der Sequenzierung der isolierten Klone sowie die Auswahl von Mutanten für die *in vitro* Charakterisierung sind in Abschnitt 4.3.3 dargestellt.

Zur Bestätigung der *in vivo* Komplementation wurde eine Retransformation von *T. thermophilus*  $\Delta\text{trpD\_shble\_77-3}$  Zellen mit den 16 unterschiedlichen isolierten Plasmiden durchgeführt. Das Ausgangskonstrukt pMK18-*sstrpD*- (I36E+M47D+D83G+F149S) diente dabei als Negativkontrolle, während auf eine Positivkontrolle erneut verzichtet wurde. Aufgrund der niedrigen DNA-Ausbeuten bei der Präparation der Plasmid-DNA aus *T. thermophilus* konnten nur 0,2  $\mu\text{g}$  pMK18-DNA für die Transformation von 1 ml  $\Delta\text{trpD\_shble\_77-3}$  Zellen verwendet werden. Bei 12 der 16 verschiedenen pMK18-*sstrpD*-Konstrukte war nach 36 h Inkubation bei 79 °C Koloniewachstum auf SH-Minimalmediumplatten zu beobachten. Aufgrund der geringen DNA-Menge bei der Transformation konnte nicht ausgeschlossen werden, dass bei den vier Fällen, die kein Wachstum zeigten, die Transformation nicht erfolgreich war. Bei allen Ansätzen wuchsen ferner deutlich weniger Klone auf SH-Minimalmedium als auf  $\text{TB}_{\text{Bleo,Kana}}$ -Vollmedium.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde daher bei fünf ausgewählten Mutanten die Retransformation bei verschiedenen Temperaturen wiederholt, wobei die aus *T. thermophilus* isolierten pMK18-*sstrpD*-Konstrukte zunächst in *E. coli* Turbo Zellen vervielfältigt und anschließend durch Mini-Präparation gewonnen wurden. Davon wurden dann 5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in die Transformation eingesetzt, die Zellen auf

200 µl eingeeengt, 40 µl der Zellsuspension auf kleine SH-Minimalmediumplatten (Ø 6 cm) ausgebracht und bei 70, 72,5, 75 und 79 °C inkubiert (Tabelle 17).

**Tabelle 17: Ergebnisse der Komplementation nach Retransformation von *T. thermophilus*  $\Delta trpD\_shble\_77-3$  bei verschiedenen Temperaturen auf SH-Minimalmedium.**

∞: Kolonienanzahl konnte aufgrund der hohen Zelldichte auf den Platten nicht ausgezählt werden.

ssAnPRT-	Anzahl an gewachsenen Kolonien bei gegebener T <sub>Sel</sub> [°C]:			
	70	72,5	75	79
(I36E+M47D+D83G+F149S)	∞	100	0	0
+R60K+T77I	∞	∞	~1000	35
+T77I+G114S+V163I	∞	∞	~1000	80
+V140+N162K+M190V+S202A+N247D	∞	∞	~1000	30
+N109S+I169T+L320M+N324I	∞	∞	~300	3

Ein Vergleich der Resultate aus Tabelle 17 mit den in 4.3.5 dokumentierten Daten zeigt, dass die Zahl der bei einer bestimmten T<sub>Sel</sub> gewachsenen Kolonien einer Mutante mit deren Thermostabilität korreliert. Bemerkenswert dabei ist, dass sich eigentlich identische Klone unterschiedlich verhalten. Bei gegebener T<sub>Sel</sub> war bei einigen Klonen Wachstum zu beobachten, während andere kein Wachstum zeigten, was wiederum auf eine Heterogenität der Klone hindeutet. Eine detaillierte Analyse dieses Phänomens stand jedoch nicht im Zentrum dieser Arbeit.

#### 4.3.3 Sequenzanalyse der komplementierenden Klone

Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, wurden die Inserts von 20 zufällig ausgewählten Klonen sequenziert, die bei 79 °C auf Selektivmedium zu Kolonienwachstum führten. Dabei zeigte sich, dass zwei Sequenzen mehrmals vorkamen, d. h. tatsächlich nur 16 unterschiedliche Inserts vorlagen (Abbildung 24). Tabelle 18 zeigt, dass diese 16 Sequenzen im Vergleich zur in *E. coli* propagierten Genbank (4.3.1) eine deutlich geringere Anzahl an Nukleotidaustauschen beinhalten.



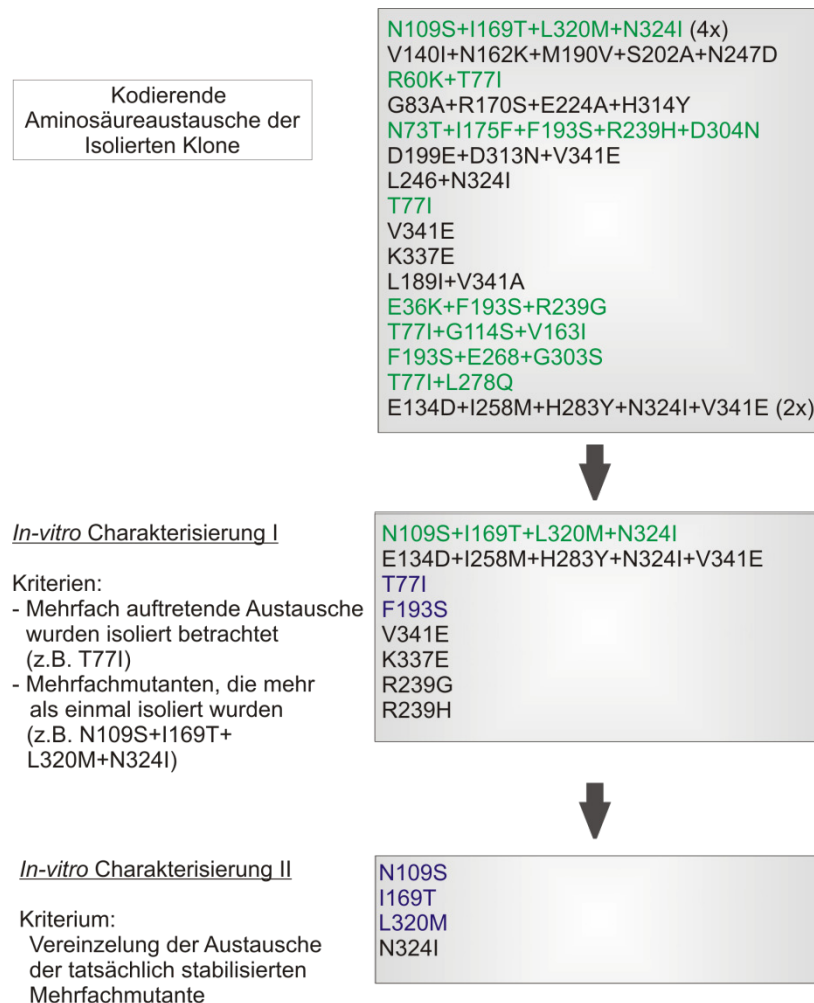
**Tabelle 18: Vergleichende Sequenzanalyse der Primärbank und der bei 79 °C komplementierenden Klone.**

Sequenzen der Primärbank entsprechen der in *E. coli* hergestellten Genbank (4.3.1, Tabelle 15). Kompl. Klone: Charakterisierung der 16 unterschiedlichen *sstrpD*-Sequenzen der komplementierenden Klone. Echt positive Klone: Charakterisierung der 8 *sstrpD*-Sequenzen, die mindestens einen stabilisierenden Aminosäureaustausch beinhalten (siehe Abbildung 24).

Eigenschaft	Primärbank	Kompl. Klone	Echt positive Klone
Länge der Sequenz [kb]	1	1	1
Anzahl der analysierten Sequenzen	10	16	8
Nukleotidaustausche/kb (Mittelwert)	12,0 ± 3,9	5,2 ± 3,1	5,4 ± 2,5
Nukleotidaustausche/kb (Medianwert)	11,0 (6 - 17)	5,0 (1 – 12)	5,0 (1 – 9)
Kodierende Mutationen [%]	74,2	52,9	53,5
Stille Mutationen [%]	25,8	47,1	46,5

Obwohl nur eine sehr geringe Anzahl an Sequenzen analysiert wurde, geht die Tendenz zur Selektion von Mutanten mit wenigen Nukleotidaustauschen. Dazu kommt, dass nur etwa in der Hälfte der Fälle ein Nukleotidaustausch bei den selektierten Klonen einen Aminosäureaustausch bewirkt. Die *sstrpD*-Inserts der eingesetzten Genbank kodieren für ssAnPRT-Mutanten mit durchschnittlich neun Aminosäureaustauschen, während die selektierten ssAnPRT-Mutanten durchschnittlich 2,8 Aminosäureaustausche enthalten. Dies zeigt eindeutig, dass Mutanten mit wenigen Aminosäureaustauschen bevorzugt selektiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass höhere Raten an Aminosäureaustauschen auch die Wahrscheinlichkeit für destabilisierende Austausche erhöhen und somit der positive Effekt stabilisierender Mutationen unterdrückt wird.

Aufgrund der uneindeutigen Ergebnisse der zunächst durchgeführten Retransformation (4.3.2) wurden zwei Kriterien für die Auswahl der Mutanten zur anschließenden *in vitro* Charakterisierung angelegt. Zum einen wurde die Auswirkung von Austauschen, die entweder isoliert gefunden wurden oder in mehr als einer Mehrfachmutante auftraten, analysiert. Zum anderen wurden bevorzugt solche Mehrfachmutanten analysiert, die mehr als einmal isoliert wurden. Waren derartige Mehrfachmutanten stabilisiert, so wurden die verschiedenen kodierenden Aminosäureaustausche individuell analysiert (Abbildung 24).



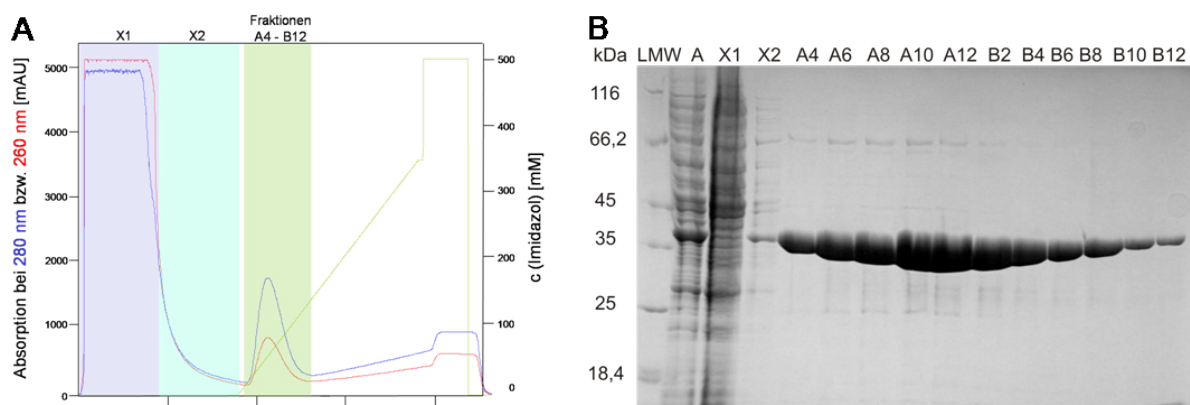
**Abbildung 24: Ergebnisse der Sequenzierung von bei 79 °C komplementierenden Klonen sowie Auswahl der Mutationen für die *in vitro* Charakterisierung.**

Die *ssrtpD*-Insertsequenz der 20 isolierten Klone wurde bestimmt, wobei 16 verschiedene Sequenzen identifiziert und die kodierenden Aminosäureaustausche dokumentiert wurden. Bei mehrfachem Auftreten einer Sequenz ist die Häufigkeit in Klammern angegeben. Für die anschließende erste *in vitro* Charakterisierung I der Mutanten wurden zwei Kriterien angewendet: Aminosäureaustausche, die entweder einzeln oder mehrfach in unabhängigen Sequenzen auftraten, wurden isoliert charakterisiert. Zusätzlich wurden die beiden Mehrfachmutanten, die öfters als einmal isoliert wurden mit allen kodierenden Aminosäureaustauschen charakterisiert. Da die Mehrfachmutante N109S+I169T+L320M+N324I einen stabilisierenden Effekt zeigte, wurden die Austausche vereinzelt charakterisiert (*in vitro* Charakterisierung II). Stabilisierende Einzelaustausche sind blau markiert. Mehrfachmutanten mit mindestens einem stabilisierenden Aminosäureaustausch sind in grün dargestellt.

#### 4.3.4 Herstellung und Reinigung der Mutanten

Für die *in vitro* Charakterisierung I wurden die in Abbildung 24 gezeigten Einzelaustausche (F193S, R239G, R239H), die mehrfach in unabhängigen Sequenzen auftraten durch OE-PCR (3.3.3.2) in den Hintergrund des Ausgangskonstruktes pQE40-*ssrtpD*-(I36E+M47D+D83G+F149S) kloniert. Die Einzelmutanten (T77I, K337E, V341E) und Mehrfachmutanten

(N109S+I169T+L320M+N324I, E134D+I258M+H283Y+N324I+V341E) wurden mittels PCR aus den isolierten pMK18-Konstrukten amplifiziert und durch Verwendung spezifischer Primer Schnittstellen für die passenden Restriktionsenzyme eingefügt (3.3.1). Zusätzlich wurden für die *in vitro* Charakterisierung II die Einzelaustausche (N109S, I169T, L320M, N324I) durch OE-PCR in den Hintergrund des Ausgangskonstruktes eingefügt. In allen Fällen erfolgte mithilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III die Klonierung der gereinigten DNA-Fragmente in den *E. coli* Expressionsvektor pQE40. Ausgehend von den generierten pQE40-ssD-Konstrukten wurden die Mutanten in *E. coli* KK8 Zellen heterolog exprimiert (3.4.1) und die rekombinanten Proteine über den N-terminal fusionierten His<sub>6</sub>-tag durch Nickelchelate-Chromatographie (3.4.2.2) gereinigt. Die Proteine eluierten bei einer Imidazolkonzentration von 30 – 180 mM. In Abbildung 25 A ist exemplarisch das Elutionsprofil der Reinigung von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+F193S gezeigt. Die Analyse ausgewählter Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (Abbildung 25 B). Die Fraktionen mit gereinigten Proteinen wurden vereinigt und das Imidazol durch Dialyse gegen 50 mM KP, pH 7,5 entfernt. Auf eine Abspaltung des N-terminalen His<sub>6</sub>-tag wurde in allen Fällen verzichtet. Die Proteine wurden einkonzentriert, die Konzentration bestimmt, in flüssigem Stickstoff eingetropft und bei –80 °C gelagert.



**Abbildung 25: Reinigung von rekombinantem ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+F193S über Metallchelate-Affinitätschromatographie.**

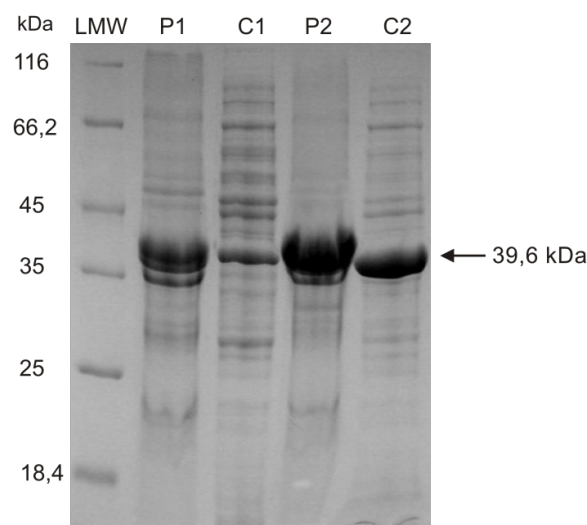
A: Elutionsprofil der Chromatographie mit Detektion der Absorption bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Die Elution erfolgte durch einen Imidazolgradienten von 0 – 375 mM Imidazol (grün).

B: SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) verschiedener Fraktionen der Chromatographie (Auftrag von je 15 µl Probe). LMW: Low Molecular Weight-Marker (Auftrag von 3 µl), A: Auftrag = lösliche Fraktion des Zellextrakts, X1 - X2: Fraktionen des Auftrags- und Waschdurchflusses, A4 – B12: Elutionsfraktionen.

Die Mutanten konnten mit einer Ausbeute von mindestens 32 mg Protein aus 1 l Bakterienkultur gereinigt werden (siehe Tabelle A 1). Über SDS-Page konnte

nachgewiesen werden, dass in allen Fällen eine Reinheit von mindestens 95 % erreicht wurde.

Auf der Basis der Ergebnisse der *in vitro* Charakterisierungen I und II (siehe 4.3.5) wurden Kombinationsmutanten mit mehreren stabilisierenden Aminosäureaustauschen hergestellt. Dafür wurde in zwei Fällen [monomere Fünffachmutante ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+T77I+N109S+I169T+F193S+L320M und dimere Fünffachmutante ssAnPRT-T77I+N109S+I169T+F193S+L320M, siehe 4.3.6] der Service der *de novo* Gensynthese der Firma Geneart in Anspruch genommen. In diesem Service inbegriffen war auch eine Kodonoptimierung. Dabei wurden 59 %, d. h. 203 von 344, der Kodone gegen von *E. coli* bevorzugte Kodone ausgetauscht. Dadurch konnte die Menge an heterolog exprimiertem Protein erhöht und auch eine deutliche Steigerung der Proteinausbeute auf bis zu 180 mg pro 1 l Bakterienkultur erzielt werden (Tabelle A 1). Abbildung 26 zeigt die unterschiedliche Produktion zweier ssAnPRT-Mutanten, wobei bei einer Mutante ein kodonoptimiertes Gen vorliegt, während bei der anderen keine Kodonoptimierung durchgeführt wurde.



**Abbildung 26: Vergleichende Expressionsanalyse zur Untersuchung der Kodonoptimierung von *sstrpD*.**

SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) zweier Mutanten (Auftrag von je 10 µl Probe). LMW: *Low Molecular Weight*-Marker (Auftrag von 3 µl), P1: unlösliche (P) und lösliche (C) Fraktionen von *E. coli* KK8 Zellen mit den rekombinanten Proteinen 1 [nicht kodonoptimiert: ssAnPRT-I36E+M47D+D83G+F193S] und 2 [kodonoptimiert: ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+T77I +I169T+F193S+L320M]. Die Mutanten wurden parallel mit analoger Vorgehensweise exprimiert.

Die beiden Mutanten unterscheiden sich in vier Aminosäureaustauschen (T77I, F149S, I169T, L320M). Da diese Aminosäureaustausche einzeln keine verbesserten Aufreinigungsausbeuten zeigten (Tabelle A 1), kann angenommen werden, dass die

um den Faktor 3,7 verbesserte Ausbeute auf die Kodonoptimierung des *ssstpD* Gens zurückzuführen ist (Tabelle 19).

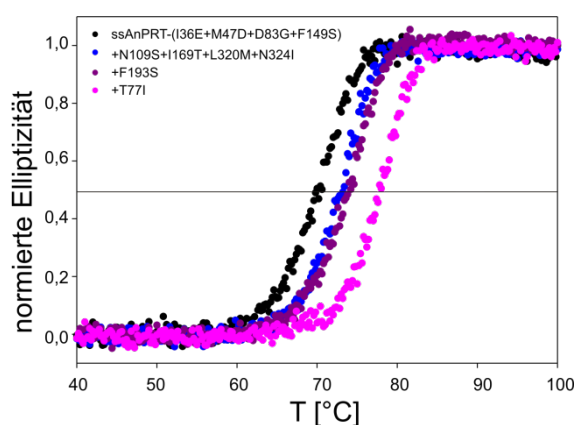
**Tabelle 19: Ausbeuten bei vergleichender Expressionsanalyse zur Untersuchung der Kodonoptimierung von *ssstpD*.**

Die Aufreinigung der in Abbildung 26 gezeigten löslichen Proteine erfolgte mit identischem Protokoll über Nickelchelat-Metallchromatographie. Durch die Kodonoptimierung der ssAnPRT-Mutanten, wurde die Ausbeute an gereinigtem Protein um den Faktor 3,7 gesteigert.

Kodon- optimierung	ssAnPRT-	Ausbeute [mg] / 1 l Bakterienkultur
-	1: I36E+M47D+D83G+F193S	50
+	2: (I36E+M47D+D83G+F149S) +T77I+I169T+F193S+L320M	185

#### 4.3.5 Thermische Stabilität der gereinigten ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten

Bei der *in vitro* Charakterisierung I (siehe Abbildung 24) wurde die Stabilität ausgewählter Mutanten mittels thermischer Denaturierung (3.5.11) über das Fern-UV CD-Signal bei 220 nm untersucht. In Abbildung 27 ist das Ergebnis für einige der charakterisierten Proteine gezeigt.



**Abbildung 27: Thermische Auffaltung von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) Einzel- und Mehrfachmutanten.**

Die thermische Denaturierung von jeweils 10  $\mu$ M Proteinlösung erfolgte mit einer Rate von 1  $^{\circ}$ C/min von 20 – 105  $^{\circ}$ C in 50 mM KP, pH 7,5 und wurde über das Fern-UV CD-Signal bei 220 nm verfolgt.

Als operationelles Maß für die thermische Stabilität wurde  $T_M^{app}$ , d. h. die Temperatur bei der 50 % des CD-Signals verschwunden sind, bestimmt (Tabelle 20).

**Tabelle 20: Übersicht über  $T_M^{\text{app}}$ -Werte der Einzel- und Mehrfachmutanten von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) aus *in vitro* Charakterisierung I.**

Gezeigt sind  $T_M^{\text{app}}$ -Werte der Mutanten im Vergleich zum Ausgangskonstrukt ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S), jeweils ermittelt über die Abnahme des Fern-UV CD-Signals bei 220 nm. Es wurden 10  $\mu\text{M}$  Protein in 50 mM KP, pH 7,5 eingesetzt und ein Temperaturgradient von 20 – 105 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min gefahren. Das Ausgangskonstrukt und Mutanten mit stabilisierenden Austauschen wurden mindestens dreimal vermessen, wobei die Mittelwerte der  $T_M^{\text{app}}$ -Werte sowie die Standardabweichung angegeben sind. Mutanten, die keine Stabilisierung zeigten wurden nur einmal vermessen. Die Mehrfachmutante V140I+N162K+M190V+S202A+N247D wurde hergestellt und charakterisiert, obwohl sie nur einmal isoliert wurde (Abbildung 24).

ssAnPRT-	$T_M^{\text{app}}$ [°C]
(I36E+M47D+D83G+F149S)	70,1 $\pm$ 0,2
+T77I	78,2 $\pm$ 0,2
+N109S+I169T+L320M+N324I	73,0 $\pm$ 0,1
+E134D+I258M+H283Y+N324I+V341E	70,1
+V140I+N162K+M190V+S202A+N247D	70,5
+F193S	74,1 $\pm$ 0,1
+R239G	69,6
+R239H	70,1
+K337E	69,9
+V341E	70,2

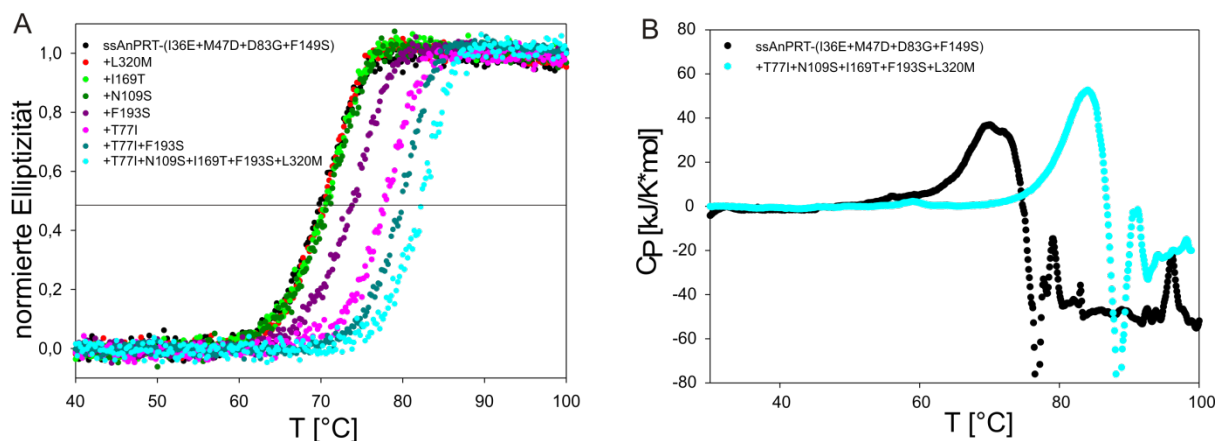
Anhand der ermittelten  $T_M^{\text{app}}$ -Werte wurden die zwei vorteilhaften Einzelaustausche T77I und F193S sowie die stabilisierte Mehrfachmutante N109S+I169T+L320M+N324I identifiziert. Die Einzelmутanten R239G, R239H, K337E und V341E sowie die charakterisierten Mehrfachmutanten E134D+I258M+H283Y+N324I+V341E und V140I+N162K+M190V+S202A+N247D wurden nicht weiter untersucht, da ihre  $T_M^{\text{app}}$ -Werte nicht oder nur sehr wenig erhöht waren. Offen bleibt an diesem Punkt, aus welchem Grund diese beiden Mehrfachmutanten sowie die Einzelmутanten K337E und V341E selektiert wurden. Ob die Mutanten durch die Translationsmaschinerie in *T. thermophilus* in einer höheren Masse hergestellt werden und dadurch die Überlebenswahrscheinlichkeit bei den vorliegenden Selektionsbedingungen erhöht wird oder ob es sich um falsch positive Mutanten handelt, kann an diesem Punkt nicht sicher beantwortet werden. Da die Mehrfachmutante N109S+I169T+L320M+N324I stabilisiert war, wurden bei der *in vitro* Charakterisierung II die vier Austausche einzeln analysiert (Abbildung 24). Dabei zeigte sich, dass N109S, I169T und L320M den  $T_M^{\text{app}}$  um 0,5 – 1 °C erhöhten, während N324I praktisch keinen Effekt auf die Stabilität hatte (Tabelle 21).

**Tabelle 21: Übersicht über  $T_M^{\text{app}}$ -Werte der Einzel- und Mehrfachmutanten von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) aus *in vitro* Charakterisierung II.**

Gezeigt sind  $T_M^{\text{app}}$ -Werte der Mutanten im Vergleich zum Ausgangskonstrukt ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S), jeweils ermittelt über die Abnahme des Fern-UV CD-Signals bei 220 nm. Es wurden 10  $\mu\text{M}$  Protein in 50 mM KP, pH 7,5 eingesetzt und ein Temperaturgradient von 20 – 105  $^{\circ}\text{C}$  mit einer Heizrate von 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  gefahren. Das Ausgangskonstrukt und Mutanten mit stabilisierenden Austauschen wurden mindestens dreimal vermessen, wobei die Mittelwerte der  $T_M^{\text{app}}$ -Werte sowie die Standardabweichung angegeben sind. Die Mutante N324I wurde nur einmal vermessen.

ssAnPRT-	$T_M^{\text{app}}$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]
(I36E+M47D+D83G+F149S)	$70,1 \pm 0,2$
+N109S	$71,0 \pm 0,2$
+I169T	$70,9 \pm 0,2$
+L320M	$70,6 \pm 0,1$
+N324I	69,9
+N109S+I169T+L320M+N324I	$73,0 \pm 0,1$

Aus den Tabellen 20 und 21 geht hervor, dass die Austausche T77I und F193S einen stark stabilisierenden Effekt haben, während die drei Austausche N109S, I169T und L320M, die gemeinsam isoliert wurden, nur einen gering stabilisierenden Effekt haben. In der Folge wurden verschiedene Mutanten mit unterschiedlichen Kombinationen dieser Austausche durch *de novo* Gensynthese (4.3.4) und OE-PCR hergestellt. Die thermische Stabilität dieser Kombinationsmutanten wurde sowohl durch Fern-UV CD als auch durch DSC analysiert (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Thermische Auffaltung von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) Einzel- und Kombinationsmutanten.**

Die thermische Denaturierung der Mutanten erfolgte mit einer Rate von 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  von 20 – 105  $^{\circ}\text{C}$  in 50 mM KP, pH 7,5 und wurde über die Abnahme des Fern-UV CD-Signal bei 220 nm sowie durch differentielle Scanning Kalorimetrie verfolgt. Für die DSC-Messungen wurden jeweils 25  $\mu\text{M}$  Protein, bei der CD-Spektroskopie 10  $\mu\text{M}$  Protein eingesetzt.

A: Fern-UV CD Auffaltungskurven der fünf stabilisierten Einzelmутanten T77I, N109S, I169T, F193S und L320M sowie der Kombinationsmutanten T77I+F193S und T77I+N109S+I169T+F193S+L320M (Fünffachmutante).

B: DSC-Auffaltungskurve des Ausgangskonstruktes sowie der Fünffachmutante. Der steile Abfall der Wärmekapazität nach dem thermischen Übergang deutet darauf hin, dass entfaltetes ssAnPRT aggregiert.



In Tabelle 22 sind die ermittelten  $T_M^{\text{app}}$ -Werte im Überblick dargestellt.

**Tabelle 22: Überblick über  $T_M^{\text{app}}$ -Werte von stabilisierten Einzel- und unterschiedlichen Kombinationsmutanten.**

Gezeigt sind  $T_M^{\text{app}}$ -Werte für die Einzel- und Kombinationsmutanten, im Vergleich zum Ausgangskonstrukt ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S), jeweils ermittelt über das Fern-UV CD-Signal bei 220 nm sowie über differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC). Für die DSC-Messungen wurden 25  $\mu\text{M}$  Protein, bei der CD-Spektroskopie 10  $\mu\text{M}$  Protein in 50 mM KP, pH 7,5 eingesetzt und in beiden Fällen ein Temperaturgradient von 20 – 105 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min gefahren. Das Ausgangskonstrukt und Mutanten mit stabilisierenden Austauschen wurden mindestens dreimal durch CD-Messungen untersucht, wobei die Mittelwerte der  $T_M^{\text{app}}$ -Werte sowie die Standardabweichung angegeben sind. Die  $T_M^{\text{app}}$ -Werte der DSC-Experimente stammen aus Einzelmessungen. Die  $T_M^{\text{app}}$ -Werte der CD-Messungen lagen i.d.R. um 1 - 2 °C unterhalb derer aus DSC-Messungen. Vermutlich ist dies auf gerätespezifische Ungenauigkeiten bei der Temperaturbestimmung zurückzuführen. Die durch die Mutationen beobachtete Erhöhung der Stabilität ( $\Delta T_M^{\text{app}}$ ) war jedoch bei beiden Methoden vergleichbar groß.

ssAnPRT-	$T_M^{\text{app}}_{\text{CD}}$ [°C]	$\Delta T_M^{\text{app}}_{\text{CD}}$ [°C]	$T_M^{\text{app}}_{\text{DSC}}$ [°C]	$\Delta T_M^{\text{app}}_{\text{DSC}}$ [°C]
(I36E+M47D+D83G+F149S)	70,1 ± 0,2	-	70,9	-
+T77I	78,2 ± 0,2	8,1	79,3	8,4
+N109S	71,0 ± 0,2	0,9	71,9	1,0
+I169T	70,9 ± 0,2	0,8	72,0	1,1
+F193S	74,1 ± 0,1	4,0	75,6	4,7
+L320M	70,6 ± 0,1	0,5	72,2	1,3
+T77I +F193S	80,1 ± 0,1	10,0	81,2	10,3
+T77I+I169T+F193S+L320M	82,4 ± 0,1	12,3	83,4	12,5
+T77I+N109S+I169T+F193S+L320M	82,8 ± 0,3	12,7	84,1	13,2

Die Summe der Stabilisierung durch die Einzelaustausche ( $\Delta T_M^{\text{app}}_{\text{CD}} = 14,3$  °C,  $\Delta T_M^{\text{app}}_{\text{DSC}} = 16,5$  °C) ist nahezu identisch zum stabilisierenden Effekt der fünf Mutationen in der finalen Fünffachmutante ( $\Delta T_M^{\text{app}}_{\text{CD}} = 12,7$  °C,  $\Delta T_M^{\text{app}}_{\text{DSC}} = 13,2$  °C). Die Analyse der Doppelmutante T77I+F193S ( $\Delta T_M^{\text{app}}_{\text{CD}} = 10,0$  °C,  $\Delta T_M^{\text{app}}_{\text{DSC}} = 10,3$  °C) und der Vierfachmutante T77I+I169T+F193S+L320M ( $\Delta T_M^{\text{app}}_{\text{CD}} = 12,3$  °C,  $\Delta T_M^{\text{app}}_{\text{DSC}} = 12,5$  °C) bestätigte die Additivität der stabilisierenden Effekte.

Die stabilisierenden Effekte der Mutationen T77I und F193S, sowie N109S, I169T und L320M erklärt warum sie in 11 der insgesamt 20 selektierten *sstrpD*-Klone gefunden wurden. Während die schwach stabilisierenden Aminosäureaustausche N109S, I169T und L320M in Kombination aus vier identischen Klonen isoliert wurden, traten die stark stabilisierenden Austausche T77I bzw. F193S in vier bzw. drei völlig unterschiedlichen *sstrpD*-Klonen auf. Das gewählte Kriterium,

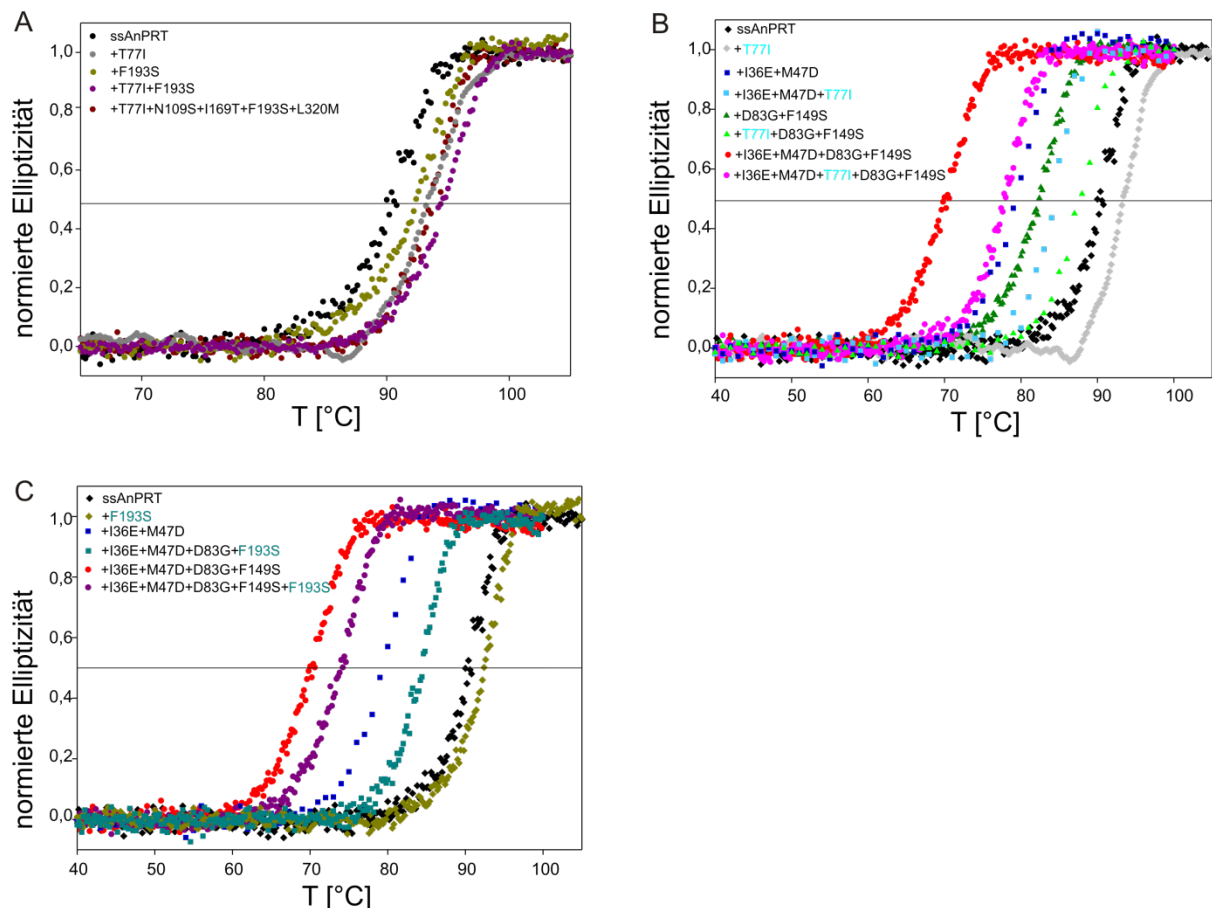


Aminosäureaustausche zu charakterisieren, die mehrfach in unabhängigen *sstrpD*-Mutanten auftreten, erwies sich also im Nachhinein als zielführend. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Fähigkeit zur *in vivo* Komplementation bei hohen Temperaturen in *T. thermophilus*  $\Delta trpD\_shble\_77-3$  Zellen einen zuverlässigen Reporter für die konformationelle Stabilität einer AnPRT-Mutante darstellt.

#### 4.3.6 Übertragung der stabilisierenden Mutationen auf weitere ssAnPRT

##### Proteine

Im Folgenden wurde untersucht, ob die bei der Selektion isolierten stabilisierenden Mutationen auch im Hintergrund von wildtypischem ssAnPRT wirksam sind. Dafür wurden die fünf Mutationen einzeln und in unterschiedlichen Kombinationen über OE-PCR in das *sstrpD*-Gen eingeführt. Die Klonierung in pQE40, die Expression in *E. coli* KK8 Zellen und die Reinigung aus der löslichen Zellfraktion mittels Metalchelat-Affinitätschromatographie erfolgte analog zu dem in 4.3.4 beschriebenen Vorgehen. Anschließend wurde die Stabilität der gereinigten Mutanten durch über Fern-UV CD bei 220 nm verfolgte thermische Denaturierung untersucht (Abbildung 29 A).



**Abbildung 29: Thermische Auffaltung ausgewählter ssAnPRT-Mutanten.**

Die thermische Denaturierung von jeweils 10  $\mu\text{M}$  Proteinlösung erfolgte mit einer Rate von 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  von 20 - 105  $^{\circ}\text{C}$  in 50 mM KP, pH 7,5 und wurde über das Fern-UV CD-Signal bei 220 nm verfolgt.

A: Effekt der isolierten stabilisierenden Mutationen im Kontext von wildtypischem ssAnPRT Protein.

B: Effekt der Mutation T77I im Kontext unterschiedlicher ssAnPRT Proteine.

C: Effekt der Mutation F193S im Kontext unterschiedlicher ssAnPRT Proteine.

Es zeigte sich, dass die Austausche T77I und F193S auch wildtypisches ssAnPRT stabilisieren, auch wenn sie eine geringere Zunahme von  $T_M^{\text{app}}$  bewirken (2,5  $^{\circ}\text{C}$  bzw. 1,6  $^{\circ}\text{C}$ , Tabelle 23) als im Hintergrund des aktivierten Monomers ( $\sim 8^{\circ}\text{C}$  bzw.  $\sim 4,5^{\circ}\text{C}$ , Tabelle 22). Darüber hinaus sind die Effekte der beiden Mutationen im Rahmen der Meßgenauigkeit auch im wildtypischen Hintergrund additiv. Anders als im aktivierten Monomer ist die Kombinationsmutante der fünf vorteilhaften Austausche im Hintergrund des wildtypischen ssAnPRT weniger stabilisierend ( $\Delta T_M^{\text{app}} = 2,4^{\circ}\text{C}$ ) als die Doppelmutante T77I+F193S ( $\Delta T_M^{\text{app}} = 3,9^{\circ}\text{C}$ ). Dies bedeutet, dass eine oder mehrere der Mutationen N109S+I169T+L320M im wildtypischen Kontext destabilisierend wirken. Tatsächlich legt die strukturelle Betrachtung (siehe 4.3.8.3) den Schluss nahe, dass die Mutation N109S nur in Gegenwart des benachbarten F149S-Austausches einen stabilisierenden Effekt hat, während sie in Gegenwart des wildtypischen F149 destabilisierend wirken dürfte.

**Tabelle 23: Übertragung der isolierten stabilisierenden Mutationen auf wildtypisches ssAnPRT: Überblick über  $T_M^{app}$ -Werte.**

Gezeigt sind  $T_M^{app}$ -Werte verschiedener ssAnPRT-Mutanten, im Vergleich zum wildtypischen ssAnPRT, jeweils ermittelt über das Fern-UV CD-Signal bei 220 nm. Es wurden 10  $\mu$ M Protein in 50 mM KP, pH 7,5 eingesetzt und ein Temperaturgradient von 20 – 105 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min gefahren. Ausgewählte ssAnPRT-Mutanten wurden mindestens dreimal durch CD-Messungen untersucht, wobei die Mittelwerte der  $T_M^{app}$ -Werte sowie die Standardabweichung angegeben sind. Der  $T_M^{app}$ -Wert von T77I+F193S ist eine Mittelung aus zwei unabhängigen Messungen, wobei die Abweichung maximal 0,5 % beträgt.

ssAnPRT-	$T_M^{app}$ [°C]	$\Delta T_M^{app}_{wt}$ [°C]
wt	91,5 $\pm$ 0,4	-
T77I	94,0 $\pm$ 0,4	2,5
F193S	93,1 $\pm$ 0,2	1,6
T77I+F193S	95,4	3,9
T77I+N109S+I169T+F193S+L320M	93,9 $\pm$ 0,5	2,4

Um den Einfluss des strukturellen Hintergrunds auf die stabilisierende Wirkung einer Mutation weiter zu untersuchen, wurde der T77I-Austausch zusätzlich im Kontext des aktivierten Dimers (D83G+F149S) und des nicht aktivierten Monomers (I36E+M47D) untersucht (Abbildung 29 B). Es zeigte sich, dass der vorteilhafte Austausch T77I in allen untersuchten ssAnPRT-Mutanten wirksam ist (Tabelle 24).

**Tabelle 24: Effekt des T77I-Austausches im Hintergrund unterschiedlicher ssAnPRT Proteine.**

Gezeigt sind  $T_M^{app}$ -Werte verschiedener ssAnPRT-Mutanten mit dem T77I-Austausch, jeweils ermittelt über das Fern-UV CD-Signal bei 220 nm. Es wurden 10  $\mu$ M Protein in 50 mM KP, pH 7,5 eingesetzt und ein Temperaturgradient von 20 – 105 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min gefahren. Ausgewählte ssAnPRT-Mutanten wurden mindestens dreimal durch CD-Messungen untersucht, wobei die Mittelwerte der  $T_M^{app}$ -Werte sowie die Standardabweichung angegeben sind. Die restlichen  $T_M^{app}$ -Werte stammen aus Einzelmessungen.

ssAnPRT-	$T_M^{app}$ [°C]	$\Delta T_M^{app}$ [°C]
wt	91,5 $\pm$ 0,4	-
+T77I	94,0 $\pm$ 0,4	2,5
aktiviertes Dimer (D83G+F149S)	82,0	-
+T77I	88,4	6,4
Monomer (I36E+M47D)	80,0	-
+T77I	84,5	4,6
aktiviertes Monomer (I36E+M47D+D83G+F149S)	70,1 $\pm$ 0,2	-
+T77I	78,2 $\pm$ 0,2	8,1

Ein Vergleich der  $\Delta T_M^{\text{app}}$ -Werte zeigt jedoch, dass der stabilisierende Effekt tendenziell mit zunehmender Stabilität des Ausgangskonstruktes zurückgeht.

In analoger Weise wurde der Effekt des F193S-Austausches zusätzlich im Hintergrund des Monomers (I36E+M47D) untersucht (Abbildung 29 C). Es zeigte sich, dass F193S auch hier einen stabilisierenden Effekt hat. Im Gegensatz zum T77I-Austausch wurde jedoch kein Zusammenhang mit der Stabilität des Ausgangskonstruktes beobachtet (Tabelle 25).

**Tabelle 25: Effekt des F193S-Austausches im Hintergrund unterschiedlicher ssAnPRT Proteine.** Gezeigt sind  $T_M^{\text{app}}$ -Werte verschiedener ssAnPRT-Mutanten mit dem F193S-Austausch, jeweils ermittelt über das Fern-UV CD-Signal bei 220 nm. Es wurden 10  $\mu\text{M}$  Protein in 50 mM KP, pH 7,5 eingesetzt und ein Temperaturgradient von 20 – 105 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min gefahren. Ausgewählte ssAnPRT-Mutanten wurden mindestens dreimal durch CD-Messungen untersucht, wobei die Mittelwerte der  $T_M^{\text{app}}$ -Werte sowie die Standardabweichung angegeben sind. Die restlichen  $T_M^{\text{app}}$ -Werte stammen aus Einzelmessungen.

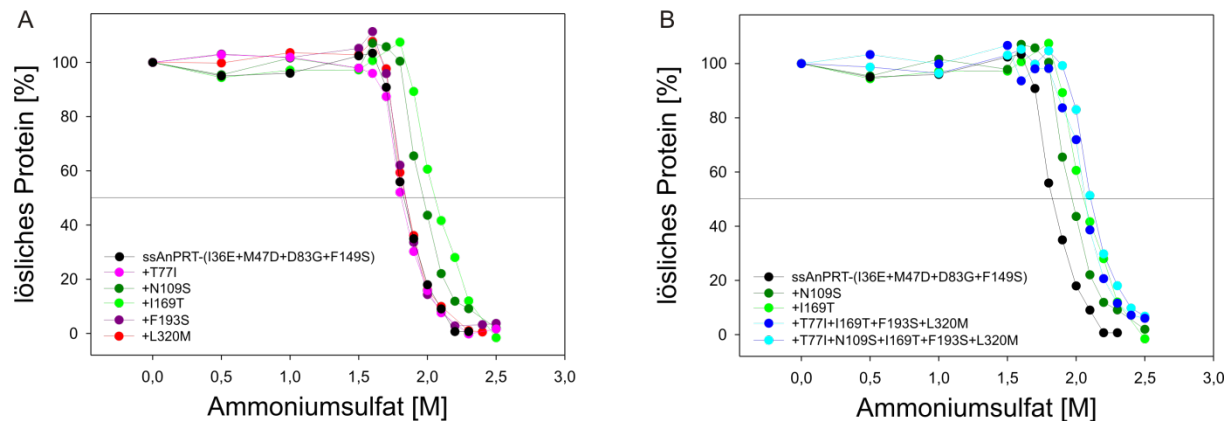
ssAnPRT-Mutante	$T_M^{\text{app}}_{\text{CD}}$ [°C]	$\Delta T_M^{\text{app}}_{\text{CD}}$ [°C]
wt	91,5 $\pm$ 0,4	-
+F193S	93,1 $\pm$ 0,2	1,6
Monomer (I36E+M47D)	80,0	-
+F193S	84,7	4,7
aktiviertes Monomer (I36E+M47D+D83G+F149S)	70,1 $\pm$ 0,2	-
+F193S	74,1 $\pm$ 0,1	4,1

#### 4.3.7 Einfluss der stabilisierenden Mutationen auf die Löslichkeit, Struktur und katalytische Aktivität des aktivierten Monomers von ssAnPRT

Der Einfluss der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten stabilisierenden Mutationen T77I, N109S, I169T, F193S und L320M (4.3.5) auf die Löslichkeit *in vitro*, die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur sowie die *steady-state* enzymkinetischen Parameter von ssAnPRT wird im Folgenden untersucht. Da im Rahmen dieser Arbeit die Stabilisierung des aktivierten Monomers (I36E+M47D+D83G+F149S) als Ziel definiert wurde, diente dieses Protein als Referenz.

#### 4.3.7.1 Löslichkeit ausgewählter Mutanten

Um die Löslichkeit von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten zu charakterisieren, wurden die Proteine in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 mit Ammoniumsulfat fraktionell präzipitiert (3.3.13). Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.



**Abbildung 30: *In vitro* Löslichkeit von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten.**

Eine Lösung von jeweils 3  $\mu$ M Protein wurde in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 bei RT fraktionell mit steigenden Konzentrationen an Ammoniumsulfat präzipitiert. Die Konzentration des im Überstand verbleibenden, löslichen Proteins wurde über Fluoreszenz-Spektroskopie anhand einer zuvor aufgenommenen Eichgerade (siehe Anhang 7.2) bestimmt.

A: Löslichkeit von Einzelmутanten.

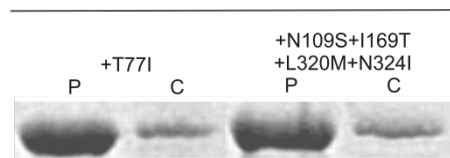
B: Löslichkeit von Einzel- und Kombinationsmutanten.

Es zeigte sich, dass die Mutationen N109S und I169T individuell und in Kombination zu einer erhöhten Löslichkeit *in vitro* führen (Abbildung 30 A). Die Ergebnisse für die Kombinationsmutanten deuten darauf hin, dass die Effekte nicht additiv sind, da die Löslichkeit der Fünffachmutante im Wesentlichen der I169T Einzelmутante entspricht (Abbildung 30 B). Die Konzentration an Ammoniumsulfat  $[L_{1/2}]^{app}$ , die benötigt wird um 50 % des Proteins zu präzipitieren, wurde als operationelles Maß für die Löslichkeit definiert. Die Werte von  $[L_{1/2}]^{app}$  der verschiedenen Mutanten sind in Tabelle 26 aufgelistet.

Tabelle 26:  $[L_{1/2}]^{app}$ -Werte der untersuchten ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten.

ssAnPRT-	$[L_{1/2}]^{app}$
(I36E+M47D+D83G+F149S)	1,83
+T77I	1,81
+N109S	1,97
+I169T	2,06
+F193S	1,84
+L320M	1,84
+T77I+I169T+F193S+L320M	2,06
+T77I+N109S+I169T+F193S+L320M	2,11

Die erhöhte Löslichkeit der ssAnPRT-Mutanten, die N109S oder I169T beinhalten, optimiert das Protein auch für weitere biochemische und biophysikalische Untersuchungen, da es stärker einkonzentriert und bei höheren Salzkonzentrationen noch in Lösung gehalten werden kann. Dies kann bei Kristallisation des Proteins für die Röntgenstrukturanalyse vorteilhaft sein. Es wurde nicht untersucht, ob diese Aminosäureaustausche in *T. thermophilus* Zellen zu einer erhöhten Löslichkeit des Proteins führen und daher zur Selektion der entsprechenden Mutanten beigetragen haben. Eine vergleichende Expressionsanalyse in *E. coli* KK8 Zellen ergab jedoch, dass die Austausche N109S und I169T nicht zu einer Erhöhung der Ausbeute an löslichem Protein führen (Abbildung 31).



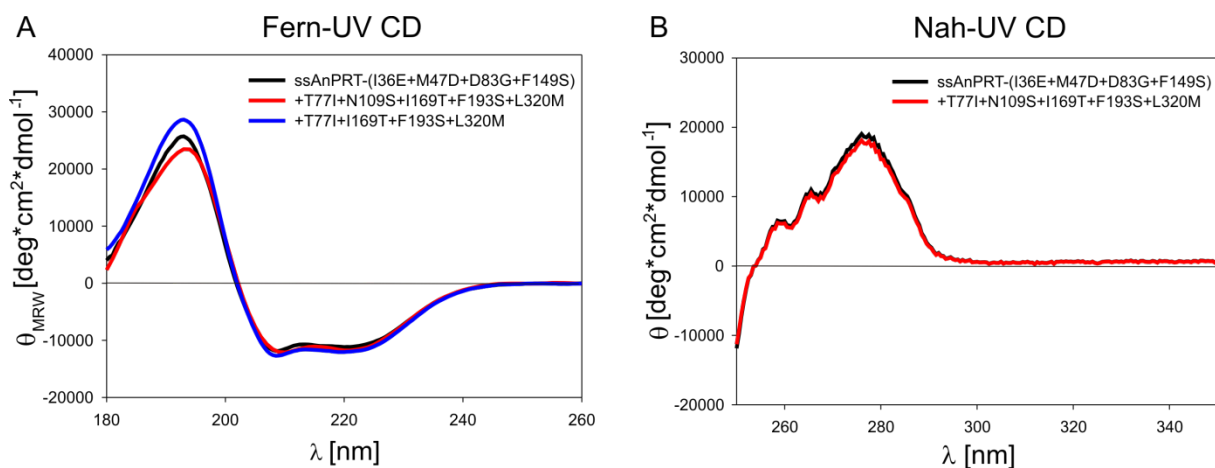
**Abbildung 31: Vergleichende Expressionsanalyse zur Überprüfung einer verbesserten *in vitro* Löslichkeit von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten mit den N109S- und I169T-Austauschen.**

Wie unter 3.4.1.1 beschrieben, wurde eine Expressionsanalyse in *E. coli* KK8 Zellen durchgeführt. Es wurden dabei die Mutanten ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+T77I und ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+N109S+I169T+L320M+N324I verglichen. Ausschnitt aus einer SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid): P: unlösliche Zellfraktion, C: lösliche Zellfraktion.

Entsprechend hatten sie auch keinen Einfluss auf die Ausbeute an gereinigtem Protein (Tabelle A 1).

#### 4.3.7.2 Circular dichroismus ausgewählter Mutanten

Um den Einfluss der Mutationen T77I, N109S, I169T, F193S und L320M auf die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur von ssAnPRT zu untersuchen, wurden CD-Spektren im Fern-UV bzw. im Nah-UV Bereich aufgenommen (3.5.2). Die in Abbildung 32 A gezeigten Fern-UV CD-Spektren der untersuchten Proteine sind nahezu identisch und weisen jeweils auf eine Sekundärstruktur mit deutlichem  $\alpha$ -helikalem Anteil hin (Nulldurchgang bei ca. 202 nm, Minima bei 208 und 220 nm; Schmid, 1997). Es wird somit deutlich, dass die Aminosäureaustausche keine wesentliche Veränderung der Sekundärstruktur hervorrufen.



**Abbildung 32: CD-Spektroskopische Untersuchungen zur Sekundär- und Tertiärstruktur verschiedener ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten.**

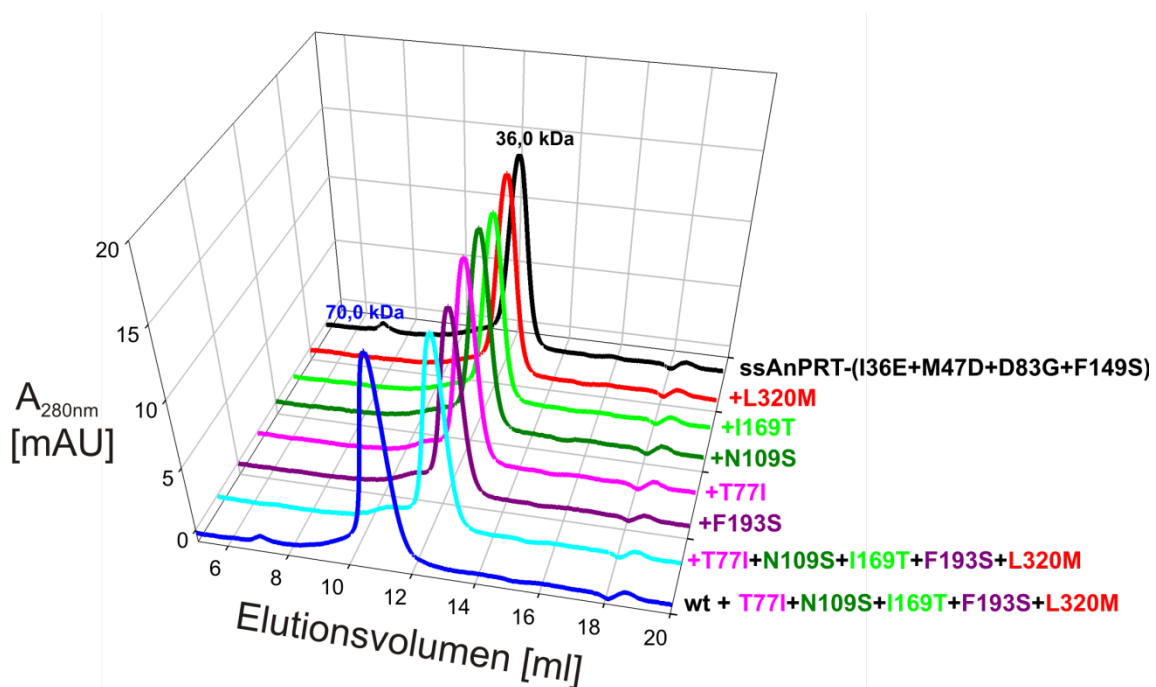
A: Die Fern-UV CD-Spektren wurden von 180 – 260 nm in 5 mM KP, pH 7,5 mit einer Proteinkonzentration von 24  $\mu\text{M}$  bei einer Temperatur von 25 °C in einer Rundküvette mit einer Schichtdicke von 0,2 mm aufgenommen. Es wurden jeweils fünf Spektren gemittelt und um das Pufferspektrum korrigiert.

B: Die Nah-UV CD-Spektren wurden von 250 – 350 nm in 50 mM KP, pH 7,5 mit einer Proteinkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  bei einer Temperatur von 25 °C in einer Rundküvette mit einer Schichtdicke von 50 mm aufgenommen. Es wurden jeweils fünf Spektren gemittelt und um das Pufferspektrum korrigiert.

Die Tertiärstrukturen konnten über Nah-UV CD-Spektroskopie (3.5.2) zwischen 250 und 350 nm analysiert werden. Dabei wird die Chiralität der Umgebung der Chromophore (Tryptophan und Tyrosin) näher betrachtet. Alle ssAnPRT-Mutanten beinhalten acht Tyrosine und zeigen identische Spektren mit drei Maxima bei 259 nm, bei 266 nm sowie bei 277 nm (Abbildung 32 B). Daraus geht eindeutig hervor, dass die Einführung der stabilisierenden Mutationen in die Ausgangsmutante zu keiner Veränderung der Tertiärstruktur führt.

#### 4.3.7.3 Oligomerisierungszustand ausgewählter Mutanten

Zur Abschätzung der Homogenität und zur Bestimmung des Assoziationszustandes der ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten wurden diese mittels analytischer Gelfiltration an einer Superdex S75 Säule untersucht (3.5.4). Durch diese Untersuchung sollte getestet werden, ob die isolierten stabilisierenden Mutationen die Bildung des Homodimers fördern. In Abbildung 33 sind die Elutionsprofile für ausgewählte ssAnPRT-Mutanten gezeigt. Die Analyse lässt die eindeutige Schlussfolgerung zu, dass die Mutationen den monomeren Assoziationszustand unter den Bedingungen des Gelfiltrationslaufes nicht verändern. Die Fünffachmutante im Hintergrund des wildtypischen Proteins eluiert dagegen wie erwartet als Homodimer (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration (Superdex 75) von verschiedenen ssAnPRT-Mutanten.**

Die Elution wurde bei 280 nm verfolgt; die Flussrate betrug 0,5 ml/min in 50 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl. Die aufgetragene Proteinmenge betrug in allen Fällen 3,8 µg. Mithilfe einer Kalibrierungsgerade (siehe Anhang 7.6) konnte die apparente molare Masse  $M_R^{app}$  und damit der Assoziationszustand bestimmt werden. Alle ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Mutanten zeigen im Gegensatz zur dimeren Mutante ssAnPRT-T77I+N109S+I169T+F193S+L320M einen monomeren Assoziationszustand.

Da die auf eine Superdex-75 (CV = 24 ml) geladenen Proben beim Gelfiltrationslauf ca. 1:10 verdünnt werden (Schwabe, 2007) kann somit zumindest bei einer



Konzentration von 1,5  $\mu\text{M}$  (Auftrag: 15  $\mu\text{M}$  Protein in 100  $\mu\text{l}$  Pufferlösung) eine Dimerbildung ausgeschlossen werden.

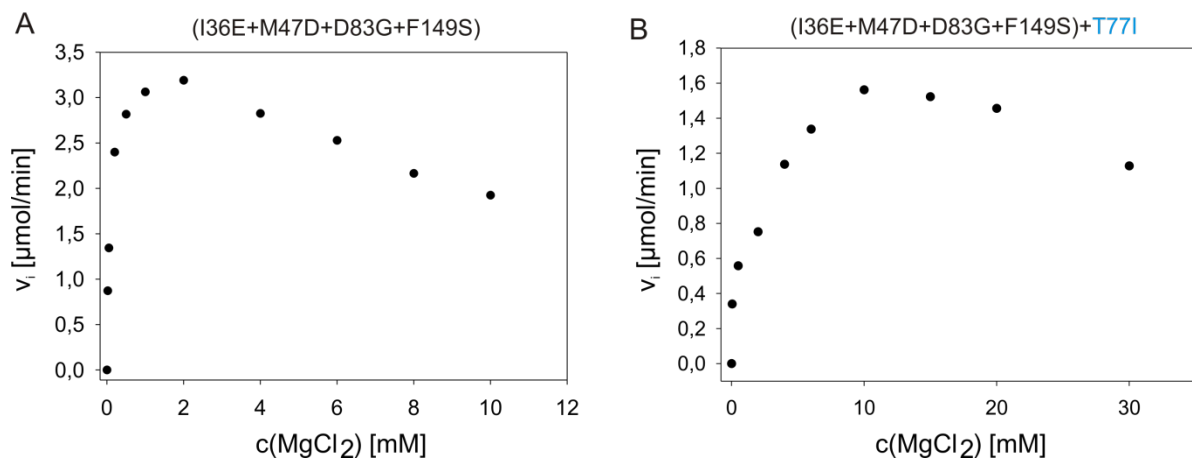
Um weitere Gewissheit über den Oligomerisierungsgrad der Mutanten zu erlangen wurde die Fünffachmutante bei verschiedenen Konzentrationen durch differentielle Scanning Kalorimetrie (3.5.10) denaturiert. Mithilfe dieses Experiments wurde untersucht, ob bei höheren Proteinkonzentrationen ein Monomer-Dimer Gleichgewicht auftritt und folglich eine höhere Proteinstabilität messbar ist. Mit einer vergleichbaren Methode konnte das Monomer-Dimer Gleichgewicht der Mutanten ssAnPRT-I36E bzw. –M47D bei 80 °C nachgewiesen werden (Schwab *et al.*, 2008). Die DSC-Messungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 15 - 150  $\mu\text{M}$  Protein durchgeführt. Die apparente Schmelztemperatur  $T_M^{\text{app}}$  lag bei allen Messungen in einem Bereich von 84 – 85 °C. Die Ergebnisse belegen daher eindeutig, dass die fünf Austausche bei den untersuchten Proteinkonzentrationen zu keiner nachweisbaren Dimerbildung führen.

#### 4.3.7.4 Steady-state Enzymkinetik

Obwohl die stabilisierenden Mutationen durch die Selektion bei 79 °C in *T. thermophilus*  $\Delta\text{trpD\_shble-77-3}$  Zellen isoliert wurden, erfolgte die Bestimmung der *steady-state* enzymkinetischen Parameter bei 37 °C. Dies gewährleistete eine Vergleichbarkeit mit den in bisherigen Arbeiten untersuchten ssAnPRT Proteinen (Schwab *et al.*, 2008; Schlee *et al.*, 2009). Nachdem die Arrheniusdiagramme der Wechselzahlen von ssAnPRT-wt und –D83G+F149S identische Steigungen zeigen (Deuss, 2006), kann angenommen werden, dass durch die Bestimmung der katalytischen Eigenschaften bei 37 °C verlässlich auf die katalytischen Eigenschaften bei höheren Temperaturen geschlossen werden kann.

Analog zu 4.1.3.3 wurde zunächst die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der zugegebenen Konzentration an  $\text{Mg}^{2+}$  bestimmt. In der Folge wurden bei optimaler  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration die katalytischen Parameter bestimmt. Wie aus Abbildung 34 A hervorgeht, zeigt das Ausgangskonstrukt ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) eine identische Magnesiumabhängigkeit wie ssAnPRT-D83G+F149S (Schlee *et al.*, 2009), mit einem Optimum bei 2 mM. Dies gilt auch für vier der fünf stabilisierenden Mutationen (Daten nicht gezeigt). Durch die Mutation T77I kommt es dagegen zu einer leicht veränderten Magnesiumabhängigkeit, die in einem Aktivitätsoptimum bei 10 mM  $\text{MgCl}_2$  resultiert (Abbildung 34 B). An diesem

Punkt sollte angemerkt werden, dass die intrazelluläre Magnesiumkonzentration in *T. thermophilus* nicht bekannt ist. Falls man jedoch annimmt, dass diese gleich der Magnesiumkonzentration im Wachstumsmedium von 1,3 mM entspricht, dann kann aus Abbildung 34 B auf eine relativ effiziente Enzymkatalyse unter Selektionsbedingungen geschlossen werden.



**Abbildung 34: Einfluss des T77I-Austausches auf die Magnesiumabhängigkeit der *steady-state* Enzymaktivität von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S).**

Die Anfangsgeschwindigkeiten des Umsatzes von 100  $\mu\text{M}$  AA wurden bei 37 °C in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 gemessen.

A:  $\text{Mg}^{2+}$ -Abhängigkeit der Umsatzrate von 0,015  $\mu\text{M}$  ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) in Gegenwart von 1 mM PRPP.

B:  $\text{Mg}^{2+}$ -Abhängigkeit der Umsatzrate von 0,018  $\mu\text{M}$  ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+T77I in Gegenwart von 1,5 mM PRPP.

In der Folge wurden die weiteren Messungen von Mutanten mit dem T77I-Austausch in Gegenwart von 10 mM  $\text{MgCl}_2$  durchgeführt. In Tabelle 27 sind die ermittelten enzymkinetischen Parameter für alle analysierten Mutanten aufgelistet.

**Tabelle 27: Steady-state enzymkinetische Parameter von ssAnPRT-Mutanten bei 37 °C.**

Die Bestimmung der katalytischen Parameter erfolgte durch die Aufnahme von Sättigungskurven in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 bei 37 °C mit variablen Konzentrationen der Substrate AA bzw. PRPP in Gegenwart optimaler  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen.  $k_{cat}$ : Wechselzahl;  $K_M$ : Michaeliskonstante für das jeweilige Substrat;  $k_{cat}/K_M$ : katalytischer Effizienzparameter. Bei der Bestimmung von  $K_M^{PRPP}$  und  $K_M^{AA}$  lag das jeweils zweite Substrat in sättigender Konzentration ( $>10 \cdot K_M$ ) vor. Werte für  $K_M$  bzw.  $V_{max}$  wurden aus den erhaltenen Sättigungskurven mithilfe einer hyperbolischen Funktion (Sigma Plot 11.0) gefittet. Angegeben sind für  $k_{cat}$  ( $= V_{max}/[E_0]$ ) jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen, während für  $K_M$  jeweils der Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen angegeben ist. Bei der Mittelung der  $K_M$ -Werte lagen die  $K_M^{PRPP}$ - bzw.  $K_M^{AA}$ -Werte in einem Fehlerbereich von maximal 40 % bzw. 20 %. <sup>(1)</sup> Daten aus Schlee *et al.* (2009), <sup>(2)</sup> Daten aus Schwab *et al.* (2008).

ssAnPRT-	$Mg^{2+}$ - Optimum [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_M^{AA}$ [μM]	$K_M^{PRPP}$ [μM]	$k_{cat}/K_M^{AA}$ [s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M^{PRPP}$ [s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]
(I36E+M47D+D83G+F149S)	2	3,4 ± 0,2	11	45	3,3 · 10 <sup>5</sup>	7,6 · 10 <sup>4</sup>
+T77I	10	1,3 ± 0,1	37	55	3,6 · 10 <sup>5</sup>	2,4 · 10 <sup>4</sup>
+N109S	2	0,78 ± 0,13	60	33	1,3 · 10 <sup>4</sup>	2,4 · 10 <sup>4</sup>
+I169T	2	3,5 ± 0,1	7	62	5,4 · 10 <sup>5</sup>	5,6 · 10 <sup>4</sup>
+F193S	2	2,7 ± 0,2	29	37	9,2 · 10 <sup>4</sup>	7,2 · 10 <sup>4</sup>
+L320M	2	3,9 ± 0,1	8	54	4,6 · 10 <sup>5</sup>	7,2 · 10 <sup>4</sup>
+T77I+N109S+I169T +F193S+L320M	10	0,046 ± 0,002	82	55	5,6 · 10 <sup>2</sup>	8,4 · 10 <sup>2</sup>
+T77I+I169T +F193S+L320M	10	1,2 ± 0,06	51	47	2,3 · 10 <sup>4</sup>	2,5 · 10 <sup>4</sup>
D83G+F149S <sup>(1)</sup>	2	13,3	3	13	4,3 · 10 <sup>6</sup>	1,0 · 10 <sup>6</sup>
I36E+M47D <sup>(2)</sup>	0,05	0,28	0,06	150	4,8 · 10 <sup>6</sup>	1,9 · 10 <sup>3</sup>
wt <sup>(2)</sup>	0,05	0,41	0,09	180	4,8 · 10 <sup>6</sup>	2,3 · 10 <sup>3</sup>

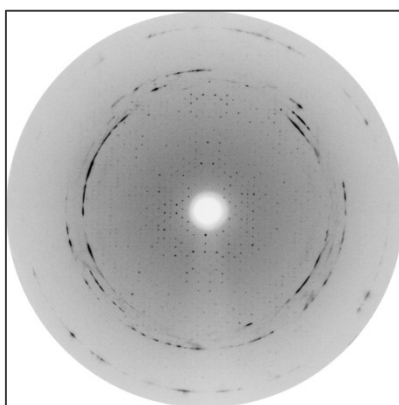
Die Daten zeigen, dass die beiden stark stabilisierenden Mutationen T77I und F193S die Wechselzahl im Vergleich zum Ausgangskonstrukt, dem aktivierten Monomer ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S), leicht um den Faktor 2,5 bzw. 1,3 reduzieren und die Michaeliskonstante für AA etwa dreifach heraufsetzen. Dagegen führt der nur schwach stabilisierende Austausch N109S zu einer 4,5-fachen Reduktion des  $k_{cat}$  und einer sechsfachen Erhöhung von  $K_M^{AA}$ . Die beiden anderen leicht stabilisierenden Austausche I169T und L320M ändern die Werte für  $k_{cat}$  und  $K_M^{AA}$  nur wenig. Der  $K_M^{PRPP}$  ist für alle untersuchten Mutanten im Rahmen der Meßgenauigkeit unverändert. Viel drastischer wirkt sich die durch den N109S-Austausch verursachte Aktivitätsminderung im Kontext der anderen Mutationen aus: die Wechselzahl der

Fünffachmutante liegt 75-fach unterhalb der des Ausgangskonstruktes, die der Vierfachmutante ohne den N109S-Austausch jedoch nur etwa dreifach. Mögliche strukturelle Erklärungen für die durch die Mutationen verursachten Effekte befinden sich in Abschnitt 4.3.8.

Die katalytische Effizienz  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{AA}}$  ist für alle Mutanten niedriger als für das wildtypische Enzym. Dagegen ist der Effizienzparameter  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRPP}}$  der im Rahmen dieser Arbeit isolierten stabilisierten Einzelmутanten im Vergleich zum wildtypischen Enzym um eine Größenordnung erhöht, jedoch im Vergleich zum aktivierten Dimer (D83G+F149S) um zwei Größenordnungen erniedrigt.

#### 4.3.7.5 Kristallisation und Röntgenbeugungsmuster von ssAnPRT-T77I+N109S+I169T+F193S+L320M

Aufgrund der hohen konformationellen Stabilität der monomeren Fünffachmutante mit allen vorteilhaften Aminosäureaustauschen sollte die Kristallstruktur in Zusammenarbeit mit Dr. Felix List (EMBL Hamburg) gelöst werden. Wie unter 3.5.15 beschrieben, wurden frisch gereinigte Proteinproben für die Kristallisation eingesetzt. Die erhaltenen Kristalle waren jedoch durchweg sehr weich und somit ungeeignet für die Röntgenstrukturanalyse. Daher wurde versucht die Struktur der dimeren Fünffachmutante ssAnPRT-T77I+N109S+I169T+F193S+L320M zu lösen. Bisher konnte ein geeigneter Kristall identifiziert werden, welcher an der *beamline* X11 am DESY Hamburg Röntgenbeugungsdaten bis zu einer Auflösung von 2,7 Å lieferte (Abbildung 35).

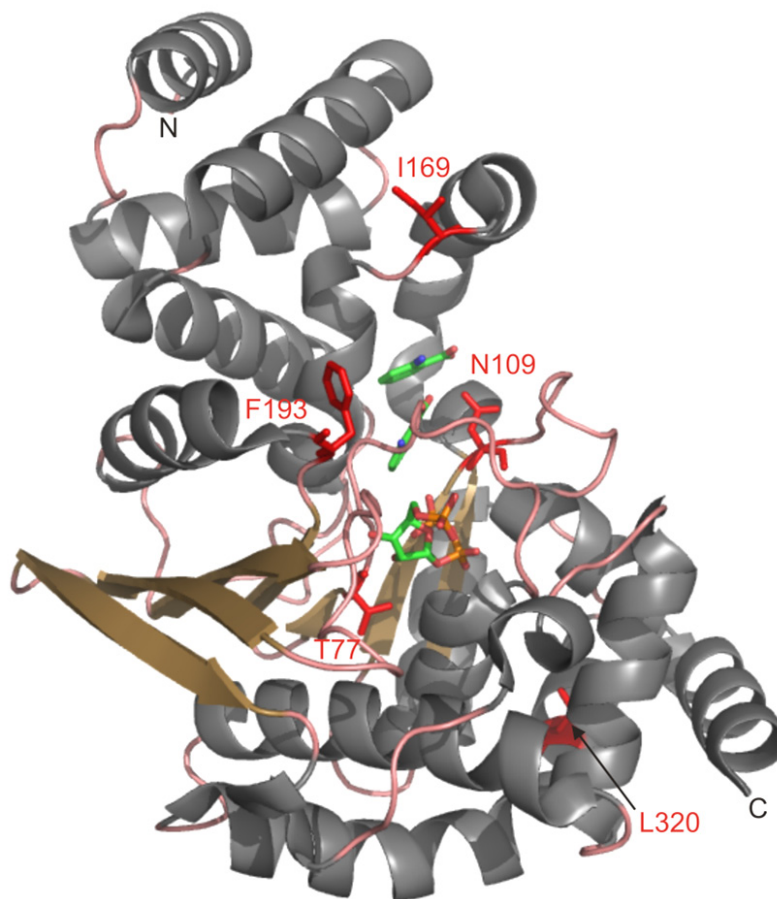


**Abbildung 35: Beugungsbild aus dem ssAnPRT-T77I+N109S+I169T+F193S+L320M Datensatz.** Röntgenbeugungsdaten wurden an der *beamline* X11 am DESY Hamburg bis zu einer Auflösung von 2,7 Å aufgenommen. Kristallisationsbedingung: 0,12 M Ammoniumacetat, 0,056 M Bis-Tris, pH 6,5, 20 % (w/v) PEG 10000.

Die in Abbildung 35 erkennbaren schwarzen Ringe führen zu einer Reduktion der Daten um ca. 35 %, weshalb es mit dem aufgenommenen Datensatz nicht möglich war, die Struktur durch molekularen Ersatz zu lösen. Gegenwärtig wird versucht, Kristalle mit besseren Beugungseigenschaften zu erhalten.

#### 4.3.8 Strukturelle Grundlagen der Stabilisierung durch die isolierten Mutationen

Nachdem zum jetzigen Zeitpunkt keine Kristallstruktur mit den stabilisierenden Austauschen vorlag, wurden diese mit dem Programm Pymol™0.99rc6 in die wildtypische Struktur modelliert, wobei keine Veränderung des Proteinrückgrats zugelassen wurde. Die Lage der Austausche ist in Abbildung 36 dargestellt.



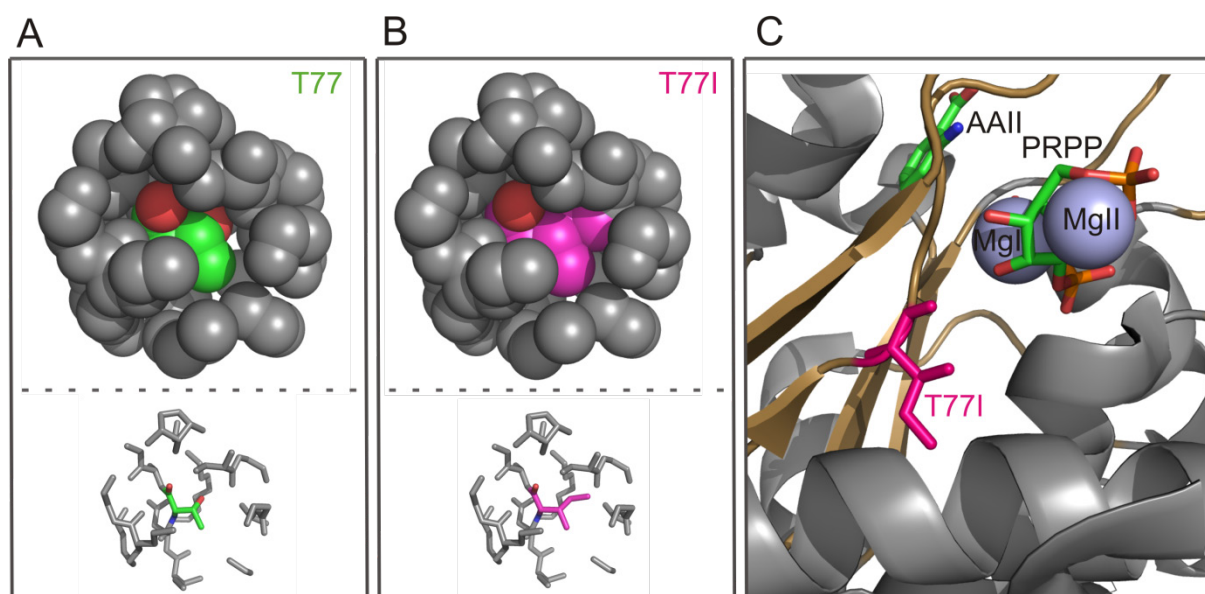
**Abbildung 36: Lage der mutierten Reste in der Röntgenstruktur von wildtypischem ssAnPRT (PDB-Eintrag: 1ZYK).**

Bänderdarstellung der Kristallstruktur einer Protomereinheit von ssAnPRT mit gebundenem PRPP sowie den beiden AA-Molekülen (PDB-Eintrag: 1ZYK). Die Aminosäurereste T77, N109, I169, F193 sowie L320 sind in rot dargestellt.

#### 4.3.8.1 Effekt der Mutation T77I

Die Mutation T77I wurde bei der Selektion aus vier verschiedenen Klonen isoliert (Abbildung 24), wobei in allen Fällen der Nukleotidaustausch ACA zu AIA auftrat. Dieser Aminosäureaustausch erhöht den  $T_M^{\text{app}}$ -Wert je nach Hintergrund um bis zu 8 °C (Tabelle 24) und hat damit den stärksten positiven Effekt von allen in dieser Arbeit isolierten Mutationen.

Wie aus dem Vergleich von Abbildung 37 A und B entnommen werden kann, führt der Austausch der moderat hydrophoben Seitenkette des Threonins gegen die stark hydrophobe Seitenkette des Isoleucins (Bowie *et al.*, 1990) zu einer verbesserten Packung im Inneren des Proteins. Man kann daher annehmen, dass zusätzlich ausgebildete van-der-Waals Wechselwirkungen die strukturelle Grundlage für den Gewinn an konformationeller Stabilität darstellen.



**Abbildung 37: Darstellung der Umgebung von T77I.**

A: Gezeigt ist die Aminosäureumgebung von T77 innerhalb eines Abstandes von 6 Å (PDB-Eintrag: 1ZYK) in der Kugel- (oben) bzw. der korrespondierenden Stäbchendarstellung (unten). Kohlenstoffatome sind in grün, Sauerstoffatome in rot und Stickstoffatome von T77 in blau dargestellt.

B: Gezeigt ist die Aminosäureumgebung von T77I innerhalb eines Abstandes von 6 Å (PDB-Eintrag: 1ZYK), in der Kugel- (oben) bzw. der korrespondierenden Stäbchendarstellung (unten). Kohlenstoffatome sind in grün, Sauerstoffatome in rot und Stickstoffatome von T77I in blau dargestellt. Die Mutation T77I wurde mithilfe des Programms Pymol™0.99rc6 *in silico* eingeführt.

C: Gezeigt ist die Röntgenkristallstruktur von ssAnPRT mit gebundenem PRPP, MgI + MgII sowie AAIL (PDB-Eintrag: 1ZYK). Die Distanz des  $C_\beta$ -Atoms von T77I zu den beiden Magnesiumionen MgI und II beträgt 6,6 Å bzw. 9,4 Å, wohingegen sich die Distanz des  $C_\beta$ -Atoms zum Stickstoffatom von AAIL auf 14 Å beläuft.

Auf der Basis bioinformatischer Ansätze konnte eine Stabilisierung der Gß1-Domäne u. a. durch den Austausch von zwei Threoninen gegen Isoleucine erreicht werden

(Malakauskas und Mayo, 1998). Dabei führten diese Austausche in einem  $\beta$ -Faltblatt zu einer Proteinkompaktierung ohne dabei die Sekundärstruktur zu beeinflussen. Die stabilisierende Wirkung dieser Austausche konnte durch *in vitro* Evolution mithilfe der Proside-Technik bestätigt werden (Wunderlich *et al.*, 2005; Wunderlich und Schmid, 2006). Dabei wurde gefolgert, dass durch die beiden Austausche eine indirekte Stabilisierung erfolgt, da Isoleucin schlechter solvatisiert wird als Threonin und folglich den ungefalteten Zustand destabilisiert (Wunderlich *et al.*, 2007). Da Position 77 vollständig im Inneren von ssAnPRT liegt, scheint der vorteilhafte hydrophobe Effekt durch den T77I-Austausch ebenso einen Beitrag für die beobachtete Stabilisierung zu leisten.

Interessanterweise ergab die Analyse eines MSAs aus 220 verschiedenen AnPRT-Sequenzen (siehe Tabelle 5), dass Isoleucin mit einer Häufigkeit von 44 % den „Konsensus“-Rest an der Position „77“ darstellt (Tabelle 28). Durch Einführung von Aminosäuren, die dem „Konsensus“-Rest entsprechen wurde bereits in mehreren Fällen eine Proteinstabilisierung erzielt (Lehmann *et al.*, 2002; Flores und Ellington, 2005; Polizzi *et al.*, 2006). Allerdings stellt Threonin mit 36 % den am zweithäufigsten vorkommenden Rest an dieser Position dar.

**Tabelle 28: Aminosäureverteilung an der Position „77“ von AnPRTs.**

Die Verteilung wurde aus einem MSA mit 220 ausgewählten AnPRTs (siehe Tabelle 5) abgeleitet.

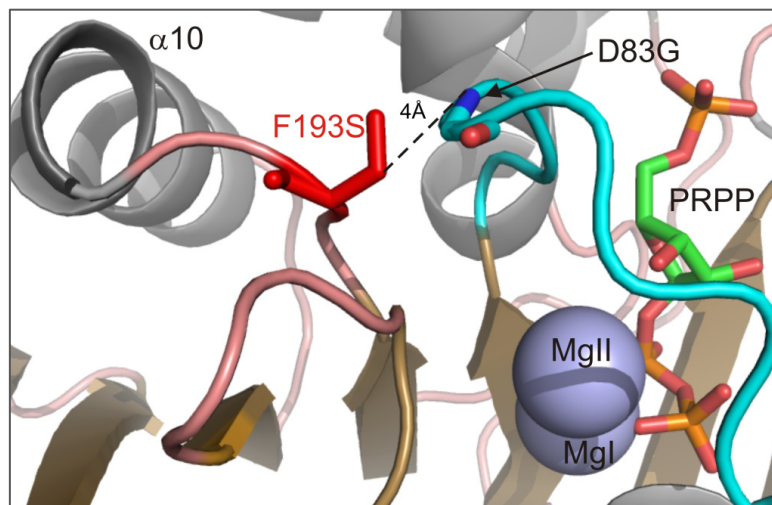
Aminosäure	relative Häufigkeit [%]
<b>Isoleucin</b>	<b>43,6</b>
<b>Threonin</b>	<b>35,9</b>
Valin	9,1
Asparagin	6,4
Serin	1,8
Cystein	1,4
Leucin	1,4
Methionin	0,5

Der Aminosäurerest T77 in ssAnPRT befindet sich in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum, ist aber nicht an einer direkten Wechselwirkung mit PRPP, AAlI und den beiden Magnesiumionen beteiligt (Abbildung 37 C). Dies erklärt warum die T77I-Mutation sich nur wenig auf die katalytische Aktivität des Enzyms auswirkt (Tabelle 27).



#### 4.3.8.2 Effekt der Mutation F193S

Der Aminosäureaustausch F193S wiederum wurde bei der Selektion in drei verschiedenen Klonen gefunden (Abbildung 24) und jeweils durch den Nukleotidaustausch TTT zu TCT verursacht. Die Mutation bewirkt je nach Hintergrund eine Erhöhung von  $T_M^{app}$  um bis zu 5 °C (Tabelle 25) und zeigt damit den zweistärksten Effekt aller identifizierten Austausche. Im Gegensatz zu T77I befindet sich der F193S-Austausch an der Proteinoberfläche in *loop*  $\beta 4\alpha 10$  in unmittelbarer Nähe von *loop*  $\beta 1\alpha 5$  (Abbildung 38).



**Abbildung 38: Darstellung der Umgebung von F193S.**

Gezeigt ist die Röntgenkristallstruktur von ssAnPRT-D83G+F149S mit gebundenem PRPP und Mgl + MglI (PDB-Eintrag: 3GBR). F193S befindet sich in *loop*  $\beta 4\alpha 10$  in räumlicher Nähe zu *loop*  $\beta 1\alpha 5$  (in cyan dargestellt), wobei die Distanz der  $C_\beta$ -Atome von F193S und D83G 4 Å beträgt. Die Mutation F193S wurde mithilfe des Programms Pymol™0.99rc6 *in silico* eingeführt.

Abbildung 38 zeigt, dass F193S in direkter Nachbarschaft von D83G aus *loop*  $\beta 1\alpha 5$  steht (Distanz der  $C_\beta$ -Atome 4 Å), der in der Apo-Kristallstruktur ungeordnet vorliegt (Mayans *et al.*, 2002), und erst im Zuge der Bindung von PRPP auswertbare Elektronendichte ausbildet (Marino *et al.*, 2006). Analog dazu erfolgte auch bei AnPRT aus *M. tuberculosis* (Lee *et al.*, 2006) durch PRPP-Zugabe eine Strukturierung des *loops*. Es lässt sich vermuten, dass der flexible *loop*  $\beta 1\alpha 5$  durch den Aminosäureaustausch F193S stabilisiert wird. Trotz der Nähe zum D83G-Austausch, der die Aufhebung der  $Mg^{2+}$ -Inhibition bewirkt (Schlee *et al.*, 2009), führt die Mutation F193S zu keiner Veränderung des Magnesiumoptimums oder der Michaeliskonstante für PRPP (Tabelle 27).

Eine Analyse der Aminosäureverteilung an Position „193“ auf der Basis eines MSAs aus 220 AnPRT-Sequenzen (siehe Tabelle 5) ergab, dass bevorzugt Reste mit

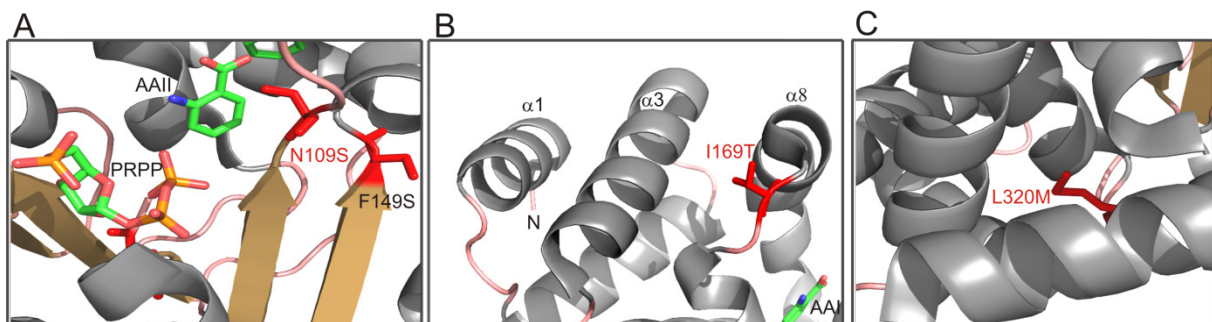


aromatischen Seitenketten auftreten (Y: 43 %, F: 35 %, A: 14 %, S: 3 %). Dieses Ergebnis zeigt, dass die beobachtete Mutation von einem „Konsensus“-Rest weg zu einem seltenen Rest führte. Folglich könnte die stabilisierende Wirkung des Austausches sehr spezifisch für ssAnPRT sein.

Eine Abhängigkeit der stabilisierenden Wirkung vom D83G-Austausch kann ausgeschlossen werden, da der Anstieg von  $T_M^{app}$  im nicht aktivierten Monomer (I36E+M47D) dem im aktivierten Monomer (I36E+M47D+D83G+F149S) entspricht (Tabelle 25).

#### 4.3.8.3 Effekt der Mutationen N109S, I169T und L320M

Die drei Mutationen wurden in Kombination aus drei Klonen isoliert (Abbildung 24), wobei jeweils folgende Nukleotidaustausche auftraten: AAT zu AGT (N109S), ATC zu ACC (I169T) und ITG zu ATG (L320M). Die einzelnen Mutationen erhöhen die thermische Stabilität von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) nur marginal um etwa 1 °C (Tabelle 22). In Abbildung 39 ist die Umgebung der Mutationen in der Struktur von ssAnPRT dargestellt.



**Abbildung 39: Darstellung der Umgebung von N109S (A), I169T (B) und L320M (C).**

Bänderdarstellung der Röntgenkristallstruktur von ssAnPRT (PDB-Eintrag: 1ZYK). Die Mutationen N109S, I169T und L320M wurden mithilfe des Programms Pymol™0.99rc6 *in silico* eingeführt.

A: Gezeigt ist die Umgebung von N109S mit gebundenem PRPP, AAI sowie F149S.

B: Gezeigt ist die Umgebung von I169T im Bereich der Protomer-Interaktionsfläche mit den Helices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 8$  sowie AAI.

C: Gezeigt ist die Umgebung von L320M.

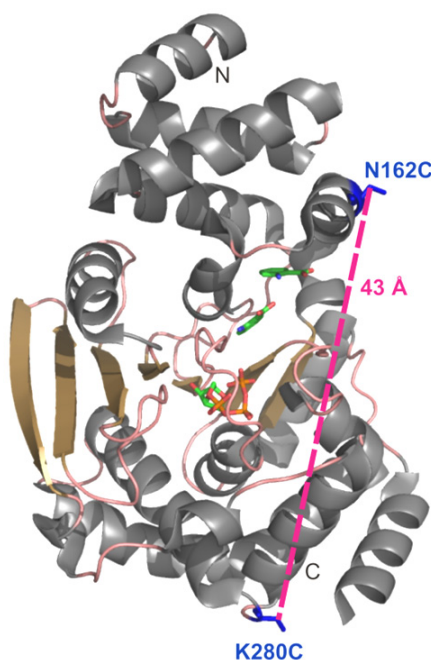
Der Aminosäurerest N109 ist Teil des aktiven Zentrums (Abbildung 39 A) und bildet in wildtypischem ssAnPRT eine Wechselwirkung sowohl mit AAI als auch AAI aus (Marino *et al.*, 2006). Darüber hinaus befindet sich der Rest in direkter Nähe zu F149S. Dieser Austausch erhöht die Wechselzahl des Enzyms indem er die Freisetzung des Produktes PRA erleichtert, vermutlich durch eine Erhöhung der konformationellen Flexibilität (Schlee *et al.*, 2009). Insofern ist es möglich, dass der

Aminosäureaustausch N109S sowohl zu einer Perturbation der AA-Bindestelle, als auch der Scharnierregion zwischen den beiden Domänen des Protomers (Schlee *et al.*, 2009) führt, was sich in der etwa sechsfach erhöhten Michaeliskonstante für AA und der etwa vierfach reduzierten Wechselzahl der N109S-Einzelmutante (Tabelle 27) widerspiegelt. Des Weiteren ist die Aminosäure Asparagin an der Position „109“ hoch konserviert (N: 87 %, G: 7 %, A: 3 % und S: 2 %), d. h. wie bei F193S (4.3.8.2) führt der beobachtete Austausch weg vom „Konsensus“-Rest. Möglicherweise lässt sich dies dadurch erklären, dass für die Aktivität wichtige Reste oft nachteilig für die Stabilität sind (Shoichet *et al.*, 1995). Der Austausch N109S führt neben der geringen Stabilisierung auch zu einer Erhöhung der Löslichkeit *in vitro* (4.3.7.1), was auf eine bessere Hydratisierung des Proteins hinweist.

Der Austausch I169T befindet sich in *loop*  $\alpha 8\alpha 9$  an der Proteinoberfläche im Bereich der Dimerisierungsfläche von ssAnPRT (Abbildung 39 B). Wie die Analysen zum Oligomerisierungszustand (4.3.7.3) eindeutig belegen, bewirkt dieser Aminosäureaustausch jedoch keine „Redimerisierung“. Neben der geringen Stabilisierung des Proteins führt der Austausch ebenso zu einer Erhöhung der Löslichkeit *in vitro* (4.3.7.1), was durch die bessere Hydratisierbarkeit von Threonin im Vergleich zu Isoleucin erklärbar ist. Der Austausch I169T hat ebenso wie L320M keinen Einfluss auf die katalytische Effizienz (4.3.7.4, Tabelle 27). L320M befindet sich in einer hydrophoben Tasche des Proteins (Abbildung 39 C) und möglicherweise führt der Austausch Leucin gegen Methionin analog zum T77I-Austausch (4.3.8.1) zu einer verbesserten Packung im Proteininneren.

#### 4.4 Vorbereitungen der ssAnPRT-Mutanten für FRET-Messungen

Die Substrate AA und PRPP liegen in der holo-Struktur von ssAnPRT weit voneinander entfernt (Marino *et al.*, 2006) und die Freisetzung des Produktes PRA wird durch die flexibilisierende Mutation F149S beschleunigt (Schlee *et al.*, 2009). Dies legt nahe, dass es im Zuge der Katalyse zu größeren Konformationsänderungen kommt. Dabei wird eine asymmetrische Scharnierbewegung angenommen, bei der die große  $\alpha/\beta$ -Domäne gegen die kleine  $\alpha$ -helikale Domäne gedreht wird (Marino *et al.*, 2006). Um diese Domänenbewegung über Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) mithilfe von Alexa-Farbstoffen verfolgen zu können, wurden die Aminosäuren N162 aus der  $\alpha$ -helikalen Domäne und K280 aus der  $\alpha/\beta$ -Domäne über OE-PCR durch Cysteinreste ersetzt (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Struktur von ssAnPRT-N162C+K280C.**

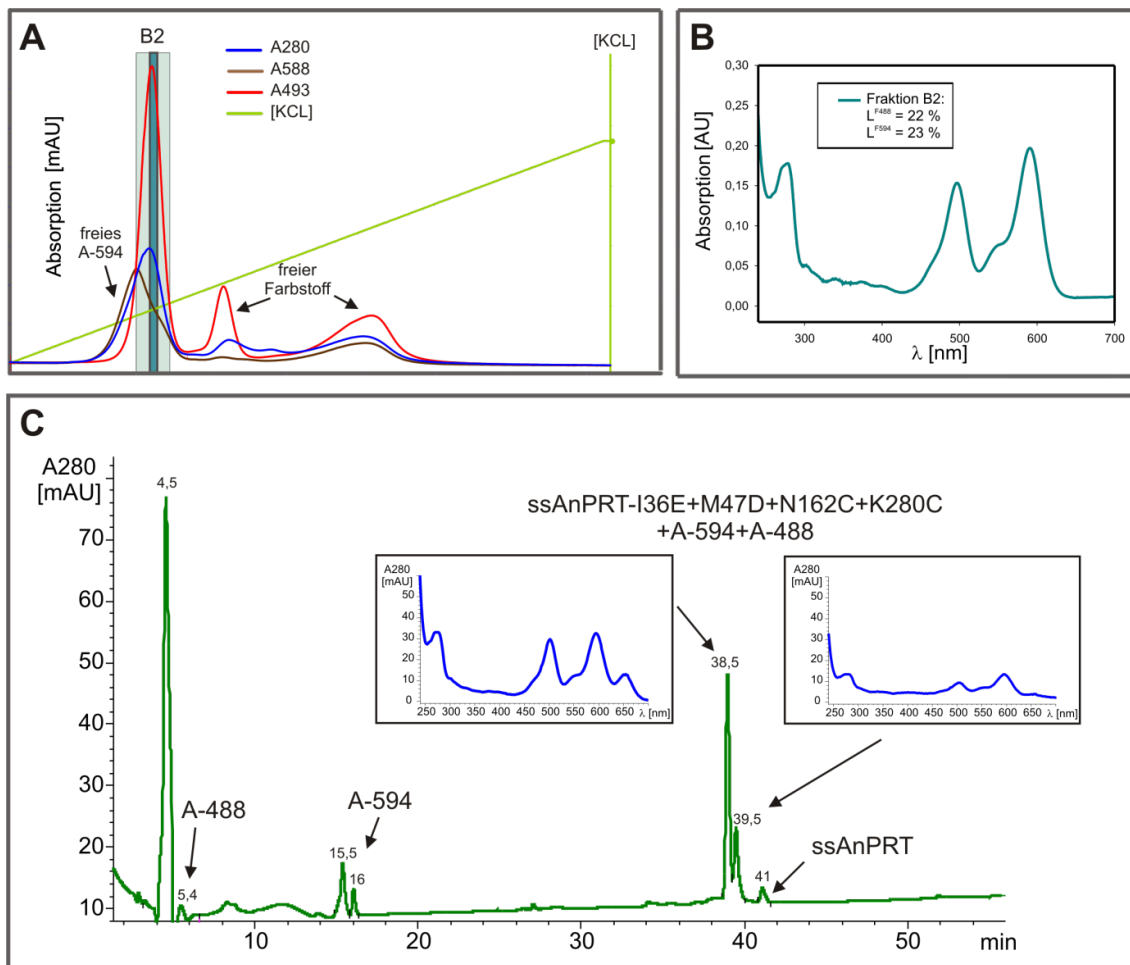
Bänderdarstellung der Kristallstruktur einer Protomereinheit von ssAnPRT-wt mit gebundenem PRPP sowie den beiden AA-Molekülen (PDB-Eintrag: 1ZYK). Die Aminosäurereste N162C und K280C sind in blau dargestellt, wobei diese zur Präsentation mithilfe des Programms Pymol™0.99rc6 *in silico* eingeführt wurden. Die Distanz der beiden C $_{\beta}$ -Atome beträgt 43 Å (pink).

Der Abstand dieser Reste beträgt 43 Å und kommt damit dem Förster-Radius von 60 Å bzw. 56 Å der verwendeten Farbstoffpaare Alexa-488 (Donor) und Alexa-594 (Akzeptor) bzw. Alexa-647 (Akzeptor) relativ nahe. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden an die SH-Gruppen der Cysteine gekoppelt und die markierten Proteinproben gemäß dem in 3.4.3 beschriebenen Protokoll aufgereinigt. Mithilfe von

Absorptionsspektroskopie (3.5.1.2) und *reversed phase* HPLC Analytik (3.5.14) wurden die Proben hinsichtlich ihres Markierungsgrades und ihrer Homogenität überprüft. Der Schwerpunkt in diesem Teilprojekt, welches hauptsächlich von Jeannette Ueckert (Lehrstuhl Biochemie II, Universität Regensburg) unter meiner Anleitung durchgeführt wurde, war die Herstellung und Anreicherung homogener Proteinproben mit hohen Markierungsgraden. Dazu wurde das Markierungsprotokoll zunächst mit den Einzelmutanten ssAnPRT-N162C und ssAnPRT-K280C optimiert, wobei Markierungsgrade von 70 – 80 % für ssAnPRT-N162C und von 50 – 70 % für ssAnPRT-K280C erreicht wurden. Es wurde entweder Alexa-488 oder Alexa-594 eingesetzt, wobei die Experimente mit beiden Farbstoffen zu vergleichbaren Markierungsgraden führten.

Um ein FRET-fähiges Farbstoffpaar zu erzeugen, wurde in der Folge mit der monomeren Mutante ssAnPRT-I36E+M47D+N162C+K280C gearbeitet. Die beiden Cysteine dieser Mutante wurden gleichzeitig mit Donor- (Alexa-488) und Akzeptorfarbstoff (Alexa-594 oder Alexa-647) im Ansatz gekoppelt. Unter der Annahme einer stochastischen Gleichverteilung sollte die Hälfte der doppelt markierten Proteine zu einem FRET-fähigen Donor-Akzeptor-Paar führen.

Exemplarisch soll in der Folge anhand drei verschiedener Markierungsansätze das Resultat der Optimierung des Markierungsprotokolls dokumentiert werden. In Abbildung 41 A ist die Reinigung von ssAnPRT-I36E+M47D+N162C+K280C markiert mit Alexa-488 und Alexa-594 dargestellt. In diesem Ansatz wurde durch Absorptionsspektroskopie (3.5.1.2) ein Markierungsgrad von 45 % bestimmt (Abbildung 41 B). Jedoch zeigte die HPLC-Analyse (Abbildung 41 C), dass sich noch ein relativ hoher Anteil an freiem Alexa-594 im Ansatz befindet, weshalb die Absorption von gebundenem Farbstoff Alexa-594 und damit der tatsächliche Markierungsgrad niedriger liegt.



**Abbildung 41: Reinigung von ssAnPRT markiert mit Alexa-488 plus Alexa-594 über Anionenaustausch-Chromatographie und Analyse ausgewählter Fraktionen.**

Die Markierung von ssAnPRT-I36E+M47D+N162C+K280C mit Alexa-488 und Alexa-594 erfolgte wie in 3.4.3 beschrieben.

A: Elutionsprofil der Aufreinigung des Markierungsansatzes über Anionenaustausch-Chromatographie (HiTrapQ 1 ml), aufgenommen über die Absorption bei 280 nm (blau), 493 nm (rot) und 588 nm (braun). Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 0 – 0,75 M KCl (grün) in 50 mM KP, pH 7,5. In den hinterlegten Fraktionen befindet sich Alexa-markiertes ssAnPRT, wobei die Fraktion B2 (türkis hinterlegt) zur weiteren Analyse verwendet wurde.

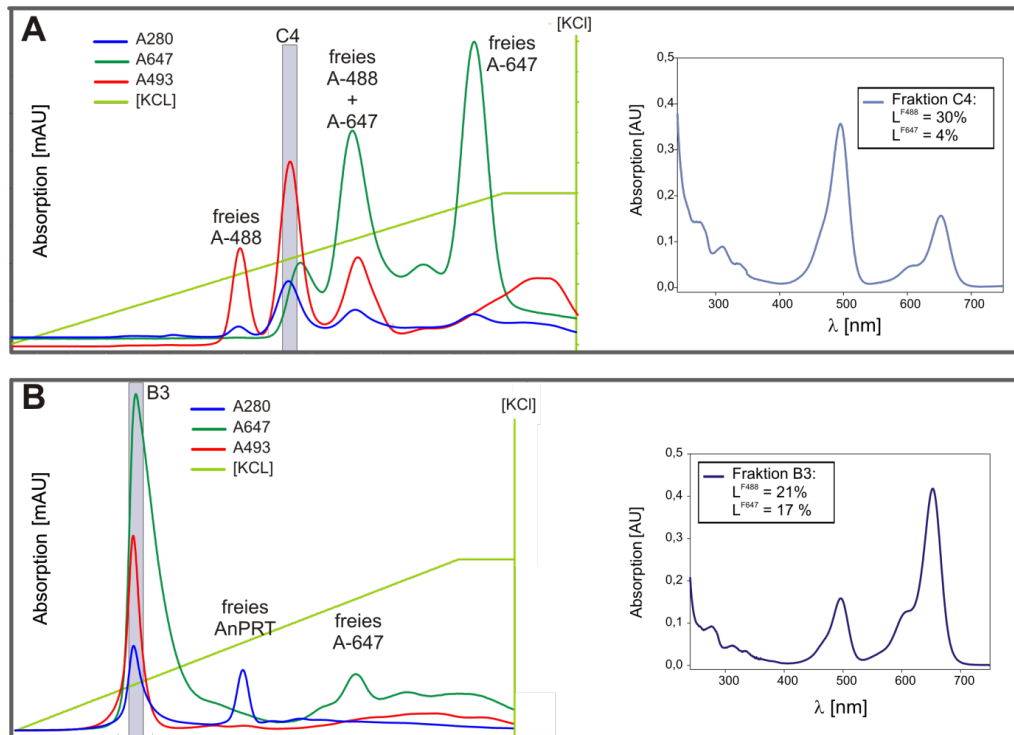
B: Die Analyse des Absorptionsspektrums der Fraktion B2 ergab einen Markierungsgrad  $L$  (siehe Formel 3 in 3.5.1.2) von 45 % für ssAnPRT (Alexa-488: 22 %, Alexa-594: 23 %) bei einer Proteinkonzentration von 4,3  $\mu$ M.

C: Elutionsprofil eines *reversed phase* HPLC Laufs von 80  $\mu$ l Probe von Fraktion B2. Die Elution (grün) erfolgte über eine 2x250 mm Jupiter-C5-Säule (Phenomenex) mit 5  $\mu$ m Partikelgröße und wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Nach 4,5 min tritt stets ein säulenspezifischer *peak* auf, der jedoch kein verwertbares Absorptionsspektrum zeigt. Die freien Farbstoffe eluieren nach 5,4 min (Alexa-488) bzw. 15,5 und 16 min (Alexa-594). Die Alexa-markierten ssAnPRT-Proteinproben eluieren nach 38,5 und 39,5 min, während unmarkiertes Protein nach 41 min erscheint. Für die *peaks* mit markiertem Protein ist jeweils das Absorptionsspektrum gezeigt.

Trotz verschiedener Optimierungsversuche der Anionenaustausch-Chromatographie konnte keine bessere Abtrennung des freien Farbstoffes Alexa-594 erreicht werden, da dieser zusammen mit markiertem Protein eluiert (Abbildung 41 A). Auch durch Einsatz eines Anionenaustauschers mit stärkerer Auflösung (1ml ResourceQ, *bead-*

Größe: 15  $\mu\text{M}$ , vlg. 1ml HiTrapQ: *bead*-Größe: 34  $\mu\text{M}$ ) konnte das Problem nicht gelöst werden.

Aus diesem Grund wurde der Akzeptorfarbstoff Alexa-594 durch Alexa-647 ersetzt. In Abbildung 42 ist die Reinigung von ssAnPRT markiert mit Alexa-488 plus Alexa-647 dargestellt.



**Abbildung 42: Reinigung von ssAnPRT markiert mit Alexa-488 plus Alexa-647 über Anionenaustauschchromatographie in 50 mM Tris/HCl, pH 9,0 (A) und 50 mM KP, pH 7,5 (B).**

Die Markierung von ssAnPRT-I36E+M47D+N162C+K280C mit Alexa-488 und Alexa-647 erfolgte wie in 3.4.3 beschrieben. Gezeigt sind die Elutionsprofile der Aufreinigungen von zwei verschiedenen Markierungsansätzen über Anionenaustausch-Chromatographie (HiTrapQ 1 ml), aufgenommen über die Absorption bei 280 nm (blau), bei 493 nm (rot) und bei 647 nm (grün).

A: Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 0 – 0,75 M KCl (grün) in 50 mM Tris/HCl, pH 9,0. In der Fraktion C4 (grau hinterlegt) befindet sich Alexa-markiertes ssAnPRT. Die Analyse des Absorptionsspektrums von C4 ergab einen niedrigen Markierungsgrad von 4 % für Alexa-647, während für Alexa-493 ein Markierungsgrad von 30 % ( $L = 34\%$ ) bei einer Proteinkonzentration von 8  $\mu\text{M}$  erreicht wurde.

B: Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 0 – 0,75 M KCl (grün) in 50 mM KP, pH 7,5. In der Fraktion B3 (grau hinterlegt) befindet sich Alexa-markiertes ssAnPRT. Die Analyse des Absorptionsspektrums deutet auf einen Markierungsgrad von 38 % hin, zu dem beide Farbstoffe in vergleichbarem Ausmaß beitragen (Alexa-488: 21 %; Alexa-647: 17 %). Die Proteinkonzentration lag bei 5  $\mu\text{M}$ . Bei diesem Ansatz wurde bei der Reinigung keine Fraktion mit freiem Alexa-488 identifiziert. Die *reversed phase* HPLC Analyse der Fraktionen C4 (aus A) und B3 (aus B) zeigten jeweils nur einen geringen Anteil an freiem Farbstoff Alexa-647 (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 42 A zeigt die Aufreinigung von ssAnPRT markiert mit Alexa-488 und -647 über Anionenaustausch-Chromatographie in 50 mM Tris/HCl pH 9,0. Das Absorptionsspektrum der Fraktion C4 deutet auf einen geringen Markierungsgrad für

Alexa-647 von 4 % hin, während Alexa-488 mit einem Markierungsgrad von 30 % eindeutig besser gebunden wurde.

In Abbildung 42 B ist eine Aufreinigung eines weiteren Markierungsansatzes durch Anionenaustausch-Chromatographie in 50 mM KP, pH 7,5 gezeigt. Die spektroskopische Analyse der Fraktion B3 zeigt einen Markierungsgrad von 38 %, wobei die beiden Farbstoffe Alexa-488 (21 %) und Alexa-647 (17 %) vergleichbar gut gebunden wurden.

Des Weiteren konnte durch *reversed phase* HPLC Analyse der Fraktionen C4 bzw. B3 aus beiden Ansätzen eine gute Abtrennung der Farbstoffe bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Daher kann angenommen werden, dass durch die Verwendung des Akzeptorfarbstoffes Alexa-647 statt Alexa-594 eine bessere chromatographische Abtrennung der freien Farbstoffe bei Verwendung einer HiTrapQ 1 ml-Säule möglich ist.

Durch Optimierung des Markierungs- und Reinigungsprotokolls war es somit möglich bei der Reaktion von ssAnPRT-I36E+M47D+N162C+K280C mit Alexa-488 plus Alexa-647 Fraktionen mit einem Markierungsgrad von ca. 40 % aufzureinigen, wobei die beiden Farbstoffe in vergleichbarem Ausmaß gebunden sind. Aufgrund der nahezu identischen Markierungsgrade der Einzelmутanten ssAnPRT-N162C und ssAnPRT-K280C mit Alexa-488 und Alexa-594, kann angenommen werden, dass die beiden Cysteine vergleichbar reaktiv sind. Deshalb kann bei einer Doppelmarkierung eine Gleichverteilung der gebundenen Farbstoffmoleküle an die beiden Cysteine angenommen werden. Im Fall von doppelt markiertem Protein mit einem Markierungsgrad von 40 %, sollten daher 20 % aller Moleküle FRET-fähige Donor-Akzeptor-Paare mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen darstellen. Nachdem mit den bisherigen Methoden keine Abtrennung von einfach- und doppelt-markiertem Protein möglich ist, muss davon ausgegangen werden, dass sich ein ebenso großer Anteil an einfach markiertem Protein im Ansatz befindet. Darum steht künftig eine weitere Optimierung der Auftrennung von einfach- und doppelt-markierten Proteinen an.

## 5 Abschließende Diskussion

### 5.1 Identifikation nativ monomerer AnPRTs

Trotz hoher Sequenzidentitäten nehmen homologe Proteine oft unterschiedliche Assoziationszustände ein (Thoma *et al.*, 2000; Clantin *et al.*, 2001; Hible *et al.*, 2005; Akiva *et al.*, 2008; Levy *et al.*, 2008; Nishi und Ota, 2010). Beispielsweise liegt im Gegensatz zu anderen charakterisierten chromosomal kodierten Dihydrofolat-Reduktasen (DHFR) einzig diejenige aus dem hyperthermophilen Organismus *T. maritima* als Dimer vor, während alle anderen Monomere sind (Dams und Jaenicke, 1999; Loveridge *et al.*, 2009). Dieser Befund belegt, dass die Vorhersage der Quartärstruktur eines Proteins selbst bei bekannter Tertiärstruktur eines Homologen nicht trivial ist. Hier können bioinformatische Methoden helfen. So gelang es beispielsweise mithilfe eines MSAs bei fünf von sechs unbekannten Lektinen die Quartärstruktur bei bekannter Tertiärstruktur korrekt zu prognostizieren (Manoj und Suguna, 2001). Analog war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, die Quartärstruktur von drei ausgewählten AnPRTs aus mesophilen Organismen vorherzusagen. Dabei wurde aus den Ergebnissen der erfolgreichen Monomerisierung von ssAnPRT mithilfe der Mutationen I36E und M47D (Schwab *et al.*, 2008) gefolgert, dass diese Positionen am N- und am C-Terminus der Helix  $\alpha 3$  Schlüsselpositionen für den Assoziationszustand von AnPRTs sein müssen (Abbildung 3 B). Basierend auf den Resultaten der Monomerisierung wurden deshalb mithilfe eines MSAs sieben AnPRT Sequenzen mit geladenen Resten an beiden Positionen als putativ monomere AnPRTs eingestuft (Tabelle 6). Diese Annahme wurde durch den Nachweis des monomeren Assoziationszustandes von drei rekombinant hergestellten und gereinigten AnPRTs mittels analytischer Gelfiltration und analytischer Ultrazentrifugation bestätigt (Tabelle 7). Somit stellen die drei charakterisierten Proteine (cl-, sa- und shAnPRT) die ersten beschriebenen nativen Monomere in der AnPRT-Proteinfamilie dar. Im Fall der vier nicht weiter charakterisierten putativ monomeren AnPRTs kann ebenfalls von einem monomeren Assoziationszustand ausgegangen werden.

*Steady-state* enzymkinetische Messungen zeigen, dass die drei nativ monomeren AnPRTs vergleichbare katalytische Parameter bei 25 °C aufweisen (Tabelle 9) und daher eine effiziente Enzymkatalyse bei den Wachstumstemperaturen der Organismen wahrscheinlich ist (Walsh, 2001). Wie postuliert, weisen die nativ



monomeren AnPRTs jeweils eine geringe konformationelle Stabilität (Tabelle 8; Abbildung 17) auf, welche bei den physiologischen Wachstumsbedingungen der Organismen jedoch ausreichend ist. CIAnPRT zeigt dabei eine geringfügig höhere thermische Stabilität als sa- und shAnPRT.

Die angestrebte Dimerisierung der nativ monomeren AnPRTs durch Ausbildung von Protein-Protein Interaktionen im Bereich der Helix  $\alpha 3$  war nicht erfolgreich. Die Einführung hydrophober Seitenketten an den exponierten Positionen der Helix führte offensichtlich nicht zur Ausbildung spezifischer Wechselwirkungen, sondern in einigen Fällen zur Aggregation des Proteins (Tabelle 10). Nimmt man an, dass sich im Laufe der Evolution zunächst dimere AnPRTs entwickelten, kam es vermutlich im Laufe der Evolutionsgeschichte hin zu monomeren AnPRTs neben dem Austausch der hydrophoben Reste am N- und am C-Terminus von Helix  $\alpha 3$  gegen geladene Reste zu weiteren Mutationen im Bereich der Kontaktfläche. Die Mutation der geladenen zu hydrophoben Resten scheint daher für eine „Redimerisierung“ alleine nicht ausreichend zu sein. Dieses Phänomen wurde als „epistatische Ratsche“ beschrieben und anhand des evolutionären Zusammenhangs zweier ursprünglicher Formen des Glucocorticoid-Rezeptors mit unterschiedlicher Ligandenspezifität erläutert (Bridgham *et al.*, 2009).

Es wurde gezeigt, dass es möglich ist, mithilfe bioinformatischer Dockingmethoden auf der Basis bekannter Röntgenstrukturen bestehende Protein-Protein Interaktionen durch zielgerichtete Mutagenese zu verstärken oder neue zu etablieren (Kuhlman *et al.*, 2001; Kortemme *et al.*, 2004; Potapov *et al.*, 2008; Jha *et al.*, 2010). In einem anderen Ansatz wurden die Kristallkontakte von monomeren Proteinen analysiert und durch Mutagenese so weit optimiert, dass es zur Ausbildung oligomerer Strukturen in Lösung kam (Grüninger *et al.*, 2008). Die bisherigen Befunde lassen vermuten, dass auch im Fall monomerer AnPRTs eine gelöste Kristallstruktur die Voraussetzung für ein erfolgreiches Design eines Dimers darstellt. Um dieses Ziel zu erreichen, muss vermutlich zunächst die intrinsische Stabilität dieser Proteine erhöht werden. Ein erster Schritt in diese Richtung wurde durch einzelne Punktmutationen bereits getan (Tabelle 11).

## 5.2 Selektionssystem zur Erhöhung thermischer Stabilität in

### *T. thermophilus*

Neben rationalem Design haben sich in den letzten Jahren verschiedene Methoden der gelenkten Evolution zur gezielten Veränderung der Eigenschaften von Proteinen etabliert. Hierbei werden im Labor Prozesse imitiert, die in der Natur im Zuge der Anpassung von Proteinen an unterschiedliche Bedingungen ablaufen (Arnold, 1998). Neuere Beispiele gelenkter Evolution sind die Veränderung der Enantioselektivität (Reetz *et al.*, 2004) und der Substratspezifität (Fasan *et al.*, 2008) von Enzymen, die Verbesserung schwacher enzymatischer Aktivitäten (Röthlisberger *et al.*, 2008; Claren *et al.*, 2009), die Etablierung der Toleranz von Proteinen gegenüber organischen Lösungsmitteln (Moore und Arnold, 1996) und auch die Erhöhung der Proteinstabilität (Kather *et al.*, 2008; Foit *et al.*, 2009).

Die Mechanismen der Evolution – Diversifizierung durch Mutagenese gefolgt von Selektion – können im Labor unter Verwendung verschiedener molekularbiologischer Techniken nachgestellt werden. So wird beispielsweise das für das Zielprotein kodierende Gen mit lokaler oder globaler Zufallsmutagenese randomisiert. Als Methoden zur Zufallsmutagenese kommen dabei *epPCR* (Leung *et al.*, 1989), *DNA-Shuffling* (Stemmer, 1994 a, b) oder PCR mit degenerierten Primern (Neylon, 2004; Reetz *et al.*, 2008) zur Anwendung, seit einigen Jahren auch die Technik der *de novo* Gen-Synthese (kommerziell erhältlich durch z.B. Sloning BioTechnology GmbH (Puchheim): siehe Van den Brulle *et al.*, 2008; GeneArt AG (Regensburg): siehe Dai *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2009). Aus dem Repertoire an erzeugten, in der Regel plasmidkodierten Mutanten müssen anschließend durch geeignete *Screening*- oder Selektions-Verfahren solche mit den gewünschten Eigenschaften zuverlässig isoliert werden. Dabei ist es entscheidend, dass mit dem gewählten Verfahren eine große Anzahl von Mutanten analysierbar ist, da bereits bei Einführung weniger Mutationen eine extrem hohe Diversität erzeugt wird. So können durch *epPCR* hergestellte Genbanken mehr als  $10^7$  Mutanten beinhalten, wobei die Größe der Genbank i.d.R. durch die Transformationseffizienz der zur Präparation benutzen *E. coli* Zellen limitiert wird (Tobias, 2003). Zur Untersuchung einer großen Anzahl an Mutanten eignen sich besonders Selektionsverfahren. Dabei wird das Zielprotein auf die Fähigkeit getestet, metabolische Defekte durch *in vivo* Komplementation zu heilen (MacBeath *et al.*, 1998; Jürgens *et al.*, 2000; Schlee *et al.*, 2009), oder Toxine wie Antibiotika abzubauen (Hoseki *et al.*, 1999; Hecky und Müller, 2005). Da bei einer

Selektion nur solche Mutanten überleben, welche die gewünschten Eigenschaften zeigen, kann innerhalb eines Experiments ein sehr großes Repertoire untersucht werden. Da aber nur in wenigen Fällen das Zellwachstum an Proteinfunktionen gekoppelt werden kann, steht für viele Ansätze kein Selektionsverfahren zur Verfügung. In diesen Fällen muss auf deutlich aufwendigere *Screening*-Verfahren zurückgegriffen werden, wobei alle in der Genbank enthaltenen Mutanten einzeln analysiert und bewertet werden müssen. Um diesen Aufwand zu minimieren, wurden wissensbasierte Methoden zur Erstellung von fokussierten Genbanken entwickelt und so thermostabilisierte Proteine identifiziert (Bommarius *et al.*, 2006).

Um die thermische Stabilität von Proteinen durch Selektionsverfahren zu erhöhen, eignen sich thermophile oder hyperthermophile Organismen. So war es bereits in einigen Fällen möglich, Antibiotikaresistenzproteine durch Selektion einer Genbank in thermophilen Zellen zu stabilisieren (Matsumura und Aiba, 1985; Liao *et al.*, 1986; Hoseki *et al.*, 1999; Brouns *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2005). Ferner gelang es, verschiedene Proteine an ein resistenzvermittelndes Reporterprotein zu fusionieren und durch Selektion in *T. thermophilus* stabilisierte Mutanten zu isolieren (Chautard *et al.*, 2007). Auf der Grundlage dieser Befunde wurde im Rahmen dieser Arbeit nun erstmalig versucht, in einem thermophilen Organismus mithilfe metabolischer Komplementation Genbanken auf thermostabilisierte Mutanten abzusuchen. Als Organismus wurde dabei wiederum das thermophile Bakterium *T. thermophilus* HB27 ausgewählt, weil es mit einer relativ hohen Effizienz transformierbar ist und *Shuttle*-Vektoren mit *E. coli* sowie stabile Selektionsmarker zur Verfügung stehen (Cava *et al.*, 2009). Durch vollständige Deletion des *trpD*-Gens wurde eine AnPRT-Defizienz erzeugt, wobei gleichzeitig ein Selektionsmarker ins Genom integriert wurde. Das früher erzeugte aktivierte Monomer ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) konnte bei einer Selektionstemperatur von 79 °C die AnPRT-Defizienz auf Tryptophan-freiem Selektionsmedium nicht komplementieren und wurde daher für eine globale Zufallsmutagenese durch *ep*PCR eingesetzt. Die erzeugte Genbank mit durchschnittlich 12 Nukleotidaustauschen pro Gen enthielt  $9 \cdot 10^6$  unterschiedliche Mutanten (Tabelle 15). Die Inkubation von  $3,0 \cdot 10^7$  auxotrophen *T. thermophilus* HB27  $\Delta trpD$  Zellen mit insgesamt 0,4 mg Plasmid-DNA führte dazu, dass - bei einer Transformationseffizienz von  $7,6 \cdot 10^4$  Kolonien/ $\mu$ g DNA - alle Mutanten der Genbank während der Selektion repräsentiert waren (4.3.2). Bei der Selektion von stabilisierten Mutanten humaner Interferone, einer Lipase aus

*Bacillus subtilis* sowie einer Formate-Dehydrogenase aus *Pseudomonas sp.* 101 durch Fusion an die thermostabilisierte Kanamycin-Nukleotidyltransferase wurden vergleichbar große Genbanken, jedoch mit einer niedrigeren Mutationsrate von nur einem Nukleotidaustausch pro Gen erzeugt (Chautard *et al.*, 2007). In diesem Fall konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, ob die Genbank während der Selektion vollständig repräsentiert war.

Die Sequenzanalyse der *sstrpD*-Inserts ergab, dass bevorzugt Klone überlebten, die weniger kodierende Aminosäureaustausche besaßen als durchschnittliche Inserts der Primärgenbank (Tabelle 18). Eine hohe Mutationsrate bei der *epPCR* erhöht die Wahrscheinlichkeit vorteilhafte Aminosäureaustausche in der Primärbank zu erzeugen (Drummond *et al.*, 2005). Von den erzeugten Mutanten mit vorteilhaften Mutationen haben sich jedoch im vorliegenden System offensichtlich solche mit relativ wenigen zusätzlichen Aminosäureaustauschen durchgesetzt. Dies erscheint durchaus plausibel, da generell die Mehrzahl von Aminosäuremutationen neutrale oder negative Effekte zeigen, wobei der Anteil neutraler Effekte vom Protein abhängig ist (Bloom *et al.*, 2005).

Bei der Auswahl der Aminosäureaustausche für die *in vitro* Charakterisierung erwies sich das Auswahlkriterium mehrfach, in unabhängigen Klonen auftretender Mutationen als zielführend (Abbildung 24). Dadurch konnten Austausche identifiziert werden, die zu erhöhter thermischer Stabilität und in zwei Fällen zu erhöhter Löslichkeit *in vitro* von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) beitragen (Tabelle 29).

**Tabelle 29: Überblick über Effekte einzelner Aminosäureaustausche.**

Qualitative Darstellung der ermittelten Effekte (Tabelle 22; Tabelle 26) der jeweiligen Mutationen auf das Ausgangskonstrukt ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S).

Mutationen	Stabilität	Löslichkeit <i>in vitro</i>
+T77I	+++	±
+N109S	+	+
+I169T	+	+
+F193S	++	±
+L320M	+	±

In *T. thermophilus* stabilisierte Antibiotikaresistenzproteine wurden ähnlich wie in dieser Arbeit in mehreren Fällen durch thermische Denaturierung *in vitro* charakterisiert (Hoseki *et al.*, 1999; Brouns *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2008). Im

Fall der Stabilisierung des Bleomycinbindepoteins wurde durch die beste Doppelmutante D32V+L63Q ein Zugewinn von  $T_M^{app}$  um 8,7 °C erzielt (Brouns *et al.*, 2005), was in etwa dem in dieser Arbeit identifizierten Einzelaustausch T77I entspricht (Tabelle 22). Der durch die Fünffachmutante erzielte Stabilitätsgewinn um etwa 13 °C wurde bisher in keinem vergleichbaren Selektionsansatz erreicht.

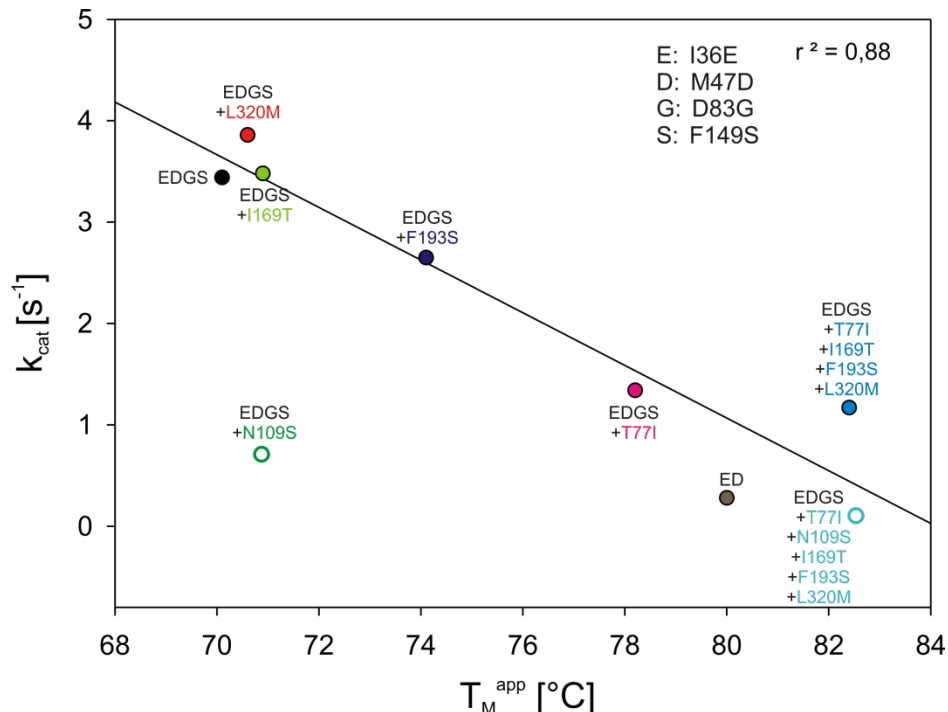
Obwohl bei dem hier entwickelten Ansatz eine *qualitativ* gute Korrelation zwischen Zellwachstum bei der Selektion und der thermischen Stabilität der Mutanten beobachtet wurde (Tabellen 17 und 20), ist eine klare *quantitative* Korrelation zwischen der Situation *in vivo* und den Ergebnissen der *in vitro* Charakterisierung schwierig. Die Frage, wie sich Proteinstabilität in einer gedrängten zellulären Umgebung im Vergleich zu gereinigtem Protein bei *in vitro* Untersuchungen verhält, konnte bisher trotz verschiedener innovativer Ansätze auch nicht vollständig beantwortet werden (Ghaemmaghami und Oas, 2001; Ignatova und Gierasch, 2004; Mayer *et al.*, 2007).

Trotz der erfolgreichen Stabilisierung des aktivierten Monomers ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) muss man sich vergegenwärtigen, dass das zur Verfügung stehende Selektionsfenster durch den Temperaturbereich vorgegeben wird, innerhalb dessen der Organismus wachsen kann (ca. 55 – 80 °C). Dieses Fenster wurde durch das labile shAnPRT mit einem  $T_M^{app}$  von 43 °C (Tabelle 13) zu weit unterschritten, als dass stabilisierte Mutanten hätten identifiziert werden können (Abbildung 23). Umgekehrt sind die Thermostabilitäten von wildtypischem, monomerem (I36E+M47D) oder aktiviertem (D83G+F149S) ssAnPRT zu hoch (Tabelle 13), um durch Selektion in *T. thermophilus* eine Stabilisierung zu ermöglichen. Dennoch bewirken die isolierten Aminosäureaustausche bei nachträglichem Einbau in diesen Enzymen eine Erhöhung der thermischen Stabilität (Tabelle 24, Tabelle 25). Im Fall der Stabilisierung der TEM-1  $\beta$ -Lactamase wurde analog dazu zunächst eine destabilisierte verkürzte Mutante durch gelenkte Evolution in *E. coli* stabilisiert und die isolierten vorteilhaften Mutationen in wildtypischen Hintergrund eingebracht. Durch diese Vorgehensweise wurde eine Erhöhung der konformationellen Stabilität und damit einhergehend des Temperaturoptimums des wildtypischen Enzyms von 35 auf 50 °C erreicht (Hecky und Müller, 2005).

### 5.3 Stabilisierte monomere ssAnPRT-Mutanten als Modellsystem zur Untersuchung der Korrelation von Stabilität, Aktivität und Flexibilität

Die bei der Selektion thermostabiler Mutanten aus der *sstrpD*-(I36E+M47D+D83G+F149S)-Genbank isolierten fünf vorteilhaften Austausche liegen an unterschiedlichen Stellen der Struktur (Abbildung 36). Während sich die Mutation I169T im Bereich der Protein-Protein Interaktionsfläche befindet, liegt die stabilisierende Mutation N109S im Bereich der Scharnierregion zwischen den beiden Domänen des Protomers, in welcher auch die aktivierende und destabilisierende Mutation F149S lokalisiert ist (Schlee *et al.*, 2009). Die beiden Mutationen T77I und F193S haben den stärksten Effekt auf die Stabilität, wobei sich der F193S-Austausch an der Proteinoberfläche befindet, wohingegen der Austausch T77I ebenso wie die schwach stabilisierende Mutation L320M im Proteininneren lokalisiert sind.

Weitgehend unabhängig von der Lage der Austausche, zeigt eine Auftragung der  $k_{\text{cat}}$ -Werte gegen die  $T_{\text{M}}^{\text{app}}$ -Werte von Einzel- und Kombinationsmutanten eine negative Korrelation zwischen Aktivität und Stabilität (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Korrelation der Wechselzahl bei 37 °C und der thermischen Stabilität von Einzel- und Kombinationsmutanten von monomerem ssAnPRT.**

Die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  bei 37 °C (Tabelle 27) zeigt einen linearen Zusammenhang ( $r^2 = 0,88$ ) mit der apparenten Schmelztemperatur  $T_{\text{M}}^{\text{app}}$  (Tabelle 22). Die beiden N109S-Mutanten (grün und cyan) sind Ausreißer und wurden nicht in den Fit miteinbezogen.

Eine Ausnahme bildet lediglich der N109S-Austausch, der in der Nähe des aktiven Zentrums liegt und vermutlich die Substratbindung und den Umsatz stört (4.3.8.3). Besonders deutlich wird der allgemeine Trend bei der Kombinationsmutante ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+T77I+I169T+F193S+L320M (Abbildung 43, blau), die eine sehr hohe thermische Stabilität ( $T_M^{app} = 82,4\text{ °C}$ ) hat, jedoch eine reduzierte Wechselzahl zeigt ( $k_{cat} = 1,2\text{ s}^{-1}$ ). Möglicherweise lässt sich dies damit erklären, dass eine erhöhte Stabilität von ssAnPRT mit einer geringeren konformationellen Flexibilität einhergeht und diese wiederum für eine effiziente Katalyse wichtig ist. Dieser Zusammenhang lässt sich im konkreten Fall mit der Wirkungsweise des ssAnPRT-Enzyms erklären, bei dem sowohl die Annäherung der Substrate AA und Mg-PRPP als auch die Freisetzung des Produktes PRA an Konformationsänderungen gekoppelt zu sein scheint (Marino *et al.*, 2006; Schlee *et al.*, 2009). Auch bei mittels Selektion in *E. coli* isolierten aktivierten Mutanten der IGPS aus *S. solfataricus* ging eine erhöhte Wechselzahl einher mit einer reduzierten konformationellen Stabilität (Merz *et al.*, 2000). Ähnliche Resultate lieferte auch die Analyse zur *in vitro* Evolution einer Metallo- $\beta$ -Lactamase (Tomatis *et al.*, 2008), wobei der Einfluss isolierter Mutationen auf den Reaktionsmechanismus und auf die Flexibilität des Enzyms aufgeklärt werden konnten.

Gemäß obiger Erklärung wird vermutet, dass die Aufgabe des Proteingerüsts von ssAnPRT bei der Katalyse vor allem darin besteht, die Substrate in räumliche Nähe und optimale Orientierung für die Reaktion zu bringen (Deuss, 2006). In der durch Röntgenstrukturanalyse untersuchten Konformation ist dies offensichtlich nicht der Fall (PDB-Eintrag: 1ZYK, Abbildung 3 A), weshalb eine Domänenbewegung als Teil des Reaktionsmechanismus angenommen werden muss. SAXS-Messungen stützen diese Mutmaßung (Marino *et al.*, 2006), eignen sich jedoch nicht für den Nachweis eines Konformationsüberganges während der Katalyse. Die Analyse der Röntgenstruktur und der SAXS-Messungen lassen jedoch vermuten, dass die postulierte Domänenbewegung ein ähnliches Ausmaß hat wie bei den mit den AnPRTs evolutionär nahe verwandten Klasse II Pyrimidin-Nukleosidphosphorylasen. So entspricht der Abstand zwischen AAIL und PRPP mit 8,6 Å (Marino *et al.*, 2006) genau den 8 – 9 Å zwischen der lytischen Phosphatgruppe und der Nukleosid Spaltstelle in der offenen Form der Pyrimidin-Nukleosidphosphorylasen (Walter *et al.*, 1990). Die angenommene Relativrotation der beiden Domänen des Protomers in ssAnPRT um 25 – 33 °C (Marino *et al.*, 2006) entspricht einer vergleichbaren

Drehung um 21 °C in der Pyrimidin-Nukleosidphosphorylase aus *B. stearothermophilus* (Pugmire und Ealick, 1998). Um diese flexible Domänenbewegung am Beispiel der AnPRTs zu untersuchen und dadurch den Zusammenhang zwischen Flexibilität und enzymatischer Aktivität des Enzyms zu klären, sollen FRET-Untersuchungen mit Alexa-Farbstoffen durchgeführt werden. Bisher konnten trotz der Markierung von dimeren ssAnPRT-Cysteinmutanten mit Donor- und Akzeptorfarbstoff und erster erfolgsversprechender Messungen die Daten aufgrund der Heterogenität der Proben nicht ausgewertet werden (Deuss, 2006). Daher war ein weiteres Ziel im Rahmen dieser Arbeit, das Markierungsprotokoll zu optimieren (4.4). Dabei wurde versucht, eine homogene Proteinspezies mit einem hohen Markierungsgrad anzureichern, wobei eine möglichst ausgeglichene Besetzung von Donor- und Akzeptorfarbstoff angestrebt wurde. Dazu wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit in das monomere ssAnPRT-I36E+M47D zur Kopplung der Farbstoffe die Mutationen N162C und K280C eingeführt. Wie aus Abbildung 42 hervorgeht, wurden Proteinproben, die mit Donor- und Akzeptorfarbstoff markiert wurden, mit einer Effizienz von bis zu 40 % angereichert. Diese Proben eignen sich für Untersuchungen an Einzelmolekülen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Claus Seidel (Lehrstuhl für Molekulare Physikalische Chemie der Universität Düsseldorf) oder für Ensemble-Messungen. In Zukunft könnte man eine spezifischere Markierung mit Farbstoffen erreichen, indem neben nur einer Cysteingruppe eine weitere, unterschiedliche Kopplungsgruppe durch den Einbau einer nichtnatürlichen Aminosäure (Wu und Schultz, 2009) in das Protein eingeführt wird (Brustad *et al.*, 2008).



## 6 Literaturverzeichnis

- Akiva, E., Itzhaki, Z. and Margalit, H.** (2008). Built-in loops allow versatility in domain-domain interactions: lessons from self-interacting domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13292-13297.
- Albers, S. V., Jonuscheit, M., Dinkelaker, S., Urich, T., Kletzin, A., Tampe, R., Driessen, A. J. and Schleper, C.** (2006). Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Appl Environ Microbiol* 72: 102-111.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Anderson, D. E., Becktel, W. J. and Dahlquist, F. W.** (1990). pH-induced denaturation of proteins: a single salt bridge contributes 3-5 kcal/mol to the free energy of folding of T4 lysozyme. *Biochemistry* 29: 2403-2408.
- Angelov, A., Mientus, M., Liebl, S. and Liebl, W.** (2009). A two-host fosmid system for functional screening of (meta)genomic libraries from extreme thermophiles. *Syst Appl Microbiol* 32: 177-185.
- Aravalli, R. N. and Garrett, R. A.** (1997). Shuttle vectors for hyperthermophilic archaea. *Extremophiles* 1: 183-191.
- Arnold, F. H.** (1998). Design by directed evolution. *Acc Chem Res* 31: 125-131.
- Averhoff, B.** (2004). DNA transport and natural transformation in mesophilic and thermophilic bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 36: 25-33.
- Bae, E., Bannen, R. M. and Phillips, G. N., Jr.** (2008). Bioinformatic method for protein thermal stabilization by structural entropy optimization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9594-9597.
- Beckman, R. A., Mildvan, A. S. and Loeb, L. A.** (1985). On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. *Biochemistry* 24: 5810-5817.
- Berkner, S., Grogan, D., Albers, S. V. and Lipps, G.** (2007). Small multicopy, non-integrative shuttle vectors based on the plasmid pRN1 for *Sulfolobus acidocaldarius* and *Sulfolobus solfataricus*, model organisms of the (cren-) archaea. *Nucleic Acids Res* 35: 88.
- Berkner, S., Wlodkowski, A., Albers, S. V. and Lipps, G.** (2010). Inducible and constitutive promoters for genetic systems in *Sulfolobus acidocaldarius*. *Extremophiles* 14: 249-259.
- Blaber, M., Zhang, X. J. and Matthews, B. W.** (1993). Structural basis of amino acid  $\alpha$ -helix propensity. *Science* 260: 1637-1640.
- Blas-Galindo, E., Cava, F., Lopez-Vinas, E., Mendieta, J. and Berenguer, J.** (2007). Use of a dominant rpsL allele conferring streptomycin dependence for positive and negative selection in *Thermus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 73: 5138-5145.
- Bloom, J. D., Silberg, J. J., Wilke, C. O., Drummond, D. A., Adami, C. and Arnold, F. H.** (2005). Thermodynamic prediction of protein neutrality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 606-611.

- Bommarius, A. S., Broering, J. M., Chaparro-Riggers, J. F. and Polizzi, K. M.** (2006). High-throughput screening for enhanced protein stability. *Curr Opin Biotechnol* 17: 606-610.
- Bosshard, H. R., Marti, D. N. and Jelesarov, I.** (2004). Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *J Mol Recognit* 17: 1-16.
- Bowie, J. U., Reidhaar-Olson, J. F., Lim, W. A. and Sauer, R. T.** (1990). Deciphering the message in protein sequences: tolerance to amino acid substitutions. *Science* 247: 1306-1310.
- Bridgham, J. T., Ortlund, E. A. and Thornton, J. W.** (2009). An epistatic ratchet constrains the direction of glucocorticoid receptor evolution. *Nature* 461: 515-519.
- Brock, T. D. and Freeze, H.** (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol* 98: 289-297.
- Brock, T. D., Brock, K. M., Belly, R. T. and Weiss, R. L.** (1972). *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch Mikrobiol* 84: 54-68.
- Brouns, S. J., Wu, H., Akerboom, J., Turnbull, A. P., De Vos, W. M. and Van Der Oost, J.** (2005). Engineering a selectable marker for hyperthermophiles. *J Biol Chem* 280: 11422-11431.
- Brustad, E. M., Lemke, E. A., Schultz, P. G. and Deniz, A. A.** (2008). A general and efficient method for the site-specific dual-labeling of proteins for single molecule fluorescence resonance energy transfer. *J Am Chem Soc* 130: 17664-17665.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I., Haeuptle, M. T. and Dobberstein, B.** (1987). A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods Enzymol* 155: 416-433.
- Burghardt, K.** (2010). Aktivierung einer thermostabilen Anthranilat-Phosphoribosyltransferase durch gerichtete Evolution. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Cannio, R., Contursi, P., Rossi, M. and Bartolucci, S.** (2001). Thermoadaptation of a mesophilic hygromycin B phosphotransferase by directed evolution in hyperthermophilic Archaea: selection of a stable genetic marker for DNA transfer into *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* 5: 153-159.
- Cao, H., Pietrak, B. L. and Grubmeyer, C.** (2002). Quinolinate phosphoribosyltransferase: kinetic mechanism for a type II PRTase. *Biochemistry* 41: 3520-3528.
- Castan, P., De Pedro, M. A., Risco, C., Valles, C., Fernandez, L. A., Schwarz, H. and Berenguer, J.** (2001). Multiple regulatory mechanisms act on the 5' untranslated region of the S-layer gene from *Thermus thermophilus* HB8. *J Bacteriol* 183: 1491-1494.
- Caston, J. R., Berenguer, J., De Pedro, M. A. and Carrascosa, J. L.** (1993). S-layer protein from *Thermus thermophilus* HB8 assembles into porin-like structures. *Mol Microbiol* 9: 65-75.
- Cava, F., Zafra, O., Da Costa, M. S. and Berenguer, J.** (2008 a). The role of the nitrate respiration element of *Thermus thermophilus* in the control and activity of the denitrification apparatus. *Environ Microbiol* 10: 522-533.

- Cava, F., Zafra, O. and Berenguer, J.** (2008 b). A cytochrome c containing nitrate reductase plays a role in electron transport for denitrification in *Thermus thermophilus* without involvement of the bc respiratory complex. *Mol Microbiol* 70: 507-518.
- Cava, F., De Pedro, M. A., Blas-Galindo, E., Waldo, G. S., Westblade, L. F. and Berenguer, J.** (2008 c). Expression and use of superfolder green fluorescent protein at high temperatures in vivo: a tool to study extreme thermophile biology. *Environ Microbiol* 10: 605-613.
- Cava, F., Hidalgo, A. and Berenguer, J.** (2009). *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles* 13: 213-231.
- Certa, U., Bannwarth, W., Stuber, D., Gentz, R., Lanzer, M., Le Grice, S., Guillot, F., Wendler, I., Hunsmann, G., Bujard, H. and Et Al.** (1986). Subregions of a conserved part of the HIV gp41 transmembrane protein are differentially recognized by antibodies of infected individuals. *EMBO J* 5: 3051-3056.
- Chan, M. K., Mukund, S., Kletzin, A., Adams, M. W. and Rees, D. C.** (1995). Structure of a hyperthermophilic tungstopterin enzyme, aldehyde ferredoxin oxidoreductase. *Science* 267: 1463-9.
- Chautard, H., Blas-Galindo, E., Menguy, T., Grand'moursel, L., Cava, F., Berenguer, J. and Delcourt, M.** (2007). An activity-independent selection system of thermostable protein variants. *Nat Methods* 4: 919-921.
- Chervenka, C.H.** (1973). A manual of methods for the analytical ultracentrifuge. *Spinco Division of Beckman Instruments, Palo Alto*.
- Chester, N. and Marshak, D. R.** (1993). Dimethyl sulfoxide-mediated primer Tm reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 209: 284-290.
- Cirino, P. C. and Georgescu, R.** (2003). Screening for thermostability. *Methods Mol Biol* 230: 117-125.
- Clantin, B., Tricot, C., Lonhienne, T., Stalon, V. and Villeret, V.** (2001). Probing the role of oligomerization in the high thermal stability of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyltransferase by site-specific mutants. *Eur J Biochem* 268: 3937-3942.
- Claren, J., Malisi, C., Höcker, B. and Sterner, R.** (2009). Establishing wild-type levels of catalytic activity on natural and artificial ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel protein scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3704-3709.
- Cline, J., Braman, J. C. and Hogrefe, H. H.** (1996). PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 24: 3546-3551.
- Contursi, P., Cannio, R., Prato, S., Fiorentino, G., Rossi, M. and Bartolucci, S.** (2003). Development of a genetic system for hyperthermophilic Archaea: expression of a moderate thermophilic bacterial alcohol dehydrogenase gene in *Sulfolobus solfataricus*. *FEMS Microbiol Lett* 218: 115-120.
- Craig, S. P., 3rd and Eakin, A. E.** (2000). Purine phosphoribosyltransferases. *J Biol Chem* 275: 20231-20234.

- Dai, J., Hyland, E. M., Yuan, D. S., Huang, H., Bader, J. S. and Boeke, J. D.** (2008). Probing nucleosome function: a highly versatile library of synthetic histone H3 and H4 mutants. *Cell* 134: 1066-1078.
- Dams, T. and Jaenicke, R.** (1999). Stability and folding of dihydrofolate reductase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* 38: 9169-9178.
- Dantas, G., Corrent, C., Reichow, S. L., Havranek, J. J., Eletr, Z. M., Isern, N. G., Kuhlman, B., Varani, G., Merritt, E. A. and Baker, D.** (2007). High-resolution structural and thermodynamic analysis of extreme stabilization of human procarboxypeptidase by computational protein design. *J Mol Biol* 366: 1209-21.
- Datsenko, K. A. and Wanner, B. L.** (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640-6645.
- De Grado, M., Lasa, I. and Berenguer, J.** (1998). Characterization of a plasmid replicative origin from an extreme thermophile. *FEMS Microbiol Lett* 165: 51-57.
- De Grado, M., Castan, P. and Berenguer, J.** (1999). A high-transformation-efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus*. *Plasmid* 42: 241-245.
- Deuss, M.** (2006). Untersuchungen zur Struktur, Funktion und Dynamik der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase aus *Sulfolobus solfataricus*. Dissertation, Universität Regensburg.
- Di Giulio, M.** (2003). The universal ancestor was a thermophile or a hyperthermophile: tests and further evidence. *J Theor Biol* 221: 425-436.
- Dietrich, S.** (2010). Mutationsanalyse und kinetische Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Indolglycerinphosphat-Synthase aus *Sulfolobus solfataricus*. Dissertation, Universität Regensburg.
- Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W.** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-6145.
- Drummond, D. A., Iverson, B. L., Georgiou, G. and Arnold, F. H.** (2005). Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins. *J Mol Biol* 350: 806-816.
- Eads, J. C., Ozturk, D., Wexler, T. B., Grubmeyer, C. and Sacchettini, J. C.** (1997). A new function for a common fold: the crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase. *Structure* 5: 47-58.
- Eckert, K. A. and Kunkel, T. A.** (1990). High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 18: 3739-3744.
- Eijsink, V. G. H., Bjork, A., Gaseidnes, S., Sirevag, R., Synstad, B., Van Den Burg, B. and Vriend, G.** (2004). Rational engineering of enzyme stability. *J Biotechnol* 113: 105-120.
- Eijsink, V. G. H., Gaseidnes, S., Borchert, T. V. and Van Den Burg, B.** (2005). Directed evolution of enzyme stability. *Biomol Eng* 22: 21-30.
- Elcock, A. H.** (1998). The stability of salt bridges at high temperatures: implications for hyperthermophilic proteins. *J Mol Biol* 284: 489-502.

- Fasan, R., Meharena, Y. T., Snow, C. D., Poulos, T. L. and Arnold, F. H.** (2008). Evolutionary history of a specialized p450 propane monooxygenase. *J Mol Biol* 383: 1069-1080.
- Fischer, A., Enkler, N., Neudert, G., Bocola, M., Sterner, R. and Merkl, R.** (2009). TransCent: computational enzyme design by transferring active sites and considering constraints relevant for catalysis. *BMC Bioinformatics* 10: 54.
- Flores, H. and Ellington, A. D.** (2005). A modified consensus approach to mutagenesis inverts the cofactor specificity of *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase. *Protein Eng Des Sel* 18: 369-377.
- Foit, L., Morgan, G. J., Kern, M. J., Steimer, L. R., Von Hacht, A. A., Titchmarsh, J., Warriner, S. L., Radford, S. E. and Bardwell, J. C.** (2009). Optimizing protein stability in vivo. *Mol Cell* 36: 861-871.
- Freire, E.** (1995). Differential scanning calorimetry. *Methods Mol Biol* 40: 191-218.
- Fridjonsson, O., Watzlawick, H. and Mattes, R.** (2002). Thermoadaptation of  $\alpha$ -galactosidase AgaB1 in *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* 184: 3385-3391.
- Friedrich, A., Hartsch, T. and Averhoff, B.** (2001). Natural transformation in mesophilic and thermophilic bacteria: identification and characterization of novel, closely related competence genes in *Acinetobacter* sp. strain BD413 and *Thermus thermophilus* HB27. *Appl Environ Microbiol* 67: 3140-3148.
- Friedrich, A., Prust, C., Hartsch, T., Henne, A. and Averhoff, B.** (2002). Molecular analyses of the natural transformation machinery and identification of pilus structures in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* strain HB27. *Appl Environ Microbiol* 68: 745-755.
- Fromant, M., Blanquet, S. and Plateau, P.** (1995). Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 224: 347-353.
- Ghaemmaghami, S. and Oas, T. G.** (2001). Quantitative protein stability measurement in vivo. *Nat Struct Biol* 8: 879-882.
- Giver, L., Gershenson, A., Freskgard, P. O. and Arnold, F. H.** (1998). Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12809-12813.
- Gribenko, A. V., Patel, M. M., Liu, J., McCallum, S. A., Wang, C. and Makhatadze, G. I.** (2009). Rational stabilization of enzymes by computational redesign of surface charge-charge interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2601-2606.
- Grüninger, D., Treiber, N., Ziegler, M. O., Koetter, J. W., Schulze, M. S. and Schulz, G. E.** (2008). Designed protein-protein association. *Science* 319: 206-209.
- Hagihara, Y., Mine, S. and Uegaki, K.** (2007). Stabilization of an immunoglobulin fold domain by an engineered disulfide bond at the buried hydrophobic region. *J Biol Chem* 282: 36489-36495.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.

- Hecky, J. and Müller, K. M.** (2005). Structural perturbation and compensation by directed evolution at physiological temperature leads to thermostabilization of  $\beta$ -lactamase. *Biochemistry* 44: 12640-12654.
- Hendsch, Z. S. and Tidor, B.** (1994). Do salt bridges stabilize proteins? A continuum electrostatic analysis. *Protein Sci* 3: 211-226.
- Henn-Sax, M., Thoma, R., Schmidt, S., Hennig, M., Kirschner, K. and Sterner, R.** (2002). Two  $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzymes of histidine and tryptophan biosynthesis have similar reaction mechanisms and common strategies for protecting their labile substrates. *Biochemistry* 41: 12032-12042.
- Henne, A., Bruggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martinez-Arias, R., Jacobi, C., Starkuviene, V., Schlenczeck, S., Dencker, S., Huber, R., Klenk, H. P., Kramer, W., Merkl, R., Gottschalk, G. and Fritz, H. J.** (2004). The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat Biotechnol* 22: 547-553.
- Hennig, M., Sterner, R., Kirschner, K. and Jansonius, J. N.** (1997). Crystal structure at 2.0 Å resolution of phosphoribosyl anthranilate isomerase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*: possible determinants of protein stability. *Biochemistry* 36: 6009-6016.
- Hennig, M., Darimont, B. D., Jansonius, J. N. and 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.
- Hettwer, S.** (2001). Tryptophansynthasen bei hohen Temperaturen: Charakterisierung der thermostabilen Enzyme aus *Thermotoga maritima* und Etablierung eines Selektionssystems zur Stabilisierung thermolabiler Enzyme in *Thermus thermophilus*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Hible, G., Renault, L., Schaeffer, F., Christova, P., Zoe Radulescu, A., Evrin, C., Gilles, A. M. and Cherfils, J.** (2005). Calorimetric and crystallographic analysis of the oligomeric structure of *Escherichia coli* GMP kinase. *J Mol Biol* 352: 1044-1059.
- Hidaka, Y., Hasegawa, M., Nakahara, T. and Hoshino, T.** (1994). The entire population of *Thermus thermophilus* cells is always competent at any growth phase. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 1338-1339.
- Hidalgo, A., Betancor, L., Moreno, R., Zafra, O., Cava, F., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. and Berenguer, J.** (2004). *Thermus thermophilus* as a cell factory for the production of a thermophilic Mn-dependent catalase which fails to be synthesized in an active form in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 70: 3839-3844.
- Höcker, B., Claren, J. and Sterner, R.** (2004). Mimicking enzyme evolution by generating new  $(\beta\alpha)_8$ -barrels from  $(\beta\alpha)_4$ -half-barrels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16448-16453.
- Hommel, U., Lustig, A. and Kirschner, K.** (1989). Purification and characterization of yeast anthranilate phosphoribosyltransferase. *Eur J Biochem* 180: 33-40.
- Hoseki, J., Yano, T., Koyama, Y., Kuramitsu, S. and Kagamiyama, H.** (1999). Directed evolution of thermostable kanamycin-resistance gene: a convenient selection marker for *Thermus thermophilus*. *J Biochem* 126: 951-956.

- Howlett, G. J., Minton, A. P. and Rivas, G.** (2006). Analytical ultracentrifugation for the study of protein association and assembly. *Curr Opin Chem Biol* 10: 430-436.
- Ignatova, Z. and Gierasch, L. M.** (2004). Monitoring protein stability and aggregation in vivo by real-time fluorescent labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 523-528.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Ivens, A., Mayans, O., Szadkowski, H., Wilmanns, M. and Kirschner, K.** (2001). Purification, characterization and crystallization of thermostable anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus*. *Eur J Biochem* 268: 2246-2252.
- Ivens, Andreas** (1998). Characterization of Anthranilate Synthase and Anthranilate Phosphoribosyltransferase from *Thermotoga maritima* and *Sulfolobus solfataricus*. Dissertation, Universität Basel.
- Jaenicke, R. and Böhm, G.** (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr Opin Struct Biol* 8: 738-748.
- Jaenicke, R.** (2000). Do ultrastable proteins from hyperthermophiles have high or low conformational rigidity? *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2962-2964.
- Jenney, F. E., Jr. and Adams, M. W.** (2008). The impact of extremophiles on structural genomics (and vice versa). *Extremophiles* 12: 39-50.
- Jha, R. K., Leaver-Fay, A., Yin, S., Wu, Y., Butterfoss, G. L., Szyperski, T., Dokholyan, N. V. and Kuhlman, B.** (2010). Computational design of a PAK1 binding protein. *J Mol Biol* 400: 257-270.
- Johnson, W. C., Jr.** (1990). Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* 7: 205-214.
- Jonuscheit, M., Martusewitsch, E., Stedman, K. M. and Schleper, C.** (2003). A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle vector. *Mol Microbiol* 48: 1241-1252.
- Jürgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M. and Sterner, R.** (2000). Directed evolution of a ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9925-9930.
- Kaneko, H., Minagawa, H. and Shimada, J.** (2005). Rational design of thermostable lactate oxidase by analyzing quaternary structure and prevention of deamidation. *Biotechnol Lett* 27: 1777-1784.
- Kar, E. G. and Aune, K. C.** (1974). Analyses of sedimentation equilibrium data. *Anal Biochem* 62: 1-18.
- Karshikoff, A. and Ladenstein, R.** (2001). Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a "traffic rule" for hot roads. *Trends Biochem Sci* 26: 550-556.
- Kather, I., Jakob, R. P., Dobbek, H. and Schmid, F. X.** (2008). Increased folding stability of TEM-1  $\beta$ -lactamase by in vitro selection. *J Mol Biol* 383: 238-251.

- Kauzmann, W.** (1959). Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv Protein Chem* 14: 1-63.
- Kawe, M., Horn, U. and Plückthun, A.** (2009). Facile promoter deletion in *Escherichia coli* in response to leaky expression of very robust and benign proteins from common expression vectors. *Microb Cell Fact* 8: 8.
- Kelly, C. A., Nishiyama, M., Ohnishi, Y., Beppu, T. and Birktoft, J. J.** (1993). Determinants of protein thermostability observed in the 1.9-Å crystal structure of malate dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Thermus flavus*. *Biochemistry* 32: 3913-3922.
- Kim, C., Xuong, N. H., Edwards, S., Madhusudan, Yee, M. C., Spraggon, G. and Mills, S. E.** (2002). The crystal structure of anthranilate phosphoribosyltransferase from the enterobacterium *Pectobacterium carotovorum*. *FEBS Lett* 523: 239-246.
- Korkegian, A., Black, M. E., Baker, D. and Stoddard, B. L.** (2005). Computational thermostabilization of an enzyme. *Science* 308: 857-860.
- Korndörfer, I., Steipe, B., Huber, R., Tomschy, A. and Jaenicke, R.** (1995). The crystal structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol* 246: 511-521.
- Kortemme, T., Joachimiak, L. A., Bullock, A. N., Schuler, A. D., Stoddard, B. L. and Baker, D.** (2004). Computational redesign of protein-protein interaction specificity. *Nat Struct Mol Biol* 11: 371-379.
- Koyama, Y., Hoshino, T., Tomizuka, N. and Furukawa, K.** (1986). Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. *J Bacteriol* 166: 338-340.
- Koyama, Y., Arikawa, Y. and Furukawa, K.** (1990 a). A plasmid vector for an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* 72: 97-101.
- Koyama, Y., Okamoto, S. and Furukawa, K.** (1990 b). Cloning of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase genes from an extreme thermophile, *Thermus* strain T2, and their expression in *Thermus thermophilus* HB27. *Appl Environ Microbiol* 56: 2251-2254.
- Kuhlman, B., O'Neill, J. W., Kim, D. E., Zhang, K. Y. and Baker, D.** (2001). Conversion of monomeric protein L to an obligate dimer by computational protein design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10687-91.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-132.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Largen, M., Mills, S. E., Rowe, J. and Yanofsky, C.** (1978). Purification and properties of a third form of anthranilate-5-phosphoribosylpyrophosphate phosphoribosyltransferase from the *Enterobacteriaceae*. *J Biol Chem* 253: 409-412.
- Lasa, I., De Grado, M., De Pedro, M. A. and Berenguer, J.** (1992 a). Development of *Thermus*-*Escherichia* shuttle vectors and their use for expression of the *Clostridium thermocellum* celA gene in *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* 174: 6424-6431.



- Lasa, I., Caston, J. R., Fernandez-Herrero, L. A., De Pedro, M. A. and Berenguer, J.** (1992 b). Insertional mutagenesis in the extreme thermophilic eubacteria *Thermus thermophilus* HB8. *Mol Microbiol* 6: 1555-1564.
- Le Gouill, C., Parent, J. L., Rola-Pleszczynski, M. and Stankova, J.** (1994). Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal Biochem* 219: 164.
- Lee, C. E., Goodfellow, C., Javid-Majd, F., Baker, E. N. and Shaun Lott, J.** (2006). The crystal structure of TrpD, a metabolic enzyme essential for lung colonization by *Mycobacterium tuberculosis*, in complex with its substrate phosphoribosylpyrophosphate. *J Mol Biol* 355: 784-797.
- Lehmann, M., Loch, C., Middendorf, A., Studer, D., Lassen, S. F., Pasamontes, L., Van Loon, A. P. and Wyss, M.** (2002). The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept. *Protein Eng* 15: 403-411.
- Lesley, S. A., Graziano, J., Cho, C. Y., Knuth, M. W. and Klock, H. E.** (2002). Gene expression response to misfolded protein as a screen for soluble recombinant protein. *Protein Eng* 15: 153-160.
- Leung, D.W., Chen, E. and Goeddel, D.V.** (1989). A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1 (1): 11-15.
- Levy, E. D., Boeri Erba, E., Robinson, C. V. and Teichmann, S. A.** (2008). Assembly reflects evolution of protein complexes. *Nature* 453: 1262-1265.
- Li, W. F., Zhou, X. X. and Lu, P.** (2005). Structural features of thermozymes. *Biotechnol Adv* 23: 271-281.
- Liao, H., McKenzie, T. and Hageman, R.** (1986). Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 576-580.
- Littlechild, J. A., Guy, J., Connelly, S., Mallett, L., Waddell, S., Rye, C. A., Line, K. and Isupov, M.** (2007). Natural methods of protein stabilization: thermostable biocatalysts. *Biochem Soc Trans* 35: 1558-63.
- Loveridge, E. J., Rodriguez, R. J., Swanwick, R. S. and Allemann, R. K.** (2009). Effect of dimerization on the stability and catalytic activity of dihydrofolate reductase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* 48: 5922-5933.
- Lucas, S., Toffin, L., Zivanovic, Y., Charlier, D., Moussard, H., Forterre, P., Prieur, D. and Erauso, G.** (2002). Construction of a shuttle vector for, and spheroplast transformation of, the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Appl Environ Microbiol* 68: 5528-5536.
- Macbeath, G., Kast, P. and Hilvert, D.** (1998). Redesigning enzyme topology by directed evolution. *Science* 279: 1958-1961.
- Makhatadze, G. I., Loladze, V. V., Ermolenko, D. N., Chen, X. and Thomas, S. T.** (2003). Contribution of surface salt bridges to protein stability: guidelines for protein engineering. *J Mol Biol* 327: 1135-1148.
- Malakauskas, S. M. and Mayo, S. L.** (1998). Design, structure and stability of a hyperthermophilic protein variant. *Nat Struct Biol* 5: 470-475.

- Manoj, N. and Suguna, K.** (2001). Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. *Protein Eng* 14: 735-745.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Dijkstra, B. W., Veltman, O. R., Van Den Burg, B., Venema, G., Ulbrich-Hofmann, R. and Eijsink, V. G.** (1997). Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond. *J Biol Chem* 272: 11152-11156.
- Marianayagam, N. J., Sunde, M. and Matthews, J. M.** (2004). The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem Sci* 29: 618-625.
- Marino, M., Deuss, M., Svergun, D. I., Konarev, P. V., Sterner, R. and Mayans, O.** (2006). Structural and mutational analysis of substrate complexation by anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem* 281: 21410-21421.
- Martin, A., Sieber, V. and Schmid, F. X.** (2001). In-vitro selection of highly stabilized protein variants with optimized surface. *J Mol Biol* 309: 717-726.
- Martin, A., Schmid, F. X. and Sieber, V.** (2003). Proside: a phage-based method for selecting thermostable proteins. *Methods Mol Biol* 230: 57-70.
- Masui, R., Kurokawa, K., Nakagawa, N., Tokunaga, F., Koyama, Y., Shibata, T., Oshima, T., Yokoyama, T., Yasunga, T. and Kuramitsu, S.** (2005). "*Thermus thermophilus* HB8, complete genome." from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>.
- Mather, M. W. and Fee, J. A.** (1992). Development of plasmid cloning vectors for *Thermus thermophilus* HB8: expression of a heterologous, plasmid-borne kanamycin nucleotidyltransferase gene. *Appl Environ Microbiol* 58: 421-425.
- Matsumi, R., Manabe, K., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T.** (2007). Disruption of a sugar transporter gene cluster in a hyperthermophilic archaeon using a host-marker system based on antibiotic resistance. *J Bacteriol* 189: 2683-2691.
- Matsumura, M. and Aiba, S.** (1985). Screening for thermostable mutant of kanamycin nucleotidyltransferase by the use of a transformation system for a thermophile, *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* 260: 15298-15303.
- Matsumura, M., Signor, G. and Matthews, B. W.** (1989). Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature* 342: 291-293.
- Matthews, B. W., Nicholson, H. and Becktel, W. J.** (1987). Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6663-6667.
- Maxwell, K. L., Mittermaier, A. K., Forman-Kay, J. D. and Davidson, A. R.** (1999). A simple in vivo assay for increased protein solubility. *Protein Sci* 8: 1908-1911.
- Mayans, O., Ivens, A., Nissen, L. J., Kirschner, K. and Wilmanns, M.** (2002). Structural analysis of two enzymes catalysing reverse metabolic reactions implies common ancestry. *EMBO J* 21: 3245-3254.
- Mayer, S., Rudiger, S., Ang, H. C., Joerger, A. C. and Fersht, A. R.** (2007). Correlation of levels of folded recombinant p53 in *Escherichia coli* with thermodynamic stability in vitro. *J Mol Biol* 372: 268-276.

- Merz, A., Knöchel, T., Jansonius, J. N. and Kirschner, K.** (1999). 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., Cramer, A., Stemmer, W. P., Yanofsky, C. and Kirschner, K.** (2000). Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures. *Biochemistry* 39: 880-889.
- Miles, E. W., Rhee, S. and Davies, D. R.** (1999). The molecular basis of substrate channeling. *J Biol Chem* 274: 12193-12196.
- Miyazaki, K., Wintrode, P. L., Grayling, R. A., Rubingh, D. N. and Arnold, F. H.** (2000). Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J Mol Biol* 297: 1015-1026.
- Monod, J., Wyman, J. and Changeux, J. P.** (1965). On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J Mol Biol* 12: 88-118.
- Moore, J. C. and Arnold, F. H.** (1996). Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nat Biotechnol* 14: 458-467.
- Moreno, R., Haro, A., Castellanos, A. and Berenguer, J.** (2005). High-level overproduction of His-tagged Tth DNA polymerase in *Thermus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 71: 591-593.
- Müller-Dieckmann, J.** (2006). The open-access high-throughput crystallization facility at EMBL Hamburg. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62: 1446-1452.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Murrell, J.N. and Jenkins, A.D.** (1994). Properties of Liquids and solutions. *John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2nd ed.*
- Mushegian, A. R. and Koonin, E. V.** (1994). Unexpected sequence similarity between nucleosidases and phosphoribosyltransferases of different specificity. *Protein Sci* 3: 1081-1088.
- Myers, J. K. and Pace, C. N.** (1996). Hydrogen bonding stabilizes globular proteins. *Biophys J* 71: 2033-2039.
- Nakamura, A., Takakura, Y., Kobayashi, H. and Hoshino, T.** (2005). In vivo directed evolution for thermostabilization of *Escherichia coli* hygromycin B phosphotransferase and the use of the gene as a selection marker in the host-vector system of *Thermus thermophilus*. *J Biosci Bioeng* 100: 158-163.
- Nakamura, A., Takakura, Y., Sugimoto, N., Takaya, N., Shiraki, K. and Hoshino, T.** (2008). Enzymatic analysis of a thermostabilized mutant of an *Escherichia coli* hygromycin B phosphotransferase. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 2467-2471.
- Neylon, C.** (2004). Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Res* 32: 1448-1459.

- Nicholson, H., Becktel, W. J. and Matthews, B. W.** (1988). Enhanced protein thermostability from designed mutations that interact with  $\alpha$ -helix dipoles. *Nature* 336: 651-656.
- Nicholson, H., Anderson, D. E., Dao-Pin, S. and Matthews, B. W.** (1991). Analysis of the interaction between charged side chains and the  $\alpha$ -helix dipole using designed thermostable mutants of phage T4 lysozyme. *Biochemistry* 30: 9816-9828.
- Nishi, H. and Ota, M.** (2010). Amino acid substitutions at protein-protein interfaces that modulate the oligomeric state. *Proteins* 78: 1563-1574.
- Notredame, C., Higgins, D. G. and Heringa, J.** (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302: 205-217.
- Ohta, T., Tokishita, S., Imazuka, R., Mori, I., Okamura, J. and Yamagata, H.** (2006).  $\beta$ -Glucosidase as a reporter for the gene expression studies in *Thermus thermophilus* and constitutive expression of DNA repair genes. *Mutagenesis* 21: 255-260.
- Oshima, T.** (1974). [Comparative studies on biochemical properties of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB 8 (author's transl)]. *Seikagaku* 46: 887-907.
- Oshima, T. and Imahori, K.** (1974). Physiochemical properties of deoxyribonucleic acid from an extreme thermophile. *J Biochem* 75: 179-183.
- Ottosen, M. B., Bjornberg, O., Norager, S., Larsen, S., Palfey, B. A. and Jensen, K. F.** (2002). The dimeric dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis* dissociates reversibly into inactive monomers. *Protein Sci* 11: 2575-2583.
- Ozturk, D. H., Dorfman, R. H., Scapin, G., Sacchettini, J. C. and Grubmeyer, C.** (1995). Structure and function of *Salmonella typhimurium* orotate phosphoribosyltransferase: protein complementation reveals shared active sites. *Biochemistry* 34: 10764-10770.
- Pace, C. N.** (1990). Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem Sci* 15: 14-17.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T.** (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4: 2411-2423.
- Pace, C. N., Hebert, E. J., Shaw, K. L., Schell, D., Both, V., Krajcikova, D., Sevcik, J., Wilson, K. S., Dauter, Z., Hartley, R. W. and Grimsley, G. R.** (1998). Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa, Sa2 and Sa3. *J Mol Biol* 279: 271-286.
- Pace, C. N., Alston, R. W. and Shaw, K. L.** (2000). Charge-charge interactions influence the denatured state ensemble and contribute to protein stability. *Protein Sci* 9: 1395-1398.
- Pace, C. N., Trevino, S., Prabhakaran, E. and Scholtz, J. M.** (2004). Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 1225-1235.
- Park, H. S., Kayser, K. J., Kwak, J. H. and Kilbane, J. J.** (2004). Heterologous gene expression in *Thermus thermophilus*:  $\beta$ -galactosidase, dibenzothiophene monooxygenase, PNB carboxy esterase, 2-aminobiphenyl-2,3-diol dioxygenase, and chloramphenicol acetyl transferase. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31: 189-197.

- Pedelacq, J. D., Piltch, E., Liong, E. C., Berendzen, J., Kim, C. Y., Rho, B. S., Park, M. S., Terwilliger, T. C. and Waldo, G. S.** (2002). Engineering soluble proteins for structural genomics. *Nat Biotechnol* 20: 927-932.
- Pedone, E., Saviano, M., Rossi, M. and Bartolucci, S.** (2001). A single point mutation (Glu85Arg) increases the stability of the thioredoxin from *Escherichia coli*. *Protein Eng* 14: 255-260.
- Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U. and Schmid, F. X.** (2000). Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nat Struct Biol* 7: 380-383.
- Polizzi, K. M., Chaparro-Riggers, J. F., Vazquez-Figueroa, E. and Bommarius, A. S.** (2006). Structure-guided consensus approach to create a more thermostable penicillin G acylase. *Biotechnol J* 1: 531-536.
- Potapov, V., Reichmann, D., Abramovich, R., Filchtinski, D., Zohar, N., Ben Halevy, D., Edelman, M., Sobolev, V. and Schreiber, G.** (2008). Computational redesign of a protein-protein interface for high affinity and binding specificity using modular architecture and naturally occurring template fragments. *J Mol Biol* 384: 109-119.
- Prangishvili, D., Albers, S. V., Holz, I., Arnold, H. P., Stedman, K., Klein, T., Singh, H., Hiort, J., Schweier, A., Kristjansson, J. K. and Zillig, W.** (1998). Conjugation in archaea: frequent occurrence of conjugative plasmids in *Sulfolobus*. *Plasmid* 40: 190-202.
- Puchkaev, A. V., Koo, L. S. and Ortiz De Montellano, P. R.** (2003). Aromatic stacking as a determinant of the thermal stability of CYP119 from *Sulfolobus solfataricus*. *Arch Biochem Biophys* 409: 52-58.
- Pugmire, M. J. and Ealick, S. E.** (1998). The crystal structure of pyrimidine nucleoside phosphorylase in a closed conformation. *Structure* 6: 1467-1479.
- Pugmire, M. J. and Ealick, S. E.** (2002). Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochem J* 361: 1-25.
- Ramirez-Arcos, S., Fernandez-Herrero, L. A., Marin, I. and Berenguer, J.** (1998). Anaerobic growth, a property horizontally transferred by an Hfr-like mechanism among extreme thermophiles. *J Bacteriol* 180: 3137-3143.
- Raushel, F. M., Thoden, J. B. and Holden, H. M.** (2003). Enzymes with molecular tunnels. *Acc Chem Res* 36: 539-548.
- Reetz, M. T., Torre, C., Eipper, A., Lohmer, R., Hermes, M., Brunner, B., Maichele, A., Bocola, M., Arand, M., Cronin, A., Genzel, Y., Archelas, A. and Furstoss, R.** (2004). Enhancing the enantioselectivity of an epoxide hydrolase by directed evolution. *Org Lett* 6: 177-80.
- Reetz, M. T., Kahakeaw, D. and Lohmer, R.** (2008). Addressing the numbers problem in directed evolution. *Chembiochem* 9: 1797-1804.
- Richards, F.M.** (1992). Folded and unfolded proteins: an introduction. *Protein Folding, Creighton, Freeman Co. USA, ed.*
- Robertson, D. E. and Steer, B. A.** (2004). Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. *Curr Opin Chem Biol* 8: 141-149.

- Roodveldt, C., Aharoni, A. and Tawfik, D. S.** (2005). Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability. *Curr Opin Struct Biol* 15: 50-56.
- Röthlisberger, D., Khersonsky, O., Wollacott, A. M., Jiang, L., Dechancie, J., Betker, J., Gallaher, J. L., Althoff, E. A., Zanghellini, A., Dym, O., Albeck, S., Houk, K. N., Tawfik, D. S. and Baker, D.** (2008). Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature* 453: 190-195.
- Saboulard, D., Dugas, V., Jaber, M., Broutin, J., Souteyrand, E., Sylvestre, J. and Delcourt, M.** (2005). High-throughput site-directed mutagenesis using oligonucleotides synthesized on DNA chips. *Biotechniques* 39: 363-368.
- Saerens, D., Conrath, K., Govaert, J. and Muyldermans, S.** (2008). Disulfide bond introduction for general stabilization of immunoglobulin heavy-chain variable domains. *J Mol Biol* 377: 478-488.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. E. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbour.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Sarkar, G. and Sommer, S. S.** (1990). The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* 8: 404-407.
- Sato, T., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T.** (2003). Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J Bacteriol* 185: 210-220.
- Sato, T., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T.** (2005). Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl Environ Microbiol* 71: 3889-3899.
- Scapin, G., Ozturk, D. H., Grubmeyer, C. and Sacchettini, J. C.** (1995). The crystal structure of the orotate phosphoribosyltransferase complexed with orotate and  $\alpha$ -D-5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate. *Biochemistry* 34: 10744-10754.
- Schlee, S., Deuss, M., Bruning, M., Ivens, A., Schwab, T., Hellmann, N., Mayans, O. and Sterner, R.** (2009). Activation of anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus* by removal of magnesium inhibition and acceleration of product release. *Biochemistry* 48: 5199-5209.
- Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R. and Wierenga, R. K.** (1997). A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* 36: 9655-9662.
- Schmid, F. X.** (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes *Proofs for Protein Structure: A practical approach, Creighton, Oxford, 2nd ed.*: 259-295.

- Schneider, B., Knöchel, T., Darimont, B., Hennig, M., Dietrich, S., Babinger, K., Kirschner, K. and Sterner, R.** (2005). Role of the N-terminal extension of the  $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzyme indole-3-glycerol phosphate synthase for its fold, stability, and catalytic activity. *Biochemistry* 44: 16405-16412.
- Schumacher, M. A., Bashor, C. J., Song, M. H., Otsu, K., Zhu, S., Parry, R. J., Ullman, B. and Brennan, R. G.** (2002). The structural mechanism of GTP stabilized oligomerization and catalytic activation of the *Toxoplasma gondii* uracil phosphoribosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 78-83.
- Schwab, T.** (2006). Monomerisierung einer thermostabilen Anthranilat-Phosphoribosyltransferase aus *Sulfolobus solfataricus* durch Proteindesign. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Schwab, T., Skegro, D., Mayans, O. and Sterner, R.** (2008). A rationally designed monomeric variant of anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus* is as active as the dimeric wild-type enzyme but less thermostable. *J Mol Biol* 376: 506-516.
- Schwabe, A.** (2007). Mutationsanalysen der Komplexbildung von Tryptophan-Synthasen aus *Thermotoga maritima*. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Schwehm, J. M., Fitch, C. A., Dang, B. N., Garcia-Moreno, E. B. and Stites, W. E.** (2003). Changes in stability upon charge reversal and neutralization substitution in staphylococcal nuclease are dominated by favorable electrostatic effects. *Biochemistry* 42: 1118-1128.
- Scott, C., Jackson, C. J., Coppin, C. W., Mourant, R. G., Hilton, M. E., Sutherland, T. D., Russell, R. J. and Oakeshott, J. G.** (2009). Catalytic improvement and evolution of atrazine chlorohydrolase. *Appl Environ Microbiol* 75: 2184-2191.
- Sears, L. E., Moran, L. S., Kissinger, C., Creasey, T., Perry-O'keefe, H., Roskey, M., Sutherland, E. and 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.
- Seitz, T., Bocola, M., Claren, J. and Sterner, R.** (2007). Stabilisation of a  $(\beta\alpha)_8$ -barrel protein designed from identical half barrels. *J Mol Biol* 372: 114-129.
- Seitz, T.** (2009). Erhöhung der Löslichkeit und Stabilität verschiedener Proteine durch rationales Design und gelenkte Evolution. Dissertation, Universität Regensburg.
- Serrano, L., Bycroft, M. and Fersht, A. R.** (1991). Aromatic-aromatic interactions and protein stability. Investigation by double-mutant cycles. *J Mol Biol* 218: 465-475.
- Serrano, L., Neira, J. L., Sancho, J. and Fersht, A. R.** (1992). Effect of alanine versus glycine in  $\alpha$ -helices on protein stability. *Nature* 356: 453-455.
- Shallom, D., Golan, G., Shoham, G. and Shoham, Y.** (2004). Effect of dimer dissociation on activity and thermostability of the  $\alpha$ -glucuronidase from *Geobacillus stearothermophilus*: dissecting the different oligomeric forms of family 67 glycoside hydrolases. *J Bacteriol* 186: 6928-6937.
- Sharp, P. A., Sugden, B. and Sambrook, J.** (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055-3063.

- Shoichet, B. K., Baase, W. A., Kuroki, R. and Matthews, B. W.** (1995). A relationship between protein stability and protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 452-456.
- Sieber, V., Plückthun, A. and Schmid, F. X.** (1998). Selecting proteins with improved stability by a phage-based method. *Nat Biotechnol* 16: 955-960.
- Sieber, V., Martinez, C. A. and Arnold, F. H.** (2001). Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nat Biotechnol* 19: 456-460.
- Sieber, V.** (2003). Selection for soluble proteins via fusion with chloramphenicol acetyltransferase. *Methods Mol Biol* 230: 45-55.
- Simpson, E. R., Meldrum, J. K., Bofill, R., Crespo, M. D., Holmes, E. and Searle, M. S.** (2005). Engineering enhanced protein stability through  $\beta$ -turn optimization: insights for the design of stable peptide  $\beta$ -hairpin systems. *Angew Chem Int Ed Engl* 44: 4939-4944.
- Sinha, S. C. and Smith, J. L.** (2001). The PRT protein family. *Curr Opin Struct Biol* 11: 733-739.
- Slatko, B. E.** (1994). Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Methods Mol Biol* 31: 35-45.
- Smith-Keary, P. F.** (1971). Changes in the pattern of reversion of a proline-requiring mutant of *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 11: 279-292.
- Stark, G. R.** (1965). Reactions of cyanate with functional groups of proteins. 3. Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry* 4: 1030-1036.
- Stemmer, W. P.** (1994 a). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10747-10751.
- Stemmer, W. P.** (1994 b). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370: 389-391.
- Sterner, R., Kleemann, G. R., Szadkowski, H., Lustig, A., Hennig, M. and Kirschner, K.** (1996). Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer. *Protein Sci* 5: 2000-2008.
- Sterner, R. and Liebl, W.** (2001). Thermophilic adaptation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36: 39-106.
- Stoll, V. S. and Blanchard, J. S.** (1990). Buffers: principles and practice. *Methods Enzymol* 182: 24-38.
- Stüber, D., Matile, H. and Garotta, G.** (1990). System for high level production in *E. coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure-function analysis. *Immunological Methods, Academic Press, New York, 4th ed.* : 121-215.
- Sun, D. P., Sauer, U., Nicholson, H. and Matthews, B. W.** (1991). Contributions of engineered surface salt bridges to the stability of T4 lysozyme determined by directed mutagenesis. *Biochemistry* 30: 7142-7153.
- Suzuki, T., Yasugi, M., Arisaka, F., Oshima, T. and Yamagishi, A.** (2002). Cold-adaptation mechanism of mutant enzymes of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Protein Eng* 15: 471-476.



- Tamakoshi, M., Yamagishi, A. and Oshima, T.** (1995). Screening of stable proteins in an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Mol Microbiol* 16: 1031-1036.
- Tamakoshi, M., Uchida, M., Tanabe, K., Fukuyama, S., Yamagishi, A. and Oshima, T.** (1997). A new *Thermus-Escherichia coli* shuttle integration vector system. *J Bacteriol* 179: 4811-4814.
- Tamakoshi, M., Yaoi, T., Oshima, T. and Yamagishi, A.** (1999). An efficient gene replacement and deletion system for an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* 173: 431-437.
- Tamakoshi, M., Nakano, Y., Kakizawa, S., Yamagishi, A. and Oshima, T.** (2001). Selection of stabilized 3-isopropylmalate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* using the host-vector system of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Extremophiles* 5: 17-22.
- Thoma, R., Hennig, M., Sterner, R. and Kirschner, K.** (2000). Structure and function of mutationally generated monomers of dimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from *Thermotoga maritima*. *Structure* 8: 265-276.
- Thompson, L. C., Walters, J., Burke, J., Parsons, J. F., Armstrong, R. N. and Dirr, H. W.** (2006). Double mutation at the subunit interface of glutathione transferase rGSTM1-1 results in a stable, folded monomer. *Biochemistry* 45: 2267-2273.
- Thoms, S., Max, K. E., Wunderlich, M., Jacso, T., Lilie, H., Reif, B., Heinemann, U. and Schmid, F. X.** (2009). Dimer formation of a stabilized Gβ1 variant: a structural and energetic analysis. *J Mol Biol* 391: 918-932.
- Tigerstrom, A., Schwarz, F., Karlsson, G., Okvist, M., Alvarez-Rua, C., Maeder, D., Robb, F. T. and Sjolín, L.** (2004). Effects of a novel disulfide bond and engineered electrostatic interactions on the thermostability of azurin. *Biochemistry* 43: 12563-12574.
- Tobias, A. V.** (2003). Preparing libraries in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol* 231: 11-16.
- Tomatis, P. E., Fabiane, S. M., Simona, F., Carloni, P., Sutton, B. J. and Vila, A. J.** (2008). Adaptive protein evolution grants organismal fitness by improving catalysis and flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20605-20610.
- Trevino, S. R., Scholtz, J. M. and Pace, C. N.** (2008). Measuring and increasing protein solubility. *J Pharm Sci* 97: 4155-4166.
- Van Den Brulle, J., Fischer, M., Langmann, T., Horn, G., Waldmann, T., Arnold, S., Fuhrmann, M., Schatz, O., O'connell, T., O'connell, D., Auckenthaler, A. and Schwer, H.** (2008). A novel solid phase technology for high-throughput gene synthesis. *Biotechniques* 45: 340-343.
- Van Den Burg, B. and Eijssink, V. G. H.** (2002). Selection of mutations for increased protein stability. *Curr Opin Biotechnol* 13: 333-337.
- Vanhercke, T., Ampe, C., Tirry, L. and Denolf, P.** (2005). Reducing mutational bias in random protein libraries. *Anal Biochem* 339: 9-14.
- Vieille, C. and Zeikus, G. J.** (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 1-43.

- Waage, I., Schmid, G., Thumann, S., Thomm, M. and Hausner, W.** (2010). Shuttle vector-based transformation system for *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* 76: 3308-3313.
- Waldburger, C. D., Schildbach, J. F. and Sauer, R. T.** (1995). Are buried salt bridges important for protein stability and conformational specificity? *Nat Struct Biol* 2: 122-128.
- Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J., Siebers, B., Hensel, R. and Taylor, G. L.** (2001). Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J Mol Biol* 306: 745-757.
- Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J. and Terwilliger, T. C.** (1999). Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 17: 691-695.
- Waldo, G. S.** (2003). Improving protein folding efficiency by directed evolution using the GFP folding reporter. *Methods Mol Biol* 230: 343-359.
- Walsh, C.** (2001). Enabling the chemistry of life. *Nature* 409: 226-231.
- Walter, M. R., Cook, W. J., Cole, L. B., Short, S. A., Koszalka, G. W., Krenitsky, T. A. and Ealick, S. E.** (1990). Three-dimensional structure of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* at 2.8 Å resolution. *J Biol Chem* 265: 14016-14022.
- Watrin, L., Lucas, S., Purcarea, C., Legrain, C. and Prieur, D.** (1999). Isolation and characterization of pyrimidine auxotrophs, and molecular cloning of the pyrE gene from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol Gen Genet* 262: 378-381.
- Weast, R.C.** (1982-1983). CRC Handbook of Chemistry and Physics. *CRC Press*, 63rd ed.: 231.
- Wigley, W. C., Stidham, R. D., Smith, N. M., Hunt, J. F. and Thomas, P. J.** (2001). Protein solubility and folding monitored in vivo by structural complementation of a genetic marker protein. *Nat Biotechnol* 19: 131-136.
- Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A., Lambeir, A. M. and Wierenga, R. K.** (1999). Structural and mutagenesis studies of *leishmania* triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng* 12: 243-250.
- Wilson, G. G. and Murray, N. E.** (1991). Restriction and modification systems. *Annu Rev Genet* 25: 585-627.
- Worthington, P., Hoang, V., Perez-Pomares, F. and Blum, P.** (2003). Targeted disruption of the  $\alpha$ -amylase gene in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol* 185: 482-488.
- Wu, X. and Schultz, P. G.** (2009). Synthesis at the interface of chemistry and biology. *J Am Chem Soc* 131: 12497-12515.
- Wunderlich, M., Martin, A., Staab, C. A. and Schmid, F. X.** (2005). Evolutionary protein stabilization in comparison with computational design. *J Mol Biol* 351: 1160-1168.
- Wunderlich, M. and Schmid, F. X.** (2006). In vitro evolution of a hyperstable G $\beta$ 1 variant. *J Mol Biol* 363: 545-557.

- Wunderlich, M., Max, K. E., Roske, Y., Müller, U., Heinemann, U. and Schmid, F. X.** (2007). Optimization of the Gβ1 domain by computational design and by in vitro evolution: structural and energetic basis of stabilization. *J Mol Biol* 373: 775-784.
- Yang, J. K., Yoon, H. J., Ahn, H. J., Lee, B. I., Cho, S. H., Waldo, G. S., Park, M. S. and Suh, S. W.** (2002). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the Rv2002 gene product from *Mycobacterium tuberculosis*, a β-ketoacyl carrier protein reductase homologue. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 303-305.
- Yang, J. K., Park, M. S., Waldo, G. S. and Suh, S. W.** (2003). Directed evolution approach to a structural genomics project: Rv2002 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 455-460.
- Yanofsky, C.** (1999). Trp Operon *Encyclopedia of Molecular Biology*, Creighton, New York, 4th ed.: 2676-2689.
- Yanofsky, C.** (2001). Advancing our knowledge in biochemistry, genetics, and microbiology through studies on tryptophan metabolism. *Annu Rev Biochem* 70: 1-37.
- Yasugi, M., Amino, M., Suzuki, T., Oshima, T. and Yamagishi, A.** (2001). Cold adaptation of the thermophilic enzyme 3-isopropylmalate dehydrogenase. *J Biochem* 129: 477-484.
- Yip, K. S., Stillman, T. J., Britton, K. L., Artymiuk, P. J., Baker, P. J., Sedelnikova, S. E., Engel, P. C., Pasquo, A., Chiaraluce, R. and Consalvi, V.** (1995). The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure* 3: 1147-1158.
- Yokoyama, S., Hirota, H., Kigawa, T., Yabuki, T., Shirouzu, M., Terada, T., Ito, Y., Matsuo, Y., Kuroda, Y., Nishimura, Y., Kyogoku, Y., Miki, K., Masui, R. and Kuramitsu, S.** (2000). Structural genomics projects in Japan. *Nat Struct Biol* 7 Suppl: 943-945.
- Yu, J. S., Vargas, M., Mityas, C. and Noll, K. M.** (2001). Liposome-mediated DNA uptake and transient expression in *Thermotoga*. *Extremophiles* 5: 53-60.
- Zavodszky, P., Kardos, J., Svingor and Petsko, G. A.** (1998). Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7406-7411.
- Zhang, X., Meining, W., Fischer, M., Bacher, A. and Ladenstein, R.** (2001). X-ray structure analysis and crystallographic refinement of lumazine synthase from the hyperthermophile *Aquifex aeolicus* at 1.6 Å resolution: determinants of thermostability revealed from structural comparisons. *J Mol Biol* 306: 1099-1114.
- Zhang, Y.** (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9: 40.
- Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J. A. and Arnold, F. H.** (1998). Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat Biotechnol* 16: 258-261.
- Zillig, W., Tu, J. and Holz, I.** (1981). Thermoproteales - a third order of thermoacidophilic archaebacteria. *Nature* 293: 85-86.

## 7 Anhang

### 7.1 Ausbeuten von ausgewählten AnPRT-Mutanten

**Tabelle A 1: Ausbeuten bei der Reinigung ausgewählter AnPRT-Mutanten.**

Die Expression der in pQE40 klonierten AnPRT-Mutanten erfolgte in *E. coli* KK8 Zellen, i.d.R. in 2 l Kulturvolumen (3.4.1.2), wonach die rekombinanten Proteine mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (3.4.2.2) aus der löslichen Zellfraktion gereinigt wurden. Bei Mutanten mit  $T_M^{app} > 85^\circ\text{C}$  wurde davor eine Anreicherung mithilfe eines Hitzeschritts (3.4.2.1) durchgeführt.

\* Technische Probleme bei der Reinigung führten zu geringerer Ausbeute.

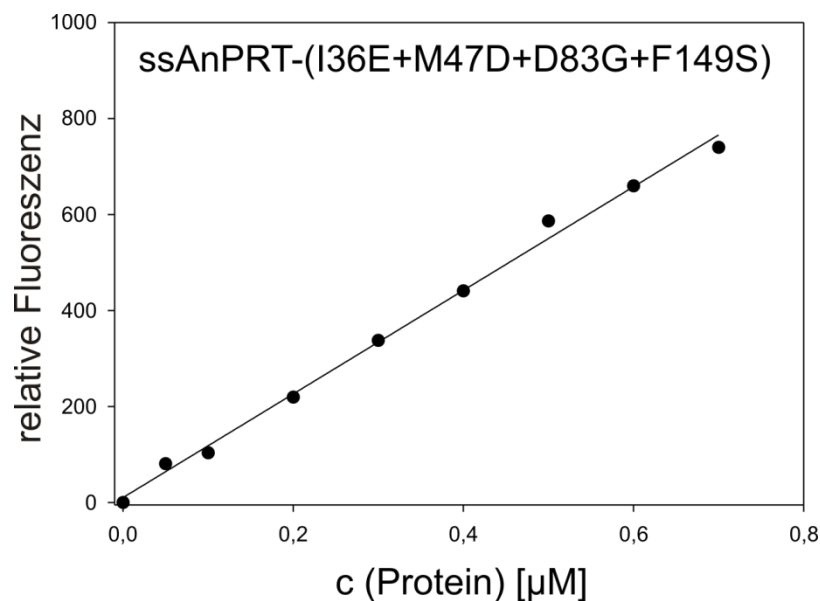
\*\* Es wurde ein kodonoptimiertes Gen verwendet (4.3.4).

\*\*\* Es wurden pQE40-ssD Konstrukte für die Expression verwendet, die evtl. Schäden im Promotorbereich haben (2.8.1; Kawe *et al.*, 2009; Burghardt, 2010).

Protein	Ausbeute aus 1 l Bakterienkultur [mg]
clAnPRT	3
saAnPRT	40
shAnPRT	15
saAnPRT-V76I	26
shAnPRT-V76I	15
ssAnPRT-F193S	9
ssAnPRT-I36E+M47D+T77I	19
ssAnPRT-I36E+M47D+T77I+D83G+F193S	36
ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)	48
ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+T77I	52
ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+T77I+I169T+F193S+L320M **	185
ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+T77I+N109S+I169T+F193S+L320M **	180
ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+N109S	50
ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+N109S+I169T+L320M+N324I	46
ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+I169T	57
ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+F193S	55
ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+L320M	60
ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S)+N324I	32
ssAnPRT-I36E+M47D+D83G+F193S	50
ssAnPRT-T77I+D83G+F149S+I169T+F193S+L320M ***	124
ssAnPRT-T77I+F193S	13
ssAnPRT-T77I *	7
ssAnPRT-D83G+F149S+T77I	53
ssAnPRT-F193S *	9
ssAnPRT-I36E+M47D+N162C+K280C ***	9
ssAnPRT-N162C+K280C ***	3
ssAnPRT-N162C ***	3
ssAnPRT-K280C ***	2
ssAnPRT ***	3

## 7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Fluoreszenz-Spektroskopie

Nach fraktionierter Präzipitation mit Ammoniumsulfat (3.5.13) wurde die Proteinkonzentration im löslichen Überstand über Fluoreszenz-Spektroskopie ermittelt. Um sicherzustellen, dass in dem verwendeten Konzentrationsbereich die Fluoreszenz-Emission linear proportional zur Proteinkonzentration ist, wurde folgende Kalibrierungskurve erstellt.



**Abbildung A 1: Kalibrierungskurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration durch Fluoreszenz-Spektroskopie.**

Die Emission von ssAnPRT-(I36E+M47D+D83G+F149S) bei 308 nm nach Anregung mit 280 nm ist im untersuchten Bereich linear proportional zur Konzentration an eingesetztem Protein. Die Messungen erfolgten in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 bei RT. Bei jeder Probe wurde die Emission 1 min lang gemessen und gemittelt (Schichtdicke der Küvette: 1 cm; Photomultiplier-Spannung: 1000 V).

### 7.3 Nukleotidsequenzen der verwendeten AnPRTs

#### AnPRT aus *C. luteolum*

1	ATGCCGCATA	AGGAATTACT	TGAAAAGCTT	CAAGCAGGAC	AGCAACTCAC	50
51	CTACGACGAA	ACGAAACGCT	GCATGGACGG	CATCATGGCA	GGGCTGTTTT	100
101	CCGAAGAGGC	CATCATCGCC	CTGCTCACCC	TCATGCAGGA	CAACGGCATT	150
151	ACCGCCGACG	CAGTCGCCGG	AGCGAGGGAA	AGCATCATGC	AGCGCGCCAC	200
201	CCCGATCCAG	CTGGACGAGC	GCGCAGTAGA	CACATGCGGC	ACCGGCGGCG	250
251	ACAGCGCCGG	CACCTTCAAT	ATTTCCACTG	CAGCGGCCAT	TATTGCCAAC	300
301	GCCGCAGGTG	TCAGCATCGC	CAAGCACGGG	AACCGCGCCG	TCACGAGCCG	350
351	CTGCGGCAGC	GCCGATGTGC	TTGAGGAACT	CGGGTTCTGC	ATCGAACTCC	400
401	CACCCGAGGC	GACCGAAGAG	CTCTACGGCA	GGACAGGGTT	TGCCTACCTG	450
451	CACGCACCGC	TCTACCATCC	GTCGATGAAA	GCGGTTGCCG	CCATCCGAAA	500
501	AAAAATCGGC	ACACGGACCA	TCTTCAACAT	ACTCGGTCCC	CTGCTCAATC	550
551	CAGCCGGTGT	CAAACGGCAG	ATGGTCGGGG	TGTTCAATAT	CGAACTCATG	600
601	GATCTTTACG	CAGAAGCACT	CCGAAAGACC	GGCTCTTTCC	ACGCCCTCAT	650
651	CGTCCACGGC	GAAACCGACC	AGGGACAACC	GCTCGACGAA	CCGAGCATCA	700
701	GCGGCATAAC	CCGGATCATT	GAGCTCCACA	ATGGCGAAAC	CGCCACCCAC	750
751	GTCGTCCGTC	CCGGAGAGTT	CCACCTGCAT	AATGGCCGCT	CAAGGACATC	800
801	GCCGGCGGAA	GCCGGGAGGA	AAATGCCGAA	ATCATCAGAA	AGATCCTCAA	850
851	CGGAACAGCC	CCGGACGCGC	ACCGTGAAGC	GGCCATCTTC	GCTTCCGCCA	900
901	TCGCCTGCTA	TGTCGGAGGC	ATCGCCAACT	GCATCGACGA	AGGGGTATGC	950
951	ATGGCCCGCG	AAGCCATAAG	CCATGGAACG	GCAAAACGCA	ACGCAGAAGC	1000
1001	CATCATCGAT	GCCAGCCGGG	AACTGGAGGC	CAGATACCGC	AGGGAGAGCG	1050
1051	ACTGA					1056

#### AnPRT aus *S. aureus*

1	ATGACATTAC	TAACAAGAAT	AAAAACTGAA	ACTATATTAC	TTGAAAGCGA	50
51	CATTAAAGAG	CTAATCGATA	TACTTATTTT	TCCTAGTATT	GGAAGTGATA	100
101	TTAAATATGA	ATTACTTAGT	TCCTATTCGG	AGCGAGAAAT	CCAACAACAA	150
151	GAATTAACAT	ATATTGTACG	TAGCTTAATT	AATACAATGT	ATCCACATCA	200
201	ACCATGTTAT	GAAGGGGCTA	TGTGTGTGTG	CGGCACAGGT	GGTGACAAGT	250
251	CAAATAGTTT	CAACATTTCA	ACGACTGTTG	CTTTTGTTGT	AGCAAGTGCT	300
301	GGCGTAAAAG	TTATAAAACA	TGGTAATAAA	AGTATTACCT	CAAATTCAGG	350
351	TAGTACGGAT	TTGTTAAATC	AAATGAACAT	ACAAACAACA	ACTGTTGATG	400
401	ATACACCTAA	CCAATTAAAT	GAAAAAGACC	TTGTATTTCAT	TGGTGCAACT	450
451	GAATCATATC	CAATCATGAA	GTATATGCAA	CCAGTTAGAA	AAATGATTGG	500
501	AAAGCCTACA	ATATTAAACC	TTGTGGGTCC	ATTAATTAAT	CCATATCACT	550
551	TAACGTATCA	AATGGTAGGC	GTCTTTGATC	CTACAAAGTT	AAAGTTAGTT	600
601	GCTAAAACGA	TTAAAGATTT	AGGTAGAAAA	CGTGCAATCG	TTTTACATGG	650
651	TGCAATGGT	ATGGATGAAG	CAACACTATC	TGGTGATAAT	TTGATATATG	700
701	AATTGACTGA	AGATGGAGAA	ATCAAAAATT	ACACATTAAA	TGCGACTGAT	750
751	TATGGTTTGA	AACATGCGCC	GAATAGTGAT	TTTAAAGGCG	GTTACCTGA	800
801	AGAAAATTTA	GCAATCTCCC	TTAATATCTT	GAATGGTAAA	GATCAGTCAA	850
851	GTCGACGTGA	TGTTGTCTTA	CTAAATGCGG	GTTTAAGCCT	TTATGTTGCA	900
901	GAGAAAGTGG	ATACCATCGC	AGAAGGCATA	GAAGTTGCAA	CTACATTGAT	950
951	TGATAATGGT	GAAGCATTGG	AAAAATACCA	TCAAATGAGA	GGTGAATAA	999

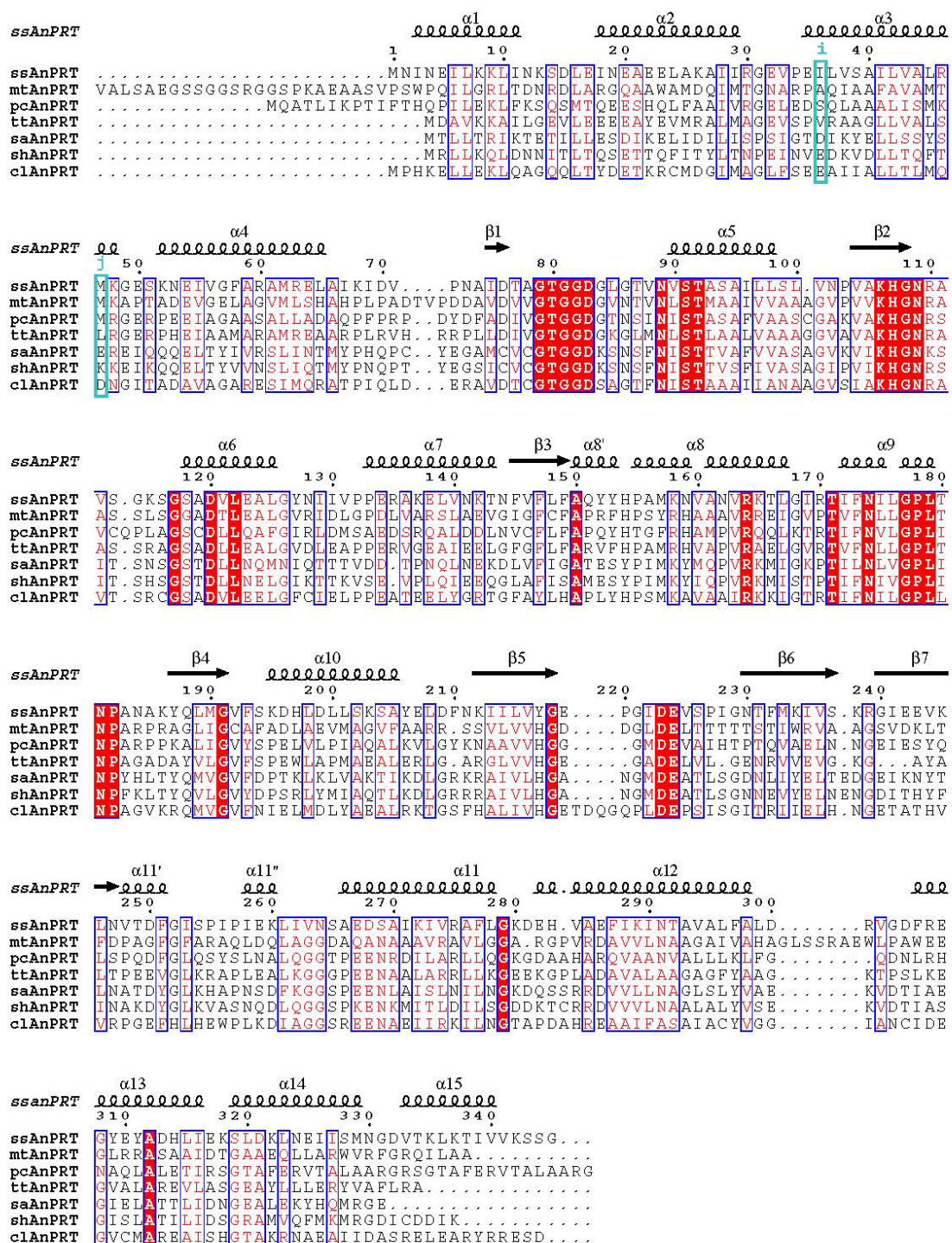
AnPRT aus *S. haemolyticus*

1	ATGAGATTAT	TAAACAATT	GGATAATAAC	ATAACTTTAA	CGCAATCAGA	50
51	GACAACACAA	TTCATAACCT	ATCTAACAAA	CCCTGAAATT	AATGTGGAAG	100
101	ACAAAGTCGA	CTTATTAACG	CAATTTACGA	AAAAGGAAAT	TAAACAACAA	150
151	GAATTAACCT	ATGTCGTCAA	TAGCTTAATT	CAAACCATGT	ATCCTAATCA	200
201	ACCAACATAT	GAAGGAAGTA	TATGTGTATG	CGGTACAGGA	GGGGATAAGT	250
251	CAAACAGTTT	CAATATTTCT	ACAACAGTAT	CGTTTATAGT	AGCAAGCGCA	300
301	GGTATTCCAG	TCATTAAACA	CGGAAATAGA	AGTATAACAT	CCCATTCCAGG	350
351	AAGTACTGAT	TTGTTAAATG	AATTGGGAAT	AAAGACGACA	AAAGTTTCAG	400
401	AAGTCCCAT	ACAAATTGAA	GAACAGGGAT	TGGCATTTAT	TAGCGCAATG	450
451	GAGTCTTATC	CAATAATGAA	ATATATTCAA	CCTGTTAGAA	AAATGATTTC	500
501	TACACCGACC	ATCTTTAATA	TAGTTGGGCC	ACTTATCAAT	CCATTTAAAT	550
551	TGACCTATCA	AGTGTTAGGA	GTGTATGACC	CAAGTCGATT	GTACATGATA	600
601	GCACAAACAT	TGAAAGATTT	AGGACGACGG	AGGGCAATAG	TGTTACATGG	650
651	AGCAAATGGT	ATGGATGAAG	CTACACTTTC	AGGAAACAAT	GAAGTTTATG	700
701	AATTAAATGA	AAATGGAGAC	ATAACGCATT	ATTTTATAAA	TGCTAAAGAT	750
751	TATGGTTTAA	AGGTTGCAAG	TAATCAAGAT	TTACAGGGTG	GGAGTCCGAA	800
801	AGAAAACAA	ATGATTACAT	TAGATATTTT	AAGTGGAGAT	GATAAACTT	850
851	GTAGAAGAGA	TGTTGTTGTA	TTAAATGCTG	CAC TTGCGTT	ATACGTTTCT	900
901	GAAAAGGTAG	ATACGATAGC	ATCTGGAATA	AGTTTAGCTA	CGATCTTAAT	950
951	TGATAGTGGT	CGAGCGATGG	TACAATTTAT	GAAAATGAGA	GGTGATATCT	1000
1001	GTGACGATAT	TAAGTGA				1017

AnPRT aus *S. solfataricus*

1	ATGAATATAA	ATGAGATTCT	TAAAAAACTC	ATAAATAAAT	CAGATTTAGA	50
51	AATTAATGAG	GCTGAAGAAT	TAGCTAAAGC	TATAATTAGA	GGAGAAGTTC	100
101	CAGAGATTTT	AGTATCAGCA	ATTTTAGTAG	CATTAAGAAT	GAAAGGTGAA	150
151	AGTAAAAATG	AAATAGTAGG	TTTTGCTAGA	GCAATGAGAG	AATTAGCGAT	200
201	CAAAATAGAC	GTGCCCCAAG	CAATAGACAC	AGCTGGTACA	GGTGGCGACG	250
251	GATTAGGGAC	AGTAAACGTT	AGTACCGCAT	CAGCTATCTT	ATTGAGTTTA	300
301	GTTAATCCAG	TTGCCAAACA	TGGTAATAGG	GCAGTAAGTG	GTAAAAGCGG	350
351	TAGCGCTGAT	GTTCTTGAGG	CTTTAGGCTA	TAATATTATA	GTTCTCCAG	400
401	AAAGGGCAAA	AGAAGTAGTC	AATAAAACGA	ATTTTCGTTTT	CCTCTTTGCA	450
451	CAATACTATC	ATCCTGCAAT	GAAGAACGTT	GCCAATGTAA	GAAAAACTTT	500
501	GGGGATCAGG	ACTATTTTCA	ATATTCTAGG	TCCATTGACT	AATCCAGCTA	550
551	ATGCGAAGTA	TCAGTTAATG	GGAGTATTTT	CGAAAGATCA	CTTAGATTTA	600
601	CTGTCAAAAA	GTGCATATGA	ATTAGATTTT	AATAAAATAA	TTTTGGTATA	650
651	TGGAGAGCCG	GGTATAGATG	AGGTAAGTCC	AATAGGAAAT	ACTTTCATGA	700
701	AAATAGTAAG	TAAGCGCGGT	ATAGAGGAAG	TCAAGTTAAA	TGTAAGTGAT	750
751	TTCGGCATAT	CACCGATTCC	AATAGAAAAG	TTAATAGTAA	ATTCTGCGGA	800
801	GGATTCCGCA	ATAAAAATAG	TTAGAGCATT	TCTGGGTAAA	GATGAACACG	850
851	TGGCTGAATT	CATTAAAATT	AACACAGCAG	TTGCGCTTTT	TGCATTAGAT	900
901	AGAGTAGGCG	ATTTTAGAGA	AGGTTATGAG	TATGCTGATC	ATTTGATAGA	950
951	AAAATCCTTG	GATAAATTAA	ATGAGATAAT	CTCAATGAAT	GGTGATGTAA	1000
1001	CTAAACTGAA	AACGATAGTG	GTGAAAAGTA	GTGGTTAA		1038

## 7.4 Multiples Sequenzalignment ausgewählter AnPRTs



**Abbildung A 2: Multiples Sequenzalignment von verschiedenen AnPRTs.**

Ausgewählt wurden AnPRTs mit bekannter Kristallstruktur (ss: *S. solfataricus*, mt: *M. tuberculosis*, pc: *P. carotovorum* und tt: *T. thermophilus* HB8) sowie die in dieser Arbeit untersuchten nativ monomeren AnPRTs (sa: *S. aureus*, sh: *S. haemolyticus*, cl: *C. luteolum*). Das MSA wurde mithilfe des T-Coffee Algorithmus (Notredame *et al.*, 2000) erstellt. In cyan sind die Spalten (i bzw. j) dargestellt, die den Positionen „36“ und „47“ (4.1.1) entsprechen.



**Tabelle A 2: Sequenzidentitäten und Sequenzähnlichkeiten paarweise verglichener AnPRTs.**

Mithilfe des Programmes Blastp (Altschul *et al.*, 1990) wurde ein paarweiser Vergleich der AnPRT Sequenzen aus *C. luteolum*, *S. aureus*, *S. haemolyticus* und *S. solfataricus* durchgeführt. Dabei wurden Sequenzidentitäten (weiß hinterlegt) sowie Sequenzähnlichkeiten (grau hinterlegt) bestimmt. Auffällig ist die sehr hohe Identität und Ähnlichkeit von sa- und shAnPRT, was mit dem engen Verwandtschaftsgrad beider Organismen erklärbar ist. Dies deckt sich auch mit der Tatsache, dass die beiden Enzyme sehr ähnliche  $T_M^{app}$ -Werte und *steady-state* enzymkinetische Parameter aufweisen (4.1.3).

	ssAnPRT	saAnPRT	shAnPRT	clAnPRT
ssAnPRT		54,7	52,0	57,8
saAnPRT	30,6		88,2	50,2
shAnPRT	30,3	63,0		52,0
clAnPRT	37,3	30,8	32,5	

## 7.5 DNA-Sequenz der Integrationsstelle von *T. thermophilus* $\Delta trpD$ -Deletionsstämmen (Abbildung 22)

Durch Sequenzierung der durch das Primerpaar 9/10 erzeugten PCR-Produkte konnte die Nukleotidabfolge der Deletionsstämmen *T. thermophilus*  $\Delta trpD_{kat^*}$  bzw.  $\Delta trpD_{shble\_77-3}$  im Bereich der Integrationsstelle der Antibiotikamarker bestimmt werden. Die farblich kodierten Sequenzen entsprechen den in den jeweiligen Legenden angegebenen Genomabschnitten, die Zahlenangaben deren Position im Genom.

### Integrationsbereich von $kat^*$ (Abbildung 22 A):

```

CCCCCGCACCTCCTGGCGGTGGTGGAGGTGCCGGAGGCCCTCGTGGTGAACGCCTGGGCGGAGGAGGCG
GGGGGGCGGACGGTGATGGGCTTCCGCCACCGGGACTACCCACCCACGGGGTGCAGTTCCACCCGGAA
AGCTACCTTACGGAGGCGGGTA AACTCATCCTCAAGAACTTCTGGAGGACCCGTGGACGCGGTGA
GAATTCTCAAATGGTATGCGTTTGGACACATCCACTATATATCCGTGTCGTTCTGTCCACTCCTGAATCCCAT
TCCAGAAATTCTCTAGCGATTCCAGAAGTTTCTCAGAGTCGGAAAGTTGACCAGACATTACGAACTGGCACA
GATGGTCATAACCTGAAGGAAGATCTGATTGCTTAAGTCTCAGTTAAGAGCGAAGCGCTCGTCGTATAACA
GATGCGGATGATGCAGACCAATCAACATGGCACCTGCCATTGCTACCTGTACAGTCAAGGATGGTAGAAATGT
TGTCGGTCCTTGACACGAATATTACGCCATTTGCCTGCATATTCAAACAGCTCTTCTACGATAAGGGCACAA
ATCGCATCGTGGAACCTTTTGGGCTTCTACCGATTTAGCAGTTTGATACACTTTCTCTAAGTATCCACCTGAATC
ATAAATCGGCAAAATAGAGAAAAATTGACCATGTGTAAGCGGCCAATCTGATTCCACCTGAGATGCATAATCT
AGTAGAATCTCTTCGCTATAAAAAATTCATTCCACCTTCCACTCACCGGTTGTCCATTTCATGGCTGAATCTG
CTTCCTCTGTTGACATGACACACATCATCTCAATATCCGAATAGGGCCCATCAGTCTGACGACCAAGAGAGC
CATAAACACCAATAGCCTTAACATCATCCCCATATTTATCCAATATTCGTTCCCTTAATTTTCATGAACAATCTTCA
TTCTTTCTTCTCTAGTCATTATTATTGGTCCATTCAT
GGGTCGTGGGCGGGAACCCGAGACGGGCGAGTTGCCGCGTTTCTCTCCGCCAGGTCCGCCCGGTGCG
GGGAAAACCCCCAAAAGGAGCCCTTTTCCCGCATCCGGCGCTATCGTAAAAACCTCACGCGCCCTTGTC
AAGCGGTCGGGCCTTAA
GAATTCATACCGCTAGAGGTCCAGGAGGACGGTGTCCCCCTCGAGGCGGGCGGGGAAGACCTTCACGGGC
CTCGGGGCGGGAAGGGTCTGCCGCCCGTCTCAGGTCAAACCGGGCCCCGTGGCGGGGGCAGACGATG
GCCCCGTCTCCACCTCCCCCTCGTGGAGGGGGCCGTCGTCGTGGGTGCAGACGTCTCCAGGGCGAAG
ACCTCCTCCCCCGTGTAGAGGAGGAGGA

```

3' terminaler Bereich von *trpG* (617174 - 1416970)

$kat^*$  (1416969 – 1416201)

Promotersequenz *slpA* (1416200 - 1416042)

3' terminaler Bereich von *tt1490* (1416041-1415804)

Integrationsbereich von *shble* 77-3 (Abbildung 22 B):

CCCCCGCACCTCCTGGCGGTGGTGGAGGTGCCGGAGGCCCTCGTGGTGAACGCCTGGGCGGAGGAGGCG  
 GGGGGGCGGACGGTGTATGGGCTTCCGCCACCGGGACTACCCACCCACGGGGTGCAGTTCCACCCGGAA  
 AGCTACCTTACGGAGGCGGGTA AACTCATCCTCAAGAACTTCTGGAGGACCCGTGGACGCGGTGA  
 CAGTTTGAATTCCGGTCAGTCCTGCTCCTCGGCCACGAAGTGCACGCAGTTGCCGGCCGGGTGCGCAGG  
 GCGAACTCCCGCCCCACGGCTGCTCGCGATCTCGGTCATGGCCGGCCCGGAGGCGTCCCGGAAGTTCC  
 TGGACACGACCTCCGACCACTCGGCGTACAGCTCGTCCAGGCCGCGCACCCACACCCAGGCCTGGGTGTT  
 GTCCGGCACCACCTGGTCTTGACCGCGCTGATGAACAGGGTCACGTCGTCCCGGACCACACCGGCGAAG  
 TCGTCTCCACGAAGACCCGGGAGAACCCGAGCCGGTCGGTCCAGAACTCGACCGCTCCGGCGACGTCGC  
 GCGCGGTGAGCACCCGGAACGGCACTGGTCAACTTGCCCATGGCCAT  
 TCCTGAATCCCATCCAGAAATTCCTAGCGATTCCAGAAGTTTCTCAGAGTCGGAAGTTGACCAGACATTA  
 CGAACTGGCACAGATGGTCATAACCTGAAGGAAGATCTGATTGCTTAACTGCTTCAGTTAAGAGCGAAGCGC  
 TCGTCGTATAACAGATGCGATGATGCAGACCAATCAACATGGCACCTGCCATTGCTACCTGTACAGTCAAGG  
 ATGGTAGAAATGTTGTGCGGTCTTGACACGAATATTACGCCATTTGCCCTGCATATTCAAACAGCTCTTCTAC  
 GATAAGGGCACAAATCGCATCGTGGAACCTTTTGGGCTTCTACCGATTTAGCAGTTTGATACACTTTCTCTAAG  
 TATCCACCTGAATCATAAATCGGCAAAATAGAGAAAAATTGACCATGTGTAAGCGGCCAATCTGATTCCACCT  
 GAGATGCATAATCTAGTAGAATCTCTTCGCTATAAAAAATCACTTCCACCTTCCACTCACCGGTTGTCCATTCA  
 TGGCTGAACCTCTGCTTCCCTCTGTTGACATGACACACATCATCTCAATATCCGAATAGGGCCCATCAGTCTGAC  
 GACCAAGAGAGCCATAAACACCAATAGCCTTAACATCATCCCCATATTTATCCAATATTCGTTCTTAATTCA  
 TGAACAATCTTCATTCTTTCTTCTCTAGTCATTATTATTGGTCCATTCAT  
 GGGTCGTGGGCGGGAACCCGAGACGGGCGAGTTGCCGCGTTTCCTCTCCGCCCAGGTCCGCCCCGGTGCG  
 GGGAAAACCCCCCAAAGGAGCCCTTTTTCCCCGCATCCGGCGCTATCGTAAAAACCTCACGCGCCCTTGTC  
 AAGCGGTCGGGCCTTAA  
 GAATTCATACCGCTAGAGGTCCAGGAGGACGGTGTCCCCCTCGAGGCGGGCGGGGAAGACCTTCACGGGC  
 CTCGGGGCGGGAAGGGTCTGCCGCCCGTCTCAGGTCAAACCGGGCCCCGTGGCGGGGGCAGACGATG  
 GCCCCGTCTCCACCTCCCCCTCGTGGAGGGGGCCGTCGTCGTGGGTGCAGACGTCCTCCAGGGCGAAG  
 ACCTCCTCCCCGTGTAGAGGAGGAGGA

3' terminaler Bereich von *trpG* (1417510 - 1417306)

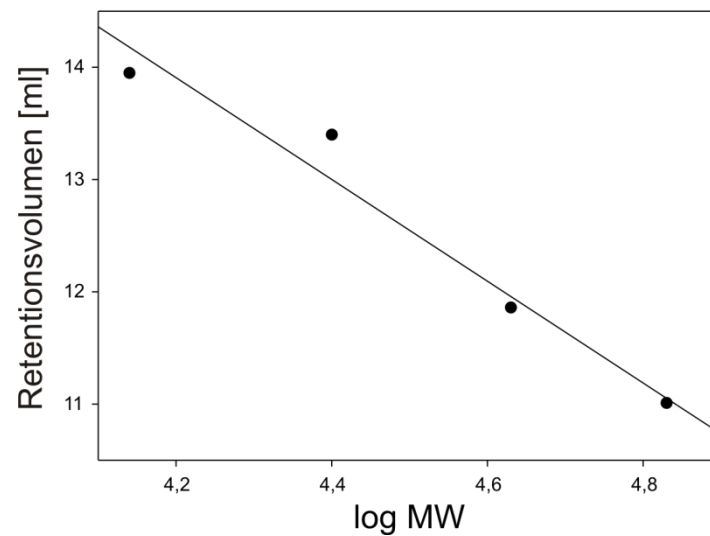
*shble*\_77-3 (1417305 - 1416909)

5' terminaler Bereich von *kat*\* (1416908 – 1416201), Deletion der 3' terminalen 54 bp durch Integration von *shble*\_77-3

Promotersequenz *slpA* (1416200 - 1416042)

3' terminaler Bereich von *tt1490* (1416041-1415804)

## 7.6 Kalibrierung der Superdex-75 (16/60) Gelfiltrationssäule



**Abbildung A 3: Kalibrierung der Superdex S-75 Gelfiltrationssäule.**

Proteine mit bekannter molarer Masse (Tabelle A 3) wurden bei RT auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte in 50 mM KP, 300 mM KCl, pH 7,5 mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Dargestellt ist das Retentionsvolumen in ml gegen den Logarithmus der molaren Masse (log MW).

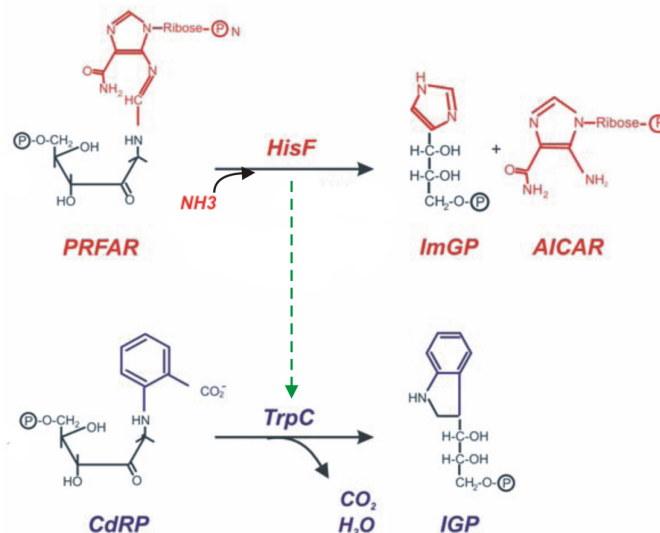
**Tabelle A3: Zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule Superdex S-75 verwendete Proteine.**

Lauf	Protein	MW [g/mol]	log MW	Retentionsvolumen [ml]
Kalibrierung 1	Ribonuklease A	13700	4,14	13,95
	Ovalbumin	43000	4,63	11,86
Kalibrierung 2	Chymotrypsinogen	25000	4,40	13,40
	Albumin	67000	4,83	11,01

## 7.7 Teilprojekt: Versuch der Etablierung der TrpC Aktivität auf dem Gerüst von HisF aus *Thermotoga maritima* (tmHisF)

### 7.7.1 Hintergrund

Im Rahmen dieser Dissertation sollte auch die postulierte evolutionäre Verwandtschaft der beiden  $(\beta\alpha)_8$ -barrel Enzyme Imidazol-Glycerinphosphat-Synthase (HisF) und Indol-3-Glycerinphosphat-Synthase (IGPS/TrpC) experimentell untersucht werden. HisF und TrpC katalysieren analoge Ringschlussreaktionen in der Biosynthese von Histidin bzw. von Tryptophan, wobei die Aminoketosen (PRFAR bzw. CdRP) jeweils durch allgemeine Säure-Base Katalyse zu aromatischen Ringen (ImGP bzw. IGP) umgesetzt werden (Abbildung A 4).



**Abbildung A 4:**  $(\beta\alpha)_8$ -barrel Enzyme Imidazol-Glycerinphosphat-Synthase (HisF) und Indol-3-Glycerinphosphat-Synthase (TrpC) katalysieren analoge Ringschlussreaktionen in der Histidin- und Tryptophanbiosynthese.

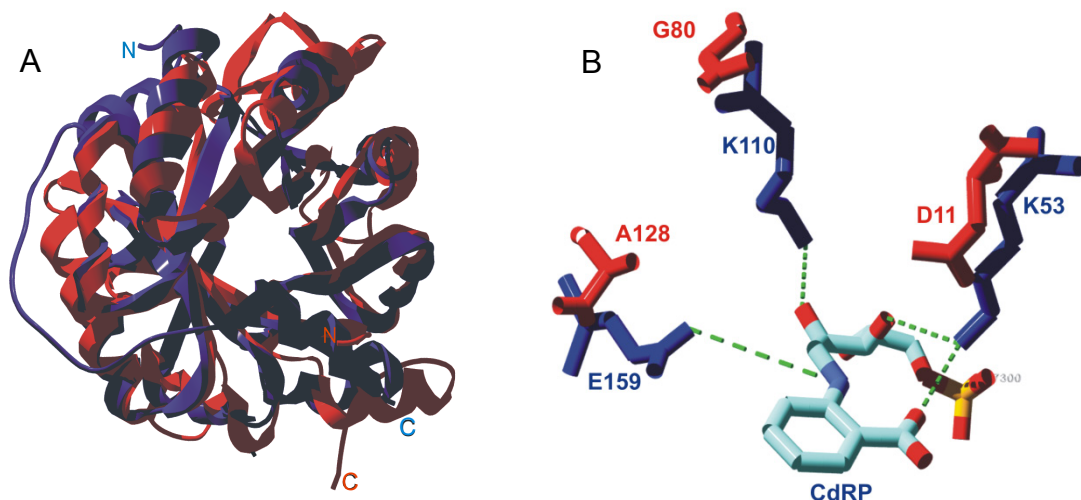
Im Rahmen der geplanten Dissertation soll mittels rationalem Proteindesign (7.7.2) bzw. gelenkter Evolution (7.7.3) auf dem Grundgerüst von tmHisF die Aktivität von TrpC etabliert werden (grüner gestrichelter Pfeil).

Diese Ähnlichkeit lässt vermuten, dass HisF und TrpC evolutionär verwandt sind. Ein starkes Argument für die evolutionäre Verwandtschaft zweier Enzyme ist es, wenn durch den Austausch weniger Aminosäuren die katalytische Aktivität eines Enzyms auf dem Proteingerüst des anderen etabliert werden kann. Deshalb sollte die Fähigkeit von TrpC zur Synthese von IGP auf das Proteingerüst von tmHisF durch rationales Proteindesign bzw. gelenkte Evolution übertragen werden.

## 7.7.2 Rationales Proteindesign

### 7.7.2.1 Planung

In einem ersten Planungsschritt wurden die Gesamtstrukturen und die Strukturen der aktiven Zentren von tmHisF und TrpC aus *S. solfataricus* (ssTrpC, mit gebundenem Substratanalogon rCdRP) überlagert (Abbildung A 5).



**Abbildung A 5: Superpositionierung der Röntgenstrukturen von ssTrpC (mit gebundenem Substratanalogon rCdRP; PDB Eintrag 1LBF) und tmHisF (PDB Eintrag 2A0N).**

A: Überlagerung des Proteinrückgrates von ssTrpC (in blau) und tmHisF (in rot) (Programm *swiss pdb viewer*; rmsd = 1,62 Å für 214 C $_{\alpha}$ -Atome).

B: Überlagerung der aktiven Zentren. Gezeigt sind das gebundene rCdRP, die katalytisch essentiellen Reste von ssTrpC (in blau) und die korrespondierenden Reste von tmHisF (in rot). Der Rest N180 aus ssTrpC und der entsprechende Rest T171 aus tmHisF sind nicht gezeigt.

Der bei der Überlagerung ermittelte *root mean square deviation* (rmsd) Wert von 1,62 Å für 214 superpositionierte C $_{\alpha}$ -Atome belegt, dass die Strukturen der beiden Enzyme sehr ähnlich sind. Für die Katalyse der TrpC Reaktion sind die Reste ssTrpC-K53 (Ausrichtung des Substrates), ssTrpC-K110 (allgemeine Säure), ssTrpC-E159 (allgemeine Base) und ssTrpC-N180 (Funktion unbekannt) essentiell (Hennig *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2005). Die Abbildung A5 B zeigt, dass tmHisF-D11 mit ssTrpC-K53, tmHisF-G80 mit ssTrpC-K110, tmHisF-A128 mit ssTrpC-E159 und tmHisF-T171 mit ssTrpC-N180 zur Deckung kommt. In der Folge wurden die entsprechenden Aminosäurereste auf dem tmHisF-Hintergrund eingeführt (Tabelle A4: blau markiert). In einer zweiten Planungsphase wurden Reste ausgetauscht oder deletiert, die für die Katalyse der TrpC-Reaktion aufgrund sterischer Gesichtspunkte störend erschienen (grün), vollständige Substratbindungsmotive aus ssTrpC (violett) übernommen und vollständige *loops* aus ssTrpC (rot) an den entsprechenden

Positionen eingeführt (Tabelle A4). Diese *loops* zeigten deutlich unterschiedliche Konfigurationen in den beiden Strukturen.

**Tabelle A 4: Erzeugte tmHisF-Mutanten, die basierend auf rationalem Proteindesign hergestellt wurden.**

Blau: Austausch essentieller Reste zur Übertragung von ssTrpC auf tmHisF, violett: Austausch zur Übertragung vollständiger Substratbindungsmotive von ssTrpC auf tmHisF, grün: Entfernung sterisch anspruchsvoller Reste im aktiven Zentrum, rot: Austausch der jeweiligen *loop*-Sequenz aus tmHisF gegen die aus ssTrpC. Die in grau hinterlegte Mutante tmhisF\* wurde als Templat für den Ansatz der gelenkten Evolution verwendet, nachdem das Genprodukt tmHisF\* eine verbesserte rCdRP-Affinität zeigte (Tabelle A 5).

tmHisF-Mutanten
D11K
D11K+T171N
D11K+A128E
D11K+G80K
D11K+A128E+T171N
D11K+A128E+T171N+S201E
D11K+G80K+A128E+S201E
D11K+G80K+A128E
D11K+A128E+S201E
D11K+G80K+A128E+T171N
D11K+G80K+A128E+S201E
D11K+G80K+G81D+G82F+A128E+S201E+G202S
$\beta_1\alpha_1$ -ssIGPS+G80K+G81D+G82F+A128E+S201E+G202S
D11K+G80K+G81D+G82F+A128E+T171N+I173R+R175L+S201E+G202S
$\beta_1\alpha_1$ -ssIGPS+G80K+G81D+G82F+A128E+T171N+I173R+R175L+S201E+G202S
$\beta_1\alpha_1$ -ssIGPS+G80K+G81D+G82F+A128E+S144L+T171N+I173R+R175L+S201E+G202S
$\beta_1\alpha_1$ -ssIGPS+G80K+G81D+G82F+A128E+S144F+T171N+I173R+R175L+S201E+G202S
$\beta_1\alpha_1$ -ssIGPS+ $\beta_2\alpha_2$ -ssIGPS+G80K+G81D+G82F+A128E+S144L+T171N+I173R+R175L+S201E+G202S
$\beta_1\alpha_1$ -ssIGPS+ $\beta_2\alpha_2$ -ssIGPS+G80K+G81D+G82F+A128E+S144L+T171N+I173R+R175L+D176A+S201E+G202S *
$\beta_1\alpha_1$ -ssIGPS + $\beta_2\alpha_2$ -ssIGPS +G80K+G81D+G82F+A128E+ $\beta_2\alpha_2$ -ssIGPS +T171N+I173R+R175L+D176A+S201E+G202S

### 7.7.2.2 In vitro Charakterisierung hergestellter tmHisF-Mutanten

Die Mutanten wurden zunächst über zielgerichtete Mutagenese (3.3.3.1 oder 3.3.3.2) erzeugt und heterolog in *E. coli* KK8 Zellen hergestellt. Mithilfe eines N-terminal fusionierten His<sub>6</sub>-tags, konnten die Mutanten durch Nickelchelate-Chromatographie gewonnen werden. Alle rekombinanten Mutanten waren sehr gut löslich und konnten mit hoher Ausbeute aus der löslichen Zellfraktion gewonnen werden (> 40 mg/l Bakterienkultur). Jedoch zeigte bei *steady-state* enzymkinetischen Messungen (Schneider *et al.*, 2005; Dietrich, 2010) selbst bei einer Konzentration von 30  $\mu$ M

CdRP keine der Mutanten eindeutige TrpC-Aktivität (0,1 M EPPS, pH 7,5,  $25\text{ °C} \leq T \leq 40\text{ °C}$ ). Bei Langzeitmessungen mit sehr hohen CdRP-Konzentrationen (50 – 100  $\mu\text{M}$ ) war jedoch ein Anstieg der IGP-Fluoreszenz erkennbar und somit ein Hinweis auf einen Umsatz von CdRP zu IGP. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Zunahme der IGP-Fluoreszenz auf eine autokatalytische Reaktion von CdRP zu IGP bei diesen Bedingungen zurückzuführen ist (7.7.4).

Um zu testen, ob die Mutationen zumindest zu einer meßbaren Erhöhung der Bindung des TrpC-Substrates CdRP führten, wurden FRET-basierte Titrationsversuche mit dem Substratanalogon rCdRP (Claren *et al.*, 2009) durchgeführt (Tabelle A 5). Es zeigte sich, dass die Affinität der Mutante tmHisF\* für rCdRP im Vergleich zum wildtypischen tmHisF etwas erhöht ist (Tabelle A 5). Diese Mutante diente daher in der Folge auch als Ausgangskonstrukt für den Ansatz der gelenkten Evolution.

**Tabelle A 5: rCdRP Bindungsstudien von tmHisF-Mutanten.**

Nach Anregung bei 280 nm wurde die Fluoreszenzemission bei 320 nm von 3  $\mu\text{M}$  Protein in 100 mM EPPS, pH 7,5 bei 25 °C über 1 min gemittelt. Die auf FRET zwischen Tryptophanresten des Proteins und dem Liganden zurückgehende Abnahme der Fluoreszenz wurde gegen die rCdRP-Konzentration aufgetragen. Die Messpunkte wurden normiert und durch einen Fit mit einer hyperbolischen Funktion (Programm Sigma Plot 11.0) die thermodynamischen Dissoziationskonstanten  $K_{d,rCdRP}$  bestimmt.

\*: tmHisF\*.

tmHisF-	$K_{d,rCdRP}$ [ $\mu\text{M}$ ]
wt	116
D11K+A128E+T171N+S201E	96
$\beta_1\alpha_{1-ssIGPS}$ +G80K+G81D+G82F+A128E+T171N+I173R+R175L+S201E+G202S	115
$\beta_1\alpha_{1-ssIGPS}$ + $\beta_2\alpha_{2-ssIGPS}$ +G80K+G81D+G82F+A128E+S144L+T171N+I173R+R175L+D176A+S201E+G202S *	60

### 7.7.3 Gelenkte Evolution

In einem zweiten Schritt sollte die TrpC-Aktivität über die Methode der gelenkten Evolution auf dem tmHisF-Proteingerüst eingeführt werden. Es wurden dafür zwei Genbanken auf zwei unterschiedlichen Ausgangskonstrukten (tmhisF-wt und tmhisF\*, Tabelle A4) erstellt (3.3.10). Die beiden hergestellten Genbanken (pTNA-tmhisF-wt:  $G = 5 \cdot 10^6$ , pTNA-tmhisF\*:  $G = 2 \cdot 10^7$ ) wurden mittels metabolischer Komplementation auf TrpC-aktive tmHisF-Mutanten abgesucht. Dazu wurden *in vivo* Komplementationstests in einem, nach dem Protokoll von Datsenko und Wanner (2000), eigens erzeugten auxotrophen *E. coli*  $\Delta trpC$  Stamm auf M9<sup>-</sup> Minimalmedium durchgeführt (Claren *et al.*, 2009). Nach Inkubation bei 37 °C wuchsen auf Platten mit diesem Medium einige Kolonien heran. Es wurde jeweils das tmhisF-Gen isoliert und in einen neuen pTNA-Vektor umkloniert, um anschließend eine Retransformation durchzuführen. In keinem Fall konnte nach der Umklonierung und anschließender Retransformation erneutes Wachstum nachgewiesen werden. Daher konnte keine tmHisF-Mutante mit dieser Methode isoliert werden, die eine TrpC-Aktivität zeigt.

### 7.7.4 Autokatalyse der CdRP zu IGP-Ringschlussreaktion

Nachdem die *steady-state* enzymkinetischen Messungen der TrpC-Reaktion einen Hinweis auf eine Autokatalyse der Ringschlussreaktion von CdRP zu IGP lieferte (7.7.2.2), wurde die Menge an gebildetem IGP mit einer Endpunktanalyse quantifiziert. Dabei wurde das Ausgangssubstrat CdRP mit und ohne Enzym (ssTrpC oder tmHisF) bei 37 °C für 15 h inkubiert und anschließend der Umsatz von IGP zu CdRP im Ansatz chromatographisch untersucht. Nach der Inkubation wurden die Proteine durch Filtration mit Amicon-Zentrifugenröhrchen entfernt. Der Durchfluss der Ansätze wurden durch *reversed phase* HPLC-Analyse mit einer Kromasil C18-Säule (250 x 4,5 mm) und einem Gradient von Laufpuffer A (0,1 % (v/v) Ameisensäure in H<sub>2</sub>O) und Laufpuffer B (0,1 % (v/v) Ameisensäure in Acetonitril) untersucht, wobei IGP durch Fluoreszenzdetektion (Anregung 295 nm, Emission 355 nm) nachgewiesen werden konnte. Aus der entstandenen Menge an IGP wurde eine Rate für die unkatalysierte Spontanreaktion von CdRP zu IGP von  $k_{\text{CdRP-IGP, unkat}} = 2,4 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  berechnet. Die erhaltene Rate stimmt mit den Signalzunahmen bei den *steady-state* Enzymkinetikkmessungen überein. Dies belegt, dass die beobachtete Bildung von IGP nicht auf die Aktivität einer tmHisF-Mutante zurückgeht.



### 7.7.5 Abschließende Diskussion

Durch rationales Design wurde keine tmHisF-Mutante mit einer messbaren TrpC-Aktivität erzeugt. Im Falle von tmHisF\* liegt zumindest eine geringfügig verbesserte Bindung des Substratanalogons rCdRP vor. Die gelöste Kristallstruktur von tmHisF mit gebundenem rCdRP oder CdRP wäre für ein rationales Design eine bessere Grundlage. Entsprechend der Anordnung des Substrates könnten die katalytisch essentiellen Aminosäuren eingeführt werden. Ein weiteres Problem ist neben der unzureichenden Strukturinformation auch das eingeschränkte Wissen über den Mechanismus der TrpC-Reaktion (Dietrich, 2010). Alternativ könnte man das Enzymdesign unter Verwendung eines wissensbasierten, bioinformatischen Ansatzes, z.B. mit dem Programm TransCent (Fischer *et al.*, 2009) durchführen, da in diesem Fall keine Kenntnis des Reaktionsmechanismus vorausgesetzt wird. Auch mithilfe gelenkter Evolution wurde keine TrpC-aktive tmHisF-Mutante isoliert. Letzlich ist das Enzymdesign der TrpC-Reaktion wohl eine momentan noch zu anspruchsvolle Aufgabe.

## 7.8 Teilpublikationen ssAnPRT

Im Rahmen dieser Dissertation wurde neben der in Kapitel 4 beschriebenen Identifizierung der nativ monomeren AnPRTs und der Stabilisierung des aktivierten Monomers von ssAnPRT durch gelenkte Evolution in *T. thermophilus* auch an weiteren Projekten mit ssAnPRT gearbeitet. Zum einen wurde die Monomerisierung von ssAnPRT durch rationales Proteindesign und zum anderen die Aktivierung von ssAnPRT erreicht.

Die erzielten Ergebnisse werden in diesem Kapitel anhand von zwei Teilpublikationen gezeigt. Im Folgenden wird kurz erläutert, welcher Beitrag zu diesen Publikationen im Rahmen der vorliegenden Dissertation geleistet wurde.

### 1.

**Schwab, T., Skegro, D., Mayans, O. and Sterner, R. (2008)**

A rationally designed monomeric variant of anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus* is as active as the dimeric wild-type enzyme but less thermostable. *J Mol Biol* 376: 506-516.

Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, liegt ssAnPRT als Homodimer vor. Durch Monomerisierung durch rationales Proteindesign sollte der Grund für die Homodimerisierung aufgeklärt werden. Die Aminosäureaustausche I36E und M47D führten in der Kombination zur erfolgreichen Monomerisierung des Enzyms. Die weitere Charakterisierung der monomeren Mutante zeigte wildtypische katalytische Eigenschaften sowie eine deutlich verringerte thermische Stabilität. So wurde gefolgert, dass ssAnPRT aus Stabilitätsgründen als Homodimer vorliegt. Die Herstellung und Charakterisierung aller Mutanten erfolgte im Rahmen meiner Diplomarbeit (Schwab, 2006) und wurde im Rahmen der Dissertation fortgesetzt. Die Röntgenkristallstrukturanalyse von ssAnPRT-M47D wurde von Prof. Olga Mayans sowie ihrem Mitarbeiter Darko Skegro (Biological Sciences, University of Liverpool) durchgeführt (Abbildung 2b, Tabelle 4).

## 2.

**Schlee, S., Deuss, M., Bruning, M., Ivens, A., Schwab, T., Hellmann, N., Mayans, O. and Sterner, R.** (2009). Activation of anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus* by removal of magnesium inhibition and acceleration of product release. *Biochemistry* 48: 5199-5209.

Die Aktivierung von ssAnPRT durch gelenkte Evolution in einem auxotrophen *E. coli* Stamm führte zur Identifizierung der beiden Mutationen D83G und F149S. Diese beiden Mutationen erhöhen die Wechselzahl des Enzyms und heben die Magnesiuminhibition auf (1.2). Der Ansatz der gelenkten Evolution und die Herstellung bzw. teilweise Charakterisierung der Mutanten wurde von Dr. Andreas Ivens begonnen und von Dr. Miriam Deuss (Deuss, 2006) fortgeführt. Dr. Sandra Schlee konnte die Charakterisierung der Mutanten vollenden, wobei Nadja Hellmann einen Beitrag bei der Datenanalyse leistete. Die Messungen zur PRPP und Magnesiumabhängigkeit der *steady-state* Enzymkinetik (Abbildung 2 und 3) wurde von mir im Rahmen der Dissertation durchgeführt. Die Röntgenkristallstrukturanalyse von ssAnPRT-D83G+F149S wurde von Prof. Olga Mayans sowie ihrem Mitarbeiter Marco Bruning (Biological Sciences, University of Liverpool) durchgeführt (Abbildung 1b und 1c, Tabelle S3 und S4).

doi:10.1016/j.jmb.2007.11.078

J. Mol. Biol. (2008) 376, 506–516

**JMB**

Available online at www.sciencedirect.com

**ScienceDirect**

## A Rationally Designed Monomeric Variant of Anthranilate Phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus* is as Active as the Dimeric Wild-type Enzyme but Less Thermostable

Thomas Schwab<sup>1</sup>, Darko Skegro<sup>2</sup>, Olga Mayans<sup>2</sup>  
and Reinhard Sterner<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biophysics und  
Physical Biochemistry  
University of Regensburg  
Universitätsstrasse 31  
D-93053 Regensburg, Germany

<sup>2</sup>Division of Structural Biology  
Biozentrum, University of Basel  
Klingelbergstrasse 70  
CH-4056 Basel, Switzerland

Received 24 October 2007;  
received in revised form  
14 November 2007;  
accepted 23 November 2007  
Available online  
4 December 2007

The anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus* (ssAnPRT) forms a homodimer with a hydrophobic subunit interface. To elucidate the role of oligomerisation for catalytic activity and thermal stability of the enzyme, we loosened the dimer by replacing two apolar interface residues with negatively charged residues (mutations I36E and M47D). The purified double mutant I36E+M47D formed a monomer with wild-type catalytic activity but reduced thermal stability. The single mutants I36E and M47D were present in a monomer–dimer equilibrium with dissociation constants of about 1  $\mu$ M and 20  $\mu$ M, respectively, which were calculated from the concentration-dependence of their heat inactivation kinetics. The monomeric form of M47D, which is populated at low subunit concentrations, was as thermolabile as monomeric I36E+M47D. Likewise, the dimeric form of I36E, which was populated at high subunit concentrations, was as thermostable as dimeric wild-type ssAnPRT. These findings show that the increased stability of wild-type ssAnPRT compared to the I36E+M47D double mutant is not caused by the amino acid exchanges *per se* but by the higher intrinsic stability of the dimer compared to the monomer. In accordance with the negligible effect of the mutations on catalytic activity and stability, the X-ray structure of M47D contains only minor local perturbations at the dimer interface. We conclude that the monomeric double mutant resembles the individual wild-type subunits, and that ssAnPRT is a dimer for stability but not for activity reasons.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** anthranilate phosphoribosyltransferase; hyperthermophile; rational protein design; *Sulfolobus solfataricus*; thermal stability

Edited by F. Schmid

### Introduction

The non-covalent association of polypeptide chains into homo-oligomeric and hetero-oligomeric enzyme complexes has important consequences for function and stability. The interplay between assembled subunits can lead to the formation of

complex active sites, facilitate the regulation of catalytic activities, and is the prerequisite for substrate channelling.<sup>1,2</sup> Moreover, the comparison of homologous enzymes from mesophiles and hyperthermophiles suggests that a higher oligomerisation state increases the resistance to thermally induced inactivation and unfolding.<sup>3–6</sup> The role of individual residues for the assembly of subunits and the consequences of a specific oligomerisation state for the function and stability of an enzyme can be tested by protein engineering. Along these lines, amino acid substitutions at the contact interface lead to the dissociation of oligomeric enzymes into subunits with more or less reduced reaction rates and conformational stabilities.<sup>7–11</sup>

\*Corresponding author. E-mail address:

Reinhard.Sterner@biologie.uni-regensburg.de.

Abbreviations used: PRT, phosphoribosyltransferase; AnPRT, anthranilate phosphoribosyltransferase; ssAnPRT, *Sulfolobus solfataricus* AnPRT.

The members of the phosphoribosyltransferase (PRT) enzyme class catalyze the transfer of a phosphoribosyl group to an aromatic base. PRTs have an important role in the metabolism of nucleotides and amino acids; for example, as key components of the purine salvage and the histidine and tryptophan biosynthetic pathways. PRPP is used as the universal phosphoribosyl donor from which the 1-pyrophosphate group is displaced during the formation of the N-1'-glycosidic bond to the base specific for each PRT. Three structurally unrelated classes of PRT can be distinguished. Most PRTs with known X-ray structure belong to class I,<sup>12</sup> whereas class II comprises quinolate PRT<sup>13,14</sup> and nicotinate PRT.<sup>15</sup> The only known member of class III is anthranilate phosphoribosyltransferase (AnPRT), which catalyzes the Mg<sup>2+</sup>-dependent ribosylation of anthranilate to phosphoribosyl anthranilate within tryptophan biosynthesis (Figure 1). The X-ray structures of AnPRTs from *Sulfolobus solfataricus* (ssAnPRT),<sup>16</sup> *Pectobacterium carotovorum*,<sup>17</sup> *Mycobacterium tuberculosis*,<sup>18</sup> *Thermus thermophilus* (PDB entry 1V8G) and Nostaceae (PDB entry 1VQU) have been solved at high resolution. Their analysis showed that AnPRTs have a similar fold and homodimeric structure as nucleoside phosphorylases, which catalyze the phosphorolysis of the glycosidic bond of nucleosides to yield free bases and ribose -1-phosphate.<sup>19</sup> Figure 2(a) shows a ribbon diagram of the structure of ssAnPRT, which has been solved in complex with two molecules of anthranilate and one molecule of PRPP. This structure, in combination with mutational analysis, made it possible to identify the role of individual residues for substrate binding at the active site of each subunit.<sup>20</sup>

To test the significance of homo-dimer formation for the function and extreme thermostability of ssAnPRT,<sup>21</sup> we exchanged two residues at the contact interface individually and in combination to loosen the dimer. The double mutant formed a pure monomer with wild-type catalytic activity but reduced thermal stability. The two single mutants were present in equilibrium between the monomer and the dimer, and their resistance to thermal inactivation increased with increasing concentration of protein. These results show that dimerisation is dispensable for the catalytic activity of ssAnPRT but important for its high intrinsic stability. The comparison of the X-ray structures of wild-type ssAnPRT and the M47D mutant is in full agreement with these findings.

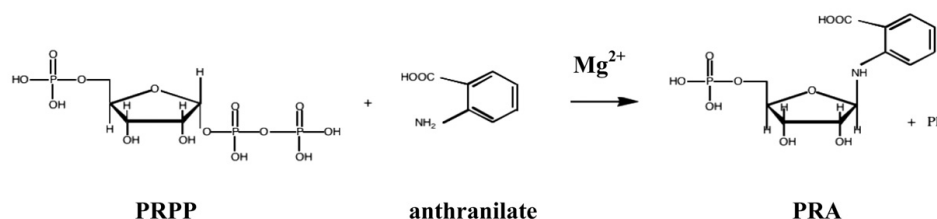
## Results

### Strategy of rational design

The monomerisation of ssAnPRT was planned on the basis of the high-resolution X-ray structure of the dimeric wild-type enzyme (Figure 2(a)).<sup>16,20</sup> Each subunit of the dimer consists of two domains: a large  $\alpha/\beta$  domain, formed by a central  $\beta$ -sheet and a

C-terminal cluster of eight helices, and a small  $\alpha$ -helical domain comprising six helices. The substrate-binding cavity for the coordination of AA and PRPP is at the domain interface, while dimer formation is mediated by the small  $\alpha$ -helical domains that associate in a head-to-head fashion following an approximate 2-fold symmetry. Details of the intersubunit interactions, which are formed mainly by residues from helices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  and  $\alpha 8$ , are given in Figure 2(b). The subunit interface of dimeric ssAnPRT is mainly hydrophobic. From the 24 residues (corresponding to a surface area of 939 Å<sup>2</sup>) buried per monomer, 20 residues (corresponding to 706 Å<sup>2</sup>) are apolar (PISA server†). A computer-based analysis (the "prot-prot" option of the program PDBsum<sup>22</sup>) showed that the hydrophobic residues Ile36 and Met47, which are located at the N and C-termini of helix  $\alpha 3$ , form the most numerous and intimate reciprocal intersubunit interactions. The main-chain carbonyl oxygen atom of Ile36 forms a hydrogen bond with the side-chain oxygen atom of Ser39' (the prime designates the residue from the other subunit), and its side-chain forms hydrophobic interactions with residues Glu35', Asn162', Val163', and Thr166'. The main-chain carbonyl oxygen atom of Met47 is hydrogen bonded to the Ne atom of Lys13', while the sulphur atom and the C $\epsilon$  atom of its side-chain form hydrophobic interactions with Leu10', Ile11', and Ala44'. Based on this analysis, site-directed mutagenesis was used to replace Ile36 and Met47 by the acidic residues glutamate and aspartate, both individually (single mutants I36E and M47D) and in combination (double mutant I36E+M47D). We reasoned that the introduction of the negatively charged side-chains would weaken the stabilizing interactions of Ile36 and Met47 with residues of the other subunit. Moreover, the relatively low distances between the C $\beta$  atoms of the two symmetry-related Ile36 residues (6.8 Å) and the two symmetry-related Met47 residues (4.4 Å) indicated that the introduced negative charges further weaken intersubunit interactions by electrostatic repulsion (Figure 2(c)). Furthermore, negatively charged residues at the protein surface increase the solubility of a protein,<sup>23</sup> which could help to stabilize the monomer. Met47 was replaced by aspartate instead of glutamate, because its shorter side-chain has a lower probability of forming a stabilizing hydrogen bond with Lys13'. Wild-type ssAnPRT and its mutants I36E, M47D, and I36E+M47D were generated with an N-terminal His<sub>6</sub> tag by heterologous gene expression in *Escherichia coli*. The recombinant enzymes were enriched from the soluble fraction of the cell extract by heat denaturation of the host proteins, followed by metal chelate affinity chromatography. All enzymes had a purity >95%, as judged by SDS-PAGE.

† [http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)



**Figure 1.** Reaction catalyzed by anthranilate phosphoribosyltransferase (AnPRT). PRPP, phosphoribosyl-α1-pyrophosphate; PRA, N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate.

### Oligomerisation state

The oligomerisation state of the recombinant ssAnPRT proteins was tested by analytical gel filtration chromatography. Figure 3 shows that wild-type ssAnPRT and the single mutants I36E and M47D elute at a similar retention time, while the double mutant I36E+M47D elutes significantly later. The elution volumes of wild-type ssAnPRT, as well as the single mutants I36E and M47D correspond to molecular masses of 64.5 kDa, 63.4 kDa and 61.7 kDa, respectively, which is somewhat smaller than the molecular mass of 77.7 kDa calculated for the dimer. Likewise, the elution volume of the double mutant I36E+M47D corresponds to a molecular mass of 32.4 kDa, which is smaller than the molecular mass expected for the monomer of 38.8 kDa (Table 1).

To test whether these deviations are due to unspecific interactions of ssAnPRT with the gel matrix, the association state of the proteins was determined also by sedimentation equilibrium runs in the analytical ultracentrifuge. The results confirmed that the wild-type enzyme forms a dimer and that the double mutant I36E+M47D forms a monomer under the given experimental conditions. The apparent molecular mass for the single mutants I36E and M47D suggested that they are present in a rapid equilibrium between a minor monomeric and a major dimeric fraction (Table 1).

### Catalytic activity

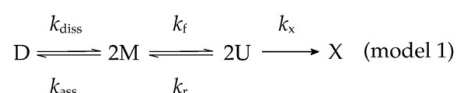
Steady-state enzyme kinetic parameters were measured to test whether the introduced amino acid substitutions have an influence on the catalytic activity of ssAnPRT. Table 2 shows that the turnover numbers ( $k_{cat}$ ) of the mutants and the wild-type enzyme are almost identical. Moreover, the Michaelis constants for both AA ( $K_M^{AA}$ ) and PRPP ( $K_M^{PRPP}$ ) differ only slightly between the monomeric I36E+M47D double mutant and the dimeric wild-type enzyme, yielding similar catalytic efficiencies ( $k_{cat}/K_M$ ) of the two enzymes for both substrates.

### Thermal stability

To investigate their stability against irreversible inactivation by heat, wild-type ssAnPRT and its mutants were incubated at 80 °C. Samples withdrawn

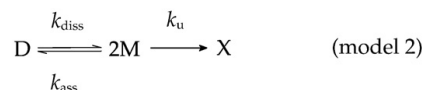
after different time intervals were chilled on ice, and their residual activities were measured at 37 °C. We observed first-order kinetics for the time-dependent inactivation of the double mutant I36E+M47D, but more complicated kinetics for wild-type ssAnPRT and the two single mutants. Nevertheless, the time-courses allowed us to determine apparent half-lives ( $t_{1/2}^{app}$ ) as an operational measure of kinetic stability. The  $t_{1/2}^{app}$  values for wild-type ssAnPRT and the I36E+M47D double mutant were approximately 40 min and 3 min, independently of the applied subunit concentration. In contrast, the  $t_{1/2}^{app}$  values of I36E and M47D increased from about 4 min and 3 min at the lowest subunit concentrations, to about 40 min and 15 min, respectively, at the highest subunit concentrations (Figure 4).

The concentration-dependence of the  $t_{1/2}^{app}$  values, together with the results of analytical gel filtration and analytical ultracentrifugation (Table 1), suggested that the single mutants I36E and M47D are present in equilibrium between the highly thermostable dimer and a much more labile monomer. To determine the equilibrium constant ( $K_D$ ) between dimer and monomer at 80 °C, we assumed the following mechanism for the dissociation and inactivation of ssAnPRT:

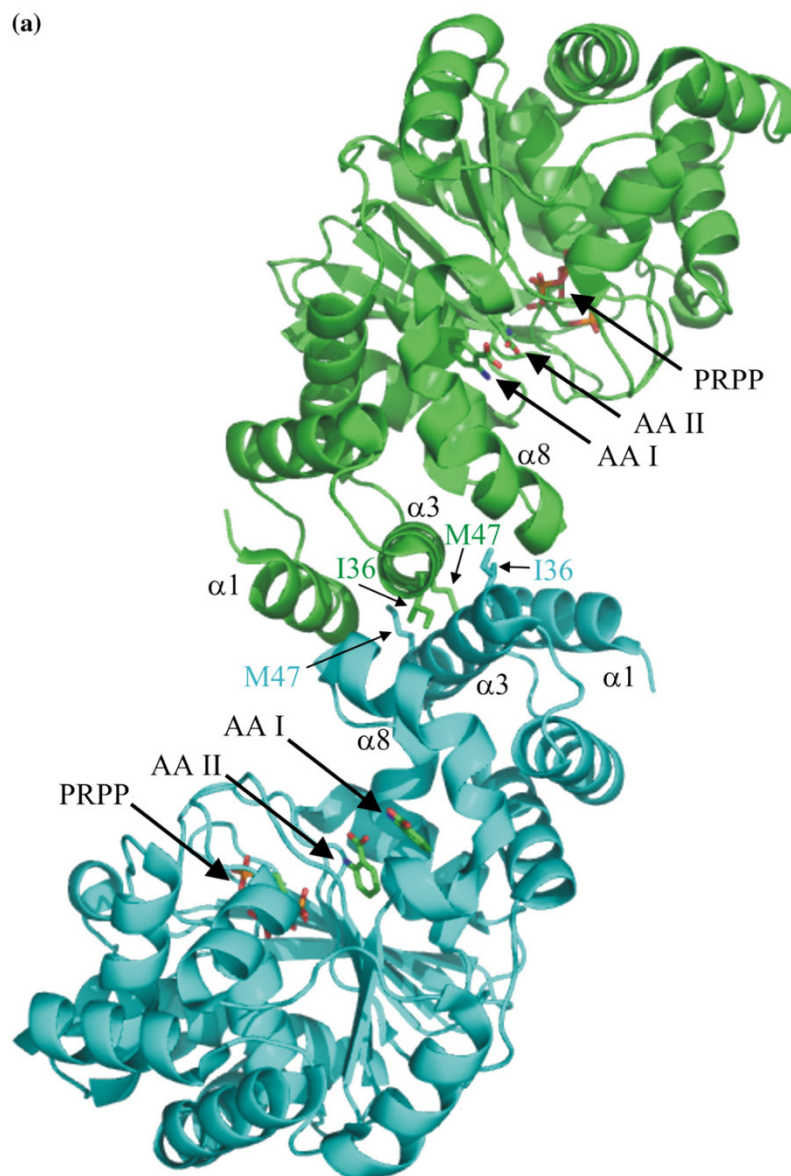


The ssAnPRT dimer (D) dissociates with the first-order rate constant  $k_{diss}$  to fully active monomers (M);  $k_{ass}$  is the second-order recombination rate constant, and the equilibrium dissociation constant  $K_D = k_{diss}/k_{ass}$ . The native monomer M then denatures reversibly with the first-order rate constants  $k_f$  and  $k_r$  to the unfolded state (U), which is inactivated with a first-order rate constant  $k_x$ .

Since the inactivation of the monomer M is a concentration-independent first-order process, which can be described by the rate constant  $k_U$ , model 1 simplifies to:



Equation (5) outlined in Material and Methods was derived on basis of model 2. We used this equation to



**Figure 2.** Dimer interface of wild-type ssAnPRT and the M47D mutant. (a) Ribbon diagram of the X-ray structure of ssAnPRT with bound substrates anthranilate (AA I and AA II) and PRPP.<sup>20</sup> Each subunit consists of a large  $\alpha/\beta$  and a small  $\alpha$ -helical domain, which mediates dimerisation in a head-to-head fashion. The side-chains of residues I36 and M47, which are located near the N and C-termini of  $\alpha$ -helix 3, respectively, are shown as sticks in both subunits. (b) A schematic display of all intersubunit interactions involved in dimerisation as identified by the “prot-prot” option of the program PDBsum.<sup>22</sup> Hydrogen bonds and hydrophobic interactions involving M47 or I36 are in red and blue, respectively. All other interactions are in black. (c) Superposition of the dimer interfaces of wild-type ssAnPRT and the M47D mutant. Residues I36, M47 and D47 are shown as sticks. The distances between the  $C_{\beta}$  atoms of the two I36 residues and the two M47 residues (marked by black stippled lines) are 6.8 Å and 4.4 Å, respectively. The distance between the carboxyl carbon atoms of the two D47 residues (marked by a yellow stippled line) is 3.6 Å.



510

Monomerisation of a Thermostable Homo-dimeric Enzyme

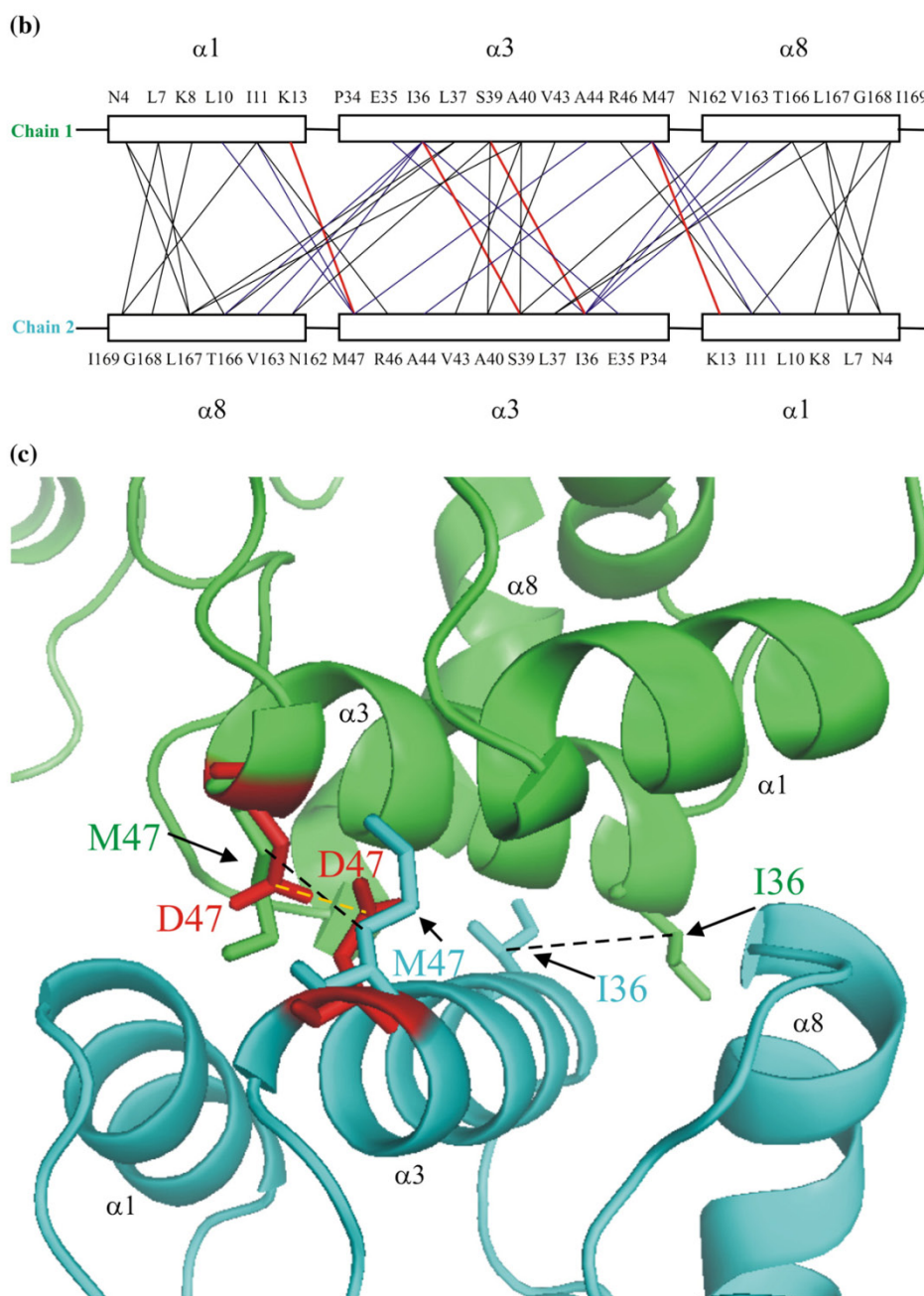
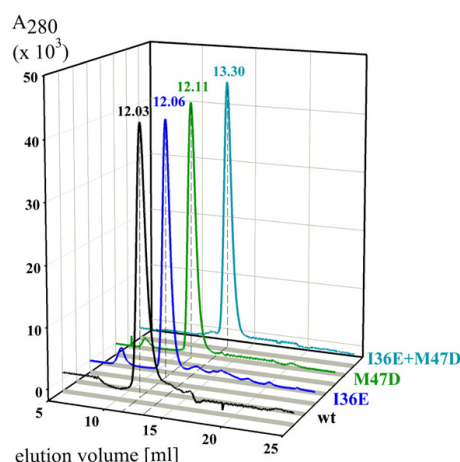


Figure 2 (legend on previous page)

apply non-linear least squares fitting to the inactivation kinetics, whereby datasets were recorded at different total subunit concentration ( $c_{\text{tot}}$ ) (I36E: nine

datasets, M47D: four datasets). For each dataset, the fitting analysis yielded an estimate for the  $K_D^1$  of the monomer-dimer equilibrium of a particular single





**Figure 3.** Analytical gel filtration chromatography of wild-type ssAnPRT and its mutants. The numbers give the elution volumes of the corresponding peaks. The experiments were performed on a calibrated Superdex S75 column at 25 °C in 50 mM potassium phosphate (pH 7.5), 300 mM KCl. The proteins were detected by their absorbance at 280 nm. The applied total protein concentration was 0.5 mg/ml in all samples, corresponding to a subunit concentration of 13.3  $\mu$ M.

mutant. The  $K_D$  values were then averaged to determine the dissociation constant  $K_D$  at 80 °C, which was  $0.8(\pm 0.6)$   $\mu$ M for the I36E mutant and  $17.0(\pm 10)$   $\mu$ M for the M47D mutant. The observation of a lower  $K_D$  value (corresponding to a higher subunit affinity) of I36E compared to M47D is in agreement with the results of analytical gel-filtration and analytical ultracentrifugation, which yielded, at identical total concentrations of subunit, higher apparent molecular masses for I36E than for M47D (Table 1). From the values of 66.0 kDa and 60.1 kDa determined in the sedimentation equilibrium runs,  $K_D$  values of approximately 1  $\mu$ M for I36E and 5  $\mu$ M for M47D were determined as published.<sup>8</sup> Given that these values can be only rough estimates and are deduced from measurements at a much lower

**Table 2.** Steady-state enzyme kinetic constants of wild-type ssAnPRT and its mutants

ssAnPRT variant	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$K_M^{AA}$ ( $\mu$ M)	$K_M^{PRPP}$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}/K_M^{AA}$ (s <sup>-1</sup> $\mu$ M <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M^{PRPP}$ (s <sup>-1</sup> $\mu$ M <sup>-1</sup> )
Wild-type	$0.41 \pm 0.04$	0.085	180	4.8	$2.3 \times 10^{-3}$
I36E+M47D	$0.28 \pm 0.06^b$	0.058	150	4.8	$1.9 \times 10^{-3}$

Experimental conditions: 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.05 mM MgCl<sub>2</sub>, 37 °C; various concentrations of AA or PRPP, in the presence of saturating conditions ( $10 \times K_M$ ) of the second substrate; subunit concentration of the enzymes: 0.01  $\mu$ M.

<sup>a</sup> The  $k_{cat}$  values are the mean and standard deviation from three independent measurements.

<sup>b</sup> The two single mutants show the same  $k_{cat}$  values within experimental error.

temperature (26 °C versus 80 °C), they agree reasonably well with those deduced from the thermal inactivation data. Since the kinetic stability of wild-type ssAnPRT is independent of concentration (Figure 4), it must be a pure dimer even at the lowest applied subunit concentration of 1  $\mu$ M the lowest concentration of subunit applied. It follows that its  $K_D$  value at 80 °C is smaller than 0.1  $\mu$ M. Since the kinetic stability of the double mutant I36E+M47D is not increased even at the highest applied subunit concentration of 27  $\mu$ M, its  $K_D$  value at 80 °C must be larger than 270  $\mu$ M.

Differential scanning calorimetry was used to further investigate the thermal stability of ssAnPRT and its mutants. At the applied subunit concentration of 12  $\mu$ M, wild-type ssAnPRT and I36E are predominantly dimeric, whereas M47D and I36E+M47D are mainly monomeric. The increased apparent melting temperatures of wild-type ssAnPRT (92 °C) and I36E (90 °C) compared to those of M47D (83 °C) and I36E+M47D (82 °C) (Table 3) support the finding that dimerisation stabilizes ssAnPRT against thermal denaturation.

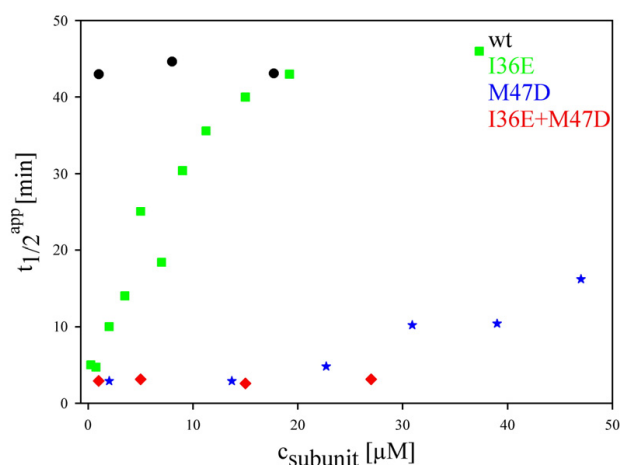
#### X-ray structure of the M47D variant

In order to elucidate the structural consequences of the introduced amino acid exchanges, we tried to crystallize the I36E, M47D and I36E+M47D mutants. However, suitable crystals (diffracting up to 2.85 Å resolution) were obtained only for the M47D

**Table 1.** Apparent and calculated molecular masses, and deduced oligomerisation states of wild-type ssAnPRT and its mutants

ssAnPRT variant	$M^{app}$ (ag) (kDa)	$M^{app}$ (au) (kDa)	$M^{calc}$ (kDa)	Deduced oligomerization state
Wild-type	64.5	72.2	77.7 (D)	Dimer
I36E	63.4	66.0	77.7 (D)	Monomer $\rightleftharpoons$ Dimer
M47D	61.7	60.1	77.7 (D)	Monomer $\rightleftharpoons$ Dimer
I36E+M47D	32.4	34.1	38.8 (M)	Monomer

$M^{app}$ , apparent molecular mass as deduced from analytical gel-filtration chromatography (ag) and sedimentation equilibrium runs in the analytical ultracentrifuge (au). Experimental conditions for analytical gel-filtration: 50 mM potassium phosphate (pH 7.5), 300 mM KCl, 25 °C; subunit concentration: 13.3  $\mu$ M. Experimental conditions for analytical ultracentrifugation: 100 mM potassium phosphate (pH 7.5), 26 °C; subunit concentration: 9.3  $\mu$ M.  $M^{calc}$ , molecular mass calculated from the amino acid sequence for the dimer (D) and the monomer (M).



**Figure 4.** Concentration-dependence of the apparent inactivation half-life ( $t_{1/2}^{app}$ ) of wild-type ssAnPRT and its mutants. The proteins were incubated at 80 °C in 50 mM Tris-HCl (pH 6.7). The time-dependent decay of the residual activities was measured at 37 °C, yielding the  $t_{1/2}^{app}$  values shown here. The experiments were performed at the given total subunit concentrations.

protein (Table 4). The two independent biological homodimers found in the asymmetric unit of this crystal form were structurally equivalent to each other and very similar to wild-type ssAnPRT, with an rms deviation of only 0.7 Å for 339 out of 345 structurally equivalent C $\alpha$  atoms per subunit. This result demonstrates that the amino acid replacement M47D does not lead to structural perturbations of the polypeptide chain, in accordance with the unchanged turnover number of the mutant (Table 2). The introduced symmetry-related carboxyl groups of Asp47 and Asp47', which have a distance of 3.6 Å, are located in the plane of the Met47 and Met47' side-chains buried within the hydrophobic environment of the subunit interface (Figure 2(c)). This finding suggests that the side-chains have elevated pK<sub>a</sub> values and might therefore be protonated at the pH 6.0 of the crystallization medium. Subunit dissociation will lead to proton release and enable favourable electrostatic interactions of the emerging negative charges with bulk solvent, thus stabilizing the monomer compared to the homodimer. The protonation of the Asp47 side-chain could also explain why it does not form a noticeable salt-bridge with the side-chain of Lys13', whose N $\epsilon$  atom is in its vicinity. Although such an interaction is geometrically possible, it does not appear to be

predominant according to crystallographic data, as anticipated in the design process.

The buried surface area per subunit is reduced to 840 Å<sup>2</sup> for the M47D interface compared to 939 Å<sup>2</sup> for the wild-type homodimer. The only perceptible deviations are two hydrophobic interactions of the Met47 side-chain with Leu10 and Ala44, which are not formed by Asp47. The crystallographic data

**Table 4.** X-ray data statistics and model parameters

Space group	P2	
Unit cell parameters		
a (Å)	91.645	
b (Å)	65.852	
c (Å)	115.702	
$\beta$ (deg.)	107.39	
Solvent content (% v/v)	45	
X-ray data		
X-ray source	X10SA (SLS)	
Wavelength (Å)	1.00	
Resolution (Å)	15.0–2.85	(2.9–2.85)
Unique reflections	30,238	(1543)
$R_{sym}$ (I)	0.11	(0.64)
Multiplicity	2.63	(2.66)
Completeness (%)	97.9	(98.1)
$I/\sigma$ (I)	8.58	(2.25)
Refinement		
Reflections in working set	29,240	
Reflections in test set	998	
No. protein atoms <sup>a</sup>	1356	
No. solvent molecules <sup>a</sup>	850	
R-factor (%)	24.92	
$R_{free}$ (%)	32.67	
rmsd from ideal		
Bond lengths (Å)	0.006	
Bond angles (deg.)	1.20	
Ramachandran plot		
Residues in core regions (%)	85.1	
Residues in disallowed regions	A78, K342	

<sup>a</sup> Four ssAnPRT copies.

**Table 3.** Apparent melting temperatures ( $T_m$ ) of wild-type ssAnPRT and its mutants as deduced from differential scanning calorimetry (DSC)

ssAnPRT variant	$T_m$ (°C)
Wild-type	92
I36E	90
M47D	83
I36E+M47D	82

Experimental conditions: 100 mM potassium phosphate (pH 7.5); subunit concentration: 12 μM; scan rate: 1 K/min.

validate the design principle of the M47D exchange and explain how it weakens the affinity between the subunits. It could be speculated that the structural consequences of the I36E exchange are similar in nature to those observed in the M47D protein, although its effect on the thermodynamic dissociation constant is less pronounced.

## Discussion

The simultaneous introduction of the I36E+M47D substitutions resulted in the dissociation of homodimeric ssAnPRT into monomers with unaltered catalytic proficiency. Since the active site of each subunit is located at a distance of about 24 Å from the subunit interface, it is then not unexpected that oligomerisation is dispensable for the enzymatic function of ssAnPRT. Along the same lines, crystallographic analysis showed that the active sites of the wild-type enzyme and the M47D mutant are superimposable within experimental error. Regardless, small-angle X-ray scattering data suggested that in ssAnPRT hinge motions are induced by the binding of the substrates anthranilate and PRPP, which are brought together during catalysis by rotational motions of the large  $\alpha/\beta$  domain *versus* the small  $\alpha$ -helical domain.<sup>20</sup> A similar hinge region and equivalent inter-domain motions induced by substrate binding have been reported for pyrimidine/thymidine nucleoside phosphorylases,<sup>24–26</sup> which are closely related to AnPRTs. It has been speculated that such hinge motions might not occur simultaneously in both subunits but that take place in an asymmetric fashion, suggesting a communication across subunits.<sup>20,26</sup> Our data show, however, that possible asymmetric motions in ssAnPRT would not have functional consequences and, thus, are unlikely to be derived from inter-subunit communication. Instead, if actually taking place, they might merely reflect steric restrictions within the system. In contrast to ssAnPRT, mutations at the subunit interface of other homodimeric enzymes such as triosephosphate isomerase,<sup>7</sup> dihydroorotate dehydrogenase,<sup>9</sup>  $\alpha$ -glucuronidase,<sup>10</sup> and glutathione transferase<sup>11</sup> resulted in the generation of monomers with drastically reduced catalytic activities. Other than in ssAnPRT, in these proteins one subunit stabilizes either directly or indirectly the active site of the neighbouring subunit, which couples enzymatic function to dimer formation.

Compared to wild-type ssAnPRT, the monomeric double mutant I36E+M47D shows a strongly reduced resistance to thermal inactivation (Figure 4). It was unclear *a priori* to what extent this destabilisation is due to the introduced amino acid substitutions *per se* and how much of it is caused by the resulting monomerisation. This problem could be solved by analysing the single mutants I36E and M47D, which are present in a monomer–dimer equilibrium and whose stability is dependent on protein concentration. At the lowest applied concentrations,

the apparent inactivation half-lives of both I36E and M47D are almost identical with the (concentration-independent) half-life of I36E+M47D, proving that the single mutant monomers are as labile as the double mutant monomers. Moreover, at the highest concentration applied, the apparent inactivation half-life of I36E is almost identical with the (concentration-independent) half-life of wild type ssAnPRT, proving that the mutant dimer is as stable as the wild-type dimer (Figure 4). These results prove that the amino acid substitutions do not influence the resistance to thermal inactivation significantly, and that the higher kinetic stability of wild-type ssAnPRT compared to I36E+M47D is due to the different oligomerisation states of the two proteins.

Our results show that the monomeric forms of the single and double mutants resemble the monomer of wild-type ssAnPRT, which appears to be equally active but less stable than the dimer. A detailed analysis of the inactivation kinetics allowed us to estimate the dissociation constants of the monomer–dimer equilibrium. The mutations induced an increase of the  $K_D$  value by at least three to four orders of magnitude, from less than 0.1  $\mu$ M in wild-type ssAnPRT to at least 270  $\mu$ M in the double mutant. Since the value for wild-type ssAnPRT is only an upper limit, and considering a  $K_D$  of approximately  $10^{12}$  M for the formation of other homo-dimers,<sup>8,27</sup> the weakening of the intersubunit interactions in ssAnPRT caused by the I36E+M47D exchanges is probably even more pronounced. A multiple alignment of 220 AnPRT sequences (L-INS-I strategy of MAFFT version 5.8<sup>28</sup>) showed that at the positions corresponding to Ile36 and Met47 in ssAnPRT, about 70% and 80% of all residues are hydrophobic. Whereas at position 36, about 10% of the residues are glutamate or aspartate, at position 47 only 2% of the aligned sequences contain a negatively charged residue. These findings suggest that Met47 is more important for dimer stability than Ile36, in accordance with the higher  $K_D$  value of M47D (about 20  $\mu$ M) compared to I36E (about 1  $\mu$ M).

The results of this work show similarities to a protein engineering study in which the dodecameric ( $4 \times 3$  subunits) ornithine carbamoyl transferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* (pfOTCase) was dissociated into catalytically active but significantly less stable trimers.<sup>29</sup> Moreover, the homodimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* (tmPRAI) was loosened by the shortening of loops that protrude reciprocally into the neighbouring subunit and the generation of electrostatic repulsion by replacing a hydrophobic phenylalanine residue by a negatively charged glutamate. The resulting monomer was catalytically as active as the native monomer but drastically less stable.<sup>8</sup> The comparatively high oligomerisation state of pfOTCase and tmPRAI are characteristic of hyperthermophiles, since the homologous enzymes from mesophiles form trimers and monomers,

respectively. In contrast, all hitherto characterized AnPRT homologues form dimers, independent of the growth temperature of their host organisms and their positions in the phylogenetic tree of life.<sup>18,21,30,31</sup> We conclude that evolution of AnPRT to a dimer conferred stability in the last common ancestor of all species, which was probably a thermophile or a hyperthermophile.<sup>32</sup> This oligomerisation state of AnPRT apparently has been retained during the evolution of the mesophiles, probably because it allowed the enzyme to increase catalytic activity at low temperatures without compromising stability significantly.

## Material and Methods

### Site-directed mutagenesis

The single mutants I36E and M47D were generated by overlap extension PCR<sup>33,34</sup> using the plasmid pQE40-ssAnPRT<sup>21</sup> as template. In order to produce the 5' megaprimer, the oligonucleotide CyRI<sup>35</sup> was used as the 5' primer, and the oligonucleotides 5'-GAA GTT CCA GAG GAA TTA GTA TCA GCA-3' (for construction of I36E) and 5'-GTA GCA TTA AGA GAT AAA GGT GAA AGT-3' (for construction of M47D) were used as 3' primers. In order to produce the 3' megaprimer, the oligonucleotides 5'-TGC TGA TAC TAA TTC CTC TGG AAC TTC-3' (for construction of I36E) and 5'-ACT TTC ACC TTTATC TCT TAATGC TAC-3' (for construction of M47D) were used as 5' primers, and the oligonucleotide CyPstI<sup>35</sup> was used as a 3' primer (new codons are underlined). The 5' and 3' megaprimers were purified by agarose gel electrophoresis, and mixed with CyRI and CyPstI in a third PCR, which yielded the full-length genes. The double mutant I36E+M47D was also generated by overlap extension PCR, using the template pQE40-ssAnPRT-I36E. Using BamHI and HindIII restriction sites, the mutated genes were cloned into pQE40. Gene expression from pQE40 results in the addition of an N-terminal His<sub>6</sub> tag to the produced protein. To confirm the introduced base substitutions and to exclude further inadvertent point mutations, all mutated genes were sequenced entirely.

### Heterologous expression and purification of ssAnPRT mutants

Wild-type ssAnPRT and its mutants were expressed heterologously at 37 °C in *Escherichia coli* strain W3110 trpEA2, containing the repressor plasmid pDM.<sup>35</sup> The resulting protein products were purified from the soluble fraction of the crude extract by heat-precipitation of the host proteins and metal chelate affinity chromatography. Details of gene expression and protein purification were similar to those in the literature.<sup>20</sup> Yields were 0.4–0.8 mg of protein per 1 g of wet cell mass. The proteins were dipped into liquid nitrogen and stored at –80 °C.

### Analytical methods

Protein concentrations were determined by measuring the absorbance at 280 nm, using molar extinction

coefficients that were calculated from the amino acid sequence.<sup>36</sup> Association states of the recombinant ssAnPRT proteins were determined by analytical gel-filtration chromatography and analytical ultracentrifugation. Analytical gel filtration chromatography was performed at 25 °C and a flow-rate of 0.5 ml/min on a calibrated Superdex 75 column (1 cm×30 cm, Amersham Pharmacia Biotech) that was equilibrated with 50 mM potassium phosphate (pH 7.5)), containing 300 mM KCl. Apparent molecular masses were calculated from the corresponding elution volumes, using a calibration curve that was obtained with standard proteins. Sedimentation equilibrium runs were performed at 26 °C in 100 mM potassium phosphate (pH 7.5) in a Beckman analytical ultracentrifuge (Spinco Model E), monitoring the absorbance at 277 nm. The runs were performed at 12,000 rpm (wild-type ssAnPRT) and 16,000 rpm (mutants), and analyzed using the meniscus-depletion method.<sup>37,38</sup> Molecular masses were calculated assuming a partial specific volume of 0.75 ml/g.

### Steady-state enzyme kinetics

The ssAnPRT reaction was followed at 37 °C by a fluorimetric assay (CARY Eclipse fluorescence spectrophotometer, Varian)<sup>21</sup> performed in 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), in the presence of 0.05 mM MgCl<sub>2</sub>. The Michaelis constants  $K_M^{AA}$  and  $K_M^{PRPP}$  were determined by analyzing saturation curves that were deduced from initial velocity measurements recorded in the presence of an excess ( $10 \times K_M$ ) of the second substrate. The turnover number  $k_{cat}$  was obtained by dividing the maximum catalytic rate by the concentration of active sites.

### Irreversible thermal inactivation

The kinetics of irreversible heat inactivation were measured as described.<sup>21</sup> The proteins were incubated at 80 °C in 50 mM Tris-HCl (pH 6.7), assuming a  $\Delta pK_a/\text{deg. C}$  for Tris buffer of –0.028.<sup>39</sup> Aliquots were taken at different times, chilled on ice, and centrifuged (Eppendorf 5415R, 13,000 rpm, 3 min, 4 °C). The residual maximum velocity of ssAnPRT in the supernatant was measured at 37 °C in 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.05 mM MgCl<sub>2</sub>.

The dependence of the apparent  $t_{1/2}$  values on the applied subunit concentrations of the single mutants I36E and M47D (Figure 4) prompted us to determine their  $K_D$  values for the monomer–dimer equilibrium (model 2) as follows. Since monomeric (M) and dimeric (D) ssAnPRT show practically identical turnover numbers (Table 2), the total concentration of active subunits  $c_{tot}$  is given by:

$$c_{tot} = c_M + 2 c_D \quad (1)$$

Rearrangement to  $c_D = 0.5 (c_{tot} - c_M)$  allows one to reformulate the equilibrium constant as:

$$K_D = c_M^2 / c_D = 2 c_M^2 / (c_{tot} - c_M) \quad (2)$$

The solution for the quadratic equation (2) is:

$$c_M = -0.25 K_D + (0.0625 K_D^2 + 0.5 K_D c_{tot})^{1/2} \quad (3)$$

The time-dependent loss of active subunits can be described by:

$$dc_{tot}/dt = -k_u c_M \quad (4)$$

Replacing  $c_M$  in equation (4) by the right-hand side of equation (3) yields:

$$dc_{\text{tot}}/dt = -k_u(-0.25 K_D + (0.0625 K_D^2 + 0.5 K_D c_{\text{tot}})^{1/2}) \quad (5)$$

The differential equation (5) cannot be integrated, but was solved numerically. Using the non-linear least-squares fitting option of the program Maple 10.0‡  $K_D$  values for the monomer dimer-equilibrium of I36E and M47D were fit from the measured inactivation kinetics at each applied value of  $c_{\text{tot}}$ , using the  $k_u$  value determined at the lowest concentrations of protein where only the monomers are populated.

#### Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC experiments were performed with a CSC 5100 Nano differential scanning calorimeter at a subunit concentration of 12  $\mu\text{M}$  in 100 mM potassium phosphate (pH 7.5) using a scan rate of 1K/min. The DSC data were analyzed by applying the programme CpCalc (version 2.1: Calorimetry Sciences Corporation, 1995) to determine the apparent melting temperature ( $T_m$ ) at which half of the protein is unfolded. The irreversibility of thermal denaturation precluded thermodynamic analysis of the data.

#### Crystal structure elucidation

The ssAnPRT variant M47D was crystallized using the hanging-drop method at room temperature from 50 mM MES (pH 6.0), 18% (w/v) PEG 1500, 5% (v/v) glycerol. The protein was dissolved at a final concentration of 5 mg/ml in 10 mM Hepes (pH 7.5), containing 25 mM NaCl. Crystallization drops consisted of equal volumes (1  $\mu\text{l}$ ) of protein and reservoir solutions. Crystals grew within 72 h to a maximal size of 200  $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ . Before irradiation, crystals in their mother liquor were flash-frozen in liquid nitrogen.

Diffraction data were collected at beamline X10SA, SLS (Villingen) and processed using XDS/XSCALE.<sup>40</sup> Data statistics are given in Table 4. The crystal form used in this study was equivalent to that described for wild-type ssAnPRT.<sup>16</sup> Briefly, crystals belonged to space group  $P2_1$  and contained four ssAnPRT molecular copies per asymmetric unit, exhibiting an A2 pseudo-symmetry resulting from a screw non-crystallographic symmetry (NCS) axis parallel to the crystallographic 2-fold axis. To account for potential rigid-body motions, phasing was performed by molecular replacement in PHASER<sup>41</sup> using wild-type ssAnPRT (PDB entry 1OI7) as the search model. Model building and validation was done with O<sup>42</sup> and COOT,<sup>43</sup> while refinement used CNS<sup>44</sup> (domain definition as described<sup>16</sup>). NCS restraints across N-terminal and C-terminal domains were applied throughout. Solvent molecules were located using ARP/wARP<sup>45</sup> as well as the "water-pick" routine in CNS,<sup>44</sup> and validated visually in COOT.<sup>43</sup>

#### Acknowledgements

We thank Dr Helmut Durchschlag for running the analytical ultracentrifuge, Korbinian Stöckl and Dr

Sandra Schlee for their help with the derivation of equation (5), and Matthias Zwick for performing a multiple sequence alignment of AnPRTs. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft within the Schwerpunktprogramm 1170 (STE 891/5-1 and 5-2).

#### References

1. Miles, E. W., Rhee, S. & Davies, D. R. (1999). The molecular basis of substrate channeling. *J. Biol. Chem.* **274**, 12193–12196.
2. Rauschel, F. M., Thoden, J. B. & Holden, H. M. (2003). Enzymes with molecular tunnels. *Acc. Chem. Res.* **36**, 539–548.
3. Jaenicke, R. & Böhm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 738–748.
4. Sterner, R. & Liebl, W. (2001). Thermophilic adaptation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 39–106.
5. Vieille, C. & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 1–43.
6. Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J., Siebers, B., Hensel, R. & Taylor, G. L. (2001). Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **306**, 745–757.
7. Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R. & Wierenga, R. K. (1997). A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry*, **36**, 9655–9662.
8. Thoma, R., Hennig, M., Sterner, R. & Kirschner, K. (2000). Structure and function of mutationally generated monomers of dimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from *Thermotoga maritima*. *Structure Fold. Des.* **8**, 265–276.
9. Ottosen, M. B., Bjornberg, O., Norager, S., Larsen, S., Palfey, B. A. & Jensen, K. F. (2002). The dimeric dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis* dissociates reversibly into inactive monomers. *Protein Sci.* **11**, 2575–2583.
10. Shallom, D., Golan, G., Shoham, G. & Shoham, Y. (2004). Effect of dimer dissociation on activity and thermostability of the  $\alpha$ -glucuronidase from *Geobacillus stearothermophilus*: dissecting the different oligomeric forms of family 67 glycoside hydrolases. *J. Bacteriol.* **186**, 6928–6937.
11. Thompson, L. C., Walters, J., Burke, J., Parsons, J. F., Armstrong, R. N. & Dirr, H. W. (2006). Double mutation at the subunit interface of glutathione transferase rGSTM1-1 results in a stable, folded monomer. *Biochemistry*, **45**, 2267–2273.
12. Sinha, S. C. & Smith, J. L. (2001). The PRT protein family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 733–739.
13. Sharma, V., Grubmeyer, C. & Sacchettini, J. C. (1998). Crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential TB drug target. *Structure*, **6**, 1587–1599.
14. Eads, J. C., Ozturk, D., Wexler, T. B., Grubmeyer, C. & Sacchettini, J. C. (1997). A new function for a common fold: the crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase. *Structure*, **5**, 47–58.
15. Shin, D. H., Oganessian, N., Jancarik, J., Yokota, H., Kim, R. & Kim, S. H. (2005). Crystal structure of a

‡ [www.maplesoft.com](http://www.maplesoft.com)



- nicotinate phosphoribosyltransferase from *Thermoplasma acidophilum*. *J. Biol. Chem.* **280**, 18326–18335.
16. Mayans, O., Ivens, A., Nissen, L. J., Kirschner, K. & Wilmanns, M. (2002). Structural analysis of two enzymes catalysing reverse metabolic reactions implies common ancestry. *EMBO J.* **21**, 3245–3254.
  17. Kim, C., Xuong, N. H., Edwards, S., Yee, M. C., Spraggon, G. & Mills, S. E. (2002). The crystal structure of anthranilate phosphoribosyltransferase from the enterobacterium *Pectobacterium carotovorum*. *FEBS Letters*, **523**, 239–246.
  18. Lee, C. E., Goodfellow, C., Javid-Majd, F., Baker, E. N. & Shaun Lott, J. (2006). The crystal structure of TrpD, a metabolic enzyme essential for lung colonization by *Mycobacterium tuberculosis*, in complex with its substrate phosphoribosylpyrophosphate. *J. Mol. Biol.* **355**, 784–797.
  19. Pugmire, M. J. & Ealick, S. E. (2002). Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochem. J.* **361**, 1–25.
  20. Marino, M., Deuss, M., Svergun, D. I., Konarev, P. V., Sterner, R. & Mayans, O. (2006). Structural and mutational analysis of substrate complexation by anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus*. *J. Biol. Chem.* **281**, 21410–21421.
  21. Ivens, A., Mayans, O., Szadkowski, H., Wilmanns, M. & Kirschner, K. (2001). Purification, characterization and crystallization of thermostable anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2246–2252.
  22. Laskowski, R. A., Chistyakov, V. V. & Thornton, J. M. (2005). PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. *Nucl. Acids Res.* **33**, D266–D268.
  23. Trevino, S. R., Scholtz, J. M. & Pace, C. N. (2007). Amino acid contribution to protein solubility: Asp, Glu, and Ser contribute more favorably than the other hydrophilic amino acids in RNase Sa. *J. Mol. Biol.* **366**, 449–460.
  24. Norman, R. A., Barry, S. T., Bate, M., Breed, J., Colls, J. G., Ernull, R. J. *et al.* (2004). Crystal structure of human thymidine phosphorylase in complex with a small molecule inhibitor. *Structure*, **12**, 75–84.
  25. Pugmire, M. J., Cook, W. J., Jasanoff, A., Walter, M. R. & Ealick, S. E. (1998). Structural and theoretical studies suggest domain movement produces an active conformation of thymidine phosphorylase. *J. Mol. Biol.* **281**, 285–299.
  26. Pugmire, M. J. & Ealick, S. E. (1998). The crystal structure of pyrimidine nucleoside phosphorylase in a closed conformation. *Structure*, **6**, 1467–1479.
  27. Rietveld, A. W. & Ferreira, S. T. (1998). Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry*, **37**, 933–937.
  28. Katoh, K., Kuma, K., Toh, H. & Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucl. Acids Res.* **33**, 511–518.
  29. Clantin, B., Tricot, C., Lonhienne, T., Stalon, V. & Villeret, V. (2001). Probing the role of oligomerization in the high thermal stability of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyltransferase by site-specific mutants. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3937–3942.
  30. Hommel, U., Lustig, A. & Kirschner, K. (1989). Purification and characterization of yeast anthranilate phosphoribosyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **180**, 33–40.
  31. Largen, M. & Mills, S. E. (1977). Immunochemical analysis of the anthranilate synthase-anthranilate 5-phosphoribosylpyrophosphate phosphoribosyltransferase aggregate of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **16**, 2526–2532.
  32. Di Giulio, M. (2003). The universal ancestor was a thermophile or a hyperthermophile: tests and further evidence. *J. Theor. Biol.* **221**, 425–436.
  33. 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.
  34. Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, **77**, 61–68.
  35. Jürgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M. & Sterner, R. (2000). Directed evolution of a ( $\beta\alpha$ )<sub>5</sub>-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 9925–9930.
  36. 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.
  37. Wales, M., Adler, F. T. & Van Holde, K. E. (1951). Sedimentation equilibria of polydisperse non-ideal solutes. VI. Number-average molecular weight and molecular-weight distribution functions. *J. Phys. Colloid Chem.* **55**, 145–161.
  38. Yphantis, D. A. (1964). Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions. *Biochemistry*, **3**, 297–317.
  39. Stoll, V. S. & Blanchard, J. S. (1990). Buffers: principles and practice. *Methods Enzymol.* **182**, 24–38.
  40. Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallog.* **26**, 795–800.
  41. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2005). Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallog. sect. D*, **61**, 458–464.
  42. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallog. sect. A*, **47**, 110–119.
  43. Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallog. sect. D*, **60**, 2126–2132.
  44. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W. *et al.* (1998). Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallog. sect. D*, **54**, 905–921.
  45. Perrakis, A., Morris, R. & Lamzin, V. S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 458–463.

Activation of Anthranilate Phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus* by Removal of Magnesium Inhibition and Acceleration of Product Release<sup>†,‡</sup>Sandra Schlee,<sup>§</sup> Miriam Deuss,<sup>§,||</sup> Marc Bruning,<sup>†</sup> Andreas Ivens,<sup>||</sup> Thomas Schwab,<sup>§</sup> Nadja Hellmann,<sup>#</sup> Olga Mayans,<sup>^</sup> and Reinhard Sterner<sup>\*,§,||</sup><sup>§</sup>Institute of Biophysics and Physical Biochemistry, University of Regensburg, Universitätsstrasse 31, D-93053 Regensburg, Germany,<sup>||</sup>Institute of Biochemistry, University of Cologne, Otto-Fischer-Strasse 12-14, D-50674 Cologne, Germany, <sup>†</sup>Division of Structural Biology, Biozentrum, University of Basel, Klingelbergstrasse 70, CH-4056 Basel, Switzerland, <sup>#</sup>Institute of Molecular Biophysics, University of Mainz, Jakob-Welder-Weg 26, D-55128 Mainz, Germany, and <sup>^</sup>School of Biological Sciences, University of Liverpool, Crown Street, Liverpool L69 7ZB, U.K.

Received December 22, 2008; Revised Manuscript Received April 18, 2009

**ABSTRACT:** Anthranilate phosphoribosyltransferase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* (ssAnPRT) is encoded by the *sstrpD* gene and catalyzes the reaction of anthranilate (AA) with a complex of Mg<sup>2+</sup> and 5'-phosphoribosyl- $\alpha$ -1-pyrophosphate (Mg-PRPP) to N-(5'-phosphoribosyl)-anthranilate (PRA) and pyrophosphate (PP<sub>i</sub>) within tryptophan biosynthesis. The ssAnPRT enzyme is highly thermostable (half-life at 85 °C = 35 min) but only marginally active at ambient temperatures (turnover number at 37 °C = 0.33 s<sup>-1</sup>). To understand the reason for the poor catalytic proficiency of ssAnPRT, we have isolated from an *sstrpD* library the activated ssAnPRT-D83G + F149S double mutant by metabolic complementation of an auxotrophic *Escherichia coli* strain. Whereas the activity of purified wild-type ssAnPRT is strongly reduced in the presence of high concentrations of Mg<sup>2+</sup> ions, this inhibition is no longer observed in the double mutant and the ssAnPRT-D83G single mutant. The comparison of the crystal structures of activated and wild-type ssAnPRT shows that the D83G mutation alters the binding mode of the substrate Mg-PRPP. Analysis of PRPP and Mg<sup>2+</sup>-dependent enzymatic activity indicates that this leads to a decreased affinity for a second Mg<sup>2+</sup> ion and thus reduces the concentration of enzymes with the inhibitory Mg<sub>2</sub>-PRPP complex bound to the active site. Moreover, the turnover number of the double mutant ssAnPRT-D83G + F149S is elevated 40-fold compared to the wild-type enzyme, which can be attributed to an accelerated release of the product PRA. This effect appears to be mainly caused by an increased conformational flexibility induced by the F149S mutation, a hypothesis which is supported by the reduced thermal stability of the ssAnPRT-F149S single mutant.

Naturally occurring enzymes must be significantly stable in order to maintain their native conformations but also sufficiently flexible to fulfill their manifold catalytic activities. Unraveling the relationship between structure, function, and stability of enzymes is relevant, because it will eventually allow us to design enzymes with a desired combination of stability and activity (1). Important insights into this problem were obtained by comparative investigations of extremely stable enzymes from hyperthermophiles and their labile homologues from mesophiles (2). Enzymes from hyperthermophiles, which optimally grow close to the boiling point of water, often are barely active at room temperature but are as active as their mesophilic counterparts at the corresponding physiological temperatures. It has been postulated that the low activity of most thermostable enzymes at mesophilic

temperatures is due to a high structural rigidity, which is relieved at the elevated temperatures at which hyperthermophilic enzymes work *in vivo* [concept of "corresponding states" (3)]. The rarely found combination of high thermostability and high catalytic activity at low temperature in native enzymes is probably due to a lack of evolutionary constraints (4). Enzymes in mesophilic organisms are under no selective pressure to be stable at elevated temperature. Similarly, the activities of hyperthermophilic enzymes at low temperatures normally need not to be high. Otherwise, hyperthermophilic enzymes would be much more efficient catalysts than their mesophilic homologues at the corresponding optimum growth temperatures, due to the acceleration of chemical reactions with increasing temperature. An example are two ( $\beta$ )<sub>5</sub>-barrel enzymes from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*, namely, phosphoribosylanthranilate isomerase and N'-[(5'-phosphoribosyl)formimino]-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide isomerase, which need to be extremely active at their physiological temperatures in order to outrun the spontaneous degradation of their thermolabile substrates (5, 6).

One approach to unravel the mutual interdependence of catalytic activity and conformational stability is the generation

<sup>†</sup>This work was supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SPP1170: STE 891/5-1, 5-2, 5-3) and a fellowship of the Bayerische Eliteförderung to S.S.

<sup>‡</sup>Structure factor amplitudes and model coordinates of ssAnPRT-D83G + F149S have been deposited at the Protein Data Bank with accession code 3GBR.

\*Corresponding author. Phone: +49 941-943 3015. Fax: +49 941-943 2813. E-mail: Reinhard.Sterner@biologie.uni-regensburg.de.

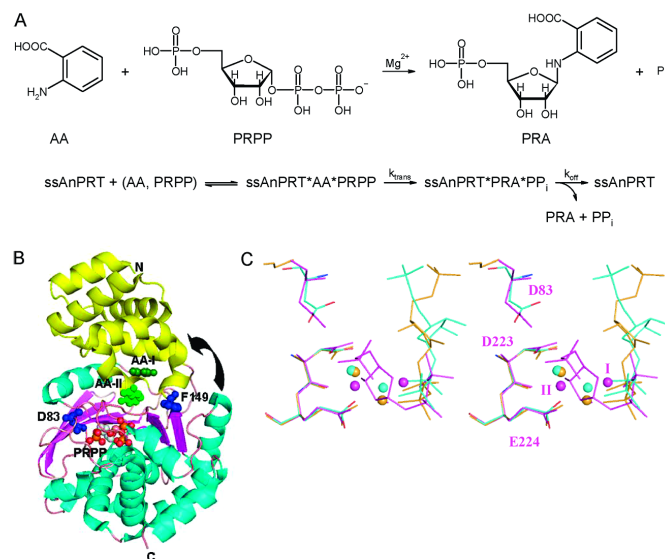


FIGURE 1: Catalyzed reaction and crystal structures of anthranilate phosphoribosyltransferases. (A) Upper panel: Reaction catalyzed by ssAnPRT. Abbreviations: AA, anthranilate; PRPP, 5'-phosphoribosyl-α-1-pyrophosphate; PRA, N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate; PP<sub>i</sub>, pyrophosphate. Lower panel: Minimal catalytic mechanism of the reaction. (B) Ribbon diagram of the X-ray structure of wild-type ssAnPRT with bound substrates. Coordinates were obtained from PDB entry 1ZYK. For clarity, only one protomer of the homodimer is shown. The N- and C-termini of the polypeptide chain are labeled. Protein domains are color-coded where the small N-terminal α-domain is yellow and the large C-terminal α/β-domain is purple and cyan. The two bound anthranilate molecules (AA-I and AA-II) are in green; bound PRPP is in gray (ribose moiety) and orange/red (phosphate moieties). Residues aspartate 83 and phenylalanine 149, which are substituted in the activated variant by glycine and serine, are displayed in blue. A putative domain motion upon substrate binding and product release is indicated by an arrow. (C) Stereoplots of PRPP and metal coordination by ssAnPRT-wt (magenta), ssAnPRT-D83G + F149S (golden), and mtAnPRT (cyan). The structures have been superimposed on the main chain atoms of the conserved acidic motif (D223-E224 in ssAnPRT). Residue numbers and location of the two bound metals (I, II) are indicated for ssAnPRT-wt. Stereo is in focused mode.

of enzymes with altered properties, either by rational protein design or by directed evolution. Such experiments have shown that enzyme mutants with improved catalytic activities compared to the wild-type enzyme often display reduced conformational stabilities (7–12) but that an increase in stability does not necessarily lead to a decrease in enzymatic activity (13–18). In most cases, however, the structural basis of simultaneous changes in activity, stability, and flexibility has remained unclear.

The members of the family of phosphoribosyltransferases (PRTases) are involved in the metabolism of nucleotides and amino acids. PRTases catalyze the Mg<sup>2+</sup>-dependent displacement of pyrophosphate (PP<sub>i</sub>)<sup>1</sup> from 5'-phosphoribosyl-α-1-pyrophosphate (PRPP) by a nitrogen-containing nucleophile, producing an α-substituted ribose 5-phosphate (19). On the basis of their tertiary structures, PRTases have been divided into different classes. Known members of class I are the orotate and uracil PRTases (20–22), as well as the purine PRTases, which transfer ribose 5-phosphate onto adenine, guanine, hypoxanthine, or xanthine (23). Representatives of class II are the quinolate and nicotinic acid PRTases (24, 25).

Anthranilate PRTase (AnPRT) catalyzes the third step within the biosynthesis of tryptophan, which is the reaction of anthranilate (AA) with Mg·PRPP, yielding phosphoribosyl anthranilate (PRA) and PP<sub>i</sub> (Figure 1A). The X-ray structures

of the homodimeric AnPRT enzymes from *Sulfolobus solfataricus* (ssAnPRT) (26, 27), *Pectobacterium carotovorum* (28), *Mycobacterium tuberculosis* (29), *Thermus thermophilus* (PDB entry 1V8G), and *Nostoc* sp. (PDB entry 1VQU) have been solved at high resolution. Their analysis revealed a novel PRTase fold, which is different from the folds of both class I and class II PRTases but similar to that of nucleoside phosphorylases. The AnPRT protomer consists of two domains, a small N-terminal α-helical domain and a large C-terminal α/β-domain, which are connected by a hinge region (Figure 1B). The two substrates AA and Mg·PRPP bind into two different domains within each protomer and are brought together during catalysis by rotational domain motions (26). Loosening of the dimer by exchanging two hydrophobic residues at the interface with negatively charged ones yielded a monomeric ssAnPRT mutant with unaltered enzymatic activity but reduced thermal stability (30).

The wild-type ssAnPRT enzyme is extremely thermostable with a half-life at 85 °C of 35 min (31) and catalytically proficient at 60 °C with a turnover number of 4.2 s<sup>-1</sup> (26) but only marginally active at 37 °C with a turnover number of 0.33 s<sup>-1</sup>. The aim of our study was to generate ssAnPRT mutants with an increased activity at ambient temperature. We then wanted to elucidate the mechanism of activation and to analyze the consequences for thermal stability. We first generated an *ssAnPRT*-D83G + F149S double mutant by *in vivo* complementation of an auxotrophic *Escherichia coli* strain at 37 °C. Subsequent steady-state and transient enzyme kinetic measurements, X-ray structure analysis, and thermal unfolding studies suggest that the

<sup>1</sup>Abbreviations: AA, anthranilate; AnPRT, anthranilate phosphoribosyltransferase; PP<sub>i</sub>, pyrophosphate; PRPP, 5'-phosphoribosyl-α-1-pyrophosphate; mtAnPRT, AnPRT from *Mycobacterium tuberculosis*; ssAnPRT, AnPRT from *Sulfolobus solfataricus*; *ssAnPRT*-D, gene encoding ssAnPRT; wt, wild type.



## Article

activating effect of the mutations is based on different mechanisms. The D83G exchange relieves the strong inhibition of wild-type ssAnPRT by the  $Mg_2$ -PRPP complex that forms on the enzyme at high concentrations of  $Mg^{2+}$ , whereas the destabilizing F149S exchange appears to facilitate product release by increasing the conformational flexibility of the enzyme.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Generation of a Plasmid Library of *ssrtpD* Genes by DNA Shuffling (32).** The *ssrtpD* gene was amplified by PCR with Taq DNA polymerase, using pQE40-*ssrtpD* plasmid as the template (31), and the oligonucleotides CyRI and CyPst (33) as 5'- and 3'-primers, respectively. The following amplification conditions were applied: step 1, 95 °C, 1 min; step 2, 95 °C, 30 s; step 3, 45 °C, 30 s; step 4, 72 °C, 1 min; step 5, 72 °C, 10 min; steps 2–4 were repeated 40 times. The amplified DNA was digested with 2.1 units of DNase I at 20 °C for 17 min, which yielded fragments in the size range of 50–200 bp. Without further purification, these fragments were reassembled in a PCR without added primers, again using Taq DNA polymerase. The following conditions were applied: step 1, 95 °C, 1 min; step 2, 95 °C, 30 s; step 3, 40 °C, 30 s; step 4, 72 °C, 1 min; step 5, 72 °C, 10 min; steps 2–4 were repeated 60 times. A final PCR was performed with Taq polymerase, using the reassembled fragments as template and the oligonucleotides 5'-TTAGGATCCCTGGTTCGCGTGGCAGCATGAACATTAACGAAATCTGAAAAAATC-3' (*Bam*HI restriction site underlined; thrombin/trypsin cleavage site and ATG start codon in italics) and 5'-CCACAAAGCTTAGTTTAACCACTACTTTTCA-3' (*Hind*III restriction site underlined) as 5'- and 3'-primers, respectively. The following amplification conditions were used: step 1, 95 °C, 1 min; step 2, 95 °C, 30 s; step 3, 60 °C, 30 s; step 4, 72 °C, 1 min; step 5, 72 °C, 10 min; steps 2–4 were repeated 35 times. The amplified fragments containing the full-length *ssrtpD* genes were purified, digested with *Bam*HI and *Hind*III, and ligated into the pQE40 vector. Electro-competent DH5 $\alpha$  cells were transformed with the ligation mixture, plated on two oversized metal LB agar plates (32  $\times$  38 cm) containing ampicillin, and incubated overnight at 37 °C. The grown cells were harvested from the plates, and the pool of pQE40-*ssrtpD* plasmids was isolated. The *ssrtpD* gene library contained about  $10^6$  independent clones, as estimated from the number of colonies that appeared on an LB agar plate on which a small volume of highly diluted transformants was streaked.

**Selection of ssAnPRT Mutants with Improved Catalytic Activity.** Selection for ssAnPRT mutants with increased catalytic activity was performed with the help of the *E. coli* strain JMB9 ( $r^- m^+ leu^- b^- \Delta trp$  LD102) (34). This strain is termed  $\Delta trp$ EGD here, because it lacks the first three genes of the tryptophan biosynthetic pathway, which code for the anthranilate synthase (TrpEG complex) and the anthranilate phosphoribosyltransferase (TrpD = AnPRT). For growth on medium without tryptophan,  $\Delta trp$ EGD requires supplementation with anthranilate and transformation with a functional *trpD* gene. Electrocompetent  $\Delta trp$ EGD cells were transformed with 3  $\mu$ g of the pQE40-*ssrtpD* plasmid gene library, incubated in LB medium for 1 h at 37 °C, and washed three times with 1% NaCl. The cells were plated on Vogel–Bonner (VB) medium (35) containing 150  $\mu$ g/mL ampicillin, 10  $\mu$ g/mL anthranilate, 0.5% casamino acids, 0.2% glucose, 10  $\mu$ M  $FeCl_3$ , and 2  $\mu$ g/mL thiamin and incubated at 37 °C until visible colonies appeared.

**Site-Directed Mutagenesis.** Point mutations were introduced into the *ssrtpD* gene by overlap extension PCR (36, 37)

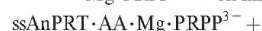
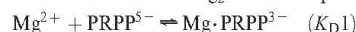
Biochemistry, Vol. 48, No. 23, 2009 5201

using the plasmid pQE40-*ssrtpD* (31) as template. For the generation of megaprimers by PCR reactions, the oligonucleotides CyRI (33) and 5'-ACAGGTGGCGCGGATTAGGG-3' (for construction of *ssrtpD*-D83G) or 5'-TTCGTTTTCTCTCTGCACAATACTAT-3' (for construction of *ssrtpD*-F149S) were used as 5'-primers, and the oligonucleotides CyPstI (33) and 5'-CCCTAATCCGCGCCACCTGT-3' (for construction of *ssrtpD*-D83G) or 5'-ATAGTATTGTGCAGAGAGGAAAACGAA-3' (for construction of *ssrtpD*-F149S) were used as 3'-primers (new codons are underlined). The megaprimers were purified and used in a third PCR reaction, together with CyRI and CyPstI. The resulting full-length products were digested with *Bam*HI and *Hind*III and ligated into pQE40.

**Heterologous Expression of *ssrtpD* Genes and Purification of Recombinant ssAnPRT Proteins.** Wild-type ssAnPRT protein and its mutants were expressed heterologously at 37 °C in *E. coli* strain W3110 *trp*EA2, containing the helper plasmid pDM,1 (33). The resulting recombinant protein products were purified from the soluble fraction of the crude extract by heat precipitation of the host proteins and metal chelate affinity chromatography. Details of gene expression and protein purification were similar to our previous studies (26). The purity of the recombinant proteins as judged from SDS–PAGE was > 95%, and the yields were 0.4–0.8 mg of protein/1 g of wet cell mass. The proteins were dropped into liquid nitrogen and stored at –80 °C. Enzyme concentrations were determined by measuring the absorbance at 280 nm, using a molar extinction coefficient for the monomer of  $11920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  as calculated from the amino acid sequence (38).

**Steady-State Enzyme Kinetics.** The ssAnPRT reaction was followed at 37 °C by a fluorometric assay performed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, and the indicated concentration of  $MgCl_2$  (31), using a CARY Eclipse fluorescence spectrophotometer (Varian). In order to prevent product inhibition, a molar excess of PRA isomerase (TrpF) and indole-3-glycerol phosphate synthase (TrpC) from *T. maritima* were added. The Michaelis constants ( $K_M^{AA}$  and  $K_M^{PRPP}$ ) were determined by fitting a hyperbolic equation (program SigmaPlot) to the saturation curves that were constructed on the basis of initial velocity measurements recorded in the presence of an excess ( $10K_M$ ) of the second substrate. The turnover number ( $k_{cat}$ ) was obtained by dividing the fitted maximum catalytic rate ( $V_{max}$ ) by the concentration of active sites ( $[E_0]$ ).

**Analysis of the PRPP and  $Mg^{2+}$  Dependence of Initial Turnover Rates.** Initial turnover rates of ssAnPRT were recorded for different concentrations of  $MgCl_2$  and PRPP in the presence of saturating concentrations of AA. The following ligand binding model was fitted to the experimental data sets: it comprises the equilibrium equations for the formation of the substrate  $Mg$ -PRPP in solution ( $K_{D1}$ ) and binding of  $Mg$ -PRPP to ssAnPRT-AA ( $K_{D2}$ ). (Since the order of substrate binding is not known, we cannot distinguish whether  $Mg$ -PRPP actually binds to the preformed ssAnPRT-AA complex or rather to ssAnPRT, followed by AA binding. However, this is irrelevant for our analysis.) Binding of free  $Mg^{2+}$  to ssAnPRT-AA- $Mg$ -PRPP yields the ssAnPRT-AA- $Mg_2$ -PRPP complex ( $K_{D3}$ ):



For fitting the model to experimental data sets the program DynaFit (BioKin Ltd.) (39) was applied, which computes the composition of complex mixtures at equilibrium by simultaneously solving the mass balance equation for the component species using the multidimensional Newton–Raphson method.  $K_D1$ , the dissociation constant for the formation of Mg-PRPP in solution, was fixed in the simulation to 0.59 mM (40), whereas the dissociation constants  $K_D2$  and  $K_D3$  and the response coefficient associated with ssAnPRT-AA-Mg-PRPP were optimized in the fit (Supporting Information Table S2). Our presumption is that the concentration of the ssAnPRT-AA-Mg-PRPP complex is directly proportional to the experimentally determined initial turnover rates, whereas the ssAnPRT-AA-Mg<sub>2</sub>-PRPP complex is unproductive. The analysis was conducted assuming that the PRPP stock solution contains traces of Mg-PRPP, the exact value (0.9%) also being optimized in the fitting procedure. Both for ssAnPRT-wt and ssAnPRT-D83G + F149S, two data sets (1, variable amount of PRPP at constant concentration of MgCl<sub>2</sub>; 2, variable amount of MgCl<sub>2</sub> at constant concentration of PRPP) were analyzed independently, and therefore two sets of estimated parameters were obtained. They are shown in Supporting Information Table S2, together with their 99% confidence intervals.

**Transient Kinetics.** The experiments were performed using a SX20 stopped-flow reaction analyzer (Applied Photophysics) thermostated at 37 °C. All given concentrations refer to final concentrations in the observation cell. Progress curves were determined in 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, by monitoring changes of fluorescence (excitation wavelength 313 nm; emission cutoff filter 395 nm), and the results of at least five mixing experiments were averaged. Each set of presented data is representative of at least two independent series of measurements performed with different protein batches. An exponential equation [ $y = a \exp(-k_{\text{obs}}t) + \text{offset}$ , program SigmaPlot] was fitted to the data. The fitted  $k_{\text{obs}}$  values were replotted as a function of the ssAnPRT concentration. The maximum rate, which corresponds to  $k_{\text{trans}}$  in Figure 1A, was estimated by fitting the following equation to these data:

$$k_{\text{obs}} = \text{ssAnPRT} \times k_{\text{trans}} / (\text{ssAnPRT} + K_s)$$

whereby  $K_s$  is the apparent binding constant for anthranilate to ssAnPRT.

**Thermal Denaturation.** Thermal denaturation was monitored by circular dichroism in a 0.1 cm cuvette, following the change in ellipticity at 220 nm in a JASCO J-815 CD spectrometer. The enzyme at a concentration of 10 μM in 10 mM potassium phosphate, pH 7.5, was unfolded by raising the temperature in 0.1 °C increments at a ramp rate of 1 °C/min using a Peltier effect temperature controller. Unfolding was irreversible, due to protein aggregation and precipitation. Measured ellipticity was normalized, and the midpoint temperature of the unfolding transition ( $T_m$ ) was determined. Kinetics of irreversible heat inactivation were measured similar to our previous studies (30). Shortly, the proteins were incubated at 80 °C in 50 mM Tris-HCl, pH 6.5, assuming a  $\Delta pK_a/^\circ\text{C}$  for Tris buffer of −0.028 (41). Aliquots were taken at different times, chilled on ice, and centrifuged. The residual enzymatic activity of ssAnPRT in the supernatant was measured at 37 °C in 50 mM Tris-HCl, pH 7.7.

**Crystal Structure Elucidation.** Crystals were obtained by the hanging drop, vapor diffusion method in 24-well VDX plates (Hampton Research) at 20 °C. Drops consisted of 1 μL:1 μL

mixtures of protein and reservoir solutions, where the reservoir contained 18% PEG 1500 (w/v), 10% glycerol (v/v), and 50 mM MES, pH 6.0, and the protein solution consisted of ssAnPRT-D83G + F149S concentrated to 5 mg/mL in 10 mM HEPES, pH 8.0. Crystals grew as thin plates within 3 days. For substrate complexation in the crystalline state, single crystals of the apoenzyme were immersed in mother liquor supplemented with 2.5 mM PRPP and 1.25 mM MnCl<sub>2</sub> for 60 min. The long soaking times were required to allow for lattice reannealing since crystals underwent visible deterioration upon initial contact with the ligands. The crystals were then briefly transferred to a cryosolution composed of soaking medium supplemented with 20% glycerol (v/v) and rapidly flash frozen in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected from a single crystal at 100 K on beamline X06SA, SLS, Villigen. Data processing used the XDS/XSCALE suite (42), and phasing was by molecular replacement in PHASER (43), using the crystal structure of wild-type ssAnPRT (PDB entry 1ZYK) in its apo form as search model. Inspection of electron density maps, manual model building, and refinement were carried out in Refmac5 (44) and Coot (45) until free and crystallographic  $R$ -factors could not be lowered any further. For cross-validation during refinement, diffraction data were divided into a working and a test set using FREERFLAG (46). The model for the PRPP substrate was created and refined using CCP4 libraries. To avoid model bias PRPP and Mn<sup>2+</sup> ions were added to the structure only in the latest stages of refinement. X-ray data collection and structure refinement statistics are given in Supporting Information Table S3, and coordination distances between PRPP and metals are given in Supporting Information Table S4. Stereo representations of ligands bound to ssAnPRT-D83G + F149S and their corresponding unambiguous electron density maps are shown in Supporting Information Figure S1.

## RESULTS

**Isolation of Activated ssAnPRT Mutants by Library Selection.** The *E. coli* strain  $\Delta\text{trpEGD}$ , which lacks chromosomal genes copies for anthranilate synthase (TrpEG complex) and anthranilate phosphoribosyltransferase (TrpD), was transformed with an *sstrpD* plasmid library generated by DNA shuffling (32). The method produces a point mutagenesis rate of 0.7%, similar to error-prone PCR (47). The transformants were plated on minimal agar supplemented with anthranilate, in order to substitute for the lacking TrpEG complex, and incubated at 37 °C. Whereas  $\Delta\text{trpEGD}$  cells transformed with the wild-type *sstrpD* gene formed visible colonies after more than 80 h, a number of cells transformed with the *sstrpD* gene library grew to a visible size within 16–48 h.

The faster growing colonies were assumed to produce ssAnPRT mutants with a higher catalytic activity than the wild-type enzyme at 37 °C, which is more than 40 °C below the physiological temperature of *S. solfataricus* (48). From the seven fastest growing colonies, plasmid was isolated, and the *sstrpD* inserts were sequenced. Three of the seven inserts contained identical mutations. Each of the remaining five different *sstrpD* genes coded for several amino acid exchanges and additionally contained a varying number of silent mutations (Supporting Information Table S1). All but one of the isolated ssAnPRT mutant proteins carried the exchanges of both aspartate 83 by glycine (D83G) or asparagine (D83N) and phenylalanine 149 by serine (F149S). In order to quantify the increase in enzymatic activity caused by these mutations, the

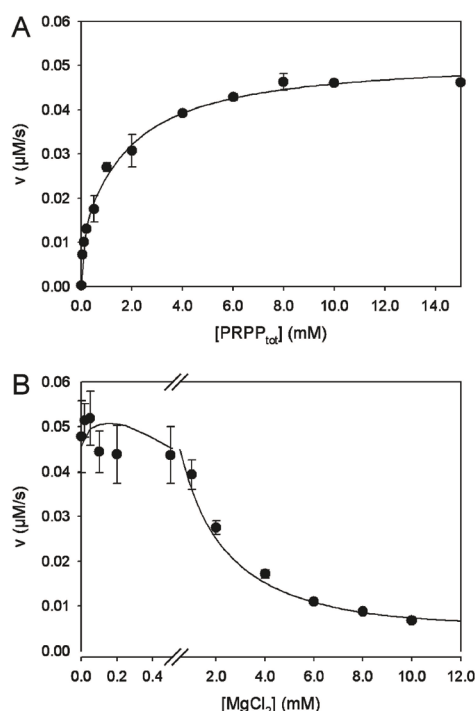


FIGURE 2:  $[\text{PRPP}_{\text{tot}}]$  and  $[\text{MgCl}_2]$  dependence of the steady-state activity of ssAnPRT-wt. Initial velocities of the turnover of  $5 \mu\text{M}$  AA by  $0.25 \mu\text{M}$  ssAnPRT-wt were measured at  $37^\circ\text{C}$  in  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl, pH 7.2, (A) in the presence of  $0.5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  while varying  $[\text{PRPP}_{\text{tot}}]$  and (B) in the presence of  $10 \text{ mM}$  PRPP while varying  $[\text{MgCl}_2]$ . Circles (●) correspond to experimentally measured values, and error bars indicate the standard deviation observed in at least two separate experiments. Solid lines represent the best fit with equilibrium equations of the ligand binding model outlined in the Experimental Procedures.

ssAnPRT-D83G + F149S protein was overproduced in *E. coli* and purified from the soluble fraction of the cell extract. Moreover, in order to evaluate the effect of the individual residue exchanges, the ssAnPRT-D83G and ssAnPRT-F149S single mutants were generated by site-directed mutagenesis, and the recombinant proteins were also produced and purified. The association states of the three mutants were investigated by gel filtration chromatography on a calibrated Superdex 75 column. The measured elution times were compatible with a dimeric association state, as observed for the ssAnPRT-wt enzyme (31).

**Magnesium Dependence of Catalytic Activity.** We previously observed that the catalytic activity of wild-type ssAnPRT is inhibited by high concentrations of  $\text{Mg}^{2+}$  (26). In order to test whether this inhibition has been removed in the selected double mutant, the initial velocities of substrate turnover by ssAnPRT-wt and ssAnPRT-D83G + F149S were measured by fluorescence spectroscopy at  $37^\circ\text{C}$ . Thereby the anthranilate and enzyme concentrations were held constant while varying the concentration of PRPP at a fixed concentration of  $\text{MgCl}_2$  or varying the concentration of  $\text{MgCl}_2$  at a fixed concentration of PRPP. The PRPP and  $\text{MgCl}_2$  dependencies of the initial velocities are shown in Figure 2 for ssAnPRT-wt and in Figure 3 for ssAnPRT-D83G + F149S.

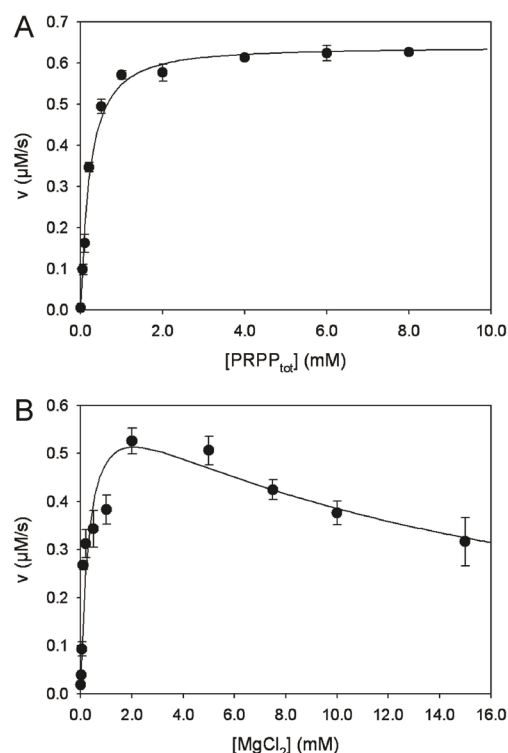


FIGURE 3:  $[\text{PRPP}_{\text{tot}}]$  and  $[\text{MgCl}_2]$  dependence of the steady-state activity of ssAnPRT-D83G + F149S. Initial velocities of the turnover of  $30 \mu\text{M}$  AA by  $0.10 \mu\text{M}$  ssAnPRT-D83G + F149S were measured at  $37^\circ\text{C}$  in  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl, pH 7.2, (A) in the presence of  $1 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  while varying  $[\text{PRPP}_{\text{tot}}]$  and (B) in the presence of  $1 \text{ mM}$  PRPP while varying  $[\text{MgCl}_2]$ . Circles (●) correspond to experimentally measured values, and error bars indicate the standard deviation observed in at least two separate experiments. Solid lines represent the best fit to equilibrium equations of the ligand binding model outlined in the Experimental Procedures.

In accordance with expectation the initial reaction rate increased with increasing concentrations of PRPP, both for ssAnPRT-wt (Figure 2A) and ssAnPRT-D83G + F149S (Figure 3A). However, for ssAnPRT-wt a marked inhibition of the activity was observed at  $\text{MgCl}_2$  concentrations higher than  $0.1 \text{ mM}$  (Figure 2B). In contrast, the activity of ssAnPRT-D83G + F149S increased up to about  $2\text{--}5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  and decreased only moderately at higher  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations (Figure 3B). While the single mutant ssAnPRT-F149S was inhibited by  $\text{MgCl}_2$  to a similar extent as ssAnPRT-wt, the initial reaction rate of the single mutant ssAnPRT-D83G was decreased only at very high concentrations of  $\text{MgCl}_2$  (data not shown), as observed for ssAnPRT-D83G + F149S.

**Crystal Structure Analysis and Modeling of Inhibition by High  $\text{Mg}^{2+}$  Concentrations.** The X-ray structure of ssAnPRT-wt in complex with substrates (26) showed that each of the two protomers of the dimer binds two molecules of anthranilate, one molecule of PRPP, and two  $\text{Mg}^{2+}$  ions or two equivalent  $\text{Mn}^{2+}$  ions (Figure 1B,C). The high-affinity metal-binding site (Mg-I) is defined by interactions of  $\text{Mg}^{2+}$  with ribose and pyrophosphate oxygen atoms of PRPP, without any direct contacts to the protein. The low-affinity metal-binding

site (Mg-II) is formed by the 5'-phosphate moiety of PRPP and the negatively charged protein residues aspartate 223 (D223) and glutamate 224 (E224). Whereas the Mg-I binding site is common in all classes of PRTs, the Mg-II site is specific for AnPRTs, where D223 and E224 are conserved.

We have solved the crystal structure of ssAnPRT-D83G + F149S in complex with PRPP and  $Mn^{2+}$  ions, which can be identified more reliably in electron density maps than  $Mg^{2+}$ , to 2.25 Å resolution. The observed crystal form contains a biological dimer in its asymmetric unit, with both protomers exhibiting identical protein conformations and ligand coordination sites. Moreover, the protein backbone of ssAnPRT-D83G + F149S shows no detectable differences to the wild-type enzyme, proving that the mutations do not alter the overall conformation. The data reveal, however, that PRPP bound to ssAnPRT-D83G + F149S adopts an extended conformation that contrasts markedly with the "S" compact shape observed in complexes of the wild-type enzyme (26) (Figure 1C). The extended PRPP conformation resembles but is not identical to the one observed in AnPRT from *M. tuberculosis* (mtAnPRT) (29). The altered binding mode of PRPP causes this substrate to span into the N-terminal  $\alpha$ -helical domain of the double mutant, approaching the binding sites for anthranilate.

It appears that the "S" shape of PRPP in ssAnPRT-wt is stabilized by a hydrogen bond between the 5'-phosphate group of the substrate and the carboxyl side chain of aspartate 83 (26), which requires that one of the two acidic groups is protonated. Although an equivalent aspartate residue is present in mtAnPRT (Figure 1C), its  $pK_a$  value or that of the 5'-phosphate group of the bound ligand might be too low to allow for hydrogen bond formation. Within ssAnPRT-D83G + F149S, the hydrogen bond is lost as a result of the D83G exchange. For wild-type ssAnPRT, the 5'-phosphate group of PRPP is involved in the binding of the Mg-II ion (26). Although a bivalent cation is also present at related locations in mtAnPRT and ssAnPRT-D83G + F149S, the 5'-phosphate group of the extended PRPP is too far apart to contribute to its binding (Figure 1C). We therefore speculated that the affinity of Mg-II for the active site might be decreased and thus the propensity for the formation of a putatively inhibitory  $Mg_2$ ·PRPP complex might be lower in ssAnPRT-D83G + F149S than in wild-type ssAnPRT.

In order to test this hypothesis, we formulated a corresponding binding model and applied nonlinear least-squares fitting to obtain the parameters from the PRPP and  $MgCl_2$  dependencies of ssAnPRT-wt (Figure 2) and ssAnPRT-D83G + F149S (Figure 3). The model permits formation of  $Mg$ ·PRPP in solution ( $K_{D1} = 0.59$  mM) (40), followed by its binding to ssAnPRT·AA ( $K_{D2}$ ) and turnover. Binding of free  $Mg^{2+}$  to the ssAnPRT·AA· $Mg$ ·PRPP complex ( $K_{D3}$ ) results in the formation of an unproductive ssAnPRT·AA· $Mg_2$ ·PRPP complex which is not turned over, accounting for the inhibitory effect of high concentrations of  $Mg^{2+}$ . In solution PRPP forms a predominant monomagnesium complex; it also can form dimagnesium complexes in metal-rich media, but with very low affinity ( $K_D = 21.3$  mM) (40, 49). Moreover, the 5'-phosphate group of PRPP is involved in the binding of Mg-II in ssAnPRT-wt but not in the activated double mutant (Figure 1C). For these reasons, we used a model where the second  $Mg^{2+}$  ion associates with the enzyme-bound but not with the free  $Mg$ ·PRPP complex, instead of an alternative model which would permit direct binding of  $Mg_2$ ·PRPP to the active site.

Both data sets, with fixed concentration of  $MgCl_2$  (Figures 2A and 3A) or fixed concentration of PRPP (Figures 2B and 3B),

Table 1: Steady-State Enzyme Kinetic Constants of Wild-Type ssAnPRT and the Activated Mutants<sup>a</sup>

ssAnPRT protein	$MgCl_2$ ( $\mu$ M)	$K_M^{AA}$ ( $\mu$ M)	$K_M^{PRPP}$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}^{var}/k_{cat}^{wt,b}$
wild type	50	0.018	47	0.33	
wild type	2000	0.020	1540	0.24	
D83G + F149S	50	3.6	13	4.4	13.3
D83G + F149S	2000	3.1	23	13.3	40.3
D83G	2000	0.12	38	2	6.1
F149S	50	1.2	151	1.2	3.6

<sup>a</sup> The steady-state constants were determined from saturation curves, which were constructed from initial velocities measured at different concentrations of AA and PRPP, in the presence of saturating concentrations of the second substrate ( $>10K_M$ ). The measurements were performed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.2 at 37 °C, in the presence of the given concentrations of  $MgCl_2$ . The values are the averages of two experiments, and standard errors are less than 10%. <sup>b</sup>  $k_{cat}$  values measured at the respective optimum concentrations of  $MgCl_2$  were compared.

were analyzed independently. Nevertheless, the model returned consistent parameter estimates of the equilibrium constants for both data sets (Supporting Information Table S2). For wild-type ssAnPRT the fitting analysis yielded  $K_{D2}$  values of 50 and 150  $\mu$ M, whereas  $K_{D2}$  values of 150 and 240  $\mu$ M were calculated for ssAnPRT-D83G + F149S. These results indicate that the  $Mg$ ·PRPP substrate binds with similar affinity to the wild-type and the double mutant enzyme. However, the fitted  $K_{D3}$  values of 60 and 190  $\mu$ M for ssAnPRT-wt are lower by about 2 orders of magnitude than the  $K_{D3}$  values of 14 and  $>30$  mM that were determined for ssAnPRT-D83G + F149S, indicating that the affinity of free  $Mg^{2+}$  for enzyme-bound  $Mg$ ·PRPP is much lower in the double mutant. As a consequence, the capacity to form the inhibitory ssAnPRT·AA· $Mg_2$ ·PRPP complex is reduced significantly in the activated variant, as suggested from crystal structure analysis.

**Michaelis Constants and Turnover Numbers.** Saturation curves for anthranilate and PRPP, in the presence of an excess of the second substrate, were monitored for wild-type ssAnPRT, the ssAnPRT-D83G + F149S double mutant, and the two single mutants. The deduced Michaelis constants and turnover numbers in the presence of different concentrations of  $MgCl_2$  are listed in Table 1. For wild-type ssAnPRT, the value of the Michaelis constant for PRPP reached its minimum at 50  $\mu$ M  $MgCl_2$  and was about 30-fold higher at 2 mM  $MgCl_2$ , in accordance with the observed inhibition of catalytic activity at high concentrations of  $MgCl_2$  (Figure 2B). The turnover number ( $k_{cat}$ ) for ssAnPRT-wt was much less affected by the  $MgCl_2$  concentration, both at 37 °C (Table 1) and at 60 °C (26). These data suggest that  $Mg_2$ ·PRPP acts as a competitive inhibition of the binding of  $Mg$ ·PRPP to wild-type ssAnPRT, in accordance with the model outlined in the previous paragraph. In contrast, for ssAnPRT-D83G + F149S, the  $K_M^{PRPP}$  values at 50  $\mu$ M and 2 mM  $MgCl_2$  are practically identical (Table 1). Remarkably, the  $K_M^{AA}$  value of the double mutant is drastically increased compared to the wild-type enzyme, irrespective of the  $MgCl_2$  concentration. Obviously, there was no selective pressure for the ssAnPRT variants to maintain the low  $K_M^{AA}$  of the wild-type enzyme, presumably because high concentrations of this substrate (10  $\mu$ g/mL = 73  $\mu$ M) were present on the agar plates. When determined at the respective optimum  $MgCl_2$  concentration, the  $K_M^{PRPP}$  values of the ssAnPRT-D83G + F149S double mutant and the two single mutants are of the same order of magnitude as for the wild-type enzyme, whereas the  $k_{cat}$  value is



## Article

increased 40-fold for the double mutant and 6-fold and 4-fold, respectively, for ssAnPRT-D83G and ssAnPRT-F149S. As a consequence, the catalytic efficiency parameter  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{AA}}$  of all variants is lowered with respect to the wild-type enzyme, whereas  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRPP}}$  of ssAnPRT-D83G and ssAnPRT-D83G + F149S is increased by 2 orders of magnitude.

**Rate-Limiting Step of the Reaction.** A minimal catalytic mechanism of the reaction catalyzed by anthranilate phosphoribosyltransferase is presented in Figure 1A. Whereas studies on AnPRT from *Saccharomyces cerevisiae* suggest that anthranilate and PRPP bind in a random order sequential fashion (50), we cannot exclude that a compulsory binding mechanism is effective in ssAnPRT. In any case, after formation of the ternary ssAnPRT·AA·PRPP complex, a phosphoribosyl moiety is transferred from PRPP to AA (described by  $k_{\text{trans}}$ ), followed by the release of the products PP<sub>i</sub> and PRA (described by  $k_{\text{off}}$ ). The double mutation D83G + F149S results in an increase of the turnover number at 37 °C by a factor of about 40 when measured at the respective optimum MgCl<sub>2</sub> concentration (Table 1). The turnover number obtained from the steady-state kinetic data depends on both the chemical transfer and the product release step:  $k_{\text{cat}} = (k_{\text{trans}}k_{\text{off}})/(k_{\text{trans}} + k_{\text{off}})$ . Therefore, the increase in  $k_{\text{cat}}$  observed for the double mutant could be caused by an increase of either  $k_{\text{trans}}$  or  $k_{\text{off}}$ , depending on whether the irreversible chemical transfer is rate-limiting and product release is comparably fast ( $k_{\text{trans}} < k_{\text{off}}$ ), or vice versa ( $k_{\text{trans}} > k_{\text{off}}$ ).

To distinguish between the two possibilities, the turnover numbers of wild-type ssAnPRT and ssAnPRT-D83G + F149S determined by steady-state kinetics were compared with the value of  $k_{\text{trans}}$  as determined from transient kinetic experiments in a stopped-flow apparatus. To this end, a preincubated solution containing AA and an excess of ssAnPRT was rapidly mixed with saturating concentrations of PRPP in the presence of the respective optimal concentration of MgCl<sub>2</sub>. Under conditions where the formation of ssAnPRT·AA·PRPP is complete within the dead time of the experiment (ssAnPRT·AA·PRPP  $\approx$  [A]<sub>total</sub>, single-turnover conditions), the reaction is described by a two-step irreversible process (Figure 1A). Since the spectroscopic change occurs at the transition from ssAnPRT·AA·PRPP to ssAnPRT·PRA·PP<sub>i</sub>, the observed first-order rate constant corresponds to  $k_{\text{trans}}$ . This conclusion is independent of whether the two substrates bind with a random or a compulsory mechanism as long as single-turnover conditions are met. The conversion of AA to PRA by ssAnPRT-D83G + F149S in the presence of 2 mM MgCl<sub>2</sub> is shown in Figure 4A, and the corresponding observed first-order rate constants are plotted as a function of the enzyme concentration in Figure 4C. Fitting a hyperbolic curve to the data yielded a limiting value of  $k_{\text{trans}} = 29.6 \pm 0.9 \text{ s}^{-1}$  (51, 52). (The interpretation of the shape of the hyperbola will depend on the substrate binding mechanism, which is unknown at present.) The  $k_{\text{cat}}$  value determined in a steady-state kinetic experiment under identical conditions was  $13.3 \pm 1.1 \text{ s}^{-1}$  (Table 1). From the relationship  $k_{\text{cat}} = (k_{\text{trans}}k_{\text{off}})/(k_{\text{trans}} + k_{\text{off}})$ , it follows that  $k_{\text{off}} = (k_{\text{cat}}k_{\text{trans}})/(k_{\text{trans}} - k_{\text{cat}}) = 24.2 \pm 2.0 \text{ s}^{-1}$  (Table 2). Since  $k_{\text{trans}}$  and  $k_{\text{off}}$  are of the same order of magnitude, phosphoribosyl transfer and product release affect catalytic turnover equally. When monitoring the enzymatic reaction of ssAnPRT-wt in the presence of 50  $\mu\text{M}$  MgCl<sub>2</sub>, we observed deviations from first-order kinetics (Figure 4B). In order to get an estimate for the limiting value, we nevertheless plotted the observed rate constants as a function of the ssAnPRT-wt concentration (Figure 4D). The hyperbolic fit yielded a  $k_{\text{trans}}$  value of  $3.3 \pm 0.16 \text{ s}^{-1}$  (Table 2),

but the actual value might be higher since the measured curves are somewhat steeper than the curves obtained from fitting a simple monoexponential equation to the data. The  $k_{\text{cat}}$  value determined in steady-state measurements under identical conditions was  $0.33 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$  (Table 1). Irrespective of the exact value of  $k_{\text{trans}}$  the relationship  $k_{\text{cat}} = (k_{\text{trans}}k_{\text{off}})/(k_{\text{trans}} + k_{\text{off}})$  implies that the values of  $k_{\text{off}}$  and  $k_{\text{cat}}$  will be very similar (Table 2), demonstrating that product release is the rate-limiting step in the catalytic cycle of ssAnPRT-wt ( $k_{\text{off}} < k_{\text{trans}}$ ). In summary, the comparison of steady-state and single-turnover data shows that the increased turnover number of ssAnPRT-D83G + F149S is mainly based on an acceleration of PRA release.

**Thermal Stability.** The thermal stabilities of wild-type ssAnPRT and the activated mutants were determined by heat denaturation which was monitored using far-UV circular dichroism spectroscopy (Figure 5A). Since thermal denaturation was irreversible, we used the apparent melting temperatures ( $T_m$ ) as an operational measure to assess the effects of the mutations on conformational stability. The ssAnPRT-wt protein and ssAnPRT-D83G showed  $T_m$  values of 90 and 91 °C, respectively, whereas the ssAnPRT-F149S protein and the double mutant exhibited  $T_m$  values of 82 °C (Table 3). These data show that the D83G exchange is neutral in terms of stability, whereas the F149S exchange is destabilizing.

Furthermore, the kinetics of irreversible heat inactivation was monitored for ssAnPRT-wt and the activated variants. For that purpose the enzymes were incubated at 80 °C, and residual activities of samples withdrawn after different time intervals were measured at 37 °C. For all ssAnPRT variants, the decay of enzymatic activity as a function of time was an first-order process, which allowed us to determine apparent half-lives ( $t_{1/2}^{\text{app}}$ ) as an operational measure of kinetic stability (Figure 5B, Table 3). In accordance with the observed  $T_m$  values, ssAnPRT-D83G ( $t_{1/2}^{\text{app}} = 77 \text{ min}$ ) resembles ssAnPRT-wt ( $t_{1/2}^{\text{app}} = 60 \text{ min}$ ), whereas ssAnPRT-F149S ( $t_{1/2}^{\text{app}} = 6.0 \text{ min}$ ) and ssAnPRT-D83G + F149S ( $t_{1/2}^{\text{app}} = 4.1 \text{ min}$ ) lose catalytic activity much more rapidly.

## DISCUSSION

We have isolated from an *ssrtpD* gene library the activated double mutant ssAnPRT-D83G + F149S. The crystal structure of ssAnPRT-wt (26) shows that aspartate 83 is part of the <sup>79</sup>GTGGD<sup>83</sup> loop, which becomes structured upon binding of PRPP. The second position relevant for activation, phenylalanine 149, is located adjacent to alanine 150, which is part of the binding pocket for AA-I (Figure 1B). *In vitro* characterization of wild-type ssAnPRT and the activated double mutant demonstrated that the amino acid exchanges have two main consequences for the enzymatic activity of ssAnPRT, namely, abolition of inhibition by high Mg<sup>2+</sup> concentrations and accelerated release of the product PRA from the active site.

**Removal of Mg Inhibition.** A marked inhibition of the reaction catalyzed by wild-type ssAnPRT was observed at MgCl<sub>2</sub> concentrations higher than 0.1 mM, whereas no significant inhibitory effect on ssAnPRT-D83G + F149S was measurable up to concentrations of 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Figures 2B and 3B). We have attributed this difference to a higher propensity for ssAnPRT-wt to form the unproductive Mg<sub>2</sub>·PRPP complex, which is not turned over but competes with the true substrate Mg·PRPP for the PRPP binding site on the enzyme. This binding mechanism does establish the simplest model that is qualitatively

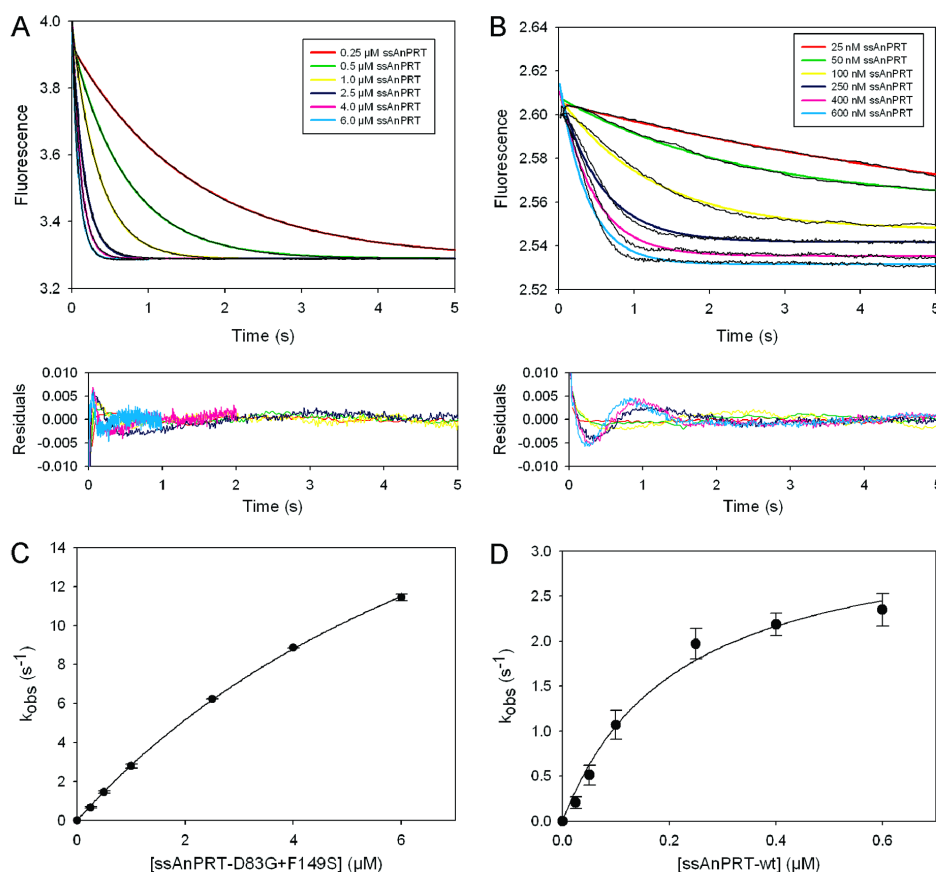


FIGURE 4: Transient kinetic analysis of (A, C) ssAnPRT-D83G + F149S and (B, D) ssAnPRT-wt. Solutions containing the indicated concentrations of (A) ssAnPRT-D83G + F149S and 0.1  $\mu\text{M}$  AA or (B) ssAnPRT-wt and 0.01  $\mu\text{M}$  AA were rapidly mixed with a solution containing 1 mM PRPP (concentrations are cell concentrations), and the turnover to PRA was monitored by recording the fluorescence decrease. A monoexponential equation reflecting a first-order rate mechanism was fitted to the data (data, black line; fit, colored lines). The bottom graphs show the deviation between data and fit. (C) Fitted exponential decay rates were plotted as a function of ssAnPRT-D83G + F149S concentration. The hyperbolic fit (black solid line) yielded  $k_{\text{trans}} = 29.6 \pm 0.9 \text{ s}^{-1}$ . (D) Fitted exponential decay rates were plotted as a function of ssAnPRT-wt concentration. The hyperbolic fit (black solid line) yielded  $k_{\text{trans}} = 3.3 \pm 0.16 \text{ s}^{-1}$ . Error bars indicate the standard deviation observed in two separate experiments. Measurements were performed at 37 °C in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 2 mM  $\text{MgCl}_2$  for ssAnPRT-D83G + F149S and in 50  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$  for ssAnPRT-wt. (Transients of ssAnPRT-wt monitored in the presence of 2 mM  $\text{MgCl}_2$  were qualitatively similar but yielded lower  $k_{\text{obs}}$  values; data not shown.)

Table 2: Rate Constants of Wild-Type ssAnPRT and the Activated Double Mutant<sup>a</sup>

ssAnPRT protein	$k_{\text{trans}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{off}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$
wild type	$> 3.3$	$\sim 0.33$	$0.33 \pm 0.02$
D83G + F149S	$29.6 \pm 0.9$	$24.2 \pm 2.0$	$13.3 \pm 1.1$

<sup>a</sup>The measurements were performed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.2 at 37 °C, in the presence of 50  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$  (wild type) and 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (D83G + F149S).

consistent with the steady-state enzyme kinetic data and the crystal structures of wild-type and mutant ssAnPRTs.

Selection of activated ssAnPRT variants was conducted with  $\Delta\text{trpEGD}$  *E. coli* cells grown on Vogel–Bonner medium, which contains 0.8 mM  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ . Since in this concentration range the intracellular concentration of unbound magnesium in *E. coli* cells is the same as the external concentration (53),

ssAnPRT-D83G + F149S was selected in the presence of 0.8 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . Activity of ssAnPRT-wt is reduced at this  $\text{Mg}^{2+}$  concentration, due to the binding of  $\text{Mg}_2\text{-PRPP}$  and the resulting increase of the apparent  $K_{\text{M}}^{\text{PRPP}}$  value. We conclude that the double mutant was selected either on the basis of its increased turnover number or its increased  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRPP}}$  value caused by the lack of inhibition by high  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations. A similar decrease of catalytic activity with increasing  $\text{MgCl}_2$  concentration was observed at 60 °C (26), which makes it likely that the inhibition is also effective at 80 °C, which is the optimum growth temperature of *S. solfataricus*. However, since the intracellular  $\text{Mg}^{2+}$  concentration of *S. solfataricus* is unknown, it currently remains unclear whether and to which extent the inhibition is also effective under physiological conditions.

**Acceleration of PRA Release.** A comparison of the results obtained in the transient and steady-state kinetic experiments revealed that the turnover of ssAnPRT-wt at 37 °C is limited by

## Article

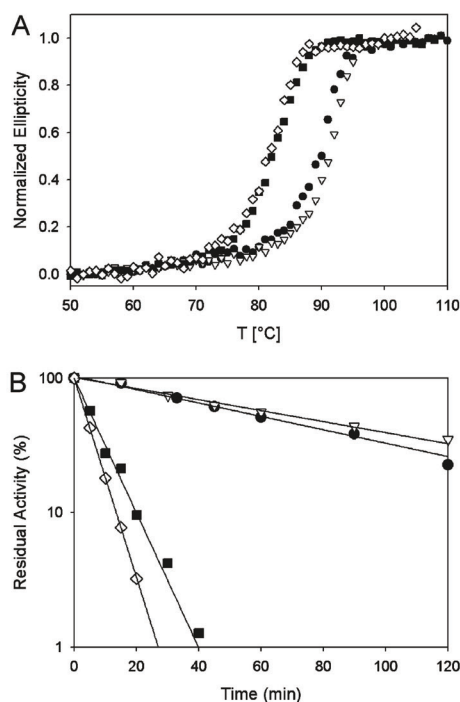


FIGURE 5: Thermal stability of wild-type ssAnPRT and the activated mutants. (A) Thermal denaturation monitored by loss of the far-UV CD signal at 222 nm. The ramp rate was 1 °C/min. Measurements were performed with 10  $\mu$ M ssAnPRT in 10 mM potassium phosphate, pH 7.5. (B) Irreversible heat inactivation. Proteins were incubated in 50 mM Tris-HCl, pH 6.5 at 80 °C, and the time-dependent decay of the residual activity was measured at 37 °C. Key: ssAnPRT-wt (●); ssAnPRT-D83G (▽); ssAnPRT-F149S (■); ssAnPRT-D83G + F149S (◇). The values for  $T_m$  and  $t_{1/2}^{PRP}$  are shown in Table 3.

Table 3: Unfolding Midpoint Temperatures and Half-Lives of Inactivation of Wild-Type ssAnPRT and the Activated Mutants<sup>a</sup>

ssAnPRT protein	$T_m$ (°C)	$t_{1/2}^{PRP}$ at 80 °C (min)
wild type	90	60
D83G	91	77
F149S	82	6.0
D83G + F149S	82	4.1

<sup>a</sup> Thermal denaturation of ssAnPRT was monitored by decrease of the far-UV CD signal at 222 nm in 10 mM potassium phosphate, pH 7.5. For irreversible thermal inactivation proteins were incubated in 50 mM Tris-HCl, pH 6.5 at 80 °C. The  $t_{1/2}^{PRP}$  values were determined from the first-order decay of residual activities at 37 °C.

the dissociation of the enzyme–product complex. Since release of pyrophosphate has been shown to be fast in other PRTases (54–56) and as we did not observe any product inhibition in the presence of high concentrations of pyrophosphate (data not shown), the slow and rate-limiting step in the enzymatic mechanism of ssAnPRT-wt was attributed to the release of the second product PRA. At 37 °C we measured a forward phosphoribosyl transfer rate of  $> 3.3 \text{ s}^{-1}$ , which is at least 10-fold more rapid than the overall rate of forward catalysis ( $0.33 \text{ s}^{-1}$ ). Rapid on-enzyme phosphoribosyl transfer chemistry with slow product release has

Biochemistry, Vol. 48, No. 23, 2009 5207

previously been reported for various PRTases, for example, human hypoxanthine–guanine (HG) PRTase (56) and orotate PRTase (55), which possess type I PRTase architecture, and *S. typhimurium* nicotinic acid (NA) PRTase (54), which is a type II PRTase (57). However, with phosphoribosyl transfer rates of  $131 \text{ s}^{-1}$  (HG PRTase),  $260 \text{ s}^{-1}$  (orotate PRTase), and at least  $500 \text{ s}^{-1}$  (NA PRTase) at 30 °C for the mesophilic PRTases the chemical transfer step proceeds far more rapidly than in ssAnPRT-D83G + F149S and probably also ssAnPRT-wt. In contrast, in the activated variant ssAnPRT-D83G + F149S phosphoribosyl transfer ( $k_{\text{trans}} = 28.3 \text{ s}^{-1}$ ) and PRA release ( $k_{\text{off}} = 25.0 \text{ s}^{-1}$ ) contribute equally to the overall rate of forward catalysis ( $k_{\text{cat}} = 13.3 \text{ s}^{-1}$ ).

For the synthesis reaction to proceed, the two substrates anthranilate and Mg·PRPP must be brought together, probably by means of a hinge motion where the N- and C-terminal domains close upon each other. Indeed, SAXS measurements with ssAnPRT-wt indicate that the enzyme undergoes a noticeable compaction upon full occupancy of its active site (26). This finding suggests that the inherent flexibility of the hinge region is central to the catalytic function of ssAnPRT, for example, by limiting the rate of product release from ssAnPRT-wt at 37 °C. In ssAnPRT-D83G + F149S, the extended binding mode of PRPP causes this substrate to span into the  $\alpha$ -helical, N-terminal domain of the enzyme, approaching closely the binding sites for anthranilate. This change is caused by the D83G mutation, and as a consequence, a less extensive domain motion might be required for effective catalysis. Since F149S is located within the hinge between the two domains of the enzyme, it is likely that the substitution at this position has an influence on the dynamics of domain opening and closure movements. It has been shown that in cases where product release is rate-limiting, an increase in flexibility along a release channel can go along with an increased catalytic rate, especially when product dissociation occurs in the millisecond range (for ssAnPRT-D83G + F149S:  $k_{\text{off}} = 25 \text{ s}^{-1}$ ,  $t_{1/2} = 28 \text{ ms}$ ), a time scale that is similar to that expected for large amplitude segmental motions (58). For ssAnPRT-wt, the  $k_{\text{cat}}$  value increases from  $0.33 \text{ s}^{-1}$  at 37 °C to  $4.2 \text{ s}^{-1}$  at 60 °C (26), suggesting that the velocity of product release, which limits the activity of the wild-type protein at 37 °C, is accelerated at 60 °C by a similar increase in flexibility as effected by the F149S replacement at 37 °C. Indeed, the melting temperature of ssAnPRT-D83G + F149S is decreased by  $\sim 10$  °C compared to ssAnPRT-wt, and kinetic stability is decreased to  $\sim 10\%$  of wild-type stability, which indicates an overall destabilization of the enzyme and might go hand in hand with increased flexibility. A similar effect has been observed with an activated variant of indole-3-glycerol phosphate synthase from *S. solfataricus*, which also shows an increased  $k_{\text{cat}}$  value due to an increased product release rate (8). This variant is more rapidly inactivated and more prone to trypsin digestion than the wild-type enzyme, supporting an inverse correlation of thermal stability and conformational flexibility. Fluorescence resonance energy transfer measurements are under way to study the correlation between local dynamics and product release of ssAnPRT and its activated mutants in more detail.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank Jeannette Ueckert for expert technical assistance, Dr. Marco Bocla and Harald Guldán for help with generation of figures, and Dr. Jochen Reinstein and Prof. Frank M. Raushel for discussion and advice.



## SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Amino acid exchanges of ssAnPRT mutants isolated by *in vivo* complementation at 37 °C (Table S1), parameter estimates and confidence intervals for the best fit to equilibrium equations of the ligand binding model outlined in Experimental Procedures (Table S2), X-ray diffraction and model refinement statistics of ssAnPRT-D83G + F149S (Table S3), coordination distances between the pyrophosphate group of PRPP and metals in ssAnPRT-D83G + F149S (Table S4), and stereo representations of ligands bound to ssAnPRT-D83G + F149S and their corresponding electron density maps (Figure S1). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## REFERENCES

- Arnold, F. H., Wintode, P. L., Miyazaki, K., and Gershenson, A. (2001) How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem. Sci.* 26, 100–106.
- Stern, R., and Liebl, W. (2001) Thermophilic adaptation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 36, 39–106.
- Jaenicke, R. (1991) Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.* 202, 715–728.
- Miyazaki, K., Wintode, P. L., Grayling, R. A., Rubingh, D. N., and Arnold, F. H. (2000) Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J. Mol. Biol.* 297, 1015–1026.
- Henn-Sax, M., Thoma, R., Schmidt, S., Hennig, M., Kirschner, K., and Stern, R. (2002) Two ( $\beta$ )<sub>3</sub>-barrel enzymes of histidine and tryptophan biosynthesis have similar reaction mechanisms and common strategies for protecting their labile substrates. *Biochemistry* 41, 12032–12042.
- Stern, R., Kleemann, G. R., Szadkowski, H., Lustig, A., Hennig, M., and Kirschner, K. (1996) Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer. *Protein Sci.* 5, 2000–2008.
- Lönn, A., Gardonyi, M., van Zyl, W., Hahn-Hagerdal, B., and Otero, R. C. (2002) Cold adaptation of xylose isomerase from *Thermus thermophilus* through random PCR mutagenesis. Gene cloning and protein characterization. *Eur. J. Biochem.* 269, 157–163.
- Merz, A., Yee, M. C., Szadkowski, H., Pappenberger, G., Cramer, A., Stemmer, W. P., Yanofsky, C., and Kirschner, K. (2000) Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures. *Biochemistry* 39, 880–889.
- Nagatani, R. A., Gonzalez, A., Shoichet, B. K., Brinen, L. S., and Babbitt, P. C. (2007) Stability for function trade-offs in the enolase superfamily “catalytic module”. *Biochemistry* 46, 6688–6695.
- Shoichet, B. K., Baase, W. A., Kuroki, R., and Matthews, B. W. (1995) A relationship between protein stability and protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 452–456.
- Tokuriki, N., Stricher, F., Serrano, L., and Tawfik, D. S. (2008) How protein stability and new functions trade off. *PLoS Comput. Biol.* 4, e1000002.
- Wray, J. W., Baase, W. A., Lindstrom, J. D., Weaver, L. H., Poteete, A. R., and Matthews, B. W. (1999) Structural analysis of a non-contiguous second-site revertant in T4 lysozyme shows that increasing the rigidity of a protein can enhance its stability. *J. Mol. Biol.* 292, 1111–1120.
- Giver, L., Gershenson, A., Freskgard, P. O., and Arnold, F. H. (1998) Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12809–12813.
- Hirano, N., Haruki, M., Morikawa, M., and Kanaya, S. (2000) Enhancement of the enzymatic activity of ribonuclease HI from *Thermus thermophilus* HB8 with a suppressor mutation method. *Biochemistry* 39, 13285–13294.
- Stevenson, B. J., Liu, J. W., and Ollis, D. L. (2008) Directed evolution of yeast pyruvate decarboxylase 1 for attenuated regulation and increased stability. *Biochemistry* 47, 3013–3025.
- Van den Burg, B., Vriend, G., Veltman, O. R., Venema, G., and Eijssink, V. G. (1998) Engineering an enzyme to resist boiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 2056–2060.
- Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A., Lambier, A. M., and Wierenga, R. K. (1999) Structural and mutagenesis studies of *Leishmania* triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng.* 12, 243–250.
- Yasugi, M., Amino, M., Suzuki, T., Oshima, T., and Yamagishi, A. (2001) Cold adaptation of the thermophilic enzyme 3-isopropylmalate dehydrogenase. *J. Biochem. (Tokyo)* 129, 477–484.
- Sinha, S. C., and Smith, J. L. (2001) The PRT protein family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 733–739.
- Ozturk, D. H., Dorfman, R. H., Scapin, G., Sacchettini, J. C., and Grubmeyer, C. (1995) Locations and functional roles of conserved lysine residues in *Salmonella typhimurium* orotate phosphoribosyltransferase. *Biochemistry* 34, 10755–10763.
- Scapin, G., Ozturk, D. H., Grubmeyer, C., and Sacchettini, J. C. (1995) The crystal structure of the orotate phosphoribosyltransferase complexed with orotate and  $\alpha$ -D-5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate. *Biochemistry* 34, 10744–10754.
- Schumacher, M. A., Bashor, C. J., Song, M. H., Otsu, K., Zhu, S., Parry, R. J., Ullman, B., and Brennan, R. G. (2002) The structural mechanism of GTP stabilized oligomerization and catalytic activation of the *Toxoplasma gondii* uracil phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 78–83.
- Craig, S. P., III, and Eakin, A. E. (2000) Purine phosphoribosyltransferases. *J. Biol. Chem.* 275, 20231–20234.
- Cao, H., Pietrak, B. L., and Grubmeyer, C. (2002) Quinolinate phosphoribosyltransferase: kinetic mechanism for a type II PRTase. *Biochemistry* 41, 3520–3528.
- Eads, J. C., Ozturk, D., Wexler, T. B., Grubmeyer, C., and Sacchettini, J. C. (1997) A new function for a common fold: the crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase. *Structure* 5, 47–58.
- Marino, M., Deuss, M., Svergun, D. I., Konarev, P. V., Stern, R., and Mayans, O. (2006) Structural and mutational analysis of substrate complexation by anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus*. *J. Biol. Chem.* 281, 21410–21421.
- Mayans, O., Ivens, A., Nissen, L. J., Kirschner, K., and Wilmanns, M. (2002) Structural analysis of two enzymes catalysing reverse metabolic reactions implies common ancestry. *EMBO J.* 21, 3245–3254.
- Kim, C., Xuong, N. H., Edwards, S., Madhusudan, Yee, M. C., Spraggon, G., and Mills, S. E. (2002) The crystal structure of anthranilate phosphoribosyltransferase from the enterobacterium *Pectobacterium carotovorum*. *FEBS Lett.* 523, 239–246.
- Lee, C. E., Goodfellow, C., Javid-Majd, F., Baker, E. N., and Shaun Lott, J. (2006) The crystal structure of TrpD, a metabolic enzyme essential for lung colonization by *Mycobacterium tuberculosis*, in complex with its substrate phosphoribosylpyrophosphate. *J. Mol. Biol.* 355, 784–797.
- Schwab, T., Skegro, D., Mayans, O., and Stern, R. (2008) A rationally designed monomeric variant of anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus* is as active as the dimeric wild-type enzyme but less thermostable. *J. Mol. Biol.* 376, 506–516.
- Ivens, A., Mayans, O., Szadkowski, H., Wilmanns, M., and Kirschner, K. (2001) Purification, characterization and crystallization of thermostable anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus*. *Eur. J. Biochem.* 268, 2246–2252.
- Stemmer, W. P. (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10747–10751.
- Jürgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M., and Stern, R. (2000) Directed evolution of a ( $\beta$ )<sub>3</sub>-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9925–9930.
- Yanofsky, C., and Horn, V. (1981) Rifampin resistance mutations that alter the efficiency of transcription termination at the tryptophan operon attenuator. *J. Bacteriol.* 145, 1334–1341.
- Vogel, H. J., and Bonner, D. M. (1956) Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 218, 97–106.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51–59.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77, 61–68.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411–2423.
- Kuzmic, P. (1996) Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* 237, 260–273.
- Thompson, R. E., Li, E. L., Spivey, H. O., Chandler, J. P., Katz, A. J., and Appleman, J. R. (1978) Apparent stability constants of  $H^+$  and  $Mg^{2+}$  complexes of 5-phosphoribosyl  $\alpha$ -1-pyrophosphate. *Bioinorg. Chem.* 9, 35–45.



## Article

Biochemistry, Vol. 48, No. 23, 2009 5209

41. Stoll, V. S., and Blanchard, J. S. (1990) Buffers: principles and practice. *Methods Enzymol.* 182, 24–38.
42. Kabsch, W. (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 795–800.
43. McCoy, A. J. (2007) Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 63, 32–41.
44. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 53, 240–255.
45. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.
46. Collaborative Computational Project, N. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 50, 760–763.
47. Stemmer, W. P. (1994) Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370, 389–391.
48. Grogan, D. W. (1989) Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *J. Bacteriol.* 171, 6710–6719.
49. Salerno, C., and Giacomello, A. (1981) Human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase. The role of magnesium ion in a phosphoribosylpyrophosphate-utilizing enzyme. *J. Biol. Chem.* 256, 3671–3673.
50. Hommel, U., Lustig, A., and Kirschner, K. (1989) Purification and characterization of yeast anthranilate phosphoribosyltransferase. *Eur. J. Biochem.* 180, 33–40.
51. Bicknell, R., and Waley, S. G. (1985) Single-turnover and steady-state kinetics of hydrolysis of cephalosporins by beta-lactamase I from *Bacillus cereus*. *Biochem. J.* 231, 83–88.
52. Fierke, C. A., and Hammes, G. G. (1995) Transient kinetic approaches to enzyme mechanisms. *Methods Enzymol.* 249, 3–37.
53. Hurwitz, C., and Rosano, C. L. (1967) The intracellular concentration of bound and unbound magnesium ions in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 242, 3719–3722.
54. Gross, J. W., Rajavel, M., and Grubmeyer, C. (1998) Kinetic mechanism of nicotinic acid phosphoribosyltransferase: implications for energy coupling. *Biochemistry* 37, 4189–4199.
55. Wang, G. P., Lundegaard, C., Jensen, K. F., and Grubmeyer, C. (1999) Kinetic mechanism of OMP synthase: A slow physical step following group transfer limits catalytic rate. *Biochemistry* 38, 275–283.
56. Xu, Y., Eads, J., Sacchettini, J. C., and Grubmeyer, C. (1997) Kinetic mechanism of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: Rapid phosphoribosyl transfer chemistry. *Biochemistry* 36, 3700–3712.
57. Chappie, J. S., Canaves, J. M., Han, G. W., Rife, C. L., Xu, Q., and Stevens, R. C. (2005) The structure of a eukaryotic nicotinic acid phosphoribosyltransferase reveals structural heterogeneity among type II PRases. *Structure* 13, 1385–1396.
58. Codreanu, S. G., Ladner, J. E., Xiao, G., Stourman, N. V., Hachey, D. L., Gilliland, G. L., and Armstrong, R. N. (2002) Local protein dynamics and catalysis: detection of segmental motion associated with rate-limiting product release by a glutathione transferase. *Biochemistry* 41, 15161–15172.

## 8 Danksagung

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

Allen voran möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Sterner für das spannende Thema und seine stets vorhandene Hilfsbereitschaft bedanken. Ich danke für sein großes Interesse, die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und für das in mich gesetzte Vertrauen die verschiedenen Projekte sehr selbstständig bearbeiten zu können. Nicht zuletzt möchte ich mich auch für die Möglichkeit zur Teilnahme an zahlreichen interessanten Tagungen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Angel Angelov und Prof. Wolfgang Liebl (TU München) gebührt großer Dank für ihre sehr hilfreiche Einführung in den Umgang mit *T. thermophilus*.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Sandra Schlee. Sie war in den letzten Jahren eine sehr wertvolle wissenschaftliche Begleiterin, der ich wichtige Anregungen und Einblicke zu verdanken habe. PD Dr. Rainer Merkl danke ich für die vielen bioinformatischen Einblicke und für das Interesse an der Arbeit.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Jeannette Ueckert bedanken. Ihre zuverlässige Hilfe und unermüdlicher Einsatz waren für das Gelingen dieses Projekts sehr wertvoll. Barbara Kellerer ist ebenso für ihr großes Engagement bei der Züchtung von Proteinkristallen zu danken. Auch Hermine Reisner, Christiane Endres und Sonja Fuchs möchte ich herzlich für die zahlreichen Hilfestellungen im Labor danken. Darüber hinaus gilt Claudia Pauer ein besonderer Dank, da sie mir viele Dinge auf Verwaltungsebene abgenommen hat.

Meiner Kochkollegin Linn Carstensen danke ich für viele kulinarische Leckereien und ein stets offenes Ohr bei Anliegen aller Art.

Bei Dr. Felix List möchte ich für die Zusammenarbeit bei der Strukturlösung bedanken.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Schreibraumkollegen Susanne Dietrich, Linn Carstensen, Nadine Borst, Josef Sperl, Kathleen Burkhardt und Sandra Schlee, die stets für einen angenehmen und lustigen Ablauf im Labor sorgten und mit wertvollen Ideen zur Seite standen.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls Biochemie II danke ich für so manche Hilfe und die stets gute Arbeitsatmosphäre. Dr. Patrick Babinger danke ich für seine kompetente Hilfe bei verschiedenen Problemen der Molekularbiologie und seine Organisation zahlreicher sportlicher Laborausflüge. Dr. Helmut Durchschlag danke ich für seine netten Anekdoten sowie der Durchführung der UZ-Läufe. Klaus Tiefenbach war stets eine große und verlässliche Hilfe bei unterschiedlichen biophysikalischen Fragen oder computerbedingten Problemen. Dr. Marco Bocola, Herrmann Zellner und Dietmar Birzer ist für ihre Hilfe bei bioinformatischen Problemen zu danken. Für eine hilfsbereite und angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich auch bei Dr. Tobias Seitz, Dr. Jörg Claren, Dr. Alexander Ehrmann, Bernd Reisinger, Oliver Janda, Anke Behr, David Peterhoff, Monika Meier, Daniel Schneider, Harald Guldán, Florian Busch und allen anderen ehemaligen Mitgliedern des Lehrstuhls Biochemie II bedanken.

Kilian Wöhrmann, Andreas Kreuzer, Michael Filarsky, David Peterhoff und Alexandra Perras danke ich für ihr Engagement im Rahmen ihrer Labor-Praktika bzw. Bachelorarbeit.

Ein weiteres herzliches Dankeschön gilt meinen Freunden in der Fakultät, die immer wieder für ein abwechslungsreiches Freizeitprogramm gesorgt haben.

Ganz besonders danke ich natürlich Eva. Ohne ihre Unterstützung und Liebe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## 9 Eidesstattliche 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 – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen und Tagungsbeiträgen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Sterner betreut worden.

Regensburg, den 12.08.2010

---

Thomas Schwab

## Teilpublikationen

Schwab, T., Skegro, D., Mayans, O. and Sterner, R. (2008) A rationally designed monomeric variant of anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus* is as active as the dimeric wild-type enzyme but less thermostable. *J Mol Biol* 376(2): 506-516.

Schlee, S., Deuss, M., Bruning, M., Ivens, A., Schwab, T., Hellmann, N., Mayans, O. and Sterner, R. (2009). Activation of anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus* by removal of magnesium inhibition and acceleration of product release. *Biochemistry* 48(23): 5199-209.

## Tagungsbeiträge

### Poster

„Correlation of Thermostability, Catalytic Activity and Conformational Flexibility exemplified by Investigations on Anthranilate Phosphoribosyltransferase“

*DFG program SPP1170 Workshop on directed evolution*, IU Bremen - 05/08/2008

### Vorträge

„Monomerisation of a homo-dimeric enzyme by rational protein design.“

*3<sup>rd</sup> Symposium of RZBB Regensburg*, Kostenz - 18/09/2007

„Monomerisation of a homo-dimeric enzyme by rational protein design.“

*26. Rabensteiner Kolleg*, Pottenstein - 22/05/2008

„Monomerisation and activation of a homo-dimeric thermostable enzyme.“

*DFG program SPP1170 Workshop on directed evolution*, IU Bremen - 05/08/2008

„Monomerisation of a homo-dimeric thermostable enzyme by rational protein design.“

*2<sup>nd</sup> Symposium of RZBB Regensburg*, Hünfeld - 24/05/2009

„Enzyme stabilisation by library selection in *Thermus thermophilus*.“

*Big NSE Protein Engineering*, Berlin - 12/05/2010

„Enzyme stabilisation by library selection in *Thermus thermophilus*.“

*28. Rabensteiner Kolleg*, Pottenstein - 05/06/2010