

**Evolution und katalytischer Mechanismus eines thermostabilen
(b/a)₈-Barrel-Enzyms aus der Histidinbiosynthese**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Martina Henn-Sax

aus Gundelsheim

2001

Berichtersteller:

Prof. Dr. R. Sterner

Prof. Dr. H. W. Klein

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 06.12.2001

Die meiste Zeit
geht dadurch verloren,
dass man nicht
zu Ende denkt.

Alfred Herrhausen

Inhalt

Inhalt	IV
Abbildungen	VII
Tabellen	IX
Zusammenfassung	X
1. Einleitung	1
1.1. Hypothesen zur Entstehung der Biosynthesewege	1
1.2. Histidin-Biosynthese	2
1.3. Enzymatische Aktivität thermostabiler Proteine	6
1.4. TIM-Barrel Proteine	7
1.5. tHisA und tHisF – Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Enzyme	11
1.6. Ziel der Arbeit	15
2. Material	16
2.1. Bakterienstämme	16
2.2. Vektoren	16
2.2.1. pDS56/RBSII/SphI	16
2.2.2. pDMI,1	17
2.2.3. pDS-pDM-System	17
2.2.4. pTNA	17
2.3. Oligodesoxyribonukleotide	18
2.4. DNA-Längenstandards	19
2.5. Protein-Längenstandards	19
2.6. Enzyme, Antikörper, Proteine	20
2.7. Chemikalien und Kits	20
2.7.1. Chemikalien	20
2.7.2. Verwendete Kits	22
2.8. Geräte	22
2.9. sonstige Materialien	23
2.10. Nährmedien	24
2.11. Puffer und Lösungen	25
2.12. Software	29
3. Methoden	30
3.1. Vorbereitungen von Geräten und Lösungen	30
3.2. Mikrobiologische Methoden	30
3.2.1. Anzucht, Vermehrung und Lagerung von <i>E.coli</i> -Stämmen	30

3.2.2. Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	30
3.2.3. Plattieren von Bakterien	32
3.2.4. Bestimmung der Transformationseffizienz	32
3.2.5. Picken von Kolonien	33
3.3. Molekularbiologische Methoden	33
3.3.1. Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen	33
3.3.2. Extraktion von DNA	33
3.3.3. Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	34
3.3.4. Agarosegelelektrophorese	35
3.3.5. Bestimmung der DNA-Konzentration	36
3.3.6. Enzymatische Manipulation von doppelsträngiger DNA	37
3.3.7. Die Polymerase-Kettenreaktion	38
3.3.8. Mutagenese von DNA	39
3.4. Präparative Methoden	45
3.4.1. Expression von rekombinanten Proteinen	45
3.4.2. Proteinreinigung	45
3.5. Proteinbiochemische Methoden	48
3.5.1. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	48
3.5.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	49
3.5.4. Fluoreszenzmessungen	50
3.5.5. Western Blot	51
3.5.6. Analytische Gelfiltration	53
3.5.7. Enzymkinetiken	53
4. Ergebnisse und Diskussion	57
4.1. Erhöhung der katalytischen Aktivität der 5'-ProFAR-Isomerase aus <i>Thermotoga maritima</i> (tHisA) bei 37°C	57
4.1.1. Vorarbeiten	57
4.1.2. Retransformation und Umklonierung verbesserter Varianten	58
4.1.3. Sequenzierungsergebnisse der Varianten tHisA_2 und _6	59
4.1.4. Selektion <i>in vivo</i> und Test der Enzymaktivität <i>in vitro</i>	59
4.1.5. Evaluation - Anforderungen an das und Erkenntnisse aus dem <i>in vivo</i> Selektionssystem	60
4.1.6. Resümee	63
4.1.7. Diskussion	63
4.2. Identifizierung katalytisch essentieller Reste des Enzyms ProFAR-Isomerase aus <i>Thermotoga maritima</i>	65
4.2.1. Auswahl von potentiell für die Katalyse wichtiger Aminosäuren	65

4.2.2. Austausch der ausgewählten Aminosäuren durch gerichtete Mutagenese	68
4.2.3. Expression der <i>thisA</i> -Gene und Reinigung der Proteinprodukte	68
4.2.4. Biophysikalische Charakterisierung der hergestellten tHisA-Varianten	70
4.2.5. Test auf <i>in vivo</i> Komplementation	73
4.2.6. Aktivitätsmessung der tHisA-Varianten	74
4.2.7. Ansätze zur Kristallisation	76
4.2.8. Diskussion	76
4.3. Untersuchungen zur evolutionären Verwandtschaft der Enzyme HisA und HisF aus der Histidinbiosynthese von <i>Thermotoga maritima</i>	83
4.3.1. <i>In vitro</i> Messung der HisA-Aktivität von tHisF und der HisF-Aktivität von tHisA	85
4.3.2. Test auf HisA-Aktivität von tHisF <i>in vivo</i>	88
4.3.3. Verbesserung der HisA-Aktivität von tHisF	89
4.3.4. Diskussion	92
4.3.5. Bedeutung der Aminosäure Threonin 171 von tHisF	94
4.3.6. Chimäre ($\beta\alpha$) ₈ -Barrel Enzyme aus tHisA und tHisF	98
4.3.7. Diskussion	102
Literatur	105
Anhang	119
A. Alignment von HisA	119
B. Alignment von HisF	123
C. Plasmidkarten	128
D. Sequenzierung der unselektierten Klone des tHisF-Repertoire	129
E. Kalibrierungskurve der Superdex-75-Gelfiltrationssäule	142
Kurzzusammenfassung	
Summary	

Abbildungen

Abbildung 1.1.: Der Histidin-Biosyntheseweg aus Bakterien und Hefe	3
Abbildung 1.2.: Die Organisation des Histidin-Operons aus <i>Thermotoga maritima</i>	4
Abbildung 1.3.: Topologie eines TIM-Barrels	10
Abbildung 1.4.: Möglicher Mechanismus der tHisF-Reaktion	12
Abbildung 1.5.: Durch HisA und HisF katalysierte Reaktionen des Histidin-Biosyntheseweges	13
Abbildung 1.6.: Struktur von HisA und HisF aus <i>Thermotoga maritima</i>	14
Abbildung 2.1: Vergleich der Promotorregion von pDS56/RBSII und pTNA	17
Abbildung 3.1.: Schematische Darstellung der Megaprimer-Methode	40
Abbildung 4.1.: <i>In vivo</i> Komplementation des $\Delta hisA$ -Stammes	58
Abbildung 4.2.: <i>In vivo</i> Komplementation und Proteinnachweis	61
Abbildung 4.3.: Zusammenhang Thermostabilität und Aktivität	63
Abbildung 4.4.: Reaktionsschema der HisA-Reaktion	65
Abbildung 4.5.: Aminosäuresequenz von tHisA	66
Abbildung 4.6.: Aufsicht und Frontansicht des tHisA-Barrels	67
Abbildung 4.7.: SDS-PAGE der Proteinreinigung von tHisA_D127N	68
Abbildung 4.8.: Schematischer Überblick über die Expression der <i>thisA</i> -Genvarianten und die Reinigung der Proteinprodukte	69
Abbildung 4.9.: UV- Absorptionsspektren der tHisA-Varianten tHisA_H48A, _D51N, _D127N und _T164H	70
Abbildung 4.10.: Fluoreszenzmaxima von tHisA und aller Varianten	72
Abbildung 4.11.: Reaktionsschema der <i>in vitro</i> Enzymreaktion	74
Abbildung 4.12.: Modell des Produktes PRFAR im aktiven Zentrum von tHisA	77
Abbildung 4.13.: Plausible Teilschritte der von HisA katalysierten Amadori-Umlagerung von ProFAR zu PRFAR	79
Abbildung 4.15.: Strukturbasiertes Alignment von tHisA und tHisF	84
Abbildung 4.16.: tHisF hat signifikante HisA-Aktivität	86
Abbildung 4.17.: Die Varianten tHisF_D11N und tHisF_D130N zeigen keine signifikante HisA-Aktivität	87
Abbildung 4.18.: tHisF kann die <i>hisA</i> -Defizienz des HfrG6-Stammes ($\Delta hisA$) nicht komplementieren	88
Abbildung 4.19.: tHisF_T171A zeigt keine signifikante HisA-Aktivität	95
Abbildung 4.20.: Netz aus Wasserstoffbrücken am aktiven Zentrum von tHisF	97
Abbildung 4.21.: Vergleichende Darstellung der Backbone-Strukturen von tHisA und tHisF	

_____	98
Abbildung 4.22.: Struktur-basiertes Alignment der N-terminalen Aminosäuren von tHisA und tHisF _____	99
Abbildung 4.23.: Verwandte $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme katalysieren aufeinanderfolgende und ähnliche Reaktionen in der Histidin- und Tryptophanbiosynthese. _____	102
Abbildung 4.24.: Experimentelle Evidenzen für die evolutionäre Verwandtschaft von HisA, HisF, TrpF und TrpC. _____	104

Tabellen

Tabelle 1.1. : Identische Aminosäurereste beim strukturbasierten paarweise Alignment der HisA und HisF-Hälften von <i>Thermotoga maritima</i> _____	14
Tabelle 2.1.: Grösse der DNA-Fragmente des DNA-Längenstandards SmartLadder® ____	19
Tabelle 2.2.: Grösse der Markerproteine des MidRange® (Promega) _____	20
Tabelle 3.1: Megaprimer-Methode _____	41
Tabelle 3.2.: Modifizierter QuikChange-Ansatz _____	42
Tabelle 3.3.: Modifiziertes Protokoll zur Zufallsmutagenese _____	44
Tabelle 3.4.: Zusammensetzung 15 %iger SDS-PAGE-Gele _____	48
Tabelle 4.1.: Sequenzierungsergebnisse der Varianten tHisA_2 und tHisA_ _____	59
Tabelle 4.2.: Enzymatische Parameter der Varianten tHisA_2 und tHisA_6 im Vergleich zum Wildtypenzym. _____	60
Tabelle 4.3.: Änderungen in k_{cat} und K_M der Varianten tHisA_2 und tHisA_6 im Vergleich zum tHisA_wt _____	62
Tabelle 4.4.: Vergleich der <i>in vivo</i> Komplementation bei 37°C mit dem k_{cat} -Wert einiger HisA-Varianten bei 25°C _____	63
Tabelle 4.5. : Die apparenten Molekulargewichte der tHisA-Varianten _____	71
Tabelle 4.6.: Emissionsmaxima der tHisA_Varianten _____	72
Tabelle 4.7.: Ergebnisse der <i>in vivo</i> -Komplementation durch die tHisA-Varianten _____	73
Tabelle 4.8.: katalytische Parameter der tHisA-Varianten _____	75
Tabelle 4.9.: Vergleich wichtiger Eigenschaften von tHisA und tHisF _____	83
Tabelle 4.10.: tHisF zeigt HisA-Aktivität <i>in vitro</i> _____	85
Tabelle 4.11.: tHisF zeigt HisA-Aktivität <i>in vitro</i> _____	86
Tabelle 4.12.: Aminosäureaustausche im <i>thisF</i> -Repertoire _____	90
Tabelle 4.13.: Mutationen in <i>thisF_40</i> _____	91
Tabelle 4.14.: Die HisF-Aktivität von tHisF_40 _____	92
Tabelle 4.15.: Die HisF-Aktivität von tHisF_T171A _____	95
Tabelle 4.16.: Gemeinsamkeiten und Unterschiede der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme HisA, HisF, TrpF und TrpC _____	103

Zusammenfassung

1. Die meisten Enzyme aus hyperthermophilen Mikroorganismen sind extrem thermostabil, zeigen jedoch bei niedrigen Temperaturen nur geringe katalytische Aktivität. Es wurde deshalb in der Literatur diskutiert, ob diese beiden Eigenschaften sich prinzipiell gegenseitig ausschließen. Zur Klärung dieser Frage sollte die katalytische Aktivität der ProFAR-Isomerase aus der Histidinbiosynthese von *Thermotoga maritima* (tHisA) bei 37°C verbessert werden. Dazu wurde ein *in vivo* Selektionssystem etabliert, das auf der Transformation eines *Escherichia coli hisA*-Mangelstammes mit einem Repertoire aus *thisA*-Varianten beruhte. Beschleunigtes Wachstum des *hisA*-Mangelstammes auf Selektivmedium bei 37°C sollte die Aufnahme von tHisA-Varianten mit verbesserter enzymatischer Aktivität anzeigen. Dabei wurde ermittelt, dass die Wachstumsgeschwindigkeit der transformierten Zellen mit den k_{cat} -Werten der aufgenommenen Varianten korrelierte. Es stellte sich jedoch heraus, dass das System zur Selektion katalytisch verbesserter tHisA-Varianten nicht empfindlich genug war.

Das etablierte Selektionssystem diente in den weiteren Teilprojekten jedoch als wichtiges Werkzeug zur Identifizierung von Aminosäureresten, die eine wichtige Rolle in der Katalyse der HisA-Reaktion spielen und zur Untersuchung der evolutionären Verwandtschaft von HisA mit HisF, einem weiteren Enzym der Histidinbiosynthese (siehe 2. und 3.).

2. In einem ersten Schritt zur Aufklärung des Mechanismus der HisA-Reaktion, sollten die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren in tHisA identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden sechs konservierte Aminosäuren im Bereich des aktiven Zentrums durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht und der Einfluß dieser Austausche auf die enzymatische Aktivität von tHisA *in vivo* und *in vitro* getestet. Der Austausch von Aspartat 8 und 127 gegen Asparagine führte zum völligen Verlust bzw. zu drastisch verringerter katalytischer Aktivität. Der Austausch von Threonin 164 gegen Alanin oder Histidin führte zu deutlichen, jedoch weniger starken Einbußen der enzymatischen Funktion. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde ein Modell für den Katalysemechanismus aufgestellt, in dem Asp8 und Asp127 als allgemeine Säure und allgemeine Base wirken, während Thr164 vermutlich an der Aktivierung eines Wassermoleküls oder der Ausrichtung des Substrates am aktiven Zentrum beteiligt ist.

3. HisA und HisF katalysieren zwei aufeinanderfolgende Reaktionen in der Histidinbiosynthese und haben eine ähnliche $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur, was eine evolutionäre

Verwandtschaft der beiden Enzyme vermuten ließ. Eine Reihe von experimentellen Daten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhalten wurden, stützen diese Hypothese. So wurde gezeigt, dass tHisF die HisA-Reaktion *in vitro* – wenn auch mit schwacher Effizienz- katalysieren kann. Versuche zur weiteren Verbesserung dieser Fremdaktivität durch gerichtete Evolution blieben bisher jedoch erfolglos. Weiterhin wurde durch gerichteten Austausch von Aminosäuren in tHisA (siehe 2.) und tHisF der Nachweis erbracht, dass die für die Katalyse entscheidenden Aminosäuren in tHisA- und tHisF identisch sind und an der gleichen Stelle in der Struktur liegen. Fehlte eine dieser Aminosäuren in tHisF, so ging auch dessen HisA-Fremdaktivität verloren. Schließlich gelang es chimäre Proteine in löslicher Form herzustellen, wobei in tHisA und tHisF jeweils die N-terminalen 34 Aminosäuren durch die des anderen Enzyms ersetzt waren. Strukturelle und mechanistische Ähnlichkeiten von tHisA und tHisF mit der Phosphoribosylanthranilat-Isomerase (TrpF) und der Indolglycerinphosphat-Synthase (TrpC) aus der Tryptophanbiosynthese deuten auf die Existenz eines weit gespannten Netzwerkes evolutionär verwandter Phosphat-bindender ($\beta\alpha$)₈-Barrel Enzyme hin.

1. Einleitung

1.1. Hypothesen zur Entstehung der Biosynthesewege

Alle lebenden Organismen nutzen denselben Pool an Aminosäuren in ihren Proteinen. Gleiches ist für die Nukleinsäuren in DNA und RNA gültig, trotzdem ist die Ausbildung einer enormen Vielfalt an Strukturen, Metaboliten und die Durchführung verschiedenster Funktionen auf Basis dieser identischen Grundbausteine möglich. Hoch organisierte biopolymere Strukturen wie Enzyme, die als Biokatalysatoren in den Stoffwechselwegen dienen, zeigen den momentanen evolutiven Stand in Hinblick auf Funktion und Stabilität. Netzwerke von Biosynthese- und Abbauwegen sind über die Grenzen der drei Domänen des Lebens hinweg streng konserviert. Ein Grund dieser Konservierung liegt wahrscheinlich darin, dass geringste Abweichungen in den essentiellen Mechanismen des Stoffwechsels einen tödlichen Effekt auf den Organismus haben (Creighton, 1993). Über die Entstehung des Stoffwechsels und der darin enthaltenen Biosynthesewege wurden verschiedenste Hypothesen entwickelt.

Die Diskussionen über den Ursprung der Stoffwechselwege basieren meist auf einer Extrapolation (Lazcano und Miller, 1999) der vorhandenen metabolischen Routen zurück zum letzten gemeinsamen Vorläufer (*last common ancestor*, LCA). Andere Hypothesen legen den Ursprung biochemischer „*Pathways*“ in die Nähe des Lebensursprungs. Die Stoffwechselwege sollten sich aus den verfügbaren Komponenten der „prebiotischen Suppe“ entwickelt haben.

Erste Schritte, den Ursprung der heute vorhandenen Stoffwechselwege zu erklären, erfolgten bereits Mitte des letzten Jahrhunderts. Horowitz postulierte in seiner Arbeit „*On the evolution of biochemical syntheses*“ (1945), dass nur das Endprodukt eines Syntheseweges dem Organismus einen entscheidenden Selektionsvorteil bietet. Aufbauend auf dieser Annahme entwickelte er die Hypothese, dass Biosynthesewege ausgehend vom letzten Enzym eines Syntheseweges entstanden sein könnten. Enzyme, die im heutigen Syntheseweg vorgeschaltete Reaktionen katalysieren, sollten sich nach und nach aus diesem Enzym entwickelt haben. Die Hypothese der retrograden Evolution etabliert eine Verbindung zwischen prebiotischer Chemie und der Entwicklung metabolischer Stoffwechselwege. Im Gegensatz zu dieser von Horowitz entwickelten Hypothese, stellt Granick (1965) in seiner Arbeit eine Entwicklung der Enzyme eines Biosyntheseweges in Reihenfolge des Auftretens im Syntheseweg vor. Grundlage des Modells ist die Nützlichkeit eines jeden Intermediates für den Organismus. Bei der

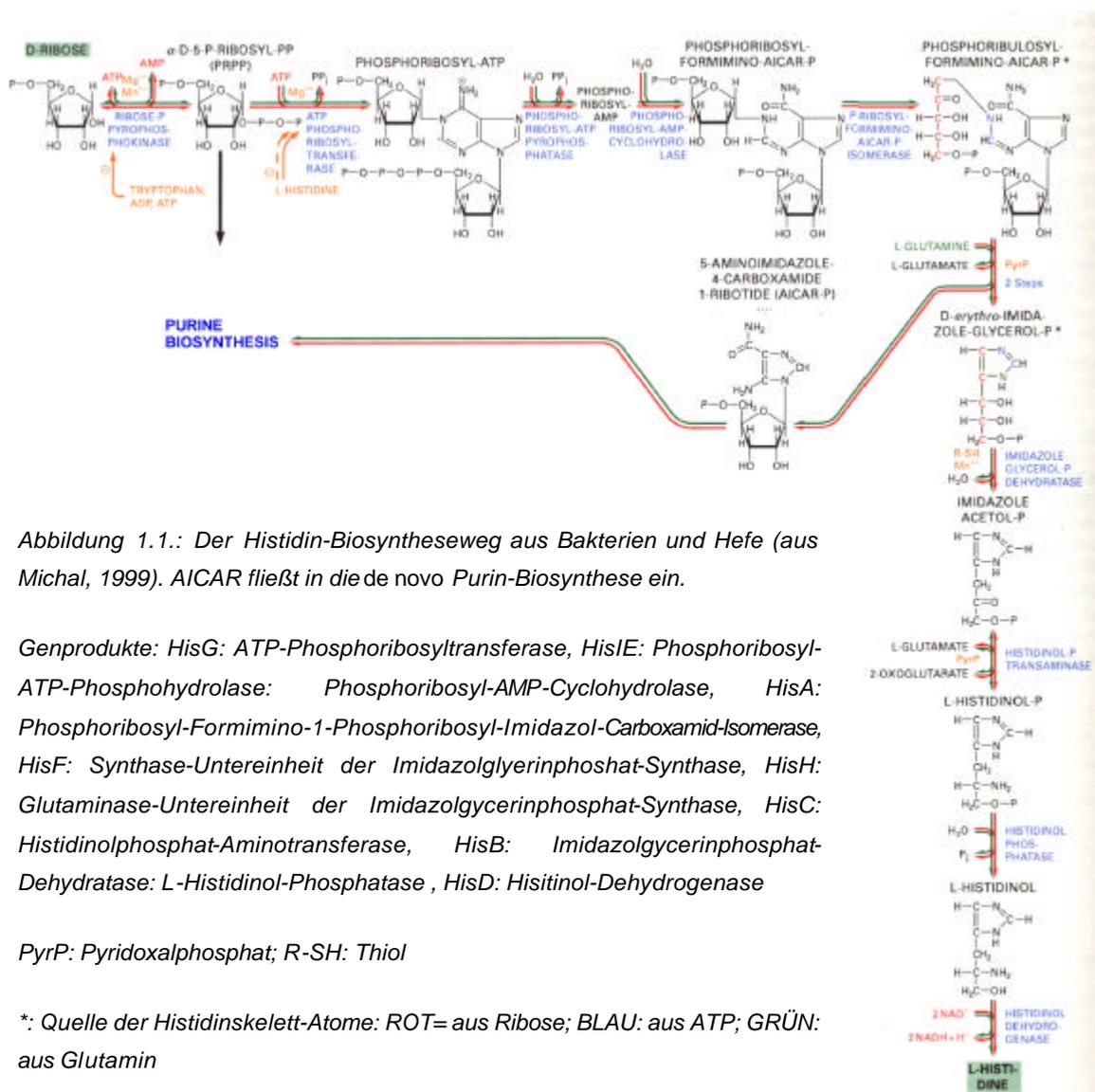
Synthese von Chlorophyll, Isoprenlipiden (Ourisson und Nakatani, 1994) und Häm ist diese Entwicklungsrichtung gegeben, bei Synthesen von Aminosäuren oder der Synthese des Purins sind die Intermediate des Syntheseweges aber nicht von Nutzen für den Organismus. Eine zufällige Aneinanderreihung von Enzymen mit ähnlicher Struktur und Funktion wurde von Waley (1969) als Hypothese zur Entstehung der Biosynthesewege vorgeschlagen. Nachdem bekannt wurde, dass *cluster* funktionell gekoppelter Gene (Jacob und Monod, 1961 am Beispiel des Lac-Operons) ein weitverbreitetes Phänomen in Bakterien sind, deutete Horowitz (1965) diese *cluster* als das Resultat früherer Duplikationsereignisse.

Als problematisch beim Modell der retrograden Evolution betrachtete Jensen (1976, 1996) die Notwendigkeit, dass alle Zwischenprodukte eines Biosyntheseweges vorhanden und über lange Zeit verfügbar sein müssen. Aufgrund der Labilität vieler Stoffwechsel-Intermediate (Larralde *et al.*, 1995; Jensen 1976) ist eine Entwicklung von Synthesewegen in retrograder Richtung schwer vorstellbar. So sind z.B. für die Histidin- und Tryptophanbiosynthese mehrere instabile Substrate bekannt (Davisson *et al.*, 1994, Sterner *et al.*, 1996, Schmidt, 1999). Roy (1999) greift die Problematik instabiler Zwischenprodukte wieder auf, indem er eine Evolution der Biosynthesewege in Sprüngen postuliert. Ausgangspunkt dieser Hypothese sind dabei multifunktionelle Enzyme, die mehrere zentrale Reaktionen des Stoffwechselweges katalysieren konnten. Roy geht in seinem Evolutionsmodell davon aus, dass alle Enzyme eines Syntheseweges aus einem gemeinsamen Vorgängerenzym entstanden sein könnten.

Jensen (1976) und Ycas (1974) verknüpfen in ihrer Patchwork-Hypothese zum ersten Mal verschiedene Biosynthesewege. Darin katalysieren eine Reihe von nicht-regulierten Enzymen mit geringer Substratspezifität ähnliche Reaktionen in verschiedenen Synthesewegen. Erst durch das Ereignis einer Genduplikation mit nachfolgender Diversifikation entwickelten sich aus diesen Vorläufern mit geringer Substratspezifität hochspezialisierte „moderne“ Enzyme.

1.2. Histidin-Biosynthese

Die Histidinbiosynthese scheint ein sehr alter Stoffwechselweg zu sein (Lazcano und Miller, 1999; Lazcano, 1992). Da die Gene des Histidin-Syntheseweges in allen drei phylogenetischen Domänen gefunden werden, war wahrscheinlich bereits vor der Trennung von Bacteria, Archaea und Eucarya, die Fähigkeit die Aminosäure Histidin zu synthetisieren etabliert (Alifano *et al.*, 1996, Bult *et al.*, 1996, Charlebois *et al.*, 1997).



Die aktivierte Verbindung Phosphoribosyl-Pyrophosphat reagiert mit dem Purinring von ATP, der danach aufgebrochen wird. Nach einer Isomerisierung (HisA) kommt es durch Spaltung des Moleküls (HisF) zur Freisetzung von AICAR. Histidin hemmt den ersten spezifischen Schritt des Reaktionsweges, die ATP-Phosphoribosyltransferase (HisG).

Histidin (chemisch: 2-Amino-3-(1H-imidazol-4-yl)propansäure) wird oft als funktionelle Gruppe am aktiven Zentrum von Enzymen gefunden (Weber und Miller, 1981). Dies ist durch die spezielle Eigenschaft der Imidazolgruppe bedingt, die bei physiologischem pH-Wert sowohl als allgemeine Säure als auch als allgemeine Base wirken kann (pK_2 Histidin = 6,05).

Da Histidin als Stickstoffquelle für seine Synthese ATP und PRPP benötigt, vermutete White (1976) als „Relikt der RNA-Welt“, dass das Histidinmolekül aus einer katalytisch aktiven RNA entstanden sein könnte.

In Enterobakterien beinhaltet die Histidinbiosynthese elf enzymatische Reaktionen, die von acht Enzymen katalysiert werden (Abbildung 1.1.). Die Genprodukte von *hisD*, *hisB* und *hisI-E* sind bifunktional, *hisH* und *hisF* kodieren für ein heterodimeres Enzym (Winkler, 1986). In anderen Mikroorganismen wird HisB durch zwei Gene (*hisBp* und *hisBd*) kodiert. Ebenso wird HisI-E in Archaeen durch zwei getrennte Gene kodiert (Fani *et al.*, 1995, Bult *et al.*, 1996, Charlebois *et al.*, 1997). In Eukarya ist das *hisI-E*-Gen mit dem N-Terminus des *hisD*-Gens fusioniert (Fani *et al.*, 1995).

Histidin Gencluster aus *Thermotoga maritima*

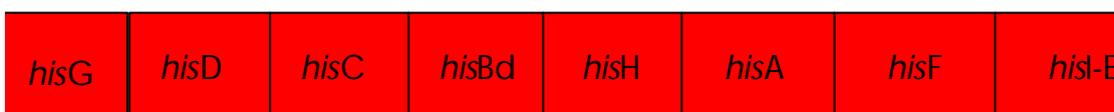


Abbildung 1.2.: Die Organisation des Histidin-Operons aus *Thermotoga maritima* (modifiziert nach Thoma *et al.*, 1998). Die Gene des Clusters überlappen größtenteils, die in *Thermotoga maritima* verwendeten Startcodone sind selten.

Die strukturelle Organisation der *his*-Gene in verschiedenen Spezies ist nicht stark konserviert. Wie auch bei anderen Stoffwechselwegen beobachtet (Dandekar *et al.*, 1998), zeigt sich für den Histidin-Biosyntheseweg ein vielfältiges Bild der Operonstruktur. Obwohl die *his*-Gene in Bakterien (Carlomagno *et al.*, 1988) und dem Archaeon *Sulfolobus solfataricus* (Charlebois *et al.*, 1997) in Operons organisiert sind, sind sie in anderen Organismen über das komplette Chromosom verteilt (Bult *et al.*, 1996). In *Thermotoga maritima* (Huber *et al.*, 1986), einem hyperthermophilen Bakterium, das im phylogenetischen Stammbaum (Woese, 1990) dem LCA sehr nahe ist, ist ebenfalls ein Operon vorhanden (Abbildung 1.2.). Die Organisation des Genclusters aus *Thermotoga maritima* stimmt mit dem Operon aus *E. coli* überein.

Innerhalb der Histidin-Biosynthese gibt es Hinweise, dass *hisB* und *hisI-E* aus Genfusion hervorgegangen sein könnten (Fani *et al.*, 1994, 1995, 1998). Ein Modell für die Evolution von *hisB* postuliert eine Entwicklung aus zwei unabhängigen Domänen, einer Domäne für die Phosphatase-Aktivität, einer Domäne für die Deydratase-Aktivität. Durch Fusion zweier unabhängiger Cistronen (in *E. coli*; Fani *et al.*, 1998). Dieses Postulat wird durch die Organisation des *hisB* in verschiedenen Organismen untermauert, wo es in zwei separaten Genen vorliegt. Die Gene von *hisI* und *hisE* sind in *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. cerevisiae* und anderen Organismen fusioniert, nicht aber in *M. vanniellii* und *A. brasilense*. Zwei Hypothesen könnten diese Differenz erklären: das bifunktionale *hisI-E* wurde mehreren Teilungen unterzogen, oder die einzel etablierten Gene wurden in unabhängigen Fusionsschritten in verschiedenen Organismen vereinigt (Fani *et al.*, 1995).

Aus *hisA*, *hisH*, *hisF* und *hisC* sollten paraloge Genduplikation entstanden sein, die vor Trennung der drei Domänen stattfand (Fani *et al.*, 1994, 1995, 1998). So wird für HisA und HisF ein gemeinsamer Vorläufer postuliert, aus dem durch Duplikationsereignisse die heutigen *hisA* und *hisF*-Gene entstanden sind. In *Pseudomonas aeruginosa* wurden Hinweise für lateralen Gentransfer gefunden, da u. a. *hisH* und *hisF* außerhalb des Operons liegen und einen für andere Gene des Organismus untypischen GC-Gehalt aufweisen (Burrows *et al.*, 1996, Fani *et al.*, 1998).

Der Histidin-Syntheseweg ist eng mit anderen Biosynthesewegen verknüpft. Neben der Synthese von Histidin, werden die Ausgangssubstrate, PRPP und ATP, auch bei der Synthese von Purinen, Pyrimidinen, Folaten und Tryptophan benötigt. AICAR, eines der Produkte, das im Histidin-Syntheseweg entsteht, wird in der *de novo* Synthese von Purinen verwendet und bildet so eine Verknüpfung zwischen diesen beiden Synthesewegen (Abbildung 1.1.). AICAR, kann in wenigen Schritten zu ATP umgesetzt werden, es kommt somit zur Wiederherstellung von ATP, das vorher bei der Histidin-Biosynthese verwendet wurde (Michal, 1999).

Identitäten von 28% bzw. 21% zwischen den Aminosäuresequenzen der Glutaminasen HisH und TrpG aus *E. coli* bzw. *Thermotoga maritima* (Beismann-Driemeyer, 2000) deuten auf eine evolutionäre Verwandtschaft zwischen Enzymen der Histidin- und der Tryptophanbiosynthese hin (Zalkin und Smith, 1998). Dafür spricht auch die Ähnlichkeit zwischen HisA und TrpF, welche beide eine Amadori-Umlagerung katalysieren und deren Strukturen jeweils ein $(\beta\alpha)_8$ -Barrel bilden (Priestle *et al.*, 1987, Wilmanns *et al.*, 1992; Lang *et al.*, 2000). Jürgens *et al.* (2000) ist es gelungen, durch gerichtete Evolution auf dem Proteingerüst von HisA aus die TrpF-Aktivität zu etablieren.

Für die Synthese von Histidin wird sehr viel Energie aufgewendet, pro Mol Histidin werden 41 Mol ATP hydrolysiert (Brenner und Ames, 1971). Deshalb ist sowohl die Transkription als auch die Translation des His-Operons streng reguliert.

Die Transkription des Operons wird durch Guanosin-5'-diphosphat-3'-diphosphat (ppGpp) angeregt, AMP als Indikator eines niedrigen Energielevels in der Zelle hat einen hemmenden Effekt auf die Histidin-Synthese. Neben dem Tryptophan-, dem Leucin- und dem Phenylalaninoperon verfügt auch der Histidin-Gencluster über den Regulationsmechanismus der Attenuation (*attenuation*, engl. Abschwächung; Kansei, 1974, Yanofsky 2001). Gefunden wurde dieser Effekt bei Tryptophan-Repressor-negativen Mutanten, die nicht wie erwartet eine konstitutive Expression der Tryptophan-Biosynthesenzyme zeigten, sondern auf Gabe von Tryptophan mit Stop der Operon-Transkription reagierten. Diese Ergebnisse legten die Existenz einer Terminationsstelle

für Transkription nahe. Eine nähere Betrachtung der Leit-RNA zeigte, dass das offene Leseraster zwei aufeinanderfolgende Tryptophan-Codons enthält. Bei Anwesenheit von Tryptophan wird das offene Leseraster in der Leit-RNA ohne Probleme translatiert, und die gebundenen Ribosomen verzögern ihren Lauf erst am Stop-Codon. Das ermöglicht die Ausbildung einer Terminationsschleife im 3'-Bereich der Leit-RNA und die Ablösung der RNA-Polymerase von der DNA. Fehlt Tryptophan, werden die Ribosomen vorzeitig an den beiden Trp-Codonen im offenen Leseraster aufgehalten. Dadurch kann sich ein anderes Muster an Sekundärstrukturschleifen ausbilden, die Termination der Transkription wird umgangen. Es erfolgt die Synthese der Tryptophan-Biosyntheseenzyme. Letztendlich stellte sich heraus, dass nicht Tryptophan selbst, sondern die Menge an beladener tRNATrp das Signal für Transkriptionstermination war (Yanofsky, 2001). Die Attenuation in der Histidin-Biosynthese wird durch sieben Histidinreste hintereinander bewirkt (Yanofsky, 1981).

Zusätzlich wird die Aktivität von HisG, des ersten Enzyms des Biosyntheseweges durch das Endprodukt Histidin inhibiert (Blasi und Bruni, 1981) durch den Spiegel seines Produkts PRATP reguliert (Yanofsky, 1981).

1.3. Enzymatische Aktivität thermostabiler Proteine

Enzyme sind hoch effiziente und spezifische Katalysatoren, welche eine Vielzahl chemischer Reaktionen beschleunigen. In ihrer natürlichen Umgebung müssen Enzyme einerseits stabil sein, um ihre Struktur aufrecht erhalten zu können. Andererseits müssen sie flexibel genug bleiben, um konformationelle Änderungen während des Katalyseprozesses zu ermöglichen. Enzyme extremophiler Organismen müssen beide gegenteiligen Anforderungen gleichzeitig erfüllen und Stabilität sowie Aktivität des Enzyms unter extremen Bedingungen, z.B. Hitze, hohe Salzkonzentration oder harschen pH-Bedingungen, gewährleisten (Hough und Danson, 1999; Sterner und Liebl, 2001).

Für die Thermostabilität von Proteinen aus hitzeliebenden Mikroorganismen konnte man intrinsische Faktoren wie eine erhöhte Anzahl von Salzbrücken, eine kompaktere Struktur, Fixierung der N- und C-Termini der Peptidkette und eine Erhöhung des Oligomerisierungsgrades finden (Jaenicke und Böhm, 1998).

Bei einer Erhöhung der Temperatur um 10°C verdoppelt sich etwa die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion (Harcourt, 1867). Ein Plot des Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten und dem reziproken Wert der absoluten Temperatur (Arrhenius, 1889) zeigt einen linearen Zusammenhang. Dies bedeutet, dass alle Reaktionen, sowohl enzymatische wie auch spontane, in thermophilen Organismen schneller ablaufen als bei mesophilen Organismen. Nach Arrhenius sollte man für hyperthermophile Organismen

erwarten, dass die Aktivität ihrer Enzymen höher ist als die mesophiler Organismen.

Hyperthermophile Organismen zeigen bei niedrigen Temperaturen oft nur sehr geringe enzymatische Aktivität (Jaenicke, 2000).

Sequenzvergleiche zeigen, dass katalytisch essentielle Reste homologer Enzyme aus Mesophilen und Hyperthermophilen konserviert sind. Die beobachteten Differenzen in ihren katalytischen Eigenschaften müssen daher aus Veränderungen des Moleküls hervorgehen, die unabhängig von den katalytisch essentiellen Resten sind. Jaenicke (2000) postulierte, dass die niedrige Aktivität der thermostabilen Enzyme bei Raumtemperatur auf ihre hohe Rigidität zurückzuführen ist. Diese Starrheit der Proteine wird bei den hohen Umgebungstemperaturen, die in hyperthermophilen Habitaten vorherrschen, vernachlässigbar. Bei ihrer optimalen Umgebungstemperatur (T_{opt}) sind die Enzyme aus Hyperthermophilen in der Regel so aktiv, wie die mesophilen Vertreter bei ihren korrespondierenden physiologischen Temperaturen (Jaenicke, 1991).

Es wird vermutet, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Stabilität und Rigidität der Proteine besteht. Steigerungen der Proteinrigidität scheinen die Thermostabilität zu erhöhen (Wray *et al.*, 1999; Shoichet *et al.*, 1995), gleichzeitig aber die katalytische Aktivität bei niedrigen Temperaturen zu verringern. Gut untersuchte Beispiele sind die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydroxygenase (GAP-DH) aus *Thermotoga maritima* und die Isopropylmalat-Dehydrogenase aus *Thermus thermophilus*. Beide Enzyme zeigen bei 25°C deutlich langsamere H-D-Austauschraten im Vergleich zu ihren orthologen Enzymen aus Hefe oder *E. coli* (Wrba *et al.*, 1990; Závodszky *et al.*, 1998). In Anwesenheit geringer Konzentrationen an chaotropem Agens (Guanidiniumchlorid) kann eine Steigerung der katalytischen Aktivität der *Thermotoga* GAP-DH beobachtet werden (Rehaber und Jaenicke, 1992).

1.4. TIM-Barrel Proteine

Eine enorme Anzahl zur Verfügung stehender Aminosäuresequenzen und dreidimensionaler Strukturen erlaubt es herauszufinden, wie die effizienten und hoch spezifischen Enzyme der heute vorliegenden Stoffwechselwege evolutiv verknüpft sind und wie sie sich aus weniger spezifischen und effizienten Vorläufern entwickelt haben könnten (Gerlt und Babbitt, 2001).

„Moderne“ Enzyme werden in Familien (*families*, klare evolutive Verwandtschaft), Superfamilien (*superfamilies*, möglicher gemeinsamer evolutionärer Ursprung) und Faltungsmotive (*folds*) eingeteilt (Murzin *et al.*, 1995). Proteine haben dann eine gemeinsame Faltungsstruktur, wenn der Hauptanteil der Sekundärstrukturelemente in gleicher Weise arrangiert ist und identische topologische Verknüpfungen aufweist.

Mitglieder der Proteinfamilien, die durch Duplikation und Diversifikation entstanden sein könnten, werden durch identische Topologie der Schwestermoleküle, sowie analoge Lage katalytisch wichtiger Aminosäure-Seitenketten gekennzeichnet (Jensen, 1976, Lang *et al.*, 2000; Traut und Temple, 2000). Faltungstopologien tolerieren eine extrem hohe Sequenzvariabilität, ohne dass ihre dreidimensionale Struktur signifikant verändert wird (Bowie *et al.*, 1990, Hegyi und Gerstein, 1999).

Divergente Evolution hin zu hoher Substratspezifität führt zu einer starken Veränderung der Primärstruktur, so dass die Sequenzähnlichkeit verwandter Proteine unter einen Schwellenwert von 20% sinken kann. Auch für Proteine mit ähnlicher Enzymaktivität ist dies der Fall, da nur sehr wenige spezifische Reste für die Katalyse verantwortlich sind (Martin *et al.*, 1998, Traut und Temple, 2000). Im speziellen Fall der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Faltung finden sich Enzyme, die den gleichen Reaktionstyp innerhalb unterschiedlicher Biosynthesewege katalysieren und eine Sequenzidentität von nur 10% aufweisen (Jürgens *et al.*, 2000). Dies hatte die konträren Annahmen von divergenter und konvergenter Evolution zur Folge. Mehrere Studien, basierend sowohl auf Sequenzvergleichen als auch auf strukturellen Evidenzen, tendieren entweder zu divergenter Evolution durch Weiterentwicklung eines Vorläuferproteins (Farber und Petsko, 1990, Farber, 1993, Reardon und Farber, 1995) oder zu konvergenter Evolution, die zu einem stabilen Faltungstypus führte (Farber, 1993, Lesk *et al.* 1989). Aktuelle experimentelle Arbeiten deuten in speziellen Fällen eher auf eine divergente Entwicklung der Synthesenzyme hin (Altamirano *et al.*, 2000^{*}; Jürgens *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2000; Höcker *et al.*, 2001b; Henn-Sax *et al.*, in Druck).

Etwa 10% aller bisher gelöster Proteinstrukturen sind $(\beta\alpha)_8$ - oder TIM-Barrel-Proteine (Hegyi und Gerstein, 1999; Gerlt, 2000). Die Struktur des $(\beta\alpha)_8$ -Barrels wurde zuerst bei der Triosephosphatisomerase (TIM) von *Gallus gallus* gefunden (Banner *et al.*, 1975). Die TIM, ein Enzym der Glykolyse, katalysiert die Umlagerung von Dihydroxyacetonphosphat in Glycerinaldehyd-3-phosphat, eine intramolekulare Redoxreaktion. Die Triosephosphatisomerase ist ein kinetisch „perfektes“ Enzym: Die Reaktion ist diffusions-kontrolliert, d. h. geschwindigkeitsbestimmend für die Katalyse ist das Aufeinandertreffen von Enzym und Substrat (Knowles, 1991).

Das TIM-Barrel Faltungsmotiv ist durch acht parallele β -Stränge charakterisiert, die im Zentrum der Domäne so angeordnet sind, dass sie mit ihren Nachbarn Wasserstoff-

*

Altamirano MM, Blackburn JM, Aguayo C, Fersht AR.

retraction: Directed evolution of new catalytic activity using the alpha/beta-barrel scaffold.
Nature. 2002 May 23;417(6887):468.

Brücken ausbilden. Im „Minimal-TIM-Barrel“ sind die parallelen β -Stränge ausschließlich durch amphipatische α -Helices verbunden, die um das Fass herum angeordnet sind. Die hydrophobe Seite der Helices zeigen zum β -Fass hin (zwischen Helices und β -Sheet kommt es zur Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen, hier ist der hydrophobste Teil des TIM-Barrels; Nagano *et al.*, 1999), die hydrophilen Reste interagieren mit dem wässrigen Medium.

Das $(\beta\alpha)_8$ -Grundmuster ist stabil gegenüber Variationen der Sekundärstruktur. Fehlen eines β -Stranges (Babbitt *et al.*, 1996) oder eine irreguläre Anzahl von α -Helices (Xyloseisomerase, Whitlow *et al.*, 1991), sowie Einfügen kompletter Faltungsdomänen (α -Amylase aus *Bacillus licheniformis*, Hwang *et al.*, 1997) konnten bereits gezeigt werden. Wie Luger *et al.* (1989) am Enzym Phosphoribosylanthranilat-Isomerase zeigen konnten, konnten Circular-Permutationen des Barrels die Stabilität und Faltung des Enzyms nicht beeinträchtigen.

Die Modulstruktur des TIM-Barrels war schon in den achtziger Jahren Motivation, ein $(\beta\alpha)_8$ -Barrel aus repetitiven $\beta\alpha$ -Einheiten ($\beta\alpha^I$) zu konstruieren (z.B. Barbarellin und Octarellin, Richardson *et al.*, 1987; Goraj *et al.*, 1990). Für Octarellin konnte die Ausbildung stabiler α -Helices und β -Faltblätter durch Aufnahme von CD-Spektren gezeigt werden. Die Ausbildung der inneren Packung des Barrels war jedoch nicht optimal (Beauregard *et al.*, 1991). Optimierungen des Octarellins ergaben, dass eine gute Barrel-Packung durch vier $\beta\alpha^I\beta\alpha^{II}$ -Module wesentlich besser erreicht werden können, als durch acht $\beta\alpha^I$ -Strukturmodule (Sander, 1991; Houbrechts *et al.*, 1995).

TIM- oder $(\beta\alpha)_8$ -Barrel zeigen eine Polarität; sie besitzen eine Region am „Boden“ des Fasses, die hauptsächlich die Stabilität des Barrels beeinflusst. Am C-Terminus des Fasses („Oberkante des Fasses“) sind die Reste lokalisiert, die für die katalytische Aktivität der TIM-Barrel-Proteine verantwortlich sind (Farber und Petsko, 1990; Pujardas und Palau, 1997, 1999; Lang *et al.*, 2000). Vereinfacht kann man von einer Arbeitsteilung zwischen „Katalyse- und Stabilitäts-Pol“ sprechen (Höcker *et al.*, 2001b). So können durch die Schleifen zwischen α -Helices und β -Strängen der N-terminalen Seite keine Substrate oder Inhibitoren gebunden werden. Vergleicht man die Sequenz-Ähnlichkeit dieser Loopregionen, so sind diese geringer als im Rest der Gesamtstruktur (Pujardas *et al.*, 1996). Urfer und Kirschner (1992) haben durch interne Duplikationen des $\beta\alpha$ -Bereichs herausgefunden, dass ein $(\beta\alpha)_{8+1}$ -Barrel nur dann gefaltet werden und eine enzymatische Aktivität ausüben kann, wenn die Duplikation auf der C-terminalen Seite des Fasses eingebracht wird. Sie schlossen aus diesem Ergebnis eine wichtige Rolle der N-terminalen Loops für die Stabilität des Barrels.

TIM-Barrel-Proteine sind in allen EC-Klassen, mit Ausnahme der Ligasen, vertreten

(Pujadas und Palau, 1999; TIM-Datenbank).

Die $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Faltung ist eine der am häufigsten beobachteten Domänenstrukturen (Bränden und Tooze, 1999). Neben der Rossmann-, Ferredoxin-, alpha-beta-Hydrolase und der P-Loop-Hydrolase-Faltung gehört die $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Faltung zu den wahrscheinlich ursprünglichsten Faltungsmotiven (Hegyi und Gerstein, 1999).

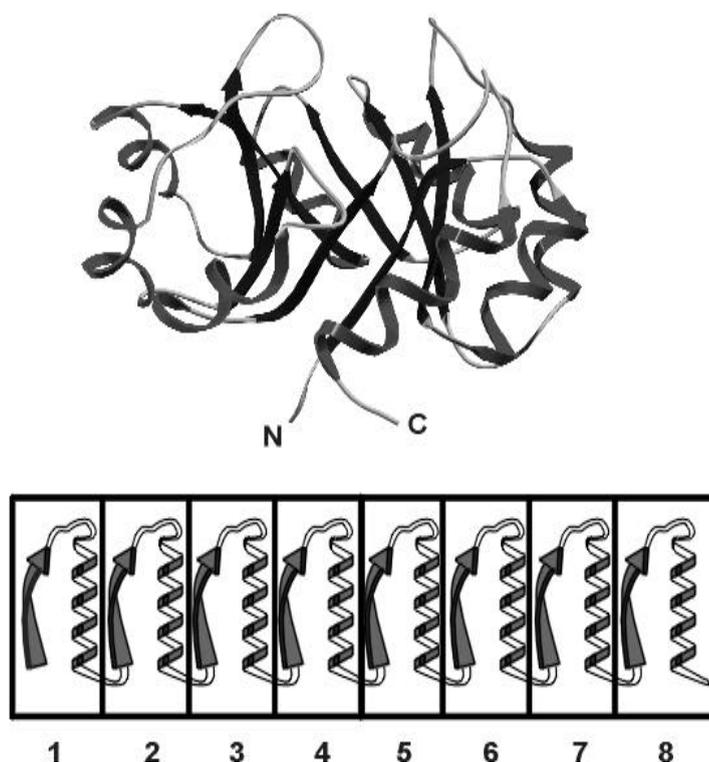


Abbildung 1.3.: Topologie eines TIM-Barrels (modifiziert nach Henn-Sax et al., 2001) . OBEN: Aufsicht, C-terminales Ende der parallelen *b*-Stränge zeigt nach oben. UNTEN: Schema der Sekundärstrukturelement-Abfolge eines TIM-Barrels. Minimalausstattung sind acht identische *ba*-Module (Pujadas und Palau, 1999).

Für nur fünf TIM-Barrel-Proteine (Concavalin B, Narbonin, Nonfluorescent Flavoprotein, Phosphodiesterase Homology Protein und Yeast Hypothetical Protein; TIM Datenbank; Pujadas und Palau, 1999) ist bisher keine enzymatische Aktivität bekannt. Im Falle von Narbonin und Concavalin B wurde von Terwisscha van Scheltinga *et al.* (1996) auf das Fehlen katalytisch essentieller Aminosäurereste hingewiesen.

Da das Faltungsmotiv $(\beta\alpha)_8$ -Barrel trotz unterschiedlichster Primärstrukturen ausgebildet werden kann, stellt das TIM-Barrel eine sehr gute Matrix zur Modifikation der enzymatischen Aktivität dar. So konnten verschiedene enzymatische Aktivitäten auf TIM-Barrel-Proteinen etabliert werden. Als Beispiele seien hier die Umwandlung der *E. coli* IGPS zur PRAI (Altamirano *et al.*, 2000) und die Etablierung einer TrpF-Aktivität auf dem

Proteingerüst HisA (Jürgens *et al.*, 2000) genannt.

1.5. *tHisA* und *tHisF* – Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Enzyme aus *Thermotoga maritima*

Das *hisA*-Gen aus *Thermotoga maritima* (*thisA*) kodiert für die ProFAR-Isomerase (HisA), welche den vierten Schritt der Histidin-Biosynthese (Abbildung 1.1.) katalysiert. Es handelt sich dabei um die Umwandlung von ProFAR – einer Aminoaldose – zu PRFAR, einer Aminoketose (Margolis und Goldberger, 1966). Diese Isomerisierungsreaktion, bei der es sich um eine Tautomerisierung eines Phosphoribosylamin-Derivates in ein entsprechendes α -Aminoketon handelt, wird Amadori-Umlagerung genannt (Isbell und Frush, 1958; Yaylayan und Huyghues-Despointe, 1994; Hommel *et al.* 1995). Für diese Reaktion werden mehrere Protonentransferschritte postuliert, die von allgemeinen Säuren und Basen katalysiert werden müssen. In *tHisA* konnten bereits zwei Reste (D8 und T164) identifiziert werden, deren Austausch gegen Asparagin oder Alanin zu einem drastischen Rückgang der enzymatischen Aktivität führt und die vermutlich an der Katalyse beteiligt sind (Schmidt, 1999).

Neben HisA katalysiert das analoge Enzym der Tryptophan-Biosynthese TrpF ebenfalls eine Amadori-Umlagerung. Die multifunktionale GTP-Cyclohydrolase 1 (FolE; EC 3.5.4.16) ein Enzym der Folat-Biosynthese kann ebenfalls eine Amadori-Umlagerung katalysieren. Hier wird vermutet, dass ein Histidin und ein Serinrest für die Katalyse verantwortlich sind (Wolf und Brown, 1969; Nar *et al.*, 1995). Amadori-Umlagerungen können auch spontan ablaufen (Creighton, 1970). Ein Beispiel einer spontanen Amadori-Umlagerung ist die Ausbildung eines Fructosederivats des Hämoglobins bei Diabetes mellitus Patienten (Brownlee und Cerami, 1981).

Das *hisF*-Gen aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* kodiert für *tHisF*, welches gemeinsam mit *tHisH* einen 1:1-Bienzymkomplex bildet, die Imidazolglyzerinphosphat-Synthase (ImGP-Synthase; Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001).

Die ImGP-Synthase gehört zur Klasse der Glutaminamidotransferasen. Transamidierungsreaktionen, die von dieser Enzymklasse katalysiert werden, gliedern sich in zwei Teilschritte, die an unterschiedlichen aktiven Zentren durchgeführt werden. Die aktiven Zentren sind häufig auf verschiedenen Polypeptiden (Untereinheiten) lokalisiert (Massieère und Badet-Denisot, 1998, Zalkin und Smith, 1998). Die Glutaminase-Untereinheit (HisH in der ImGP-Synthase) katalysiert die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und NH_3 . Der produzierte Ammoniak könnte durch einen vom Lösungsmittel

abgeschirmten Kanal zum aktiven Zentrum von HisF weitergeleitet werden (Thoma, 1998; Beismann-Dreimeyer und Sterner, 2001). Dieses „Tunneln“ konnte bereits für eine andere Glutaminamidotransferase z.B. die Carbamoylphosphat-Synthetase (Thoden *et al.*, 1997), die Glu-PRPP-Amidotransferase (Krahn *et al.*, 1997) und die Asparaginsynthase (Larsen *et al.*, 1999) beobachtet werden. Der von tHisH hergestellte naszierende Ammoniak lagert sich an der Synthase-Untereinheit (HisF in der ImGP-Synthase) an ein für die jeweilige Glutaminamidotransferase spezifisches Akzeptorsubstrat X (hier: PRFAR). Die Produkte der ImGP-Synthase-Reaktion sind ImGP und AICAR (Abbildung 1.4.).

HisF katalysiert eine mehrstufige Cycloligase-Lyase-Reaktion. Dabei wird folgender Mechanismus vorgeschlagen (Abbildung 1.4.; Beismann-Dreimeyer und Sterner, 2001):

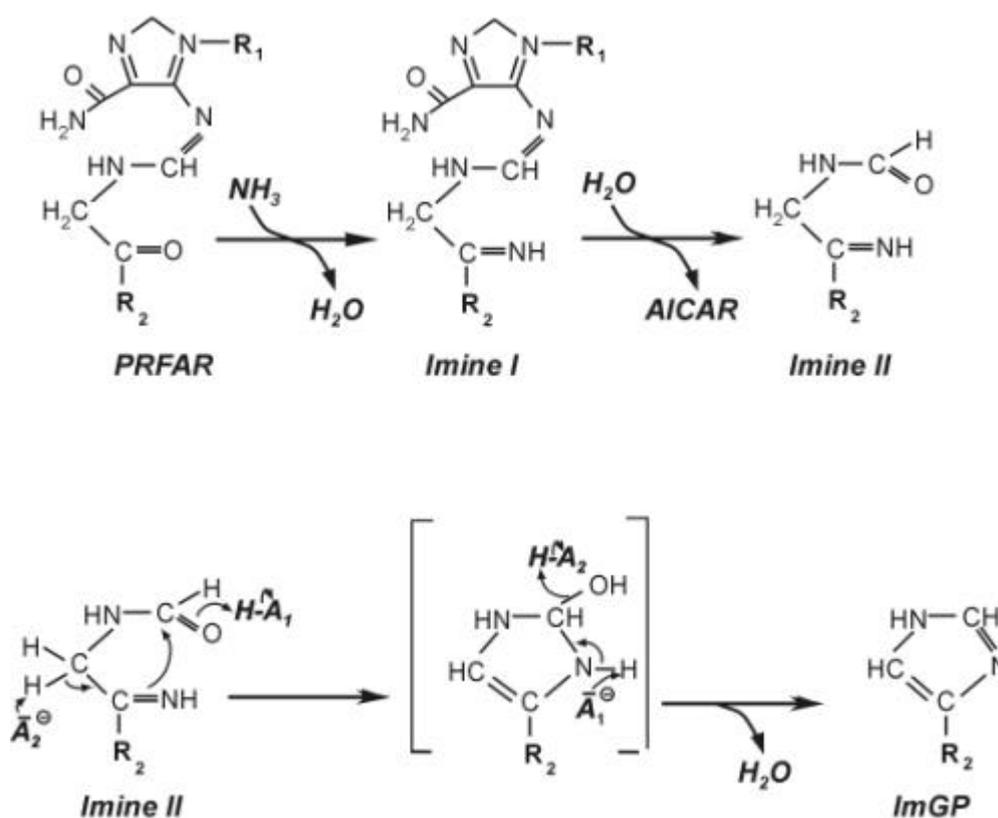


Abbildung 1.4.: Möglicher Mechanismus der tHisF-Reaktion (nach Beismann-Dreimeyer und Sterner, 2001). Einzelheiten finden sich im Text.

Der erste Schritt ist ein nukleophiler Angriff des Ammoniaks an der Carbonylfunktion des Ribuloseanteils von PRFAR unter Freisetzung von Wasser. Es wird ein Imin gebildet. Unter hydrolytischer Spaltung wird AICAR aus dem Enzym freigesetzt, das Imin II entsteht. Bisher konnten alle Reaktionen spontan ablaufen. Die Deprotonierung des C2 von Imin II führt zur Ausbildung einer Doppelbindung zwischen C1 und C2 und zur

gleichzeitigen Auflösung der Schiff-Base-Doppelbindung. Die freie Bindung greift am partiell positiven Carbonyl-Kohlenstoff der Aldehydgruppe an, der Carbonylsauerstoff wird deprotoniert. Die Bildung von ImGP erfolgt durch eine Protonierung der neu entstandenen Hydroxylgruppe. Wasser, eine gute Abgangsgruppe wird freigesetzt. Durch Deprotonierung des Ringstickstoffs entsteht der Imidazolring.

Wie bei HisA läßt die Reaktionsabfolge der HisF-Reaktion eine allgemeine Säure-Base-Katalyse zu. Die essentiellen Reste von tHisF konnten bereits als D11 und D130, zwei Aspartatresten, identifiziert werden (Beismann-Driemeyer, 2000).

tHisA und tHisF katalysieren aufeinanderfolgende Schritte der Histidin-Biosynthese in *Thermotoga maritima*. tHisA und tHisF setzen zweifach phosphorylierte Substrate um (Abbildung 1.5.).

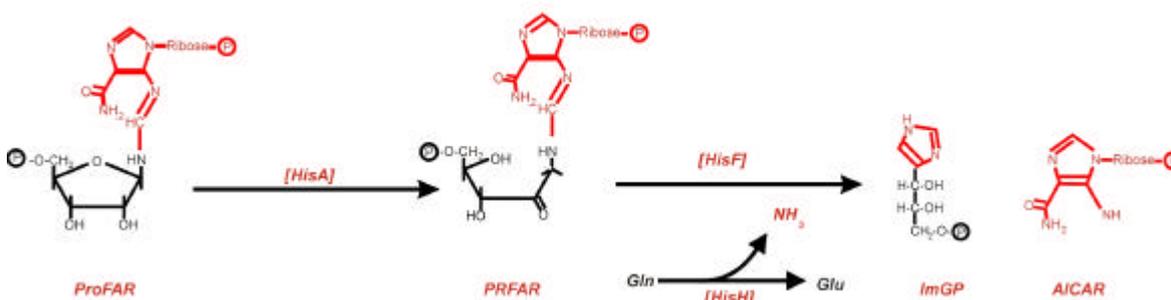


Abbildung 1.5.: Durch HisA und HisF katalysierte Reaktionen des Histidin-Biosyntheseweges

Das von HisA erzeugte Produkt ist das Substrat für HisF, deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Substratbindungstaschen von tHisA und tHisF sehr ähnlich sind.

Beide Enzyme, die bereits als $(\beta\alpha)_8$ -Barrel vorhergesagt waren (Thoma *et al.*, 1998), wurden durch Röntgenkristallographie als TIM-Barrel bestätigt (Lang *et al.*, 2000). Die Sekundärstrukturelemente der Enzyme lassen sich sehr gut superpositionieren. Die Hauptketten zeigen eine rms Abweichung von 1,79 Å. Zwischen tHisA und tHisF konservierte Reste sind an identischen Stellen des $(\beta\alpha)_8$ -Barrels lokalisiert.

Vergleicht man die Gene *hisA* und *hisF* aus der Histidinbiosynthese verschiedener Organismen, deutet dies auf eine enge Verwandtschaft der beiden Enzyme hin. Die Aminosäuresequenz der beiden Genprodukte sind in verschiedenen Mikroorganismen sehr ähnlich (Alifano *et al.*, 1996). In *Thermotoga maritima* besitzen HisA und HisF 26% identische und 41% ähnliche Aminosäuren (Thoma *et al.*, 1998).

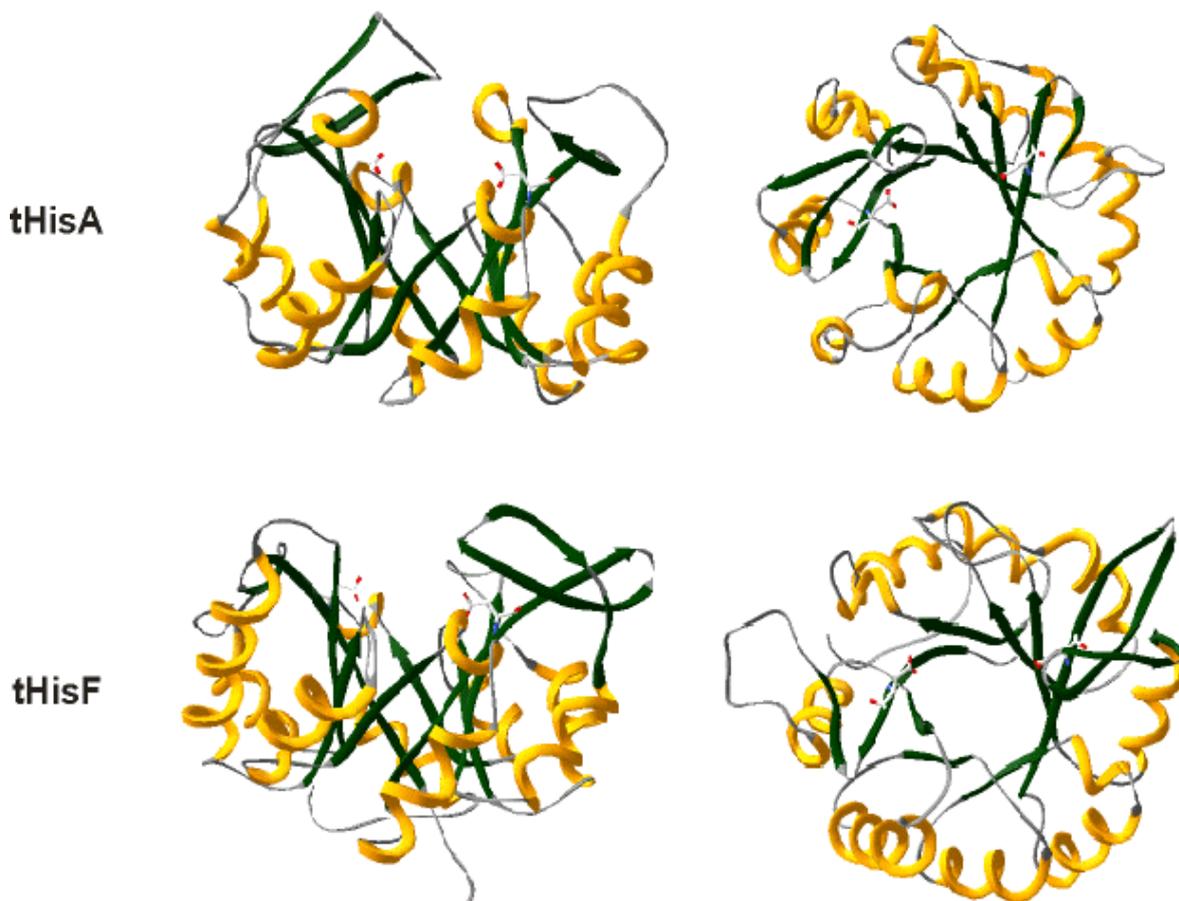


Abbildung 1.6.: Struktur von HisA und HisF aus *Thermotoga maritima* (Lang et al., 2000). **b**-Stränge dunkelgrün; **a**-Helices orange; links: Seitenansicht auf die Fässer, an deren oberen Ende die aktiven Zentren liegen; rechts: Aufsicht auf die aktiven Zentren von *tHisA* und *tHisF*. Markiert sind die Aspartatreste D8 und D127 für *tHisA*; D11 und D130 für *tHisF*.

Teilt man *tHisF* und *tHisA* in zwei Hälften, so fällt eine starke Sequenzähnlichkeit zwischen den N-terminalen (*HisF*-N, *HisA*-N) und den C-terminalen Hälften (*HisF*-C, *HisA*-C), sowie die Ähnlichkeit bei kreuzweiser Kombination auf (Tabelle 1.1.). Die Werte sind vergleichbar mit Werten, die bei *Saccharomyces cerevisiae* (Fani et al., 1995) und *Methanococcus voltae* (Fani et al., 1994) gefunden wurden (Thoma et al., 1998, Höcker, 1999; Lang et al., 2000; Höcker et al., 2001a).

Tabelle 1.1.: Identische Aminosäurereste beim strukturbasierten paarweise Alignment der *HisA* und *HisF*-Hälften von *Thermotoga maritima* (aus Lang et al., 2000).

Sequenz- alignment strukturbasiert	HisA-N	HisF-N	HisA-N	HisA-C	HisA-N	HisA-C
	HisA-C	HisF-C	HisF-N	HisF-C	HisF-C	HisF-N
% identische Reste	23	16	26	16	15	22

Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten schlugen Fani *et al.* schon 1994 ein Evolutionsmodell vor, in dem von einem gemeinsamen Vorgängermolekül halber Länge ausgegangen wird, aus dem *hisA* und *hisF* durch zwei Duplikationsschritte entstanden sind. Die klare interne Duplikation von *hisA*, kann so in anderen nah verwandten homologen TIM-Barrel-Strukturen nicht beobachtet werden. Copley und Bork (2000) gehen nicht nur davon aus, dass der letzte gemeinsame Enzymvorläufer HisA am ähnlichsten war, sondern dass ein HisA-ähnliches Protein der Vorläufer zu einem heute existenten HisF war.

Ein wichtiger Unterschied zwischen HisA und HisF liegt in ihrem Assoziationsgrad. Während HisA als Monomer vorliegt, bildet HisF mit HisH ein Heterodimer (Buchanan, 1973). In Eukaryoten dagegen sind die Gene der *hisF*- und *hisH*-Homologen fusioniert (HIS7 in *Saccharomyces*, Kuenzler *et al.*, 1993). Die Duplikation und Diversifikation von HisA und HisF muss daher vor der Rekrutierung von HisH stattgefunden haben.

1.6. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Promotionsarbeit hatte folgende Zielsetzung:

1. Untersuchung des Zusammenhangs zwischen hoher Thermostabilität und schwacher katalytischer Aktivität bei niedrigen Temperaturen. Dazu sollte die enzymatische Aktivität von HisA aus *Thermotoga maritima* bei 37°C mittels gerichteter Evolution verbessert werden.
2. Gewinnung erster Einblicke in den Katalysemechanismus der HisA-Reaktion. Dazu sollten konservierte Aminosäuren am C-terminalen Pol des β -Fasses ausgetauscht und der Effekt auf die katalytische Aktivität *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.
3. Experimenteller Nachweis der postulierten evolutionären Verwandtschaft von HisA und HisF. Dazu sollten beiden Enzyme daraufhin untersucht werden, ob sie die Reaktion des jeweils anderen katalysieren können. Eine dabei gemessene „Restaktivität“ sollte gegebenenfalls durch zielgerichtete Mutagenese bzw. mittels gerichteter Evolution verbessert werden.

2. Material

2.1. Bakterienstämme

***E. coli* DH5 α** (Hanahan, 1983)

[F⁻, *end* A1, *hscR*17, (*r_k⁻m_k⁻*), *supE*44, *thi*1, *recA*1, *gyrA* (Nal^r), *relA*1, Δ (*lacZYA-argF*)U169, Φ 80/*lacZ* Δ M15]

***E. coli* HfrG6** (Matney *et al.*, 1964)

λ^- , *hisA*323(stable)

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

[*trpR*, *tna2*, Δ *trpEA2*] = W3110*trpEA2*

***E. coli* UTH860** (Goldschmidt *et al.*, 1970)

ara-14, *gln* V44 (AS), *galK*2, λ^- , *hisF*860 (stable), *rpsL*145 (*strR*), *malT*1 (λ^R), *xyIA*5, *mtl*-1

***E. coli* JM 109** (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

[*recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*1, *hscR*17, *supE*44, *relA*1, λ^- , Δ (*lac-proAB*), F['], *traD*36, *proAB*, *lac*^q, Δ M15]

2.2. Vektoren

2.2.1. pDS56/RBSII/SphI (Bujard *et al.*, 1987; www.qiagen.com)

Der pDS56/RBSII/SphI-Vektor besitzt einen starken T5 Promotor und zwei aufeinanderfolgende Lac-Operator-Sequenzen. Diese vermitteln die Repression des T5-Promotors durch das Lac-Repressor Protein LacI (siehe unten). Die vorhandene synthetische Ribosomenbindestelle RBS II bewirkt hohe Translationsraten.

Erfolgreich mit pDS56/RBSII/SphI transformierte Zellen werden über ihre Ampicillin-Resistenz selektioniert, da auf dem Vektor eine funktionale β -Lactamase-Aktivität codiert ist. Eine vorhandene Sequenz der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase wird nicht abgelesen, da diese keinen erkennbaren Promotor hat (Stüber *et al.*, 1990) und zwischen den Transkriptionsterminatoren ϕ (Phage λ) und T1 (*rrn*-Operon aus *E. coli*) liegt. Das Plasmid besitzt einen ColE1 Replikationsursprung. Die Klonierung von zu exprimierenden Genen erfolgt in der Regel über *PaeI* (*SphI*) und *HindIII*-Schnittstellen.

Die käufliche Form des pDS56/RBSII/SphI (pDS) wird bei Qiagen (Hilden) als pQE 40 angeboten. Zur Lagerung von pDS-Konstrukten wird der *E. coli* Stamm JM 109 empfohlen, da dieser durch eine chromosomale Mutation im Promotor des LacI-Gens eine

erhöhte Repressorkonzentration besitzt und somit das Expressionslevel eines in dem pDS klonierten Gens regulieren.

2.2.2. pDMI,1 (Certa *et al.*, 1986)

Das pDMI,1-Plasmid (pDM) besitzt ein p15A-Replikon. Dies ist mit allen Plasmiden, die einen ColE1-Replikationsursprung besitzen, kompatibel. Selektion erfolgt über die Kanamycinresistenz des Plasmids. Von pDM aus wird das Lac-Repressor-Protein (lacI) konstitutiv exprimiert. Die Konzentration liegt bei ca. 5000 Repressorproteinen pro Zelle während der logarithmischen Wachstumsphase. Der pDM-Vektor ist ebenfalls bei Qiagen (Hilden) kommerziell erhältlich (= pREP4).

2.2.3. pDS-pDM-System

Die Expression eines Gens von Interesse im pDS-pDM-System wird durch Zugabe von IPTG induziert. Die zwei hintereinander liegende Operatorsequenzen des pDS sichern eine „enge“ und genaue Kontrolle des Transkriptions-Levels. Durch die Bindung des Lac-Repressors an die Operatorsequenzen des pDS56/RBSII verhindert sie, daß es im nicht-induzierten Zustand (ohne IPTG) zu einer nennenswerten Transkription vom T5-Promotor auskommt.

2.2.4. pTNA

Der pTNA-Vektor entspricht, bis auf Ausnahme des Promotorbereichs, dem pDS-Vektor (2.2.1.). Durch einen Austausch der Sequenzbereiche zwischen den Schnittstellen *XhoI* und *EcoRI* wurde der starke T5-Promotor und die doppelt vorhandene Lac-Operator Region des pDS durch einen schwach konstitutiven *E. coli* Tryptophanase Promotor ersetzt. (Quelle: Arbeitsgruppe Yanofsky, Stanford)

	<i>XhoI</i>		-33		04		-10
pDS	CTC GAG	AAAT CATAAAA	<u>TTATTGCTT</u>	<u>TGTGAGCGGA</u>	TAACA	ATTAT	
pTNA	CTC GAG	CTCT GAGT	<u>TAATA</u>	ATGTTATCGA	CAATG AAAGC	AATTTTCGTA	
			03			<i>EcoRI</i>	
pDS	AATAGATTCA	<u>ATTGTGAGCG</u>	<u>GATAACAATT</u>	TCACACA	GAA TTC	ATTAAAG	
pTNA	CTGTAAGGT				GAA TTC	ATTAAAG	
			Startcodon				
pDS	AGGAGAAATT	AAGCATGC					
pTNA	AGGAGAAATT	AAGCATGC					
			<i>PaeI</i>				

Abbildung 2.1.: Vergleich der Promotorregion von pDS56/RBSII und pTNA. *XhoI*-, *EcoRI*- und *PaeI*-Schnittstelle, Promotor-Konsensus-Sequenzen und das Startcodon sind **fett** hervorgehoben. Die repetitive Sequenz im Promotor-Operator-Bereich ist doppelt unterstrichen.

2.3. Oligodesoxyribonukleotide

Wenn nicht anders erwähnt wurden Oligodesoxyribonukleotide von der Firma Metabion, München bezogen.

Primer zur Sequenzierung von *thisA* aus dem pDS56/RBSII-Vektor

5'-Seq: 5'-GTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTC-3'

3'-Seq: 5'-ACAAATCCAGATGGAGTTCTGAGG-3'

Primer zur Sequenzierung und Amplifikation von *thisA* und *thisF* aus dem pDS56/RBSII- und dem pTNA-Vektor

5'-CyRI: 5'-TCACGAGGCCCTTTCGTCTT-3'

3'-CyPstI: 5'-TCGCCAAGCTAGCTTGGATTCT-3'

Mutationsprimer Projekt: Punktmutationen in *thisA*

Die Primer wurden alle mit Hilfe des Primer Generator entworfen (Primer Generator: www.med.jhn.edu/medcenter/primer/primer.cgi). Im allgemeinen enthalten oder zerstören* die Mutationsprimer eine, in *thisA* nur einmalig vorkommende Schnittstelle (unterstrichene Sequenz).

3'H48A_DraIII*: 5'-GAGATCCACCACGGCATCAGTGTGAA-3'

3'D51N_HphI: 5'-ATTCACGTGGTGAATCTCTCGATTGCG-3'

5'R83N_VspI: 5'-GTAATCGAGCGAATTAATCCCGCCTCC-3'

5'D127N_MseI: 5'-GTGTTCACTTAACTCGAGTTGGA-3'

5'H163A_MscI: 5'-GAAGAGATCGTGGCCACGGAGATC-3'

5'T164H_BspHI: 5'-GAGATCGTACATCATGAGATCGAAAAA-3'

Mutationsprimer Projekt: Looptausch

Alle Mutationsprimer enthalten eine *SalI*-Schnittstelle (unterstrichene Sequenz). Alle Primer wurden von Sigma Deutschland, Darmstadt bezogen.

F-3'-*SalI*: 5'-GAACTTCCAGGTTCGACAGGATCACCGC-3'

F-5'-*SalI*: 5'-GCGGTGATCCTGTCGACCTGGGAAAGTTC-3'

A-3'-*SalI*: 5'-GTTTTCCACCAGTTCGACGGGATCTTTTTTC-3'

A-5'-*SalI*: 5'-GAAAAGATCCCGTTCGACCTGGTGGAAAAC-3'

Mutationsprimer Projekt: Punktmutation in *thisF*, Austausch von Threonin 171 gegen Alanin

5'-T171A: 5'-GATCCTGCTCGCCAGCATCGACAGAGACGG-3'

3'-T171A: 5'-CCGTCTCTGTCGATGCTGGCGAGCAGGATC-3'

Die Primer enthalten ein *SfaNI*-Schnittstelle (unterstrichene Sequenz)

Shuffling *thisF*: nested Primer

5'innerF: 5'-GAGGAGAAATTAAGCATGCTCGCTAAAAG-3'

3'innerF: 5'-CAGCTAATTAAGCTTGGCTGCAGGTCGACG-3'

2.4. DNA-Längenstandards

Smart Ladder[®] (Eurogentec)

Die SmartLadder enthält eine exakte Menge an DNA in jeder Bande und ist daher ausser zur Bestimmung der Grösse auch zur Quantifizierung von DNA-Proben geeignet.

Tabelle 2.1.: Grösse der DNA-Fragmente des DNA-Längenstandards SmartLadder[®]

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

* bei einem Auftrag von 5 µl SmartLadder

I Eco91I/Eco47III (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)

Polynukleotidgrössen [bp]: 20995, 16062, 14140, 11445, 8453, 7242, 6369, 5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1264, 702, 224, 117

2.5. Protein-Längenstandards

10-kDa Protein Leiter (Fluka)

relative Molmasse der Markerproteine: 200000, 120000, 110000, 100000, 90000, 80000, 70000, 60000, 50000, 40000, 30000, 20000, 10000

MidRange[®] (Promega)

Tabelle 2.2.: Grösse der Markerproteine des MidRange[®] (Promega)

Protein	relative Molmasse
Phosphorylase A	97400
Bovines Serum Albumin	66200
Glutamat Dehydrogenase	55000
Ovalbumin	42700
Aldolase	40000
Carbonat Anhydrase	31000
Trypsin Inhibitor (Sojabohne)	21500
Lysozym	14400

2.6. Enzyme, Antikörper, Proteine

Amersham, Braunschweig:	Thermosequenase [™] -Kit
Boehringer Mannheim, Mannheim:	Ribonuklease A (RNase A), T4-DNA-Ligase
MBI-Fermentas, Vilnius, Litauen:	Restriktionsendonukleasen (PaeI, HindIII), T4-DNA-Ligase
Gibco, Eggstein:	DNaseI
Merck, Darmstadt:	Benzonase [®]
New England Biolabs, Bad Schwalbach:	Restriktionsendonukleasen
Promega, Madison, USA:	Tfl-DNA-Polymerase, Taq- DNA-Polymerase
Stratagene, Heidelberg:	cloned <i>Pfu</i> ^{TURBO} ™ Polymerase
eigene Produktion der Abteilung molekulare Genetik und präparative Molekularbiologie, Göttingen:	Taq- DNA-Polymerase
Schwander, 1997	polyklonaler Antikörper tHisA, Serum aus Kanninchen
Sigma, Deisenhofen	Anti-rabbit IgG-alkalische Phosphatase <i>conjugat developed in goat</i>

2.7 Chemikalien und Kits

2.7.1. Chemikalien

Ammoniumpersulfat (APS)

Serva, Heidelberg

Ampicillin (Na-Salz)	Applichem, Darmstadt
Adenosintriphosphat (ATP)	Boehringer, Mannheim
Bacto Agar	Difco, Dreieich
Bacto Trypton	Difco, Dreieich
Bacto Pepton	Difco, Dreieich
Bacto Yeast Extract	Difco, Dreieich
Bio-Rad Protein Assay (Bradford)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chill out® Flüssigwachs	MJ Research, Watertown, USA
Chloroform	Riedel-de-Haen, Seelze
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka, Neu-Ulm
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Hamburg
Ethanol	Riedel-de Hean, Seelze
Ethylendiamintetraessigsäure DiNa-Salz	ICN, Meckenheim
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glyzerin, 87%	Fluka, Neu-Ulm
Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid (IPTG)	Bethesda Research Laboratories, Neu-Isenburg
Kanamycin A (Monosulfat)	Sigma, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Fluka, Neu-Ulm
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Oligonucleotide	Metabion
Protogel®, Simerville, USA	National Diagnostics, Simerville, USA
Qualex Gold Agarose	AGS GmbH, Heidelberg
Saccharose	Fluka, Neu-Ulm
Sequagel®XR Simerville, USA	National Diagnostics, Simerville, USA
N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	ICN, Meckenheim

Alle nicht eigens aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen und haben, falls nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad p. a.. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde quarzbidestilliertes Wasser verwendet. Für Medien wurde Reinwasser benutzt. Chromatographiepuffer wurden über eine Sartorius

Sterilfiltrationsapparatur sterilfiltriert und entgast.

2.7.2. Verwendete Kits

Jetstar® Plasmid Midiprep Kit 2.0	Genomed, Bad Oyenhausen
NucleoTrap® DNA-Purification Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co.
Nucleospin® DNA-Extraction Kit	KG,Düren
Qiaquick Gel Extraxtion Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange®	Stratagene, Heidelberg

2.8. Geräte

Absorptionsspektrophotometer:

Uvikon 930 und 933	Kontron, Eiching
--------------------	------------------

Chromatographieeinheit:

Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)	Pharmacia/LKB, Freiburg
Liquid Chromatography Controller LCC-500	
Pump P-500	
Mixer	
Peristaltic Pump P-1	
Single Path Monitor UV-1	
Optical Unit und Control Unit	
Fractioncollector Frac-100	
Vision™ Workstation for Perfusion Chromatography	Perseptive Biosystems,
BioCAD® Family	Femingham,USA

Gelelektrophoreseapparaturen:

Mighty Small II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
-----------------	---

Fluoreszenzphotometer:

Fluorescence Spectrometer F-4500	Hitachi Ltd, Tokio, Japan
----------------------------------	---------------------------

Spannungsgeräte:

Electrophoretic Power Supply	Pharmacia/LKB, Freiburg
------------------------------	-------------------------

Waagen:

Universal U 4800 P Feinwaage	Sartorius, Göttingen
MC410S Feinwaage	Sartorius, Göttingen

Zentrifugen:

Kühlzentrifuge Rotixa/RP	
--------------------------	--

Kühlzentrifuge Roto Silentia/RP	Hettich, Tuttlingen
Sorvall RC-5C (Rotoren SS34, GSA)	Sorvall/Kendrew, Bad Nauheim
Biofuge <i>pico</i> und <i>fresco</i>	W. C. Heraeus GmbH, Hanau
Ultrazentrifuge Centrikon [®] T1055	Kontron, Eiching
sonstige Geräte:	
Brutschrank	W. C. Heraeus GmbH, Hanau
Cybertech CS-1 elektr. Sofortbildkamera	Cybertech, Berlin
DNA-Sequenzier Modell 4000L	LI-COR, Lincoln, USA
Eismaschine	Ziegra, Stockport, England
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Gene Pulser [®] und Pulse Controller	BioRad, München
Hamilton Mikroliterspritze	Hamilton, Birsach, Schweiz
heizbare Magnetrührer	IKA Labor Technik, Stauffen
pH- Elektrode U402-M5	Ingold, Steinsbach/Taunus
pH-Meter-526	WTW, Weilheim
Präzisionsquarzküvetten	Hellma, Mühlheim/Baden
Metallblockthermostate	Werkstatt Abt. MolGen,
Göttingen	
Schütteltisch	Gesell. für Labortechnik MBH, Burgwedel
Schüttler für Bakterienkulturen	New Brunswick Scientific
Sterilfiltrieraufsatz	Sartorius, Göttingen
Thermocycler DNA Thermal	
Mini-Cycler PTC-150	MJ Research, Watertown, USA
Refraktometer	Zeiss Optron, Jena
Ultraschall Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
UVT2035 UV-Leuchttisch	Herolab, Wiesloch
Wasserbad	Gesell. für Labortechnik mbH,
Burgwedel	
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich,
Schweiz	

2.9. sonstige Materialien

Centricon 10- Miniconcentratoren	Millipore, Amicon, Bioseparations,
----------------------------------	---------------------------------------

Centriprep 10-Proteinconcentratoren	Eschborn
Red Sepharose® CL-6B	Pharmacia, Freiburg
Superdex®75-Säule	Pharmacia, Freiburg
Poros 20 HQ-Säule	Perseptive Biosystems,
Femingham,USA	
Faltenfilter	Schleicher und Schüll, Dassel
Glasplatten für SDS-Gele	Hoefer Scientific, SF, USA
Greiner-Röhrchen (15 ml)	Greiner & Söhne (Nürtingen)
Minsart NML Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Pipetten	Gilson, Villiers-le-Bel,
P1000, P200, P20	Frankreich
Parafilm	American National Can.,
	Chicago,USA
PCR-Cups	Biozym, Hess.-Oldendor
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht
Skalpell-Klingen	Bayha GmbH, Tuttlingen
Vacuklo, Einmalfiltrationsgerät (0,2 µm)	Schleicher und Schüll, Dassel

2.10. Nährmedien

Die Medien und alle Lösungen für die Arbeit mit biologischem Material wurden direkt nach der Herstellung im Autoklaven sterilisiert oder sterilfiltriert. Falls nicht anders vermerkt, wurden die Lösungen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

dYT-Medium:

10 g/l	Yeast Extrakt
16 g/l	Tryptone
5 g/l	NaCl

LB-Medium:
(Luria-Bertani)

5 g/l	Yeast Extract
10 g/l	Tryptone
10 g/l	NaCl

LB-Agar:

LB-Medium
+ 15 g/l Bacto-Agar

SOB-Medium: (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	20 g/l Tryptone 5 g/l Yeast Extract 10 mM NaCl, pH 7,5 vor Benutzung des Mediums 0,01 Volumen $MgCl_2$	autoklavieren Zugabe von: 1M
SOC-Medium:	SOB-Medium + 20 ml Glukose-Lösung	20%ig
Vogel-Bonner-Medium (VB) (Vogel und Bonner, 1956)	10 ml/l Glukose-Lösung 40 ml/l VB-Salz autoklavieren, vor Benutzung des Mediums Zugabe von:	20%ig 25x
	1 ml/l $FeCl_3$ 1 ml/l Thiamin alle Lösungen sterilfiltriert	0,01M 1mg/ml
VB-Agar:	10 ml Glukose-Lösung 17 g Bacterio-Agar ad 958 ml H_2O autoklavieren, unter Rühren auf 60°C abkühlen lassen, danach Zugabe von:	20%ig
	40 ml VB-Salz 1 ml $FeCl_3$ 1 ml Thiamin alle Lösungen sterilfiltriert	25x 0,01 M 1 mg/ml
Antibiotika:	Lagerung bei -20°C; Zusatz im Verhältnis 1:1000 zum Kulturmedium	
Ampicillin-Lösung:	100 mg/ml in H_2O_{bidest} , steril filtriert	
Kanamycin-Lösung:	75 mg/ml in H_2O_{bidest} , steril filtriert	

2.11. Puffer und Lösungen

SDS-PAGE:

SDS-Auftragspuffer:	5x	
	20 %	Glyzerin
	5 %	SDS
	0,01 %	Bromphenolblau
	0,1 %	2-Mercaptoethanol
	0,125 M	Tris/HCl pH 6,8
Acrylamid/ Bisacrylamid-Stammlösung:	30 %	Acrylamid/Bisacrylamid (37:1)
APS-Stammlösung:	10 %	Ammoniumpersulfat
		Lagerung bei -20°C
SDS-Gel Sammelpuffer:	0,5 M	Tris
	0,4 %	SDS
		auf pH 6,8 einstellen
SDS-Gel Trennpuffer:	1,5 M	Tris
	0,4 %	SDS
		auf pH 8,8 einstellen
SDS-Laufpuffer:	10x	
	2,0 M	Glycin
	1 %	SDS
	0,25 M	Tris
SDS-PAGE-Färbelösung:	0,2 %	Coomassie G250
	50 %	Ethanol
	10 %	Eisessig
		lichtgeschützte Lagerung bei RT
Puffer für Sucrosegradientenzentrifugation:		
		100 mM Tris/HCl pH 8,0
		10 mM EDTA
		100mM NaCl
		30 bzw 10% Sucrose
Puffer für Proteinreinigung:		
HF-Puffer:	100 mM	Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5
	1 mM	EDTA

	1 mM	DTT
RS1-Puffer:	50 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
RS2-Puffer:	50 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	800 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
Lagerpuffer:	50 mM	Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5
	1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
BioCAD 1:	100 mM	Tris/HCl pH 8,0
BioCAD 2:		H ₂ O
BioCAD 3:	3,0 M	NaCl
Puffer zur Präparation chemisch kompetenter Zellen		
TFB I:	100 mM	KCl
	50 mM	MnCl ₂
	30 mM	Kaliumacetat
	10 mM	CaCl ₂
	15 %	Glyzerin
	auf pH 5,8 bis 6,2 mit Essigsäure einstellen	
TFB II:	10 mM	MOPS, pH 7,0
	10 mM	KCl
	75 mM	CaCl ₂
	15 %	Glyzerin
Puffer zur Präparation von Plasmid-DNA		
Mini I:	50 mM	Glukose
	10 mM	EDTA (Na-Salz)
	25 mM	Tris/HCl pH 8,0
Mini II:	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS

direkt vor Gebrauch mischen

Mini III: 7 M Ammoniumacetat

RNaseA-Stammlösung: 10 mg/ml RNaseI
10 mM Tris/HCl pH 7,5
15 mM NaCl
20 Minuten auf 100°C erhitzen, auf RT abkühlen,
Lagerung bei -20°C

Agarosegelelektrophorese:

Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg/ml Ethidiumbromid

TBE: 5x
445 mM Tris
445 mM Borsäure
12,5 mM EDTA (Na-Salz)

Surcrose-Farbmarker: 6x
60% Sucrose
Spatelspitze Bromphenolblau und Xylencyanol

Lösungen für HisA- bzw. HisF-Enzymassay:

Glutamin-Stammlösung: 100 mM Glutamin, sterilfiltriert

Ammoniumacetatlösung: 7,0 M Ammoniumacetat, sterilfiltriert

Test-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5 oder 8,0
1 mM EDTA (Na-Salz)
1 mM DTT
immer frisch ansetzen, sterilfiltriert

Western-Blot:

BCIP: 50 mg/ml in 100% Dimethylformamid,
Lagerung bei -20°C

NBT: 75 mg/ml in 70% Dimethylformamid, sterilfiltriert,
Lagerung bei -20°C, lichtgeschützt

Blocking-Puffer: 2% Milchpulver

TBS/TritonX: 20 mM TrisHCl, pH 7,5
500 mM NaCl
0,05 % TritonX100

Western I: 25 mM TrisHCl, pH 10,4

Western II: 300 mM TrisHCl, pH 10,4

Western III: 25 mM TrisHCl, pH 9,4
40 mM Norleucin
0,01 % SDS

sonstige Puffer und Lösungen:

EDTA-Stammlösung: 500 mM EDTA (Na-Salz)
unter Zugabe von NaOH-Plätzchen in H₂O lösen

VB-Salz: 25x
2,5 g MgSO₄ x 7 H₂O
25,0 g Citrat x 7 H₂O
125,0 g K₂HPO₄
44,0 g NaNH₄HPO₄ x 4 H₂O
ad 250 ml H₂O

dNTP-Stammlösung: je 10 mM dNTP in H₂O (N = A, C, G oder T)
Lagerung bei -20°C

2.12. Software

Chromas©	Version 1.45 (32-bit)	©Mc Carthy
Corel draw©	Version 7.0	Corel Corporation
COSY	Version 5.5	Eberhard, 1990
SigmaPlot®	Version 5.0	SPSS Inc.
Swiss PDBViewer©	Version 3.5/3.7b	Glaxo Welcome Experimental Research
The Primer Generator	www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi	
Wisconsin Package	Version 10.0	Genetic Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin, USA

3. Methoden

3.1. Vorbereitungen von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Glaswaren wurden zur Sterilisation 20 min auf 181°C erhitzt. Alle hitzestabilen Lösungen wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden durch einen Membranfilter (Sartorius oder Millipore) der Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert.

3.2. Mikrobiologische Methoden

3.2.1. Anzucht, Vermehrung und Lagerung von *E. coli*-Stämmen

E. coli-Stämme wurden bei 37°C in dYT- oder LB-Medium unter Schütteln (150 rpm) angezogen und bei plasmidtragenden Bakterien mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Aus Stammkulturen wurde unter sterilen Bedingungen mit einer Impföse ein Aliquot der Stammkultur entnommen (entspricht 10 bis 20 µl) und damit ein Reagenzglas mit 5 ml Medium inokuliert. Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen Medium verfolgt.

Bakterienstämme wurden als Glycerinkultur bei -70°C gelagert. 1,0 ml einer frisch angezogenen Kultur der OD_{600} 0,4 bis 0,6 wurde dazu mit 1,0 ml Glycerin (87 %, steril) gemischt und eingefroren.

3.2.2. Transformation von *E. coli*-Zellen

3.2.2.1. Elektroporation nach Dower *et al.* (1988)

3.2.2.1.1. Präparation der elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

50 ml dYT-Medium wurden mit 400 µl einer Vorkultur (z.B. *E. coli* HfrG6) angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (150 rpm) bis zu einer OD_{600} von 0,5 – 0,7 inkubiert. Nach der Zellernte (Hettich Rotixa/RP, 4000 rpm, 10 min, 4°C) wurde das Zellpellet in absteigenden Volumina (50, 25, 10 ml) eiskaltem H_2O_{bidest} mit einem sterilen Glasstab vorsichtig resuspendiert. Nach den Zentrifugationsschritten wurde vorsichtig dekantiert und im letzten Schritt das Pellet in 150 µl 10%iger steriler Glycerinlösung aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden zu je 90 µl in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert

und bei -70°C aufbewahrt. Während der gesamten Präparation wurden die Zellen auf 4°C gehalten.

3.2.2.1.2. Präparation hoch-kompetenter *E. coli*-Zellen zur Elektroporation

Zur Herstellung hochkompetenter Zellen zur Elektroporation wurden 400 ml LB-Medium mit dem gewünschten *E. coli*-Stamm inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,4 bis 0,5 geschüttelt. Die Zellen wurden in 50 ml Aliquots wie oben beschrieben aufbereitet. Im letzten Schritt wurden die elektrokompetenten Zellen in sterilem Wasser aufgenommen. Es wurden 8 Aliquots á 200 μl erzeugt und sofort zur Transformation verwendet.

3.2.2.1.3. Mikro-Dialyse von DNA-Lösungen (Jacobs et al., 1990)

Um DNA-Lösungen von durch die Reaktionsbedingungen des Ligationsvorgangs eingebrachten Ionen zu befreien, wurden die Ligationsansätze (10 – 20 μl) für eine Stunde gegen 10 %ige Glycerinlösung auf einem Millipore[®] VS-Filter (Porengröße 0,0025 μm) dialysiert.

Wahlweise kann die DNA in Ligationsansätzen auch mit Ethanol oder Isopropanol gefällt werden (vgl. 3.3.1.1. oder 3.3.1.2.).

3.2.2.1.4. Elektroporation

Die Transformation erfolgte mit einer ionenfreien DNA-Lösung (10 – 40ng DNA/Aliquot kompetenter Zellen). Die Plasmid-DNA wurde mit den auf Eis aufgetauten Zellen vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette pipettiert. Die Transformation erfolgte mit dem GenePulser[®], der die Zellen einem Stromimpuls (25 μF , 2,5 V und 200 Ω) aussetzt. Die so behandelten Zellen wurden sofort in 2,0 ml dYT aufgenommen und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 1 h bei 37°C im Rotationsschüttler gekurt. Die Zellen wurden unverdünnt, 1:10 und 1:100 auf Selektivmedium ausplattiert und für 12 h bei 37°C inkubiert.

3.2.2.2. Transformation von *E. coli* nach Inoue et al. (1990)

3.2.2.2.1. Präparation der chemisch-kompetenten Zellen

Zur Präparation der chemisch-kompetenten Zellen wurden ÜN-Kulturen von *E. coli*-Zellen in 300 ml SOC-Medium (1,0 Liter Schikane-Kolben) bei 37°C und 150 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Zellen geerntet (Hettich Rotixa/RP, 4000 rpm, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 90 ml eiskaltem TFBI resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Das nach einem zweiten Zentrifugationsschritt (Hettich Rotixa/RP, 4000 rpm, 10 min, 4°C) erhaltene Pellet wurde

mit 12 ml TFBII-Lösung resuspendiert und in je 200 µl Aliquots portioniert. Diese wurden bei -70°C gelagert.

3.2.2.2. Transformation chemisch-kompetenter Zellen

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis langsam aufgetaut und mit 10 – 40 ng DNA (entspricht 2-10 µl Lösung) für 5 min auf Eis inkubiert. Die Transformation der Zellen erfolgte durch einen Hitzeschritt bei 42°C (Dauer: 42 s). Die Zellen wurden nochmals für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl dYT wurden sie für 1 h bei 37°C inkubiert. Auf Selektivmedienplatte wurden 200 µl und das Restvolumen des Ansatzes ausplattiert.

3.2.3. Plattieren von Bakterien

Die Bakteriensuspensionen (100µl) wurden mit Hilfe eines sterilen Glasstabs oder einer sterilen Glaspipette auf einer Agar-Platte ausgestrichen. Bei Plattierungen auf Minimalmediumplatten wie z. B. VB-Platten wurden die Zellsuspensionen dreimal mit Minimalmedium (VB-Medium) gewaschen.

3.2.3.1. In vivo Komplementation

Die histidinauxotrophen Stämme HfrG6 ($\Delta hisA$, Mathney *et al.*, 1964) und UTH 860 ($\Delta hisF$; Goldschmidt, 1970) wurden durch Elektroporation (3.2.2.1.4.) mit pTNA-klonierten Genvarianten transformiert und in Vollmedium für 1 – 4 h bei 37°C geschüttelt. Um anhaftendes nährstoffreiches Vollmedium zu entfernen wurden, vor der Ausplattierung auf Minimalmedium, die Zellsuspensionen dreimal mit 1,0 ml VB-Medium gewaschen. Ein Zehntel der Gesamtlösung wurden plattiert. Als Selektivmedium wurde VB-Medium mit Ampicillin verwendet, als Kontrolle der Transformation wurde parallel immer auf LB_{amp}-Platten ausgestrichen. Neben der Ausplattierung wurden *in vivo* Komplementationen über Austropfen von Zellsuspensionen durchgeführt. Dazu wurden 10 bis 50 µl der insgesamt 1000 µl gewaschene Zellsuspension in einem Tropfen auf die Voll- bzw. Selektivmediumplatte gegeben. Die Inkubation der Selektivplatten erfolgte bei 37°C bis zum sichtbar werden von Kolonien oder für maximal 7 Tage, LB_{amp}-Platten waren in der Regel über Nacht bewachsen.

3.2.4. Bestimmung der Transformationseffizienz

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden Verdünnungen der Kultur von 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 hergestellt und jeweils 100 µl davon auf Selektivmedium plattiert.

3.2.5. Picken von Kolonien

Einzelkolonien wurden mit Hilfe steriler Glasstäbe oder steriler Pipettenspitzen gepickt und damit 3-5 ml Kulturröhrchen mit Medium inokuliert.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen

3.3.1.1. DNA-Fällung mit Ethanol

Zur Fällung von DNA wurden Lösungen mit 1/10 Volumen 7 M Ammoniumacetat und drei Volumen 96%igem Ethanol versetzt. Nach Vortexen der Proben wurden diese für etwa 20 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die gefällte DNA bei 13000 rpm für mindestens 20 min bei einer Temperatur von 4°C (Heraeus Biofuge*fresco*) abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bei RT getrocknet und in 20 bis 50 μl H_2O aufgenommen.

3.3.1.2. DNA-Fällung mit Isopropanol

Die DNA-Fällung erfolgte hierbei mit drei Volumen Isopropanol und wurde analog zur Ethanol-Fällung durchgeführt. Kleine DNA-Fragmente (< 200 bp) können mit Isopropanol besser gefällt werden.

3.3.2. Extraktion von DNA aus wässrigen Lösungen mit organischen Lösungsmitteln

3.3.2.1. DNA-Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

Um Proteine, Ethidiumbromid und hydrophobe Verunreinigungen aus der Lösung zu entfernen, ist eine DNA Extraktion mit Phenol und Chloroform notwendig. Dazu wurde die Lösung mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, kräftig gemixt und abzentrifugiert (Heraeus Biofuge*pico*, 13000 rpm, 5 min). Die wässrige Oberphase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Ethanol gefällt (vgl. 3.3.1.1.). Die Extraktion kann bei Bedarf mehrmals wiederholt werden.

3.3.2.2. Extraktion mit Chloroform

Zur Aufreinigung von DNA wurde eine Chloroform-Extraktion der DNA durchgeführt.

Hierbei wurde ein Volumen Chloroform auf die DNA-Lösung gegeben, gemixt und zentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 13000 rpm, 5 min). Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit Ethanol gefällt (vergleiche 3.3.1.1.).

3.3.3. Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3.3.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation)

3.3.3.1.1. Mini-Präparation durch modifizierte alkalische Lyse

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Zellen durch Zugabe von SDS und NaOH. Die Proteine und genomische DNA werden durch eine anschließende Neutralisation mit Ammoniumacetat gefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt.

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA wurde nach folgender Vorschrift durchgeführt: Von einer frischen ÜN-Kultur plasmidtragender *E. coli*-Zellen wurden 1,5 ml in einer Laborzentrifuge (Heraeus Biofuge *pico*, 13000 rpm, 1 min) geerntet. Das Zellpellet wurde mit 100 µl Mini I-Lösung resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl frisch angesetzter Mini II-Lösung und vorsichtigem Schwenken werden die Zellen lysiert. Anschließend wurde 5 min bei RT inkubiert. Die NaOH-haltige Zellsuspension wurde durch Zugabe von Mini III (7 M Ammoniumacetat) neutralisiert und für 5 min inkubiert. Die Bestandteile der Zellen werden mit dem SDS bei der Zentrifugation (Heraeus Biofuge *pico*, 13000 rpm, 5 min) gefällt und der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (3.3.2.1.) mit nachfolgender Ethanol-Fällung (3.3.1.1.). Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in 30 µl H₂O aufgenommen. Bei Restriktionsspaltungen wurde dem Ansatz 1 µg/ml RNaseA zugegeben.

3.3.3.1.2. Modifizierte Mini-Präparation „JetstarQuick“

Eine schnelle und effiziente Präparation von Plasmid-DNA erfolgt durch folgendes Protokoll:

Die 2,0 ml plasmidtragende ÜN-Bakterienkultur wurde durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge *pico*, 13000 rpm, 30 s) geerntet. Das Pellet wurde mit 100 µl E1-Lösung (Jetstar Midi 2.0 Kit) resuspendiert und sofort mit 100 µl E2-Lösung unter vorsichtigem Schwenken gemischt. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei RT. Zugabe von E3-Lösung führte zur Fällung der Proteine und der genomischen DNA der Zellen. Nach Zentrifugation (Heraeus Biofuge *pico*, 13000 rpm, 5 min) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und einer Chloroform-Extraktion (3.3.2.2.) mit an-

schließender Ethanolfällung (3.3.1.1.) unterzogen.

Nach diesem Protokoll präparierte Plasmid-DNA wurde direkt für Sequenzierungsreaktionen eingesetzt.

3.3.3.2. Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Bereich (Midi-Präp)

Plasmid-DNA wurde in Mengen bis ~ 120 µg aus 50 ml über Nacht Kulturen mit Hilfe des Jetstar Midipräp Kits 2.0 präpariert. Plasmid-DNA in größeren Mengen wurde zur Umklonierung oder auch zur Sequenzierung eingesetzt.

3.3.4. Agarosegelelektrophorese

Der Erfolg von DNA-Manipulationen wie Restriktionsverdauung, Ligationen u. ä. kann mit Hilfe von Agarosegelen kontrolliert werden. Die Auftrennung der DNA-Fragmente kann durch Zugabe des DNA-interkallierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid verfolgt werden, die DNA-Banden können durch Betrachten des Gels im UV-Licht (Sharp *et al.*, 1973) sichtbar gemacht werden. Eine Abschätzung der Länge und Menge der DNA-Fragmente kann anhand von DNA-Längenstandards (2.4.) erfolgen.

Agarose wurde in 0,5 x TBE-Puffer suspendiert (1%) und durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung der Lösung auf etwa 60°C wurde Ethidiumbromid zugegeben (Endkonzentration 0,5 µg/ml), vorsichtig gemischt und die Lösung in eine Gelschale gegossen, danach ein Taschenkamm eingesetzt. Für analytische Agarosegele wurde in der Regel ein Volumen von 25 ml 1%ige Agaroselösung auf eine Glasplatte gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit Laufpuffer (0,5 x TBE) überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit Sucrosefarbmarker (2.11.) im Verhältnis 5:1 gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Feldstärke von 10 V/cm. Die DNA-Banden wurden anschließend bei einer Wellenlänge von 254 nm betrachtet.

3.3.4.1. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

3.3.4.1.1. Gel Extraction Kits

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mit Hilfe des Extraktionskits von Qiagen (Qiaquick *Gel Extraction Kit*) oder Machery-Nagel (*Nucleotrap DNA-Extraction Kit*) wurde die DNA aus dem Gel isoliert. Die Trennung des DNA-Fragments aus der Gelmatrix erfolgt dabei durch ein Herauslösen mit chaotropen Reagentien.

Die Durchführung der Gelextraktion erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

3.3.4.1.2. Die Squeeze-freeze-Methode

Diese Methode wurde von Sakar und Sommer (1990) beschrieben und wurde verwendet, wenn nur geringe Mengen an DNA benötigt wurden. Dazu wurde das aus der Gelmatrix ausgeschnittene DNA-Fragment bei -70°C für 15 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (Heraeus Biofuge*pico*, 13000 rpm, 5 min). Der DNA-enthaltende Flüssigkeitsüberstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und gegebenenfalls durch Ethanol-Fällung (3.3.1.1.) gereinigt oder direkt in eine PCR eingesetzt.

3.3.4.2. Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Sucrosegradienten-Zentrifugation

Zur Erzeugung molekularer Repertoires ist es nötig, eine möglichst große Anzahl an Transformanten zu erhalten, um zumindest einen Grossteil der Varianten in der Bibliothek vertreten zu haben. Wurde für die Ligation einer Genbank Vektorfragment verwendet, wurde dies durch Sucrosegradienten-Dichtezentrifugation erhalten. Zur Herstellung des Sucrosegradienten wurden 12 ml-Ultrazentrifugationsröhrchen mit Sucrosegradientenpuffer der Konzentrationen 30 und 10% befüllt. Die Erstellung des Gradienten erfolgte mittels eines Gradientenmischers. Maximal 100 µg DNA gespaltene DNA wurden in Lösung vorsichtig auf den Gradienten aufgetragen, anschliessend wurde mit Paraffin überschichtet. Die Röhrchen wurden tariert in den TST41.14 Schwenkbecherrotor geladen und in der Kontron Centrikon[®] T1055 Ultrazentrifuge im Vakuum zentrifugiert (28000 Upm, 15 h, 15°C). Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die Röhrchen aus dem Rotor genommen und mit einer Kanüle (0,55 x 25 mm) ein Loch in den Boden des Röhrchens gestochen. Durch Austropfen des Gradienten wurden 25 Fraktionen á ~ 400 µl erhalten, von denen Aliquots direkt auf einem Agarosegel analysiert wurden. Die gewünschten Fraktionen wurden einer Ethanol-fällung (3.3.1.1.) unterzogen.

3.3.5. Bestimmung der DNA-Konzentration

3.3.5.1. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz entspricht die optische Dichte von 1 bei der Wellenlänge 260 nm (OD_{260}) einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngige DNA (bzw. 35 µg/ml RNA oder 33 µg/ml Einzelstrang DNA). Bei einer Küvettenschichtdicke von 1 cm und 0,1 % $A_{260} = 20 \text{ cm}^2/\text{mg}$ gilt:

$$C_{\text{dsDNA}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (\text{OD}_{260} \times 50 \times f) / 1000$$

C_{dsDNA} : Konzentration doppelsträngiger DNA

f: Verdünnungsfaktor

Die Reinheit der DNA konnte durch ein Absorptionsspektrum von 230 bis 350 nm und durch Absorptionsmessungen bei 260 und 280 nm ermittelt werden. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} präparierter DNA sollte bei mindestens 1,8 liegen. Ein weiteres Qualitätsmerkmal ist die Abwesenheit von auf Lichtstreuung beruhender Absorption oberhalb von 300 nm.

3.3.5.2. Abschätzung der DNA-Konzentration auf Agarosegelen

Die Konzentration von DNA-Proben kann durch Vergleich der Intensität ethidiumbromidgefärbter DNA eines Längenstandards (z.B. SmartLadder von Eurogentec; (2.4.) mit der Intensität der Probe abgeschätzt werden.

3.3.6. Enzymatische Manipulation von doppelsträngiger DNA

3.3.6.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden meist Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet (Sambrook *et al.*, 1989; Wilson und Murray, 1991), die symmetrische Erkennungs-Sequenzen besitzen und innerhalb dieser Sequenzen schneiden. Dabei entstehen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden.

Die DNA-Proben wurden in der Regel mit 1 U Enzym/ μg DNA in dem entsprechenden Puffer bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Um unspezifische Aktivität (*Star-Activity*) zu verhindern, wurde das eingesetzte Enzym im Verdau-Ansatz immer mindestens 1:10 verdünnt. Die durch Enzymzugabe eingebrachte Glycerinkonzentration überstieg so nicht 5% des Gesamtansatzes.

3.3.6.2. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Eine Rezirkularisierung eines linearisierten Vektors kann durch Dephosphorylierung der 5'-Phosphat-Enden vermieden werden.

Nach Spaltung der DNA wurde der Reaktionsansatz mit entsprechenden Mengen 10 x CIP-Puffer (Fermentas) und Alkalischer Phosphatase (10 U/ μg DNA) versetzt und auf 100 μl mit H_2O aufgefüllt. Nach Inkubation (1 h, 37°C) erfolgte eine Inaktivierung der Alkalischen Phosphatase durch Erhitzen des Ansatzes auf 85°C für 10 min.

3.3.6.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation von DNA-Fragmenten mit linearem Vektor wurde das geschnittene Insert-Fragment in einem drei- bis fünffachen molaren Überschuss zum Vektor-Fragment

zugegeben. Die Ligation erfolgte in T4-Ligase-Puffer mit 1 U T4-DNA-Ligase für 1 – 3 h bei 37°C oder ÜN bei 4°C in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Der Ligationsansatz kann nach Mikro-Dialyse (3.2.2.1.3.), Ethanolfällung (3.3.1.1.) oder direkt zur Transformation verwendet werden (3.2.2.).

3.3.7. Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die *in vitro* Amplifikation kleinster DNA-Mengen (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Durch mehrfaches Wiederholen der Denaturierung, Hybridisierung (Annealing) und DNA-Syntheseschritte (Extension) wird die DNA-Sequenz, die von Primern eingerahmt wird, exponentiell vermehrt.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde, soweit an den entsprechenden Stellen im Text nicht anders erwähnt, mit 20 ng der zu amplifizierenden DNA-Matrize, je 50 pmol der beiden PCR-Primer und je 50 pmol dATP, dGTP, dCTP und dTTP durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 100 µl des für die jeweils verwendete thermostabile DNA-Polymerase empfohlenen Reaktionspuffers. Polymerase (*Taq*-, *Tfl*- oder *Pfu^{Turbo}*-Polymerase) wurde in variablen Mengen von 0,5 bis 5 Units zugegeben. Die Probe wurde mit Chill-out Wachs überschichtet und in einem PCR-Block unter folgenden Temperaturbedingungen inkubiert:

Die Trennung des Doppelstranges erfolgte bei 95°C für 30 s, die Primer wurden für 30 s bei der für das verwendete Primer-Paar spezifischen Temperatur hybridisiert und für die Verlängerungsreaktion der Polymerase bei 72°C eine Zeit von 1min/kb (*Pfu^{Turbo}*-Polymerase) oder 30 s/kb (*Taq*- oder *Tfl*-Polymerase) gewählt. Die Hybridisierungstemperatur wurde nach Chester und Marchak (1993) berechnet. Die Formel berücksichtigt sowohl den GC-Gehalt des Oligodesoxyribonucleotids (Primer) als auch dessen Länge:

$$T_{\text{Schmelz}} [\text{°C}] = 69,3 + 0,41 (\text{Gehalt}_{\text{GC}} [\%] - 650/N_{\text{Primer}})$$

$$T_{\text{Hybridisierung}} [\text{°C}] = T_{\text{Schmelz}}(1) + T_{\text{Schmelz}}(2) / 2 - 3$$

T_{Schmelz} :	Schmelztemperatur des Primers
$T_{\text{Hybridisierung}}$:	Hybridisierungstemperatur bei PCR – Reaktion mit Primer 1 und Primer 2
Gehalt _{GC} :	GC-Gehalt des Primers [%]
N_{Primer} :	Anzahl der Nukleotide des Primers

3.3.5.1. Kolonie-PCR

Zum Nachweis von Plasmid-DNA in Bakterien oder als Screening-Verfahren zur Kontrolle einer erfolgreichen Klonierung wurden Kolonien von Agar-Platten mit sterilen Pipetten-

spitzen gepickt und in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 50 µl *Taq*-Reaktions-Puffer übertragen. Mit derselben Spitze wurde auch eine 2,0 ml Flüssigkultur angeimpft. Die Zellen wurden durch zweiminütiges Erhitzen (98°C) aufgeschlossen. Der Reaktionsmix enthielt 50 pmol dNTPs, Primer und 0,5 U *Taq*-Polymerase. Die Amplifikation erfolgte bei Nachweis des *thisA*- oder *thisF*-Genes im pDS56/RBSII- bzw. im pTNA-Vektor mit den Primern CyRI und CyPstI mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

Zellaufschluss:	2 min	98°C	
Denaturierung:	30 sec	95°C	} 30x
Annealing:	30 sec	50°C	
Extension:	30 sec	72°C	
Extension	10 min	72°C	

3.3.5.2. Nukleotid-Sequenzanalyse doppelsträngiger DNA

Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden durch das Göttingen Genome Laboratory oder dem Zentrum für Molekulare Medizin Köln durchgeführt.

3.3.8. Mutagenese von DNA

3.3.8.1. Zielgerichteter Austausch von Nukleotiden

3.3.8.1.1. Megaprimer-Methode

Punktmutationen lassen sich durch die sogenannte Megaprimer-Methode erzeugen (Sakar und Sommer, 1990; Barik, 1998). In einer ersten PCR wurde ein Gen-Fragment, der Megaprimer, durch einen flankierenden und einen Mutationsprimer amplifiziert. Anschließend wurde in einer weiteren PCR-Reaktion dieser Megaprimer zusammen mit einem weiteren flankierenden Primer verwendet, um das zu mutagenisierende Gen insgesamt („*full-length*“) zu amplifizieren (Abbildung 3.1.; Tabelle 3.1.). Bei beiden Reaktionen dient die Wildtyp-DNA als Template.

Um die Ausbeute an „*full-length*“ Produkt zu erhöhen kann die zweite PCR als asymmetrische PCR durchgeführt werden. Hierbei wurde in den ersten fünf PCR-Zyklen nur der Megaprimer zur Amplifikation eingesetzt (Barik, 1998), erst danach wurde der zweite, flankierende Primer zugegeben. Für den Entwurf der Mutationsprimer hat es sich als nützlich erwiesen, dass dieser neben der Information für die substituierende Aminosäure gleichzeitig eine einmalig im mutierten Gen vorkommende Schnittstelle enthält oder entfernt (*unique-cutter*, Barik, 1998). Die eingeführte Mutation ist so schnell und eindeutig durch Restriktionsverdau des PCR-Produkts im Vergleich zum

wildtypischen Produkt zu erkennen. Die Mutationsprimer wurden mit Hilfe der Software *Primer Generator* (2.12.) entworfen.

Als Beispiel dient die Erzeugung der Mutation von *thisA_D51N*. Durch den eingesetzten Mutationsprimer 3'-D51N_HphI wurde ein Austausch von GAT zu AAT im Codon 51 erzeugt, so dass auf Proteinebene die Aminosäure Aspartat gegen Asparagin ausgetauscht wurde. Zugleich wurde auf DNA-Ebene eine Restriktionsenzym-Schnittstelle für *HphI* eingefügt, so dass beim Screening von Transformanten die mutierten Klone leicht identifizierbar sind. Die verwendeten Primer sind in 2.3.3. aufgeführt. Für die erzeugten Aminosäureaustausche tHisA_H48A, _R83N, _D127N und _T164H erfolgte die Erzeugung der Punktmutationen analog. Als Template diente der Vektor pTNA_*thisA*.

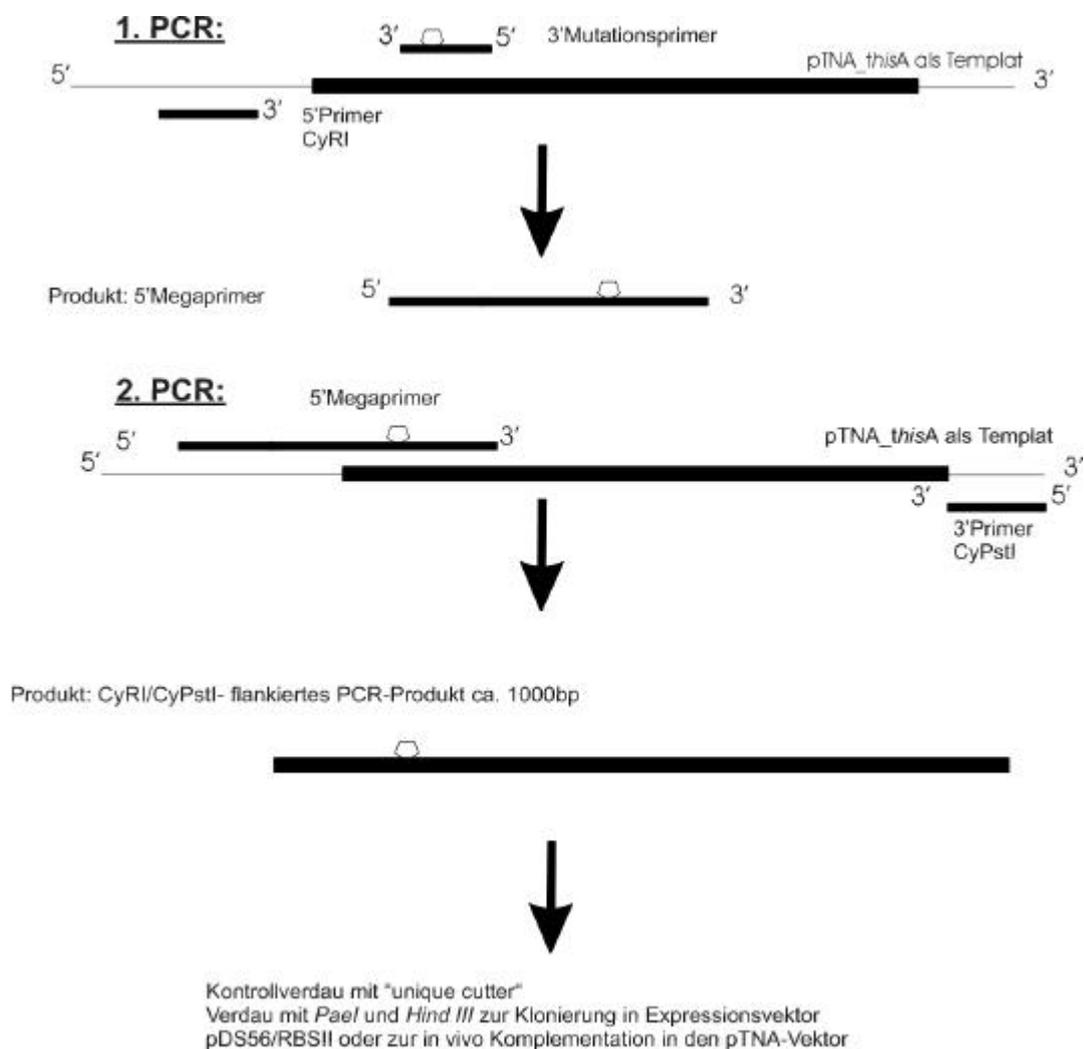


Abbildung 3.1.: Schematische Darstellung der vorgehensweise zur Herstellung von Punktmutanten durch die Megaprimer-Methode (modifiziert nach Barik, 1998) am Beispiel des Gens *thisA*.

Tabelle 3.1.: Ein typischer Ansatz zur Erzeugung von Punktmutationen durch die Megaprimer-Methode. A.: PCR1 – Amplifikation des Megaprimeres B.: PCR2: Erzeugung des „full-length“-Produktes CyRI/CyPstI_thisA_D51N

A. Amplifikation des Megaprimeres D51N	
DNA-Matrize: pTNA_thisA (20 ng/μl)	5 μl
flankierender Primer: 5'- CyRI (100 ng/μl)	2,5 μl
Mutationsprimer: 3'-D51N_HphI (100 ng/μl)	2,5 μl
<i>Pfu^{turbo}</i> -Polymerase (2,5 U/μl)	1,0 μl
10x <i>Pfu^{turbo}</i> -Puffer	10,0 μl
PCR-dNTP-Mix (10 mM)	2,0 μl
H ₂ O	ad 100 μl

PCR-Bedingungen		
1	95°C	2 min
2	95°C	30 sec
3	50°C	30 sec
4	72°C	30 sec
5	72°C	10 min
Schritt 2 – 4 wurde 29x wiederholt		

B. Erzeugung des full-length-Produktes	
DNA-Matrize: pTNA_thisA (20 ng/μl)	5 μl
flankierender Primer: 3'- CyPstI (100 ng/μl)	2,5 μl
Megaprimer D51N (50 ng/μl)	20 μl
<i>Pfu^{turbo}</i> -Polymerase (2,5 U/μl)	1,0 μl
10x <i>Pfu^{turbo}</i> -Puffer	10,0 μl
PCR-dNTP-Mix (10 mM)	2,0 μl
H ₂ O	ad 100 μl

PCR-Bedingungen		
1	95°C	2 min
2	95°C	30 sec
3	50°C	1 min
4	72°C	1 min
5	72°C	10 min
Schritt 2 – 4 wurde 29x wiederholt		

3.3.8.1.2. modifizierte QuikChange[®]-Methode

Zur Einführung weiterer Punktmutationen wurde das QuikChange[™]-Kit der Firma Stratagene herangezogen. Es kann zur Veränderung von Aminosäureresten, zur Deletion oder Insertion einzelner Aminosäuren verwendet werden. Benötigt wurden komplementäre Mutationsprimer, für jeden DNA-Strang des Vektors. Template war der pTNA-Vektor mit gewünschtem Insert. Die *Pfu^{Turbo}*-Polymerase verlängert in mehreren Temperaturzyklen den Mutationsprimer und ein mutiertes Plasmid mit Nicks entsteht. Nach dem PCR-Schritt erfolgt ein Verdau mit der Restriktionsendonuklease *DpnI*, die 5'-Gm⁶ATC-3'-Sequenzen in methylierter bzw. hemimethylierter Form schneidet. Die während der Temperaturzyklen erzeugten Plasmide sind nicht methyliert und daher als Target für *DpnI* ungeeignet. Die Transformation des *E. coli*-Stamm DH5α erfolgte mit dem genickten Plasmid.

Das Protokoll des Herstellers wurde, wie in Tabelle 3.2., gezeigt modifiziert.

Tabelle 3.2.: Modifizierter QuikChange-Ansatz am Beispiel des Projektes Chimären (4.3.6.).

Reaktionsansatz modifiziertes QuikChange	
DNA-Matrize: pTNA_ <i>thisA</i> (20 ng/μl)	2,5 μl
3'-Mutationsprimer A-3'- <i>Sall</i> (50 pmol)	2,0 μl
5'-Mutationsprimer A-5'- <i>Sall</i> (50 pmol)	2,0 μl
<i>Pfu</i> ^{turbo} -Polymerase (2,5 U/μl)	1,0 μl
10x <i>Pfu</i> ^{turbo} -Puffer	5,0 μl
PCR-dNTP-Mix (10 mM)	1,0 μl
H ₂ O	ad 50 μl

PCR-Bedingungen		
1	95°C	2 min
2	95°C	30 sec
3	55°C	1 min
4	68°C	14 min
Schritt 2 – 4 wurde 15x wiederholt		

Der PCR-Ansatz wurde mit 1 μl *DpnI* (10 U/μl) versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dem Restriktionsverdau des Templat-Plasmids mit *DpnI* wurden chemisch-kompetente DH5α mit 1 μl des Verdau transformiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf Selektivmedium plattiert.

3.3.8.2. Zufallsmutagenese

3.3.8.2.1. Modifikation des Stemmer'schen Shuffeln

Neben dem zielgerichteten Austausch von Nukleotidsequenzen kann über error-prone PCR und Stemmer'sches Shuffling (Stemmer, 1994), StEP (Zhao *et al.*, 1998) und einer Vielzahl neuer Methoden eine DNA-Sequenz zufällig verändert werden oder homologe DNA-Sequenzen durchmischt werden.

Zur Mutagenese des *thisF*-Gens wurde auf das Stemmer'sche Shuffeln zurückgegriffen.

Die DNA-Shuffling Technik besteht aus zwei Hauptschritten:

1. Fragmentierung des gewünschten Gens mit DNaseI
2. Reassemblierung in Anwesenheit der *Taq*-DNA-Polymerase in Thermozyklen.

Im Originalprotokoll wird die gewünschte DNA unter Zusatz von Mg²⁺ mit DNaseI verdaut. Dadurch entstehen Fragmente, die im Einzelstrang Nicks enthalten. Die Fragmente werden auf ein Agarosegel aufgetragen und die mit gewünschter Größe (+ 50 – 200 bp) isoliert. Diese Fragmente dienen im nächsten Schritt, der primerless PCR, gleichzeitig als Primer und Template. Durch Einsatz einer DNA-Polymerase (meist *Taq* oder ein *Taq-Pfu*-Gemisch) wird das Gen wieder neu assembliert und durch wiederholtes Aufschmelzen und Hybridisieren des Produkts die Templatestränge sukzessive verlängert. Auf einem analytischen Agarosegel aufgetragen kann hier ein Schmier in Höhe der erwarteten Gengröße beobachtet werden.

Im letzten Schritt, der primed PCR, werden die aussenliegenden Primer eingesetzt. Die in der primerless PCR erhaltenen Template werden hochamplifiziert.

Dabei werden zufällig Fehler in die DNA-Sequenz eingeführt. Durch Variation der Bedingungen lassen sich die Fehlerraten wie gewünscht einstellen.

Das von Stemmer entwickelte Protokoll (Stemmer, 1994) wurde wie in Tabelle 3.3 der Amplifikation und Mutation des Zielgens *thisF* angepasst. Zur primed PCR wurden sogenannte *nested primer* eingesetzt, die nur wenig ausserhalb des Zielgen binden (Volkov und Arnold, 2000). Die Ausbeute an mutagenisiertem Zielgen konnte durch den Einsatz der *nested primer* deutlich gesteigert werden.

Die erzeugten primed PCR-Produkte wurden ethanolgefällt (3.3.1.1.) und dann mit den Restriktionsendonukleasen *PaeI* und *BamHI* verdaut (3.3.6.1.). Der pTNA-Vektor wurde ebenfalls mit *PaeI* und *BamHI* verdaut, danach dephosphoryliert (3.3.6.2.).

Die aus dem Restriktionsverdau entstehenden Fragmente wurden auf einen Sucrosegradienten aufgetragen und nach 3.3.4.2. aufgereinigt. Vier Ansätze mit 500 ng Vektor und 500 ng „*thisF*“-Fragment wurden über Nacht bei 4°C ligiert (3.3.6.3.).

Die Ligationsansätze wurden über Mikrodialyse entsalzt (3.2.2.1.3.), in sechs Aliquots aufgeteilt und hoch-elektrokompetente DH5 α -Zellen (3.2.2.1.2.) wurden mit diesen Ansätzen transformiert (3.2.2.1.4.).

Tabelle 3.3.: Nach Stemmer (1994) und Volkov und Arnold (2000) modifiziertes Protokoll zur Zufalls-mutagenese.

Reaktionsschritt	Reaktionsbedingungen	
Amplifikation des Zielgens <i>thisF</i>	DNA-Matrize: pTNA_ <i>thisF</i> (20 ng/μl)	2,5 μl
	dNTPs (10 mM)	2,0 μl
	5'-CyRI (100 ng/μl)	1,0 μl
	3'-CyPstI (100ng/μl)	1,0 μl
	MgCl ₂ (50 mM)	8,0 μl
	10 x Taq-Puffer	10,0 μl
	Taq-Polymerase (Hauseigen)	1,0 μl
	H ₂ O	ad 100 μl
	Programm: 5' bei 95°C 45" bei 95°C 45" bei 55°C 1'20" bei 72°C 10' bei 72°C } 30 x	
DNase-Verdau	100 μl PCR-Ansatz + 0,2 – 0,16 U DNaseI in DNase-Puffer (Mg ²⁺ ; Gibco); im Thermocycler; 7 min bei 20°C (Verdau) 10 min bei 95°C (Stop)	
Aufarbeitung der DNase-Fragmente	analytisches 2%iges Agarosegel: Fragmente < 200 bp: direktes weiterarbeiten Fragmente > 200 bp: nochmaliges verdauen	
primerless PCR	Fragmente aus DNaseI-Verdau	1,0 μl – 8,0 μl
	dNTPs (10 mM)	2,0 μl
	MgCl ₂ (25 mM)	8,0 μl
	10 x Taq-Puffer	10,0 μl
	Taq-Polymerase (Hauseigen)	1,0 μl
	H ₂ O	ad 100 μl
	Programm: 5' bei 95°C 45" bei 95°C 45" bei 55°C 1'20" bei 72°C 10' bei 72°C } 45 x	
primed PCR	Einsatz von 2 μl aus verschiedenen primerless Ansätzen; 100 μl-Ansätze und Programm wie zur Amplifikation des Templates; als Primer wurden die <i>nested primer</i> 5'inner und 3'inner eingesetzt, Extnsionszeit wurde auf 1' 40" erhöht	

3.4. Präparative Methoden

3.4.1. Expression von rekombinanten Proteinen

3.4.1.1. Probeexpression hyperthermophiler Proteine

Um die Induktion der Expression des gewünschten Zielgens zu prüfen, wurden Proteinpräparationen im analytischen Maßstab durchgeführt. 20 ml LB-Medium wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum (1:1000 aus Stammlösung, 2.10.) versetzt und aus einer frischen ÜN-Kultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C und 150 Upm inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,6 wurde die Hälfte der Kultur mit 1mM IPTG induziert, während die andere Hälfte uninduziert blieb. Nach Wachstum über Nacht bei 37°C wurden die Zellen geerntet (Hettich, Rotixa/RP, 4000 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in 1,0 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, 1 mM DTT, 1mM EDTA, pH 7,5 resuspendiert und die Zellen durch Sonifikation (Stärke 5 (50%), 1min) aufgeschlossen. Um die Fraktion, die das exprimierte Protein enthält zu identifizieren, wurden 100 µl abzentrifugiert (Heraeus, Biofuge*pic*o, 13000 rpm, 10 min) und das Pellet im gleichen Volumen 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, 1 mM DTT, 1mM EDTA, pH 7,5 resuspendiert. Als Test des CRX (= *crude extract*) auf Hitzestabilität der löslichen Proteine wurde durch Inkubation von 100 µl des CRX bei 75°C im Thermoblock (10 min) geprüft. Die Probe wurde erneut abzentrifugiert (HF = Hitzefällung). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert (3.5.1.):

3.4.1.2. Proteinherstellung im präparativen Maßstab

Zur Aufreinigung der Proteine wurden 1,0 l LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und aus einer ÜN-Vorkultur angeimpft. Bei einer optischen Dichte von 0,6 (gemessen bei 600 nm) wurde mit 1 mM IPTG induziert und ÜN bei 37°C weiterinkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 rpm (4°C, 20 min; Hettich Roto Silenta/RP) geerntet, das Pellet (Nassgewicht: 3-4 g) in 40 ml HF-Puffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer, 1 mM DTT, 1 mM EDTA; pH7,5) resuspendiert.

3.4.2. Proteinreinigung

3.4.2.1. Zellaufschluss

Der Zellaufschluß erfolgte durch Ultraschall (Branson Sonifier: Stärke 5 (50%), Intervall von 10 x 30 s und 10 x 30 s Pause). Im Anschluss wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation des Aufschlusses abgetrennt (Sorvall, SS34-Rotor;

10 min, 15000 rpm). Der lösliche Überstand wurde wie unter 3.4.2.3. und 3.4.2.4. angegeben aufgereinigt.

3.4.2.2. Dialyse von Protein-Lösungen

Proteinlösungen wurden jeweils dreimal gegen einen mindestens 100-fachen Volumenüberschuß des Puffers dialysiert. Die Dialyse wurde in Dialyseschläuchen (Visking, Dialyseschläuche 20/32, 16 mm) mit einer Ausschlußgröße von 12 – 14 kDa ÜN bei 4°C unter ständigem Rühren durchgeführt.

3.4.2.2. Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Das Einkonzentrieren von Proteinlösungen wurde mit Centriprep 10[®] und Centricon 10[®] laut Herstellerangaben (Amicon[®]) in einer Hettich Rotixa/RP-Zentrifuge (3000 rpm, 4°C) bis Erreichen eines gewünschten Volumens oder einer gewünschten Proteinkonzentration durchgeführt.

3.4.2.3. Behandlung mit Benzonase[®]

Um Nukleinsäuren, die beim Zellaufschluss (3.4.2.1.) freigesetzt wurden, aus dem *crude extract* zu entfernen, wurden 4 µl Benzonase[®] zugesetzt, die Lösung umgeschwenkt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Benzonase-Verdau wurde zentrifugiert (Sorvall, SS34-Rotor; 10 min, 15000 rpm).

3.4.2.4. Hitzefällung von *E. coli*-Proteinen

Die Hitzefällung wurde als effektiver Schritt zur Abtrennung von nicht hitzestabilen Proteinen des Expressionsorganismus *E. coli* eingesetzt. Dabei wurde der verbleibende Überstand des Zellaufschlusses (CRX) für 10 min bei 70°C erhitzt. Die Hitzefällung wurde in HF-Puffer durchgeführt. Durch Einsatz des HF-Puffers bleibt der pH-Wert bei starken Temperaturänderungen stabil (Stoll und Blanchard, 1990). Die ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (Sorvall, SS34, 15000 rpm, 4°C, 30 min) abgetrennt.

3.4.2.5. Affinitätschromatographie

Das Chromatographiematerial Red Sepharose[®] CL-6B (Amersham Pharmacia) ist eine mit dem Farbstoff Procion[®] Red HE-3B kovalent verbundene Sepharose (CL-3B). Diese zeigt strukturelle Ähnlichkeit zu NADP⁺ und kann verschiedene Nukleotid-bindende Proteine spezifisch binden. Über hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen

können Proteine mit aromatischen und anionischen Liganden gebunden werden. Die Elution kann entweder durch geeignete Konzentration spezifischer Cofaktoren oder Salzgradienten erfolgen.

Die Red Sepharose® CL-6B wurde zur Reinigung von tHisA-Varianten eingesetzt.

Gegen 50 mM TrisHCl pH 7,5, 1mM EDTA, 1mM DTT (Puffer RS1) dialysierte Proben wurden auf eine mit RS1 equilibrierte Red Sepharose® CL-6B (Säulenvolumen = 50 ml; Equilibrierung mit 5 SV Puffer) über eine P1-Pumpe an der FPLC-Anlage (LCC-500, Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen. Nach Waschen der Säule (1 SV; RS1-Puffer) erfolgte die Elution mit 500 ml eines linearen Gradienten von 0 bis 100 % RS2 (50 mM TrisHCl pH 7,5; 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl). Das Elutionsprofil wurde bei 280 nm aufgenommen. Die Säule wurde mit 2 SV RS2 gespült und mit 5 SV RS1 regeneriert. Die Laufgeschwindigkeit betrug 1,0 ml/min.

Nach fünf, wie oben beschriebenen Reinigungsläufen, wurde die Affinitätsäule nach Herstellerangaben regeneriert. Die Einlagerung des Säulenmaterials erfolgte in 0,02% Natrium-Azid.

3.4.2.6. Perfusions-Chromatographie unter Anwendung einer Anionenaustauschersäule

Proteine binden aufgrund ihrer Nettoladung an Trägermaterialien, die positiv geladene (Anionentauscher) oder negativ geladene (Kationentauscher) Seitengruppen tragen. Geladene Makromoleküle verdrängen reversibel bei Probenauftrag die Gegenionen sukzessiv vom Trägermaterial. Da die Gesamtladung des Proteins vom pH-Wert abhängt, kann die Elution entweder durch Verschieben des pH-Wertes zum pI des Zielproteins hin oder durch verringern der Coulomb-Wechselwirkungen durch Erhöhen der Salzkonzentration (Erhöhen der Ionenstärke) erfolgen. Bei der Perfusions-Chromatographie erlauben die physikalischen Eigenschaften der Säulenmaterialien eine hohe Flussrate, ohne die Auflösung oder Kapazität der Auftrennung zu verringern. Varianten von tHisF wurden über die HQ 20 Anionentauschersäule (Säulenvolumen = 7,8 ml) an der Perfusionschromatographie-Anlage BioCAD nach folgendem Protokoll aufgereinigt: Die HQ 20-Säule wurde mit 4 SV 10 mM TrisHCl pH 8,0 (BioCAD1) equilibriert. Nach Auftrag des Probenvolumens (20 – 40 ml) wurde mit 2 SV BioCAD1 gewaschen, die tHisF-Varianten durch einen linearen Gradienten von 0 bis 1,5 M NaCl in BioCAD1 eluiert. Die Regenerierung der Säule erfolgte mit 2 SV BioCAD1. Die Laufgeschwindigkeit betrug 15 ml/min.

3.5. Proteinbiochemische Methoden

3.5.1. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Native Proteine wandern im elektrischen Feld zu dem ihrer Ladung entgegengesetzten Pol. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der angelegten Feldstärke, der Nettoladung der Proteine, ihrer Größe und Form und außerdem von der Viskosität der Gelmatrix. Diese Größen sind zueinander nicht proportional.

Setzt man der Proteinlösung Natriumdodecylsulfat (SDS) zu, bindet das negativ geladene Detergens in einem theoretischen Verhältnis von 1,4 g SDS/g Protein (entspricht einem SDS-Molekül pro zwei AS-Resten) an das Protein. Die große negative Ladung maskiert die Eigenladung der Proteine, so dass die SDS-beladenen Proteine nahezu identische Ladungs-Masse-Verhältnisse und ähnliche Form aufweisen. Die Elektrophorese von Proteinen in einem SDS-haltigen Gel trennt sie daher aufgrund der Siebeffekte in Abhängigkeit ihrer molaren Massen. Die relative Mobilität der Proteine ider SDS-PAGE ist linear mit dem Logarithmus ihrer molaren Massen korreliert. Zur Analyse und Abschätzung des Reinheitsgrades der Proteinpräparation wurden 15%ige SDS-Polyacrylamidgele mit Trenn- und Sammelgelen eingesetzt (Fling und Gregerson, 1986).

Tabelle 3.4.: Zusammensetzung 15 %iger SDS-PAGE-Gele. Ansatz für 10 Gele

Bestandteile	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-SL (30%)	32,5 ml	3,4 ml
Trenngel-Puffer	14,8 ml	-
Sammelgel-Puffer	-	5,2 ml
H ₂ O	17,6 ml	11,7 ml
TEMED	32,5 µl	17 µl
APS (250 mg/ml)	130 µl	85 µl

Gelgröße: 10 x 8 x 15 cm³

Laufbedingungen: Stromstärke von 30 mA, 1 h bei RT

3.5.1.1. Probenvorbereitung

Die Proben wurden mit 1/5 ihres Volumens mit SDS-Auftragspuffer versetzt und ca. 5 min bei 99°C inkubiert.

3.5.1.2. Fixieren und Anfärben von Proteingelen

Proteingele wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung in Coomassie Blue

enthaltender Ethanol/Essigsäure/Wasser-Mischung (SDS-PAGE-Färbelösung) fixiert und eingefärbt. Die Inkubation erfolgte unter Schwenken für 15 – 20 min bei RT. Zum Entfärben der Gele wird Reinwasser verwendet (mehrmaliges Aufkochen des Geles in der Mikrowelle: 900 W, 3 min).

3.5.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.5.2.1. Bradford Test

Der Bradford Test ist ein Assay zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts von wässrigen Lösungen. Der enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliantblau bindet unspezifisch an Proteine, besonders an kationische, nichtpolare und hydrophobe Reste. Das Absorptionsspektrum verschiebt sich dabei von 465 nm für freies Coomassie auf 595 nm für Coomassie mit gebundenem Protein (Bradford, 1976). Die Absorption verhält sich in einem Bereich von ca. 0,2 – 1,4 mg/ml (20 – 140 µg Gesamtprotein) linear zum Proteingehalt der Lösung.

Zur schnellen Abschätzung des Proteingehalts wurden 800 µl Proteinlösung mit 200 µl Biorad-Protein Assay Färbelösung versetzt und gevortext. Die Farbentwicklung ist binnen zwei Minuten beendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen eine Kalibrierungsgerade, die mit verschiedenen BSA-Verdünnungen eingestellt worden war. Die Proteinlösungen wurden so verdünnt, dass sie im linearen Bereich der Kalibrierungsgeraden lagen.

3.5.2.2. Proteinbestimmung durch UV-Absorption

Absorption elektromagnetischer Strahlung im UV/Vis-Bereich erfolgt, wenn delokalisierte π -Elektronen aus dem Grundzustand in einen angeregten, energiereicheren Zustand überführt werden. Carbonylgruppen der Peptidbindung absorbieren im Wellenlängenbereich von 180 – 240 nm. Der Bereich von 250 bis 300 nm ist gekennzeichnet durch die Absorption der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin, in geringerem Maße auch von Disulfidbrücken im Bereich von 250 nm. Tryptophan und Tyrosin liefern dabei den größten Beitrag zur Absorption, da ihre Extinktionskoeffizienten um fast eine Größenordnung höher liegen als die des Phenylalanins und der Disulfidbrücken (Schmid, 1989).

Spektren von zuvor zentrifugierten Proteinlösungen wurden im Bereich von 240 bis 350 nm aufgenommen. Im Bereich oberhalb von 310 nm sollte eine Proteinlösung keine Absorption zeigen. Eine Absorption mit abfallender Basislinie im Bereich von 310 – 400 nm kann durch Lichtstreuung großer Proteinkomplexe oder Proteinaggregate entstehen.

Bei bekanntem Extinktionskoeffizienten kann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei 280 nm errechnet werden.

Lambert-Beer-Gesetz: $A = \epsilon \cdot c \cdot d$

- A: Absorption bei 280 nm
 ϵ : Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280 \text{ nm}; 0,1\%}$ [cm^2/mg]
 c: Proteinkonzentration [mg/ml]
 d: Schichtdicke der Küvette [cm]

$$\epsilon_{280 \text{ nm}; 0,1\%} = a \epsilon_{M; \text{Trp}} + b \epsilon_{M; \text{Tyr}} + c \epsilon_{M; \text{Cysteine}} / \text{MW} \quad (\text{Pace et al., 1995})$$

- $\epsilon_{M; \text{Trp}}$: molarer Extinktionskoeffizient von Tryptophan bei 280 nm ($5600 \text{ cm}^{-1} \text{ l}^{-1}$)
 $\epsilon_{M; \text{Tyr}}$: molarer Extinktionskoeffizient von Tyrosin bei 280 nm ($1340 \text{ cm}^{-1} \text{ l}^{-1}$)
 $\epsilon_{M; \text{Cysteine}}$: molarer Extinktionskoeffizient von Cysteinen bei 280 nm ($150 \text{ cm}^{-1} \text{ l}^{-1}$)
 a, b, c: Anzahl der entsprechenden Aminosäuren
 MW: Molekularmasse des Proteins (g/mol)

tHisA besitzt einen Tryptophan-, fünf Tyrosin- und neun Phenylalaninreste. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ_M beträgt $12,95 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, der spezifische Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280 \text{ nm}; 0,1\%}$ wurde bei einer relativen molaren Masse von 27028 mit $0,48 \text{ cm}^2/\text{mg}$ errechnet (Schwander, 1997). tHisF besitzt, wie tHisA, einen Tryptophanrest sowie 11 Phenylalanine und drei Tyrosinreste. ϵ_M beträgt $11,50 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, der spezifische Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280 \text{ nm}; 0,1}$ $0,41 \text{ cm}^2/\text{mg}$. Die relative molare Masse von tHisF beträgt 27720 (Thoma, 1998). Alle Spektren wurden am Kontron 933 UV-Vis-Photometer gemessen.

3.5.4. Fluoreszenzmessungen

Bei der Rückkehr eines durch Absorption von Strahlung im ultravioletten oder sichtbaren Bereich angeregten Moleküls in den Grundzustand wird Wärme und Fluoreszenzemission frei. Aufgrund der strahlungsfreien Prozesse ist das emittierte Licht energieärmer als das absorbierte und daher zu größeren Wellenlänge hin verschoben. Die Fluoreszenzemission von Proteinen bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm ist durch die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin im Verhältnis 1100 : 200 : 8 bestimmt (Schmid, 1989).

Die Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren ist stark von ihrer molekularen Umgebung im Protein abhängig bzw. wird von dem verwendeten Lösungsmittel beeinflusst. Das Emissionsmaximum von Tryptophan im Inneren eines nativen Proteins liegt im Bereich von 333 nm. Dieser Wert entspricht dem von freiem Tryptophan in hydrophober Umgebung. Das Maximum kann aber im Extremfall bis 310 nm verschoben werden. Im Verlauf einer Denaturierung werden Tryptophanreste zum wässrigen Lösungsmittel exponiert. Es kommt zur Verschiebung des Emissionsmaximums zu 353 nm und gleichzeitiger Intensitätsabnahme. Tyrosine hingegen zeigen im Verlauf der Denaturierung nur eine geringe Verschiebung des Emissionsmaximums bei 303 nm. Eine Intensitätsabnahme ist ebenfalls zu beobachten (Schmid, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteinlösungen bei 280 oder 295 nm angeregt, die Emissionsspektren im Bereich von 300 – 400 nm am Hitachi Fluoreszenzspektrometer F4500 aufgenommen. Spaltweite war 5 nm. Eine Pufferkorrektur wurde jeweils durchgeführt.

3.5.5. Western Blot

Unter Western-Blotting versteht man den elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Membran und die anschliessende Immunodetektion des Zielproteins.

3.5.5.1. Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Towbin et al., 1979, modifiziert)

Zunächst wurden die Proteine auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel (3.5.1.) aufgetrennt. Der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll) erfolgte mit Hilfe des NOVABLOT® *Elektrophoretic Transfer Kits* (LKB). Das System besteht aus einer großflächigen Graphit-Kathode und einer gleichgrossen Graphit-Anode. Zum Transfer wurde folgender Aufbau vorgenommen: auf die Anode wurden nacheinander zwei Lagen mit Western I und eine Lage mit Western II getränkte Gel-Blotting-Papiere (Whatman-Papier), darauf die Nitrozellulose und das Polyacrylamidgel und abschliessend drei Lagen in Western II getränkte Gel-Blotting Papiere gelegt und luftblasenfrei angedrückt. Nitrozellulose und Whatman-Papier hatten dabei die gleiche Grösse wie das Gel. Die Kathode wurde aufgelegt und mit einem Gewicht (~ 1 kg) beschwert. An die Anode und Kathode wurde eine Spannung angelegt und der Blot für ca. eine Stunde durchgeführt, wobei die angelegte Stromstärke 0,8 mA pro mm² Gelfläche betrug, jedoch die Spannung nie grösser als 10 V war.

3.5.5.2. Anfärben von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Zur Überprüfung, ob der Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran erfolgreich war, wurde die Membran nach dem Proteintransfer für 5 min in Ponceau-S-Färbelösung geschwenkt und mehrfach bis zum Sichtbarwerden der Proteine als rote Banden mit PBS gespült. Hierbei wurden auch die Positionen der Markerbanden mit Bleistift oder Kugelschreiber angezeichnet. Zur Entfernung des Ponceau-S wurden die Membranen bis zur vollständigen Entfärbung mit TBS/TritonX gewaschen.

3.5.5.3. Spezifischer Nachweis von Proteinen mittels Antikörper (Blake et al., 1984)

Zum immunochemischen Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen wurde diese zunächst zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, an die ebenfalls der Antikörper binden könnte, für eine Stunde bei RT unter Schütteln mit Magermilchpulver (Blocking, 2%) in TBS geschüttelt. Anschliessend wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS/TritonX gewaschen und zur spezifischen Bindung des Antikörpers an das zu detektierende Protein für mindestens 3 Stunden bei RT (oder ÜN bei 4°C) mit einer 1:250 Verdünnung des rabbit α HisA (Schwander, 1997) in Blocking Puffer inkubiert. Zur Entfernung nichtgebundener Antikörper wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS/TritonX gewaschen. Danach wurde die Membran für 3 Stunden mit dem Sekundärantikörper goat α rabbit IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Sigma, 1:10000 Verdünnung in 10 ml Blocking-Puffer) unter Schütteln bei RT inkubiert. Anschliessend wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS/TritonX gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde eine Farbreaktion mit BCIP/NBT angeschlossen (3.5.5.4.)

3.5.5.4. Farbreaktion mittels BCIP/NBT

Die indirekte Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch Erzeugung eines Farbniederschlags durch die Alkalische Phosphatase, gekoppelt an den Sekundärantikörper. Die Alkalische Phosphatase spaltet von BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) Phosphat ab, wodurch das farblose Substrat in ein farbiges Produkt (Indigo) umgesetzt wird, welches auf der Membran als sichtbarer Niederschlag ausfällt. NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) dient in dieser Reaktion als Farbverstärker, es wird zu dem purpurfarbenen Diformazan reduziert. Zur Detektion wurde die Membran mit 10 ml Alkalische Phosphatase-Puffer, mit 30 μ l NBT und 40 μ l BCIP versetzt und bis zum sichtbar werden spezifischer Signale (5 –10 min bis max. 45 min) im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Waschen mit Wasser gestoppt. Die Membran ist getrocknet

lagerungsfähig.

3.5.6. Analytische Gelfiltration

Die Retentionszeiten globulärer Proteine werden vorwiegend durch ihre relative molare Masse determiniert. Über einen relativ breiten Bereich der relativen Molekülmassen sind die Elutionsvolumina eine lineare Funktion der Logarithmen der relativen Molekülmassen. Stellt man eine Kalibrierungskurve mit Proteinen ähnlicher Form und bekannter relativer Molekülmassen auf, so läßt sich die relative Molekülmasse unbekannter Proteine bestimmen. Die Methode basiert auf dem Prinzip des Molekularsiebs.

Im Rahmen der Arbeit wurde von den erzeugten tHisA-Varianten das apparente Molekulargewicht und ihr Oligomerisierungsgrad bestimmt.

Alle Gelfiltrationsläufe wurden mit der Superdex[®]75-Säule (Amersham Pharmacia) an der FPLC-Anlage (LCC-500, Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Blue Dextran wurde zur Bestimmung des Totvolumens (V_0), KNO_3 zur Bestimmung des Totalvolumen (V_t) eingesetzt. Aus den Elutionsvolumina von Kalibrierungsproteinen kann der Verteilungskoeffizient K_{av} errechnet werden und gegen den Logarithmus des Molekulargewichts aufgetragen werden. Anhand der aus den Messpunkten ermittelten Regressionsgerade kann über den K_{av} -Wert der untersuchten Proteine deren apparentes Molekulargewicht ermittelt werden.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

K_{av} : Verteilungskoeffizient

V_e : Elutionsvolumen des Proteins

V_t : Totalvolumen des Proteins

V_0 : Totvolumen der Säule

Es wurden jeweils 100 μg Protein aus dem Kalibrierungs-Kit für Gelfiltration (Boehringer Mannheim) oder 100 μg der gereinigten tHisA-Varianten auf die Superdex 75-Säule aufgetragen. Laufgeschwindigkeit war 1 ml/min.

3.5.7. Enzymkinetiken

Die katalytischen Parameter K_M und k_{cat} wurden für die tHisA- und die tHisF-Aktivität unter Fließgleichgewichtsbedingungen (*steady-state*) bestimmt.

Die kinetischen Messungen wurden mit einem gekoppelten Enzymaktivitätstest

durchgeführt (Hamilton, 1995), die HisA-Reaktion ist der HisF-Reaktion vorangestellt.

Die Kopplung der beiden Reaktionen ist notwendig, da die direkte Umsetzung des Substrates 5'ProFAR zu 5'PRFAR durch tHisA spektroskopisch nicht detektiert werden kann, da die Produkte nahezu identische Extinktionskoeffizienten besitzen. Die Kopplung mit der HisF-Reaktion führt zur Spaltung von 5'PRFAR in AICAR und ImGP. Die Reaktion lässt sich durch einen Abfall der Absorption bei 300 nm verfolgen und mit $\Delta\epsilon_{300}=(5'\text{-PRFAR-AICAR}) = 5,64 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ quantifizieren (Klem & Davisson, 1993). Der Assay wurde in einem Volumen von 1,0 ml in 50 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) in einer 1 cm Quarzküvette gemessen. Alle Enzymtests wurden bei 25°C (Wasserbad-Temperierung, mgw Lauda RM6; Temperaturfühler Uvikon, KP91-00608) am Kontron UVIKON Spektrophotometer 933 durchgeführt. 5'-ProFAR wurde nach der Vorschrift von Davisson *et al.* (1994) enzymatisch hergestellt. Die Konzentration des Substrates wurde durch Absorptionsmessung bei 300 nm bestimmt: $\epsilon_{300} (5'\text{-ProFAR}) = 6,069 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Klem & Davisson, 1993). Wildtyp-tHisF und tHisH wurden freundlicherweise von Silke Beismann-Driemeyer zur Verfügung gestellt.

Es wurden vollständige Umsatzkurven aufgenommen. Mit Hilfe des Programmpakets COSY (Eberhard, 1990; 2000) wurden die enzymatischen Parameter K_M und k_{cat} mittels der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt.

integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung:

$$K_M \ln \frac{A_0}{A_t} - A_0 + A_t = v_{max} t$$

K_M : Michaelis-Menten-Konstante

A_0, A_t : Absorption zum Zeitpunkt $t = 0$ bzw. t

v_{max} : Maximale Umsatzgeschwindigkeit

3.5.7.1. Messung der HisA-Aktivität

Der HisA-Enzymtest wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

5 mM Glutamin (in Testpuffer gelöst)

1 μM tHisF und tHisH (von Silke Beismann-Driemeyer zur Verfügung gestellt)

Substrat: 20 μM oder variable Konzentrationen an 5'ProFAR (in Testpuffer gelöst)

Testpuffer: 50 mM TrisHCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

Testvolumen: 1000 μl

Start: Zugabe von 100 nM tHisA_wt bzw. variable Konzentrationen der tHisA-

Varianten

Messung der HisA-Aktivität von tHisF unter Zugabe von tHisH

5 mM Glutamin (in Testpuffer gelöst)

20 µM tHisH (von Silke Beismann-Driemeyer zur Verfügung gestellt)

Substrat: 20 µM oder variable Konzentrationen an 5'ProFAR (in Testpuffer gelöst)

Testpuffer: 50 mM TrisHCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

Testvolumen: 1000 µl

Start: Zugabe von 20 µM tHisF_wt oder 15 µM der tHisF-Varianten

Messung der HisA-Aktivität von tHisF unter Zugabe von Ammoniumacetat

5 mM Glutamin (in Testpuffer gelöst)

200 nM [NH₃] entspricht einer Zugabe von 350 mM Ammoniumacetat

Substrat: 20 µM oder variable Konzentrationen an 5'ProFAR (in Testpuffer gelöst)

Testpuffer: 50 mM TrisHCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

Testvolumen: 1000 µl

Start: Zugabe von 20 µM tHisF_wt

Kontrollmessungen zu 3.5.7.1.

5 mM Glutamin (in Testpuffer gelöst)

20 µM tHisH

Substrat: 20 µM oder variable Konzentrationen an 5'ProFAR (in Testpuffer gelöst)

Testpuffer: 50 mM TrisHCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

Testvolumen: 1000 µl

Start: Zugabe von 20 µM BSA oder 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5;
1mM EDTA, 1mM DTT

Messzeitraum waren 10 – 180 Minuten.

3.5.7.2. Messung der HisF-Aktivität

5 mM Glutamin (in Testpuffer gelöst)

1 µM tHisH

1 µM tHisA

Substrat: 20 µM oder variable Konzentrationen an 5'ProFAR (in Testpuffer gelöst)

Testpuffer: 50 mM TrisHCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

Testvolumen: 1000 µl

Start: Zugabe von 100 nM bis 20 µM des tHisF-Wildtyps oder der Varianten

Der Ansatz zur Messung der ammoniumabhängigen HisF-Reaktion unterschied sich von dem zur Messung der glutaminabhängigen Reaktion darin, dass 300 mM Ammoniumacetat anstelle von Glutamin und tHisH zugegeben wurde.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Erhöhung der katalytischen Aktivität der 5'-ProFAR-Isomerase aus *Thermotoga maritima* (tHisA) bei 37°C

Homologe Enzyme aus mesophilen und hyperthermophilen Organismen sind bei den jeweiligen Temperaturen häufig vergleichbar aktiv („*corresponding states*“; Somero, 1978; Jaenicke, 1991). Dies bedeutet zwangsläufig, daß die Enzymvariante aus dem hyperthermophilen Organismus bei „mesophilen“ Temperaturen sehr viel schwächer aktiv ist, vermutlich wegen mangelnder, für die Katalyse jedoch entscheidender, konformationeller Flexibilität (Jaenicke, 2000). Im Rahmen des hier beschriebenen Teilprojekts sollte versucht werden, die katalytische Aktivität des extrem thermostabilen Enzyms ProFAR-Isomerase aus *T. maritima* (tHisA) bei 37°C auf die des homologen Enzyms aus *E. coli* (eHisA) bei dieser Temperatur zu steigern. Als experimenteller Ansatz sollte gerichtete Evolution verwendet werden, d. h. eine Kombination aus Zufallsmutagenese des *thisA*-Gens und Selektion *in vivo* mittels eines *hisA*-Mangelstammes von *E. coli* ($\Delta hisA$). Die Grundannahme ist, daß der $\Delta hisA$ -Stamm nach Transformation mit plasmidkodierten *thisA* wegen der schwachen katalytischen Aktivität des Genproduktes auf Mediumsplatten ohne Histidin nur langsam wächst. Nach Transformation mit dem mutagenisierten *thisA*-Genrepertoire sollten $\Delta hisA$ -Zellen, die eine Variante mit erhöhter Aktivität aufgenommen haben, durch beschleunigte Komplementation *in vivo* identifiziert werden (Merz *et al.*, 2000). Die verbesserten tHisA-Varianten sollten dann produziert und ihre enzymatischen Eigenschaften *in vitro* mit denen von Wildtyp-tHisA und eHisA verglichen werden.

4.1.1. Vorarbeiten

Im Rahmen des Großpraktikums „Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie“ wurden von Alexander Strom Vorarbeiten zu diesem Projekt geleistet.

Um Varianten mit verbesserter Aktivität bei Raumtemperatur zu erhalten, wurde durch Zufallsmutagenese mittels DNA-Shuffling (Stemmer, 1994, 1995) ein *thisA*-Repertoire erzeugt. Dieses wurde über die Restriktionsschnittstellen *PaeI* und *HindIII* in den Expressionsvektor pDS56/RBSII (2.2.1) kloniert.

Zellen des *E. coli* $\Delta hisA$ -Stammes (= HfrG6, Matney *et al.*, 1964; 2.1.2.) wurden mit diesem Genrepertoire transformiert (3.2.2.1.4.), ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Nach Transformation mit wildtypischem *thisA* waren nach ca. 39 h Kolonien auf den Selektionsplatten sichtbar. Dagegen waren nach Transformation mit dem Repertoire fünf

Kolonien bereits nach ca. 20 Stunden sichtbar herangewachsen (Abbildung 4.1.).

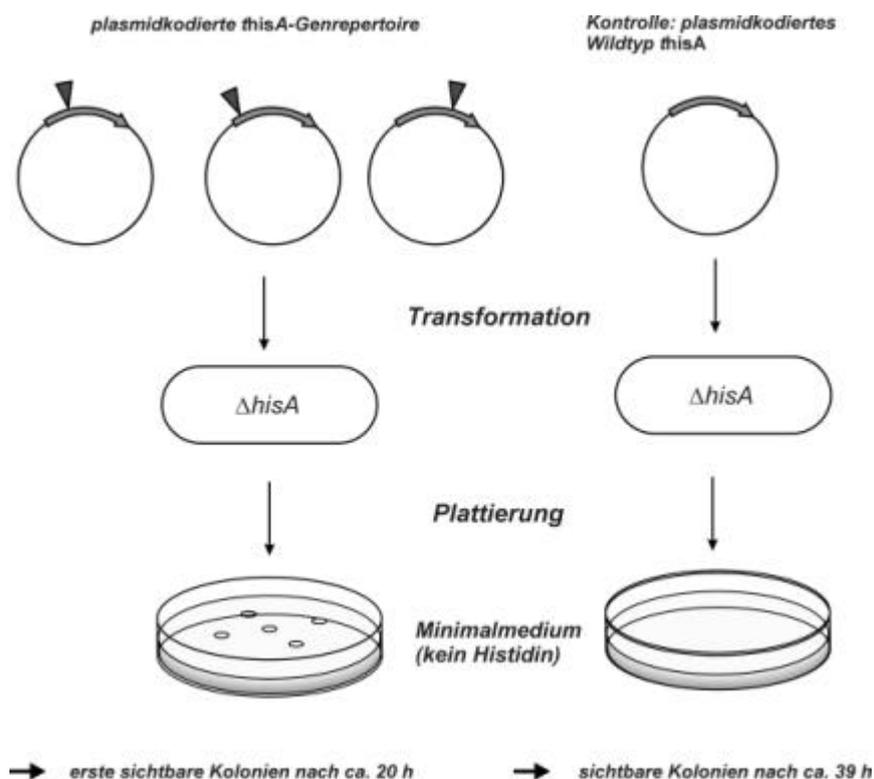


Abbildung 4.1.: In vivo Komplementation des *DhisA*-Stammes. Fünf Varianten des *hisA*-Repertoires verhalfen dem *DhisA*-Stamm zu einem beschleunigten Wachstum auf Selektivmedium.

4.1.2. Retransformation und Umklonierung verbesserter Varianten

Aus den fünf schneller wachsenden Kolonien wurde Plasmid-DNA präpariert (3.3.3.2.) und der $\Delta hisA$ -Stamm damit erneut transformiert (3.2.2.1.4.). Bei dieser „Retransformation“ zeigte sich, daß eine der ursprünglich selektierten *thisA*-Varianten seine Fähigkeit zur beschleunigten *in vivo* Komplementation verloren hatte.

Um Vektormutationen als Ursache für die erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit auszuschließen, wurden die selektierten Varianten des *thisA*-Gens und das *thisA*-Wildtyp-Gen in frisch präparierten pDS-Vektor (3.3.3.2.) umkloniert. Außerdem wurden die Varianten sequenziert.

Nach der Transformation des $\Delta hisA$ -Stammes mit den umklonierten Varianten zeigte sich, daß zwei weitere Varianten ihre Fähigkeit zur beschleunigten Komplementation *in vivo* verloren hatten.

Nach diesen Kontrollexperimenten blieben also noch zwei Varianten (*thisA_2* und *thisA_6*) übrig, die eine im Vergleich zum Wildtyp-Protein erhöhte katalytische Aktivität besitzen sollten. Wie durch DNA-Sequenzierung festgestellt werden konnte, war vermutlich eine spontan auftretende Deletion in der repetitiven Promotor/Operator-

Region des pDS-Plasmids (Abbildung 2.2., 2.2.4.) die Ursache für die widersprüchlichen Komplementationsergebnisse. Dieses Deletionsereignis tritt häufig auf (Schwander, 1997) und wird vor allem dann beobachtet, wenn die Zelle Streß ausgesetzt ist, wie z.B. beim Wachstum auf Minimalmedium mit Ampicillin in Abwesenheit des Lac-Repressors (2.2.3. und 2.2.4.).

Der pDS-Vektor wurde aus diesem Grund nicht mehr für *in vivo* Komplementationstests eingesetzt.

4.1.3. Sequenzierungsergebnisse der Varianten tHisA_2 und _6

Tabelle 4.1.: Sequenzierungsergebnisse der Varianten tHisA_2 und tHisA_6

Variante	Mutation	Lage in der (β) ₃ -Struktur (Lang <i>et al.</i> 1998)
„tHisA_2“	AS # 3 GTT (Valin) ⇒ ATT (Isoleucin)	im β 1-Faltblatt
„tHisA_6“	AS # 11 AGA (Arginin) ⇒ GGA (Glycin) Mutation der AS # 83 AGA (Arginin) ⇒ GGA (Glycin)	R11 liegt im Loop zwischen β 1 und β 1'. R83 liegt unmittelbar vor α 3 in der Nähe einer angenommenen Phosphatbindungsstelle

In Variante tHisA_2 wurde ein Aminosäureaustausch Val3Ile gegen Isoleucin gefunden. Die Sequenz des *E. coli* HisA besitzt an dieser Stelle ebenfalls ein Isoleucin. In Variante tHisA_6 wurden insgesamt drei Mutationen detektiert, wobei nur zwei zu einem Aminosäureaustausch führten. An Position Arg11 war es zum Austausch gegen Glycin gekommen, Position Arg83 wurde ebenfalls gegen Glycin ersetzt. Der Rest Arginin 83 liegt unmittelbar im Anschluß an eine für die Phosphatbindung vermutete konservierte Sequenz, des Aminosäure-Motivs GGIR (Wilmanns *et al.*, 1991; Bork *et al.*, 1995). Zusätzlich wurde eine stille Mutation an Position der Aminosäure 129 (CGA nach CGG) detektiert.

4.1.4. Verwendung eines alternativen Plasmids für die Selektion *in vivo* und Test der Enzymaktivität *in vitro*

Aufgrund der Mutationsanfälligkeit des pDS-Vektors unter Stressbedingungen wurden die Varianten tHisA_2 und tHisA_6 und das wildtypische tHisA-Gen in den pTNA-Vektor (2.2.4.) umklont und Δ tHisA mit diesen Varianten transformiert. Die Expression der plasmidkodierten Gene erfolgt im pTNA-Vektor schwach, aber konstitutiv. Die Komplementation der HisA-Defizienz auf Selektionsmedium bei 37°C erfolgte nach ~24h,

und zwar zeitgleich für den plasmidkodierte *thisA*-Wildtyp und *thisA_2* und *thisA_6*. *thisA_2* und *thisA_6* wurden in *E. coli* exprimiert, die Genprodukte gereinigt (3.4.2.3. und 3.4.2.4.) und ihre katalytische Aktivität *in vitro* Enzymassays (3.5.7.) mit der von tHisA verglichen. Es zeigte sich, daß die k_{cat} -Werten der beiden Varianten und des tHisA_wt nahezu identisch waren (Tabelle 4.2.). tHisA_6 zeigte dagegen einen drastisch erhöhten K_M -Wert für das Substrat ProFAR, wodurch die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M^{ProFAR} deutlich verringert wurde. Diese Ergebnisse zeigen, daß keine der selektierten tHisA-Varianten eine verbesserte Enzymaktivität aufweist.

Tabelle 4.2.: Enzymatische Parameter der Varianten tHisA_2 und tHisA_6 im Vergleich zum Wildtypenzym.

Probe	K_M^{ProFAR} [μM]	V_{max} [$\mu Mmin^{-1}$]	E_0 [μM]	k_{cat} [1/s]	k_{cat}/K_M^{ProFAR} [1/ μMs]
tHisA_2	0,97	5,24	0,1	0,87	0,90
tHisA_6	59,8	25,0	0,5	0,83	0,014
tHisA_wt	0,99	5,83	0,1	0,97	0,98

4.1.5. Evaluation - Anforderungen an das und Erkenntnisse aus dem *in vivo* Selektionssystem

Die bisherigen Ergebnisse des Projekts wurden evaluiert und von Grund auf neu überdacht. Dabei ergaben sich folgende Anforderungen an das Selektionssystem:

1. Eine große Anzahl von Gen- bzw. Proteinvarianten, die durch die Zufallsmutagenese erzeugt werden, muß schnell und einfach gesichtet werden können.

Die Elektrotransformation (3.2.2.1.4.) von *E. coli*-Zellen zur Einführung von Plasmid-DNA ermöglicht Transformationseffizienzen bis zu 10^9 transformierte Zellen pro μg DNA. Diese hohe Transformationseffizienz erlaubt es Genbanken mit ca. $10^6 - 10^7$ unabhängigen Klonen herzustellen. Dies reicht aus, um bei einem Gen auf 1000 bp alle möglichen Zweierkombinationen von Mutationen und damit alle dadurch möglichen Zweierkombinationen von Aminosäureaustauschen zu testen.

2. Ein schnelleres Wachstum des von *DhisA* auf Selektionsplatten muß eine Verbesserung der enzymatischen Aktivität des Enzyms bei 37°C widerspiegeln, nicht eine Heraufsetzung der Enzymmenge.

Dies bedeutet, dass die Anzahl an Plasmiden pro Zelle und die Stärke der Genexpression nicht variieren dürfe. Da diese Voraussetzung bei der Verwendung des pDS-Plasmides offensichtlich nicht erfüllt war (4.1.2.), wurde für alle weiteren Kompletationsversuche in diesem und den anderen Teilprojekten das Plasmid pTNA für Kompletationsversuche verwendet.

Nach dem Wechsel zum pTNA-System wurde geprüft ob die Proteinmenge während einer *in vivo* Selektion für verschiedene Varianten identisch ist. Zum Test wurden die Proteine HisA aus *E. coli* (eHisA), tHisA, tHisA_H48A sowie tHisA_D8N (Ergebnisteil 4.2.; Tabelle 4.3.) verwendet.

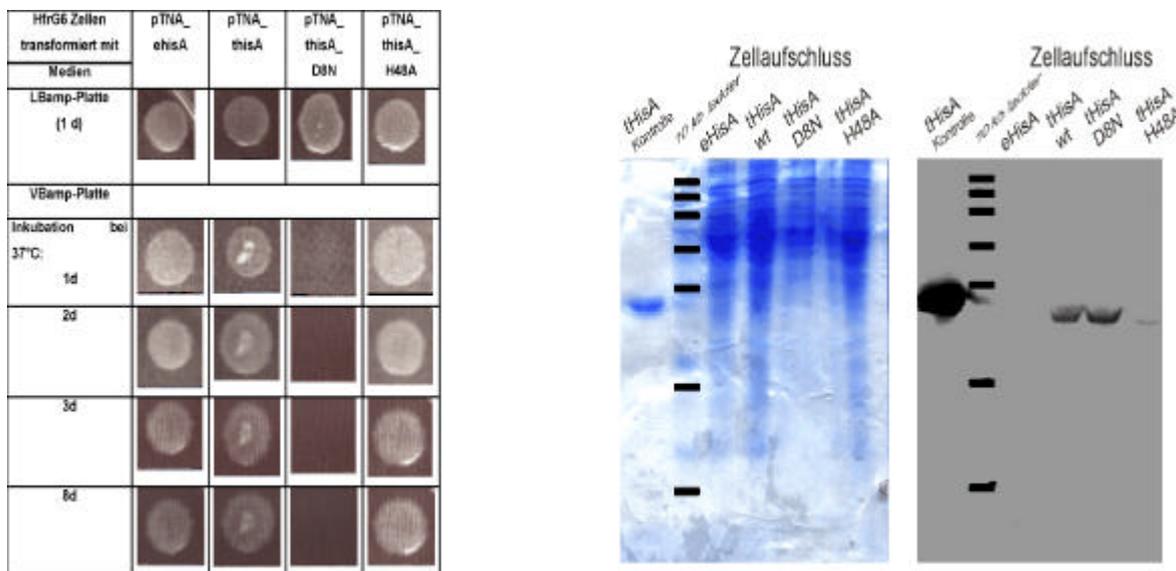


Abbildung 4.2.: In vivo Komplementation (links) und Proteinnachweis nach Aufschluß von $\Delta hisA$ -Zellen (rechts). $\Delta hisA$ wurde mit verschiedenen *hisA*-Genvarianten transformiert. LINKS: Auf LB_{amp} können alle plasmidtragenden Zellen heranwachsen, auf Minimalmedium nur Zellen mit katalytisch aktivem tHisA. tHisA_D8N, ist katalytisch inaktiv (siehe Ergebnisteil 4.2.) und kann deshalb kein Koloniewachstum erzeugen. RECHTS: SDS-PAGE: aufgetragen wurden je 20 μ l der löslichen Fraktion des Zellaufschlusses, als Kontrolle 7 μ M gereinigtes tHisA, Marker 10 kb Leiter (2.5.2.); die Anfärbung erfolgte mit Coomassie-Blau. Western Blot der SDS-PAGE: Durch Inkubation mit tHisA-Antikörper werden in den Zellaufschlüssen vergleichbare Mengen an tHisA und tHisA_ nachgewiesen. eHisA kann mit dem Antikörper nicht detektiert werden.

Nach Transformation von $\Delta hisA$ mit den entsprechenden Genvarianten und Anzucht in Vollmedium, wurden die Zellen aufgeschlossen und versucht die Proteinmengen über SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot (3.5.5.) abzuschätzen. Wie das Coomassie gefärbte SDS-Gel zeigt, enthalten die transformierten Zellen etwa die gleiche Menge an löslichen Zellproteinen; es ist jedoch keine Bande zu erkennen, die tHisA entsprechen könnte. Dagegen zeigt der Western Blot, das vergleichbare Mengen an Protein von tHisA_Wildtyp und tHisA_D8N vorliegen.

3. Es muß Klarheit darüber bestehen, auf welche katalytische Parameter das *in vivo*-System selektiert.

Der Zeitraum bis zum Auftauchen sichtbarer Kolonien von $\Delta hisA$ -Zellen auf Selektivmedium war unabhängig davon, ob sie mit *thisA*, *thisA_2* oder *thisA_6* transformiert wurden. Während jedoch die k_{cat} -Werte dieser 3 Proteinvarianten identisch waren, lag der K_M^{ProFAR} von tHisA_6 60-fach über dem von tHisA und tHisA_2, die

katalytische Effizienz war dementsprechend erniedrigt (Tabelle 4.3.).

Tabelle 4.3.: Änderungen in k_{cat} und K_M der Varianten tHisA_2 und tHisA_6 im Vergleich zum tHisA_wt

Varianten	$K_M^{\text{ProFAR}} \text{ Variante} /$ $K_M^{\text{ProFAR}} \text{ wt}$	$k_{cat} \text{ wt} /$ $k_{cat} \text{ Variante}$	$k_{cat} / K_M^{\text{ProFAR}} \text{ wt} /$ $k_{cat} / K_M^{\text{ProFAR}} \text{ Variante}$
tHisA_2	1	1,1	1,1
tHisA_6	60	1,2	70

Weder K_M^{ProFAR} noch $k_{cat} / K_M^{\text{ProFAR}}$ korrelieren also mit der Komplementationsdauer *in vivo* und können somit nicht die Parameter sein, auf die im verwendeten System selektiert wird. Unter der Annahme, daß tHisA, tHisA_2 und tHisA_6 in etwa gleichen Mengen in den $\Delta hisA$ -Zellen vorliegen (vgl. Abbildung 4.2.), kommt somit nur k_{cat} als selektierter Parameter in Frage. Diese Annahme wurde durch die Untersuchung einer Reihe weiterer tHisA-Varianten mit einzelnen Aminosäureaustauschen bestätigt (siehe Ergebnisteil 4.2.). In jedem Fall korrelierte die Komplementationsdauer mit dem k_{cat} -Wert des gereinigten Enzyms, in keinem Fall mit k_{cat} oder $k_{cat} / K_M^{\text{ProFAR}}$ (siehe Ergebnisteil 4.2.).

Warum ist dies so? Da die Expression des *his*-Operons unter den gegebenen Versuchsbedingungen (Abwesenheit von externem Histidin) dereprimiert ist, werden die ersten Enzyme des Biosyntheseweges (HisG und HisH-E) große Mengen an ProFAR synthetisieren. Da internes HisA fehlt, wird sich ProFAR trotz seiner relativ geringen Stabilität anreichern. Unabhängig von jeweiligen K_M^{ProFAR} -Wert, werden deshalb vermutlich alle tHisA-Varianten vollständig mit Substrat gesättigt sein. Die Umsatzrate hängt damit – bei gegebener Enzymkonzentration – nur von der Wechselzahl k_{cat} ab. Bei ähnlichen Versuchen mit zwei Enzymen aus der Tryptophanbiosynthese erwies sich ebenso k_{cat} als der selektierte Parameter (Merz *et al.*, 2000; Jürgens *et al.*, 2000).

4. Es muß gewährleistet sein, daß auch geringe Verbesserungen im selektierten enzymkinetischen Parameter detektierbar sind.

In Tabelle 4.4. werden die Komplementationsdauer nach Transformation von $\Delta hisA$ -Zellen mit den k_{cat} -Werten verschiedener HisA-Varianten verglichen. Es zeigt sich, daß eHisA nur zu einem geringfügig beschleunigten Wachstum gegenüber tHisA und tHisA_H48A führt, obwohl sein k_{cat} -Wert ca. 3 - 4 bzw. 10 mal höher liegt.

Tabelle 4.4.: Vergleich der *in vivo* Komplementation bei 37°C mit dem k_{cat} -Wert einiger HisA-Varianten bei 25°C

Variante	eHisA	tHisA	tHisA_H48A	tHisA_2	tHisA_6
k_{cat} [1/s]	4,9	1,4	0,38	0,87	0,83
$\frac{k_{cat}^{eHisA}}{k_{cat}^{Variante}}$	1	3,5	12,9	5,6	5,9
<i>in vivo</i> Komplementation nach ~ x Stunden	20 h +/- 2h	24 h +/- 2h	24 h +/- 2h	24 h +/- 2h	24 h +/- 2h

4.1.6. Resümee

Der katalytische Parameter auf den das *in vivo* System selektiert ist der k_{cat} -Wert. Das Selektionssystem erfüllt alle an es gestellte Anforderungen mit einer Ausnahme: geringe Verbesserungen des k_{cat} -Wertes können nicht über unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit von transformierten $\Delta hisA$ -Zellen nachgewiesen werden (Tabelle 4.4.). Dies bedeutet, dass der k_{cat} -Wert von tHisA bei 25°C (37°C) bereits zu nah an dem von eHisA liegt, als daß eine weitere Verbesserung im verwendeten Selektionssystem detektierbar wäre.

4.1.7. Diskussion

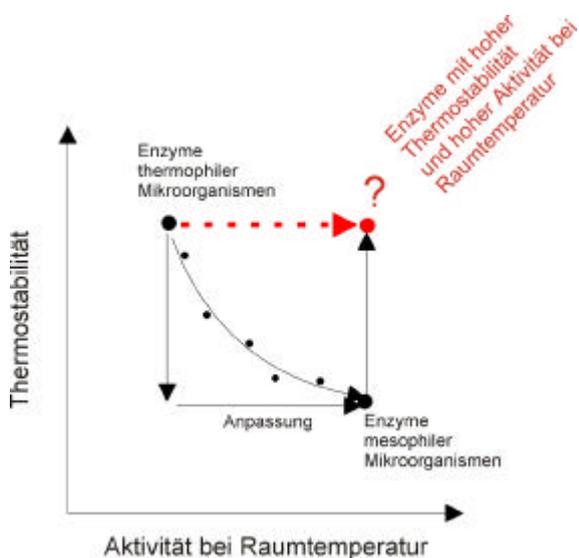


Abbildung 4.3.: Enzyme, die aus bei verschiedenen Temperaturbedingungen lebenden Organismen isoliert werden, zeigen in der Regel hohe Thermostabilität und eine nur schwache Aktivität bei niedrigen Temperaturen. Mesophile Enzyme sind hingegen aktiver bei Raumtemperatur aber nur wenig thermostabil. Enzyme, die beide Eigenschaften erfüllen, sind nur selten in der Natur. HisA aus *Thermotoga maritima* ist einer der seltenen Vertreter. (Abbildung modifiziert nach Arnold et al., 2001)

∴ Mikroorganismen lebend in verschiedenen Temperaturbereichen; : Idealvertreter für mesophile und thermophile Enzyme: postulierte Enzyme, die die Eigenschaften Thermostabilität und hohe enzymatische Aktivität bei niedrigen Temperaturen erfüllen.

Der hohe k_{cat} -Wert von tHisA bei „mesophilen“ Temperaturen zeigt, daß Enzyme signifikante katalytische Aktivität bei niedrigen Temperaturen und hohe Thermostabilität in sich vereinigen können. Ähnliches wurde bereits für die Enzyme Phosphoanthranilat

Isomerase (tTrpF) und Indolglyzerolphosphat Synthase (tTrpC) aus der Tryptophanbiosynthese von *T. maritima* beobachtet (Sternier *et al.*, 1996; Merz *et al.*, 1999). Als zwangsläufige Konsequenz der Zunahme von k_{cat} mit der Temperatur ergibt sich daraus, daß tHisA, tTrpF und tTrpC bei 80°C deutlich höhere k_{cat} – und damit auch deutlich höhere k_{cat}/K_M -Werte aufweisen als ihre mesophilen Homologen bei 37°C.

Für tHisA und tTrpF wird angenommen, dass sie damit dem raschen Zerfall ihrer thermolabilen Substrate, den Aminoaldosen ProFAR bzw. PRA, effizient entgegenwirken (Sternier *et al.*, 1996; Schmidt, 1999).

Viele orthologe Enzyme von Hyperthermophilen und Mesophilen sind dagegen bei ihren korrespondierenden physiologischen Temperaturen vergleichbar aktiv. Diese „*corrospoding states*“ (Somero, 1978; Jaenicke, 1991) sind wahrscheinlich auf eine identische Konformationsflexibilität der mesophilen und thermophilen Enzyme bei ihrer jeweils optimalen Wachstumstemperatur zurückzuführen (Závodszy *et al.*, 1998; Jaenicke, 2000).

Das hyperthermophile Enzym TrpC aus *Sulfolobus solfataricus*, konnte in seiner enzymatischen Aktivität bei Raumtemperatur durch gerichtete Evolution verbessert werden (Merz *et al.*, 2000). Dabei wurde festgestellt, daß die erhöhte Aktivität bei Raumtemperatur durch eine Erhöhung der Flexibilität eines Loops am aktiven Zentrum verursacht wurde. Umgekehrt wiesen mesophile Enzyme, deren Thermostabilität durch gerichteten Austausch von Aminosäuren erhöht wurde, eine verringerte enzymatische Aktivität bei Raumtemperatur auf (Wray *et al.*, 1999; Shoichet *et al.*, 1995).

tHisA, tTrpF und tTrpC zeigen jedoch, ebenso wie einige durch „Protein design“ erzeugte Enzymvarianten, daß hohe katalytische Aktivität bei niedrigen Temperaturen miteinander vereinbar sind (van den Burgh *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 2001).

Die Tatsache, daß nur wenige in der Natur vorkommende Enzyme beide Eigenschaften gleichzeitig aufweisen, zeigt damit nur, dass im Laufe der Evolution nicht auf diese Eigenschaften selektiert wurde.

Enzyme aus mesophilen Organismen stehen unter keinem Selektionsdruck, extrem thermostabil zu sein. Analog dazu muß die katalytische Aktivität von Enzymen aus hyperthermophilen Organismen bei unphysiologisch niedrigen Temperaturen nicht hoch sein (Miyazaki *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 2001).

4.2. Identifizierung katalytisch essentieller Reste des Enzyms ProFAR-Isomerase aus *Thermotoga maritima*

4.2.1. Auswahl von potentiell für die Katalyse wichtiger Aminosäuren

Die ProFAR-Isomerase (HisA) katalysiert den vierten Schritt der Histidinbiosynthese, eine Amadori-Umlagerung (Isbell und Frush, 1958; Smith und Ames, 1964) von ProFAR zum PRFAR. Diese intramolekulare Redoxreaktion, von einer Amino-Aldose zum korrespondierenden Ketosederivat, beinhaltet vermutlich eine Reihe von Proton-Transfer-Schritten.

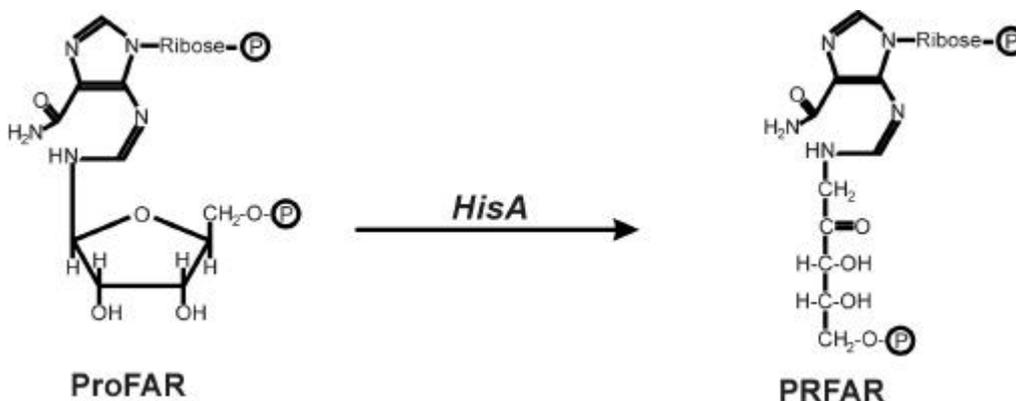


Abbildung 4.4.: Reaktionsschema der HisA-Reaktion. ProFAR, die Aminoaldose wird durch HisA in einer intramolekularen Redoxreaktion zu PRFAR, der Aminoketose umgesetzt.

Zu Beginn der Arbeit war für HisA die Struktur eines $(\beta\alpha)_8$ -Barrels vorhergesagt (Wilmanns und Eisenberg, 1993, 1995; Thoma, 1998). Inzwischen konnte die Struktur von HisA aus *T. maritima* durch Röntgenkristallographie in einer Auflösung von 1,85 Å aufgeklärt (Lang *et al.*, 2000) und die vorhergesagte $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Faltung bestätigt werden. $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Proteine zeigen die für die Katalyse wichtigen Reste immer am C-Terminus von β -Strängen oder in den daran anschließenden Loops („Katalyse-Pol“), wohingegen für die Stabilität wichtige Reste sich im Nterminalen Bereich des Fasses befinden (Luger *et al.*, 1989; Thoma *et al.*, 2000; „Stabilitäts-Pol“, Höcker *et al.*, 2001b; siehe auch: Topologie des TIM-Barrels Abbildung 1.3.).

Ein weiteres Kriterium, um mögliche katalytisch essentielle Reste eines Enzyms zu identifizieren, ist ihre Konservierung in verschiedenen Spezies. Multiple Sequenzvergleiche zwischen 24 HisA-Varianten der verschiedensten Organismen zeigten, daß 29 Reste, die tHisA besitzt, in mehr als 80% der Sequenzen konserviert waren (Schmidt, 1999). Im Falle von tHisA, das mehrere Protonentransfer-Schritte katalysieren muß, konzentriert sich die Suche auf konservierte Reste, deren Seitenketten als allgemeine

Säure bzw. allgemeine Base wirken können. Aminosäuren, die diesen Kriterien der (i) Lage am „Katalyse-Pol“ von tHisA, der (ii) Konservierung und der (iii) Imitationsfähigkeit der Seitenkette genügten, sollten durch annähernd isosterische, jedoch chemisch inerte Reste ersetzt werden. Der Einfluß des Austausches auf die Aktivität von tHisA *in vivo* und *in vitro* sollte Aufschluß über die relative Bedeutung der ersetzten Reste erlauben und die Grundlage zum Entwurf eines plausiblen Reaktionsmechanismus legen.

Entsprechend der angesprochenen Kriterien werden folgende Aminosäuren ausgewählt, die ausgetauscht werden sollten:

konserviert		v	p	a	i	d	l	g	v	l	G	p	y	g	i	H	v																																	
HisA	1	M	L	V	V	P	A	I	D	L	F	R	G	K	V	A	R	M	I	K	R	K	E	N	T	I	F	Y	E	K	D	P	V	E	L	V	E	K	L	I	E	E	G	F	T	L	I	H	V	V
ausgetauscht		N																A																																
konserviert		d	L	g	a	n	l	l	i	g	G	g	i	r	g	r	v																																	
HisA	51	D	L	S	N	A	I	E	N	S	G	E	N	L	P	V	L	E	K	L	S	E	F	A	E	H	I	Q	I	G	G	G	I	R	S	L	D	Y	A	E	K	L	R	K	L	G	Y	R	R	Q
ausgetauscht		N																																																
konserviert		i	v	g	s	a	l	l	l	l	d	g	v	g	w																																			
HisA	101	I	V	S	S	K	V	L	E	D	P	S	F	L	K	S	L	R	E	I	D	V	E	P	V	F	S	L	D	R	G	R	V	A	F	K	G	W	L	A	E	E	E	I	D	P	V	S		
ausgetauscht		N																																																
konserviert		v	t	i	d	g	l	g	i	G	g	i																																						
HisA	151	L	L	K	R	L	K	E	Y	L	E	E	I	V	H	T	E	I	E	K	D	G	T	L	Q	E	H	D	F	S	L	T	K	K	I	A	I	E	A	E	V	K	V	L	A	A	G	G	I	
ausgetauscht		A/H																																																
konserviert		i	d	G	g	i	v	g	a																																									
HisA	201	S	S	E	N	S	L	K	T	A	Q	K	V	H	T	E	T	N	G	L	K	G	V	I	V	G	R	A	F	L	E	G	I	L	T	V	E	V	X	K	R	Y	A	R						
ausgetauscht																																																		

Abbildung 4.5.: Aminosäuresequenz von tHisA. (i) Aminosäuren innerhalb Sekundärstrukturelemente sind farbig gekennzeichnet: grün: β -Stränge, rot: α -Helices. (ii) Konsensussequenz konservierte Reste: Grossbuchstaben: Rest ist in allen der 24 alignen Sequenz konserviert. (iii) ausgetauschte Reste: in Fettdruck unterhalb der Sequenz. Einzelheiten zu den Aminosäure-Austauschen finden sich im Text.

- Aspartat 8, im Strang β 1 gelegen, in 100% de 24, zum Alignment (siehe Anhang A, Schmidt, 1999) verwendeten HisA-Sequenzen konserviert
- Histidin 48, Lage ist im Strang β 2, ist ebenfalls zu 100% konserviert.
- Aspartat 51, liegt wie H48 im Strang β 2 und ist zu ca. 80% konserviert. H48 und D51 liegen innerhalb eines konservierten Musters: $iH_{48}vvd_{51}L$.
- Arginin 83, liegt im auf den Strang β 3 folgenden Loop (β 3 α 3) am Ende einer hoch-konservierten Sequenz GGGIR, die mit der Bindung der Substratphosphatreste in Verbindung gebracht wird. Arginine haben oft die Aufgabe zur Stabilisierung von

Phosphatresten beizutragen (Chakrabarti, 1993; Copley und Barton, 1994).

- Aspartat 127, liegt im Strang $\beta 5$ und ist in 22 der 24 verwendeten Sequenzen konserviert.
- Threonin 164 liegt im Strang $\beta 6$, und ist in allen bakteriellen und archaeellen Sequenzen konserviert. Eukaryotische Sequenzen besitzen an dieser Position ein Histidin.
- zusätzlich wurde der Austausch H163A vorgenommen. Histidin 163 liegt direkt neben dem Threonin 164. Da einige Zuckerisomerasen ein Histidin in ihren aktiven Zentren aufweisen (Knowles, 1991; Harris *et al.*, 1998; Teplyakov *et al.*, 1999) und in eukaryotischen Sequenzen an Position „164“ ein Histidin konserviert ist (Alignment, Anhang A), sollte geprüft werden, ob ein Einfluß auf die Katalyse durch das Entfernen des Restes Histidin 163 feststellbar ist.

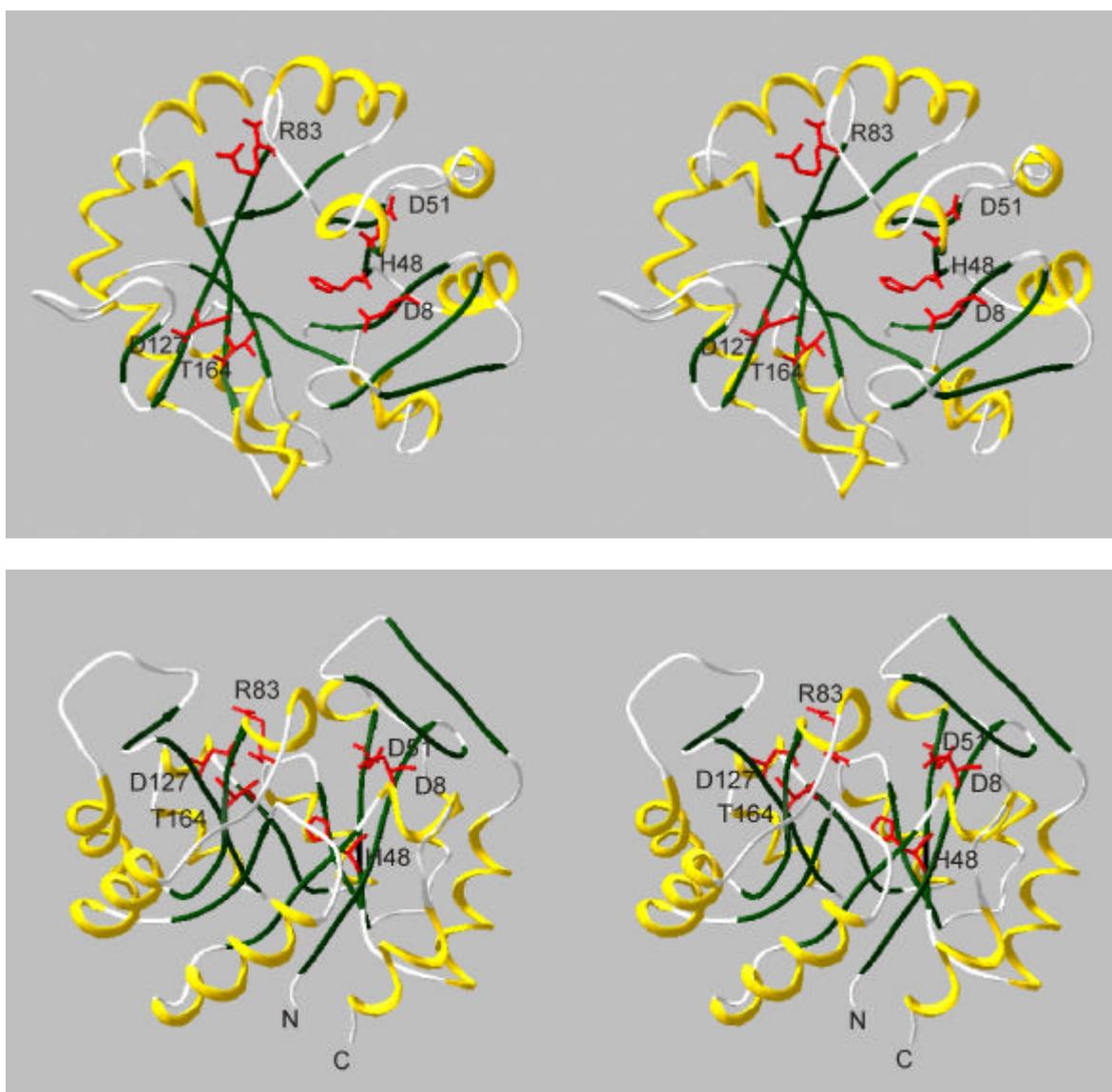


Abbildung 4.6.: Aufsicht und Frontansicht des tHisA-Barrels. Gezeigt ist die räumliche Lage der ausgetauschten Aminosäurereste.

4.2.2. Austausch der ausgewählten Aminosäuren durch gerichtete Mutagenese

Die einzelnen Aminosäuren werden durch zielgerichtete Mutagenese mittels Megaprimer-PCR ausgetauscht (Sakar und Sommer, 1990; Barik 1998; 3.3.8.1.1.).

Asp8, 51 und 127, sowie Arg83, die geladene Seitenketten besitzen, wurden jeweils durch Asp ersetzt, dessen Seitenkettenamid nicht als allgemeine Säure oder Base wirken kann. Die Reste His48 und Thr164 wurden gegen das kleinere Ala, Thr164 zusätzlich durch ein Histidin, ersetzt.

Zusätzlich zur *missense* Mutation wurde eine stille Mutation eingeführt, welche eine neue Schnittstelle kreierte oder eine bestehende zerstörte. Diese Schnittstelle erleichtert die Identifizierung von Klonen, die die gewünschte Mutation tragen (Barik, 1998; 3.3.8.1.1. und 2.3.).

4.2.3. Expression der *thisA*-Gene und Reinigung der Proteinprodukte

Zur Expression wurde das pDM,pDS-System (Bujard *et al.*, 1987; 2.2.4.) genutzt. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* KK8 (Schneider *et al.*, 1981; 2.1.) eingesetzt. Alle tHisA-Varianten fanden sich überwiegend im löslichen Teil des Zellextraktes (CRX) und konnten durch einen Hitzeschritt angereichert werden. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie mit einer Red Sepharose Säule (Reinigungsprotokoll: Abbildung 4.8., nach Schmidt, 1999).

Abbildung 4.7. zeigt die SDS-PAGE einer Proteinreinigung am Beispiel der Variante tHisA_D127N. Das Protein ist zu >99% rein.

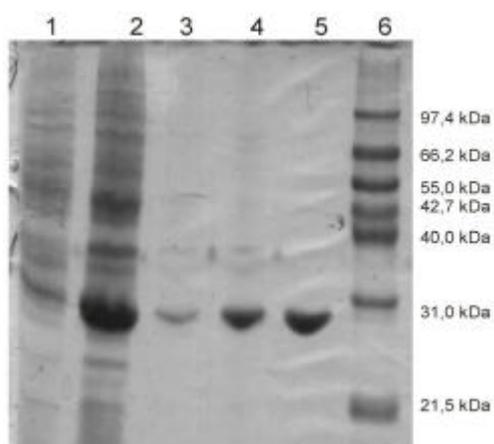


Abbildung 4.7.: SDS-PAGE (15% Acrylamid) der Proteinreinigung von tHisA_D127N. Spur 1: CRX ohne Induktion mit IPTG; Spur 2: CRX nach Induktion; Spur 3: Überstand nach Hitzeschritt; Spur 4: vereinigte Fraktionen nach Affinitätschromatographie über Red Sepharose; Spur 5: aufkonzentriertes tHisA_D127N; Spur 6: mid range marker (Promega)

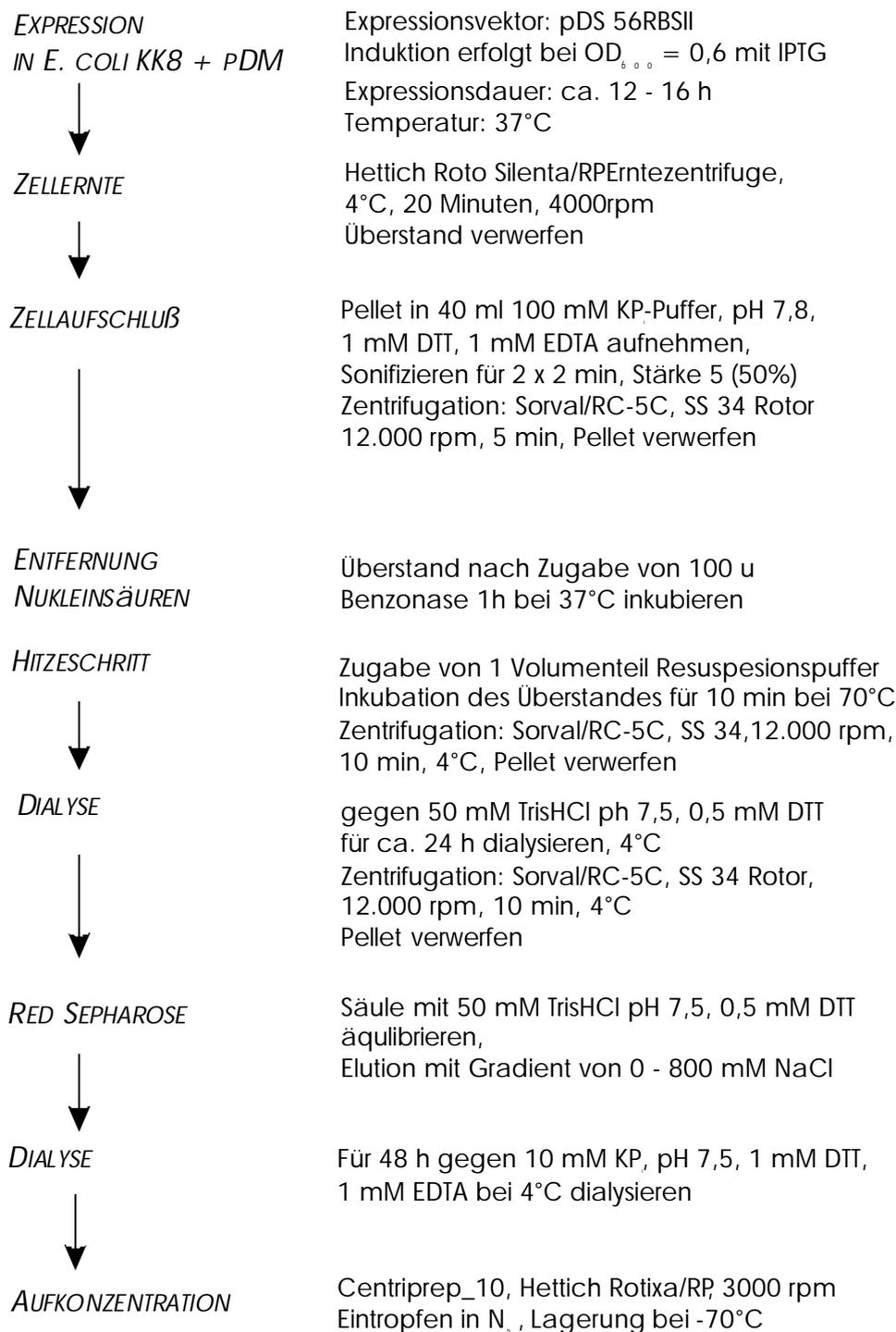
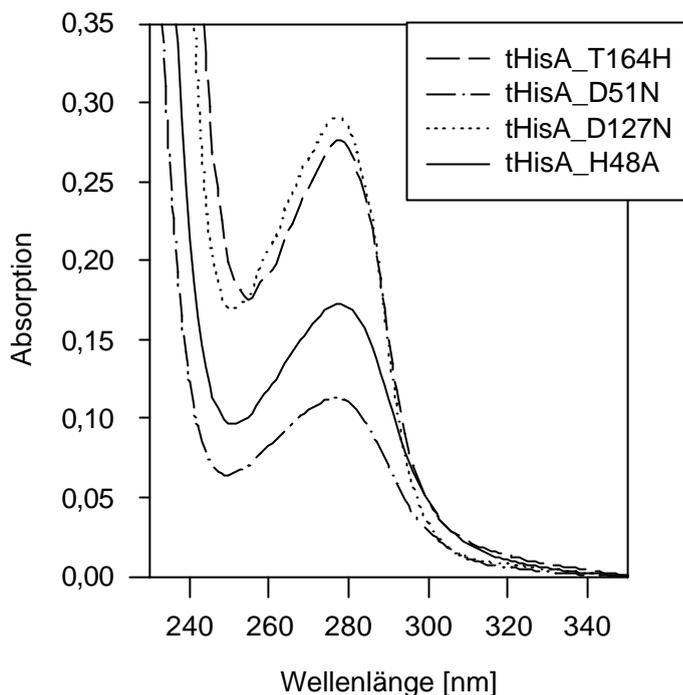


Abbildung 4.8.: Schematischer Überblick über die Expression der tHisA-Genvarianten und die Reinigung der Proteinprodukte (nach Schmidt, 1999).

Alle Varianten konnten mit einer Ausbeute von 10 – 15 mg/l Flüssigkultur gereinigt werden. Die Absorptionsspektren der gereinigten und aufkonzentrierten tHisA-Varianten

liefern keinen Hinweis auf nennenswerte Aggregation (Abbildung 4.9.).

Abbildung 4.9.: UV- Absorptions-
spektren der tHisA-Varianten
tHisA_H48A, _D51N, _D127N und
_T164H



4.2.4. Biophysikalische Charakterisierung der hergestellten tHisA-Varianten

Oftmals führen Aminosäureaustausche zu einer Änderung der Proteinkonformation (Fersht, 1999). Dies kann zur Einschränkung der Aktivität eines Enzyms führen, ohne daß der ausgetauschte Rest direkt an der Katalyse beteiligt ist. Um derartige Effekte auszuschließen, wurden alle tHisA-Varianten mittels analytischer Gelfiltration (4.2.4.1.) und Fluoreszenzspektroskopie (4.2.4.2.) untersucht und mit Wildtyp tHisA verglichen.

4.2.4.1. Bestimmung des apparenten Molekulargewichts durch analytische Gelfiltration

Aus den Elutionsvolumina wurden mittels einer Kalibrierungskurve (Anhang E) die apparenten Molekulargewichte berechnet. Sie deuten darauf hin, dass alle tHisA-Varianten als Monomere vorliegen (Tabelle 4.5.).

Tabelle 4.5 : Die apparenten Molekulargewichte der tHisA-Varianten. Gezeigt sind die Elutionsvolumina V_e der tHisA-Varianten und die dazu über eine Kalibrierungskurve (Anhang E) ermittelten apparenten Molekulargewichte (MW), sowie die aus der Aminosäuresequenz berechneten theoretischen Molekulargewichte (MW_{th}). *: Daten aus Schmidt (1999). Alle untersuchten tHisA-Varianten liegen als Monomer vor.

Variante	V_e [ml]	MW [kDa]	MW_{th} [kDa]	Assoziations- zustand
tHisA_wt	12,30	25,8	27,03	Monomer
tHisA_wt*	11,40	27,3	27,03	Monomer
tHisA_D8N*	11,35	27,9	27,03	Monomer
tHisA_H48A	12,30	25,8	26,96	Monomer
tHisA_D51N	12,15	27,3	27,03	Monomer
tHisA_R83N	12,15	27,3	26,99	Monomer
tHisA_D127N	12,30	25,8	27,03	Monomer
tHisA_T164A*	11,35	27,9	27,00	Monomer
tHisA_T164H	12,15	27,3	27,07	Monomer

4.2.4.2. Fluoreszenz-Spektroskopie

Konformationsänderungen von Proteinen lassen sich durch Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften verfolgen, die auf Änderungen der Umgebung von Tryptophan-Resten zurückgehen (Schmid, 1997).

tHisA besitzt nur einen Tryptophanrest, der an Position 138, im auf den Strang $\beta 5'$ folgenden Loop liegt. Im Wildtyp-Protein ist dieser Tryptophanrest Lösungsmittel-exponiert, was durch ein Maximum der Fluoreszenzemission bei 346 nm belegt wird (Schmidt, 1999). Tabelle 4.6. zeigt, dass sich die Emissionsmaxima der tHisA-Varianten von denen des Wildtypenzymns nur wenig unterscheiden.

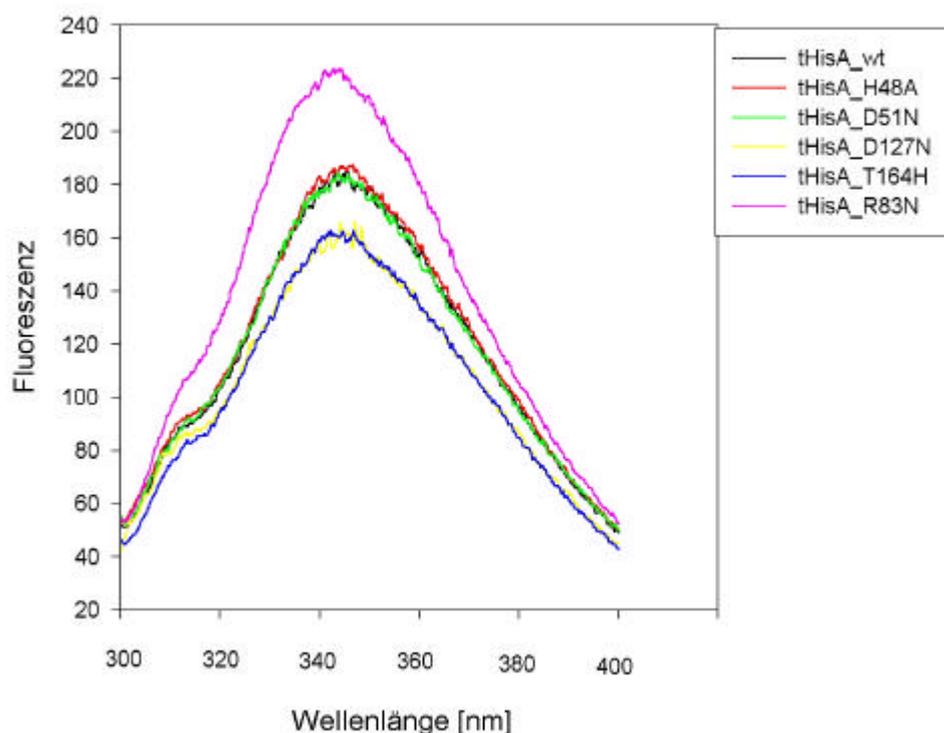


Abbildung 4.10.: Die Fluoreszenzmaxima von *tHisA* und aller Varianten deuten darauf hin, dass der einzige Tryptophanrest dem Lösungsmittel zugewandt ist. Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung der Proteine (50 $\mu\text{g/ml}$ in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5) bei 295 nm. Die Spektren wurden bei 25°C aufgenommen.

Tabelle 4.6.: Emissionsmaxima der *tHisA*-Varianten; * Daten aus Schmidt (1999).

tHisA-Varianten	tHisA_wt	tHisA_D8N*	tHisA_H48A	tHisA_D51N	tHisA_R83N	tHisA_D127N	tHisA_T164A*	tHisA_T164H
λ max	345 nm	345 nm	347 nm	346 nm	344 nm	347 nm	344 nm	347 nm

Dies deutet darauf hin, dass die Umgebung des Tryptophans 138 sich in den einzelnen Varianten nur wenig unterscheidet und auch weitgehend mit der Umgebung des Tryptophans im Wildtyp-Protein identisch ist (Abbildung 4.10.).

Die Ergebnisse aus analytischer Gelfiltration und Fluoreszenzspektroskopie belegen, dass sich die Proteinkonformationen der *tHisA*-Varianten nicht signifikant von der des Wildtypenzym unterscheiden. Dies bedeutet, daß reduzierte enzymatische Aktivitäten der einzelnen Varianten auf eine Rolle des ausgetauschten Restes in der Katalyse der *tHisA*-Reaktion hinweisen und nicht auf eine Änderung der Struktur des Enzyms.

4.2.5. Test auf Komplementation eines *E. coli hisA*-Defizienzstammes durch die verschiedenen tHisA-Varianten

Die Bedeutung ausgetauschter Aminosäuren für die Katalyse wurde über die Fähigkeit der Varianten zur Komplementation der *hisA*-Defizienz des *E. coli*-Stammes HfrG6 getestet. Dazu wurden die *thisA*-Genvarianten zunächst in das Plasmid pTNA umkloniert. pTNA entspricht weitgehend dem pDS-Plasmid jedoch ist der lac-Promotor durch einen modifizierten Promotor des *E. coli* Tryptophanasegens ersetzt (2.2.4.).

Dies führt zu einer konstitutiven Expression klonierten *thisA*-Genvarianten auf relativ niedrigem Level (Merz *et al.*, 2000; Jürgens *et al.*, 2000). Elektrokompente Zellen des *HisA*-Defizienzstammes HfrG6 (Matney, 1964) wurden mit den pTNA_*thisA*-Konstrukten transformiert.

Als Negativ- und Positivkontrollen wurden der untransformierte bzw. der mit pTNA_*thisA*_wt transformierte HfrG6-Stamm ausgetropft. Die Zellen wurden 4 Stunden bei 37°C gekurt und danach dreimal mit 1,0 ml sterilem Minimalmedium gewaschen. Jeweils 50 µl dieser Lösung wurde auf Selektivplatten (VB_{amp}) und zur Kontrolle der Transformation auf LB_{amp}-Platten aufgetropft. Die Platten wurden bei 37°C für maximal 10 Tage inkubiert. Tabelle 4.7. gibt einen Überblick auf das Wachstum der Transformanten auf den Selektivplatten.

Tabelle 4.7.: Ergebnisse der *in vivo*-Komplementation durch die tHisA-Varianten.

HfrG6 transformiert mit:	Wachstum
<i>thisA</i> _D8N	kein Wachstum nach 10 Tagen
<i>thisA</i> _H48A	Wachstum über Nacht
<i>thisA</i> _D51N	Wachstum über Nacht
<i>thisA</i> _R83N	Wachstum über Nacht
<i>thisA</i> _D127N	kein Wachstum nach 10 Tagen
<i>thisA</i> _H163A	Wachstum über Nacht
<i>thisA</i> _T164A	Wachstum nach 2 Tagen
<i>thisA</i> _T164H	kein Wachstum nach 10 Tagen
<i>thisA</i> _wt	Wachstum über Nacht
ohne Plasmid	kein Wachstum nach 10 Tagen

Ausgehend von den Ergebnissen der *in vivo* Komplementation des *E. coli* $\Delta hisA$ -Stammes, scheinen die Reste His48, Asp51, Arg83 und His163 für die Katalyse der HisA-Reaktion nicht essentiell zu sein. Der Austausch der Reste Asp8 (Schmidt, 1999), Asp127 verhindern dagegen die Komplementation *in vivo*, ebenso der Austausch von Thr164 gegen His. Dagegen führt der Austausch von Thr164 gegen Ala nur zu einem

verlangsamten Wachstum der Zellen.

4.2.6. Aktivitätsmessung der tHisA-Varianten

Die enzymatische Aktivität der tHisA-Varianten wurden unter Fließgleichgewichtsbedingungen (3.5.7.1.) gemessen, wobei gesamte Umsatzkurven aufgenommen wurden. Aus der Anfangssteigung unter Substratsättigung wurde graphisch v_{max} und die Wechselzahl nach $k_{cat} = v_{max} / [E_0]$ ermittelt. Zusätzlich wurden die gesamten Umsatzkurven mit der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung analysiert, wodurch zusätzlich zu v_{max} auch der K_M -Wert für das Substrat ProFAR bestimmt werden konnte.

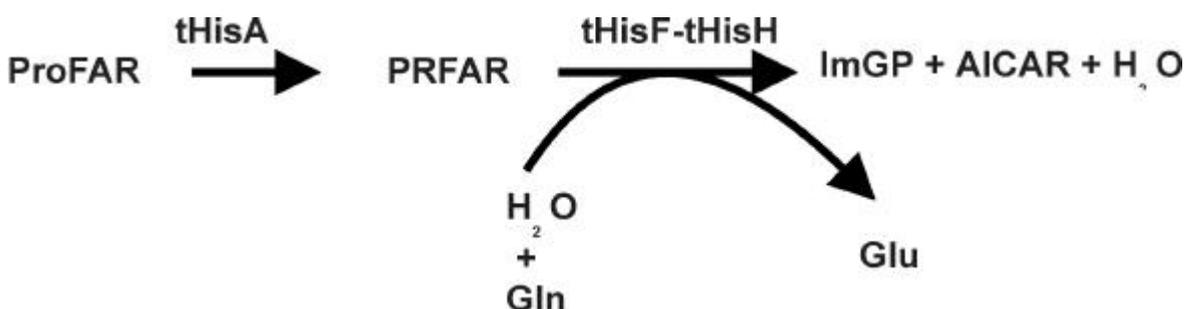


Abbildung 4.11.: Reaktionsschema der *in vitro* Enzymreaktion. Ausgehend von ProFAR wird im *in vitro* Enzymassay die Reaktion von HisA mit der von HisF/HisH gekoppelt. Endprodukte sind AICAR und ImGP.

Die ermittelten k_{cat} - und K_M -Werte, sowie die katalytischen Effizienzen k_{cat}/K_M^{ProFAR} , der tHisA-Varianten sind in Tabelle 4.8. (folgende Seite) denen des Wildtyps gegenübergestellt.

Den grössten Einfluss in der enzymatischen Aktivität *in vitro* weisen die Varianten tHisA_D8N, tHisA_D127N und tHisA_T164H auf, gefolgt von tHisA_T164A. Diese Ergebnisse decken sich mit den Komplementationsversuchen *in vivo* (Tabelle 4.7.). Auffallend ist, dass die Fähigkeit zur Komplementaion mit dem k_{cat} und k_{cat}/K_M^{ProFAR} -Werten der Varianten korreliert, nicht jedoch mit den K_M^{ProFAR} -Werten. So kann die Variante mit dem höchsten K_M^{ProFAR} -Wert, tHisA_R83N die *hisA*-Defizienz ebenso über Nacht komplementieren wie das Wildtypenzym. Diese Komplementationsergebnisse korrelieren mit den in Ergebnisteil 4.1. gezeigten, ermittelten Ergebnissen.

Tabelle 4.8.: katalytische Parameter der tHisA-Varianten:

Variante	k_{cat} [1/s]	$k_{cat_wt}/$ k_{cat_PM}	K_m [μ M]	$K_m_PM/$ K_m_wt	k_{cat}/K_m [1/ μ Ms]	$k_{cat}/K_m_wt/$ k_{cat}/K_m_PM	Komplementation <i>in vivo</i>	Lage in Struktur
tHisA_D8N ¹⁾	keine Aktivität messbar						keine	β 1
tHisA_H48A ²⁾	0,38	1,7	2,9	4,8	0,131	8,5	üN	β 2
tHisA_D51N ²⁾	0,29	2,3	6,4	10,6	0,046	24	üN	β 2
tHisA_R83N ²⁾	0,23	2,9	37,9	63,2	0,006	185,0	üN	Loop zw. β 3 α 3
tHisA_D127N ²⁾	$2,7 \times 10^{-4}$	2792	2,0	3,4	$1,3 \times 10^{-4}$	8540	keine	β 5
tHisA_T164A ¹⁾	0,018	37,2	5,6	9,3	0,003	370	nach 2 Tagen	β 6
tHisA_T164H ²⁾	$1,3 \times 10^{-3}$	515	19,8	33	$6,8 \times 10^{-3}$	1630	keine	β 6
tHisA_wt ²⁾	0,67	1	0,6	1	1,11	1	üN	

1) Schmidt, 1999: in 50 mM TrisHCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, 1 mM DTT, je 1 μ M HisF/H, 5 mM Gln, 20 μ M ProFAR, T=22°C

2) in 50 mM TrisHCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, 1 mM DTT, je 1 μ M HisF/H, 5 mM Gln, variabel ProFAR, T=25°C

Die zusätzlich angefertigte Variante tHisA_H163A wurde ausschließlich durch *in vivo* Komplementation geprüft. Die Komplementation des Δ hisA-Stammes erfolgte über Nacht.

4.2.7. Ansätze zur Kristallisation

Die beiden Varianten tHisA_D8N und _D127N wurden nochmals aufgereinigt (Abbildung 4.7.) und auf eine Endkonzentration von ca. 10 mg/ml in 10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT eingeeengt. Beide Enzyme zeigen keine oder nur noch schwache HisA-Aktivität (Tabelle 4.8.) In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Matthias Willmans am EMBL/DESY in Hamburg wird an einer Ko-Kristallisation mit dem Substrat ProFAR gearbeitet, um eine genaue Vorstellung von der Lage des Substrates innerhalb des aktiven Zentrums zu erhalten und dadurch Rückschlüsse auf den Katalysemechanismus ziehen zu können. Bisherige Ansätze, bei denen das Substrat 5'-ProFAR auf bereits gebildete Kristalle gegeben wurde (*soaken*), führten zum Auseinanderbrechen der Kristalle (M. Walker, pers. Kommunikation). Dies deutet darauf hin, dass die Substratbindung zu signifikanten Konformationsänderungen des Proteins führt.

4.2.8. Diskussion

Meist sind nur zwei bis drei Aminosäurereste direkt an der Lösung oder Bildung von Bindungen beteiligt, bei einer enzymatischen Katalyse beteiligt (Peracchi, 2001). Der Austausch einer dieser essentiellen Reste verändert signifikant die katalytischen Parameter oder gar den Mechanismus einer Reaktion (Plapp, 1995). Die meisten essentiellen Reste wirken als allgemeine Säure oder Base (Peracchi, 2001).

4.2.8.1. Bedeutung der ausgetauschten Aminosäuren für die Katalyse durch tHisA

Um die Effekte der einzelnen Aminosäureaustausche und einen möglichen Mechanismus für die HisA-Reaktion auf struktureller Basis diskutieren zu können, wurde auf eine Hilfskonstruktion zurückgegriffen. Die Kristallstrukturen von tHisA und tHisF lassen sich sehr gut superpositionieren (Lang *et al.*, 2000). In der Struktur von tHisF wurden zwei Moleküle anorganischen Phosphates gefunden, die vermutlich die Lage der Phosphatreste des tHisF-Substrates PRFAR markieren. Michael Hennig (Hoffmann-La Roche, Basel) hat aufbauend auf dieser Annahme das Substrat PRFAR in das aktive Zentrum von tHisF modelliert (unveröffentlichte Daten). Auf Basis dieser Modellierung wurde mit Hilfe der *iterative magic fit*-Option des SwissPDBviewers dieses Substrat von tHisF, PRFAR, welches das Produkt der HisA-Reaktion darstellt, in die tHisA-Struktur eingefügt (Abbildung 4.12.).

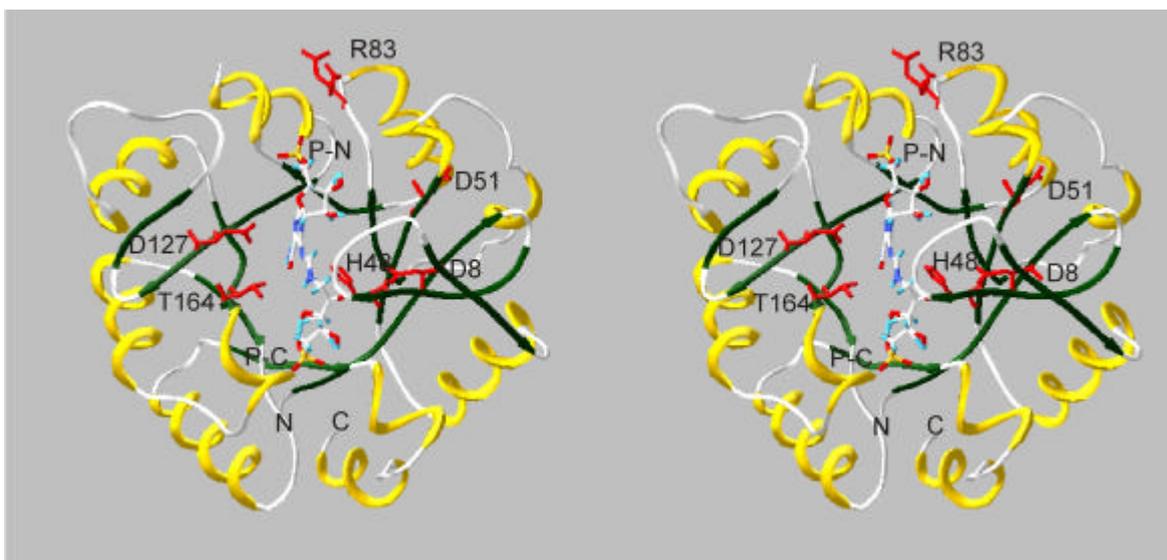


Abbildung 4.12.: Modell des Produktes PRFAR im aktiven Zentrum von *tHisA*. a-Helices in gelb, b-Stränge in grün. Die Seitenketten der ausgetauschten Aminosäuren sind in „ball and stick“-Darstellung gezeigt. Die Phosphatreste von PRFAR sind mit P-N und P-C bezeichnet, da sie in der N- bzw. C-terminalen Hälfte der Struktur liegen. Farbkodierung der Atome: N, blau; O, rot; H, hellblau; C, weiss; P, orange; Aminosäurereste in rot.

Histidin 48:

Die Seitenkette von His48 scheint keine wesentliche Rolle im HisA-Katalysemechanismus zu spielen, da sich der k_{cat} -Wert durch den Austausch His48 Ala nur um einen Faktor von etwa 2 verschlechtert. Der $K_{\text{M}}^{\text{ProFAR}}$ -Wert ist gegenüber dem Wildtyp-Enzym um den Faktor 5 erhöht. In ähnlicher Weise führt der Austausch des analogen His47 in eHisA lediglich zu einer 5-fachen Abnahme von k_{cat} und einer 2-fachen Zunahme von $K_{\text{M}}^{\text{ProFAR}}$ (Hamilton, 1995). Die vollständige Konservierung dieses His-Restes in allen bekannten HisA-Enzymen lässt sich also nicht mit einer Beteiligung an der Katalyse erklären, sondern muss andere, bisher unbekannte Gründe haben.

Aspartat 51:

Die Seitenkette von Asp51 ist für die Katalyse der HisA-Reaktion ebenfalls nicht essentiell, da sich der k_{cat} -Wert durch den Austausch Asp51Asn ebenfalls nur um einen Faktor von etwa 2 verringert. Der $K_{\text{M}}^{\text{ProFAR}}$ -Wert erhöht sich dagegen etwa um eine Größenordnung. Dies bedeutet, daß Asp51 an der Bindung des Substrates beteiligt sein könnte, obwohl seine Seitenkette von PRFAR wegzuzeigen scheint (Abbildung 4.12.).

Arginin 83:

Arg 83 scheint für die Bindung des Substrates sehr wichtig zu sein, da der $K_{\text{M}}^{\text{ProFAR}}$ -Wert durch den Austausch Arg83Asn ca. 60-fach erhöht. Da der k_{cat} um den Faktor 3 zurückgeht, verringert sich die katalytische Effizienz dadurch annähernd 200-fach. Hamilton (1995) hatte für die eHisA-Varianten Arg83Thr und Arg83Lys ca. 40-fach bzw. 70-fach verringerte katalytische Effizienzen ermittelt. Dagegen hatte der Austausch von

Arg98 und Arg131 keine wesentlichen Auswirkungen auf die Aktivität von eHisA (Hamilton, 1995).

Arginin 83 liegt am Ende eines konservierten Sequenzabschnittes gGgir im Loop $\beta 3\alpha 3$ (Abbildung 4.5.), der mit der Erkennung einer der Phosphatreste im Substrat ProFAR in Verbindung gebracht wird (Wilmanns *et al.*, 1991; Bork *et al.*, 1995; Thoma *et al.*, 1998). Hamilton (1995) hatte Monophosphat-Derivate des ProFAR hergestellt und diese mit dem Wildtyp-eHisA umgesetzt. Dabei zeigte sich, dass diese Derivate eine um den Faktor 25 bzw. 35 verringerte Bindung aufwiesen. Dies läßt darauf schließen, daß beide Phosphatreste des Substrats für eine korrekte Orientierung innerhalb des aktiven Zentrums notwendig sind und daß Arg83 dabei eine wichtige Rolle spielt.

Aspartat 8 und Aspartat 127:

Asp8 und Asp127 sind essentiell für die Katalyse. Die Variante tHisA_D8N zeigt keine messbare Aktivität mehr. Der K_M -Wert von tHisA_D127N ist nur unwesentlich im Vergleich zum Wildtyp erhöht, der k_{cat} -Wert ist allerdings um einen Faktor 2800 herabgesetzt. Asp8 und Asp127 sind an den C-terminalen Enden der Stränge $\beta 1$ und $\beta 5$ lokalisiert. Superpositioniert man Hälften von tHisA, so kommen sie an identischen Positionen zu liegen (Lang *et al.*, 2000). Gleiches gilt in HisF für die katalytisch essentiellen Reste Asp 11 und Asp 130 (Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001). Dies führt dazu, daß bei einer Superpositionierung von tHisA und tHisF die Reste Asp8 und Asp11 bzw. Asp127 und Asp130 zur Deckung kommen. Dies stützt die Hypothese, daß HisA und HisF durch divergente Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind, welcher das Resultat der Duplikation eines $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barrels darstellt (Lang *et al.*, 2000; Höcker *et al.*, 2001 a, b).

Threonin 164:

Das Threonin an Position 164 wurde gegen Alanin bzw. Histidin ausgetauscht. Die Variante tHisA_T164A ist in ihrer katalytischen Effizienz um den Faktor 370 schlechter als der Wildtyp, die Variante tHisA_T164H sogar um den Faktor 1670. In beiden Fällen ist sowohl der k_{cat} als auch der K_M^{ProFAR} -Wert betroffen. Threonin 164 scheint somit eine wichtige Rolle in der Katalyse zu spielen.

4.2.8.2. Putativer Mechanismus der HisA-Reaktion

Eine Amadori-Umlagerung ist eine praktisch irreversible Tautomerisierung von Hexose- oder Pentose-Aminen zu α -Aminoketone (Isbell und Frush, 1958; Yaylayan und Huyghues-Despointes, 1994). Amadori-Umlagerungen können spontan (Creighton, 1970) oder enzymatisch katalysiert erfolgen.

Bei der Reaktion von HisA handelt es sich um eine Amadori-Umlagerung, die vermutlich

durch allgemeine Säure-Base-Katalyse beschleunigt wird. Abbildung 4.13. zeigt einen chemisch plausiblen Ablauf der Reaktion.

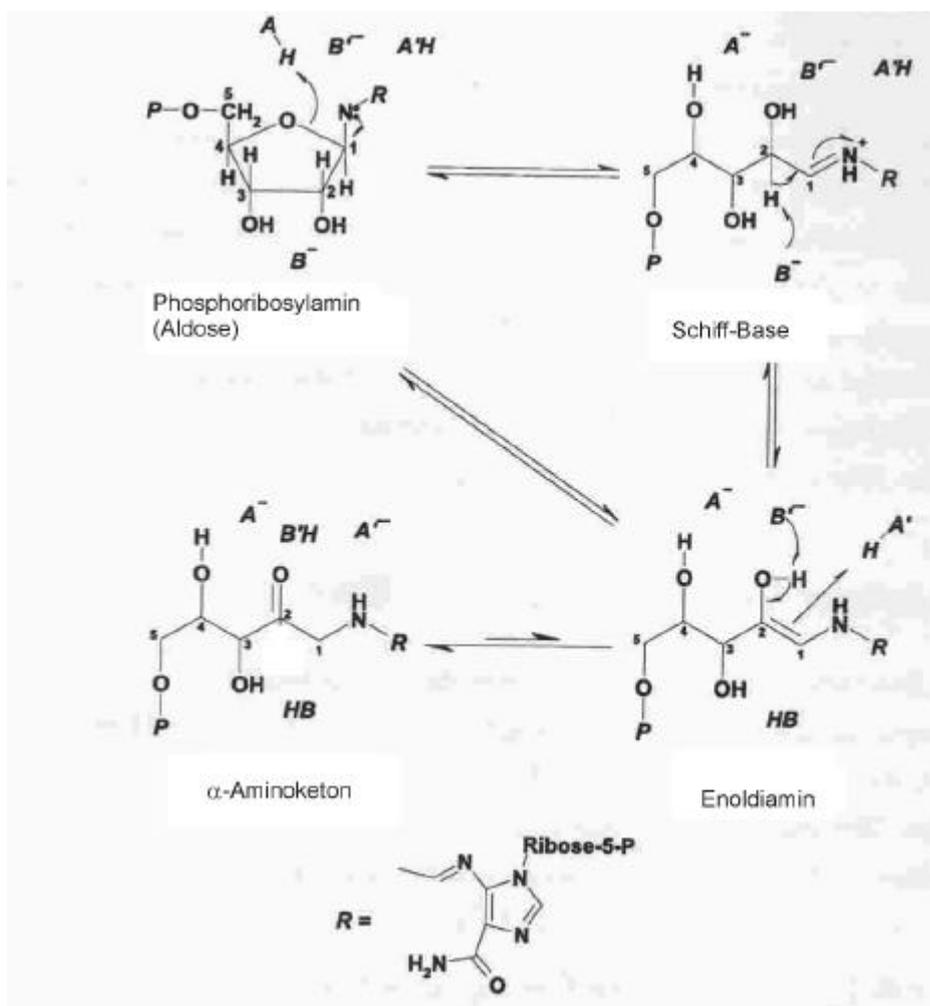


Abbildung 4.13.: Plausible Teilschritte der von HisA katalysierten Amadori-Umlagerung von ProFAR zu PRFAR. Als allgemeine Säure A-H bzw. A'-H und allgemeine Base B⁻ bzw. B['] kommen die Seitenketten von Asp8, Asp127 oder ein aktiviertes Wassermolekül in Frage. Einzelheiten finden sich im Text.

Die Reaktion beginnt vermutlich mit der Protonierung des Ringsauerstoffs durch eine allgemeine Säure A-H, was zur Öffnung des Riboseringes und zur Ausbildung einer Schiff Base führt. Als zweiter Schritt erfolgt eine Deprotonierung des C-2'-Kohlenstoff durch eine allgemeine Base B⁻, wodurch ein Enoldiamin entsteht. Diese beiden Protonierungs- und Deprotonierungsschritte könnten auch simultan erfolgen, wodurch die Schiff Base umgangen würde. Eine weitere allgemeine Base B['] könnte nun die C2-Hydroxylgruppe deprotonieren, während eine weitere allgemeine Säure A'-H den C1-Kohlenstoff protonieren würde. Durch diese Schritte wird die Doppelbindung zwischen C-1' und C-2' durch eine Doppelbindung zwischen C-2' und dem Carbonylsauerstoff ersetzt, wodurch aus dem Enoldiamin das α-Aminoketon entsteht. Dieser Reaktionsmechanismus würde erfordern, dass HisA zwei für die Katalyse essentielle allgemeine Säuren und zwei

allgemeine Basen zur Verfügung stellt. Denkbar ist jedoch auch, dass einer oder mehrere der skizzierten Teilreaktionen Schritte unkatalysiert ablaufen, wodurch eventuell nur eine allgemeine Säure und eine allgemeine Base zur Katalyse der Reaktion notwendig wären. Die Reste Asp8, Asp127 und Thr164 spielen eine wichtige Rolle für die HisA-Reaktion, da ihr Austausch gegen andere Aminosäuren zu einem zu einem Ausfall bzw. zu einer drastischen Verschlechterung der enzymatischen Katalyse führt (Tabelle 4.8.). Die Carboxylatgruppen von Asp8 und Asp127 könnten als allgemeine Säure A-H bzw. A'-H und allgemeine Base B' bzw. B'' in tHisA wirken, ebenso wie es für Asp11 und Asp130 in tHisF angenommen wird (Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001). Eine Überlagerung der Strukturen von tHisA und tHisF zeigt, dass Asp8 und Asp11 bzw. Asp127 und Asp130 jeweils an identischen Stellen an den C-terminalen Enden der β -Stränge 1 und 5 liegen (Lang *et al.*, 2000). Falls diese strukturelle Entsprechung einer funktionellen Analogie der Aminosäuren entspricht, dann in der tHisA-Reaktion Asp8 als allgemeine Säure und Asp127 als allgemeine Base wirksam sein (Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001). Der Antwort auf diese Frage soll durch die Aufklärung der Röntgenstruktur eines Enzym-Substrat-Komplexes näher gekommen werden. Entsprechende Kristallisationsversuche blieben bisher leider erfolglos, vermutlich wegen der Labilität von ProFAR (Davisson *et al.*, 1994; siehe Kapitel 4.2.7.).

Schwieriger als die Rolle von Asp8 und Asp127 ist die Bedeutung von Thr164 für die Katalyse zu interpretieren. Der hohe pK_a -Wert der Hydroxylgruppe der Threoninseitenkette schließt eine Rolle als allgemeine Säure oder Base praktisch aus. Denkbar scheint allerdings, daß das Threonin ein Wassermolekül aktiviert, wodurch ein Hydroxylion entstehen könnte, welches dann selbst als allgemeine Base in die Reaktion eingreift. Eine derartige Aktivierung ist vermutlich nicht sehr spezifisch, was die relativ hohen Restaktivitäten der Varianten tHisA_T164A und tHisA_T164H erklären würde (Tabelle 4.8.). Kinetische Isotopenstudien zeigen, dass der k_{cat} -Wert von HisA aus *E. coli* in D_2O fast viermal kleiner ist als in H_2O (Hamilton, 1995). Dies bedeutet, daß ein Lösungsmittelmolekül am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Katalyse beteiligt ist. Bei diesem Schritt könnte es sich um die erwähnte Aktivierung eines Wassermoleküls zur Erzeugung eines Hydroxylions handeln. Andere Möglichkeiten wären die Re-Protonierung der allgemeinen Säure(n) bzw. die Re-Deprotonierung der allgemeinen Basen, um den in Abbildung 4.13. postulierten katalytischen Zyklus zu vervollständigen.

Ebenso wie die durch HisA katalysierte Umwandlung von ProFAR zu PRFAR, ist auch der letzte Schritt im postulierten Reaktionsmechanismus der GTP Cyclohydrolase I eine Amadori-Umlagerung. Für dieses Enzym wurde eindeutig gezeigt, dass die Entfernung eines Protons vom C-2' von GTP durch eine starke Base ein Lösungsmittelmolekül beteiligt ist (Bracher *et al.*, 1998). Es scheint möglich, daß es sich bei der Base um ein

Hydroxylion handelt, das durch Polarisierung eines Wassermoleküls durch ein Zn^{2+} -Ion erzeugt wird (Auerbach *et al.*, 2000). Da für die Katalyse der HisA-Reaktion die Anwesenheit von Zn^{2+} -nicht erforderlich ist, müsste die Aktivierung eines Wassermoleküls zur Abstraktion des Protons von C-2' über einen anderen Mechanismus erfolgen, z.B. über die Aktivierung durch Thr164.

Es bleibt zu klären, ob die geringe Restaktivität der Variante tHisA_D127N tatsächlich auf den eingeführten Asparaginrest zurückgeht oder auf ein Artefakt zurückzuführen ist (Schimmel, 1989; Fersht, 1999). Denkbar wäre z. B. die Missinkorporation der Wildtyp-Aminosäure Asp während der Translation, ein Ereignis welches in Abhängigkeit vom verwendeten Expressionsstamm und der Art der ausgetauschten Aminosäure mit einer Häufigkeit von bis zu 1/1000 auftreten kann (Freist *et al.*, 1998; Stansfield *et al.*, 1998). Ebenso möglich erscheint die spontane Desamidierung der Seitenkette des neu eingeführten Asparaginrestes zum Aspartat, was einer Reversion zum Wildtypenzym entsprechen würde (Pries *et al.*, 1995). Der bei der Reinigung durchgeführte Hitzeschritt (Abbildung 4.7.; 3.4.2.4.) könnte eine solche Desamidierung begünstigen. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, daß auch die Variante tHisA_D127V, bei der Aspartat 127 durch ein Valin ersetzt ist, noch schwache HisA-Aktivität zeigt (Jürgens *et al.*, 2000). Um definitiv entscheiden zu können, ob auch andere Aminosäuren als Aspartat an Position 8 und 127 eine Katalyse der tHisA-Reaktion ermöglichen, müssen die beiden Codone total randomisiert und durch Selektion *in vivo* funktionelle Varianten gesucht werden (Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001). Die Restaktivitäten der Varianten tHisA_D127N, tHisA_T164A und tHisA_T164H könnten sich auch durch Änderung des Katalysemechanismus als Folge der Entfernung essentieller Reste erklären (Peracchi, 2001), z. B. infolge der Beteiligung anderer Aminosäuren am aktiven Zentrum (Steyaert *et al.*, 1990; Henot und Pollack, 2000). Es wurde auch gezeigt, dass funktionelle Gruppen des Substrates zur Katalyse beitragen können. Das bekannteste Beispiele einer derartigen „Substrat-assistierten Katalyse“ sind Serinproteasen (Dall'Acqua und Carter, 2000).

Der Mechanismus der von HisA katalysierten Amadori-Umlagerung ist vermutlich dem der Phosphoribosylanthranilat-Isomerase analog, welche ebenfalls eine $(\beta\alpha)_3$ -Barrel Faltung zeigt und den vierten Schritt der Tryptophanbiosynthese katalysiert. Für die Reaktion von TrpF aus *Thermotoga maritima* (tTrpF) sind die Aminosäuren Cys7 und Asp126 essentiell (Thoma, 1998). Die Kristallstruktur von tTrpF mit gebundenem Produktanalogon rCdRP legt nahe, dass Asp126 als allgemeine Säure die Öffnung des Riboseringes katalysiert, während Cys7 als allgemeine Base für die Deprotonierung von C-2' verantwortlich sein könnte (M. Hennig und Reinhard Sterner, unveröffentlichte Daten). Interessanterweise befinden sich Cys7 und Asp126 in tTrpF an den C-terminalen Enden der β -Stränge 1 und

6, analog zu Asp8 und Thr164 in tHisA. Bisher wurde in tTrpF kein essentieller Rest am C-terminalen Ende des β -Stranges 5 identifiziert, der Asp127 in tHisA entspricht. Der Austausch von Asp127 gegen Valin führt jedoch dazu, daß tHisA auf Kosten eines großen Teils seiner intrinsischen Aktivität die TrpF-Reaktion mit signifikanter Effizienz katalysiert (Jürgens *et al.*, 2000). Obwohl die mechanistische Grundlage dieser Änderung der Substratspezifität unklar ist, deuten die Ergebnisse auf eine wichtige Rolle von β -Strang 5 in der Katalyse sowohl der HisA- als auch der TrpF-Reaktion hin.

4.3. Untersuchungen zur evolutionären Verwandtschaft der Enzyme HisA und HisF aus der Histidinbiosynthese von *Thermotoga maritima*

Die beiden Enzyme HisA und HisF katalysieren zwei aufeinanderfolgende Reaktionen in der Biosynthese von Histidin, d. h. das Produkt der HisA-Reaktion ist das Substrat für die HisF-Reaktion (Abbildung 1.5.). Beide Enzyme haben eine ähnliche $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur und ihre Aminosäuresequenzen sind zu ca. 26% identisch (Thoma *et al.*, 1998; Lang *et al.*, 2000). Eine Superpositionierung der Strukturen von tHisA und tHisF aus *Thermotoga maritima* ergab, daß die für die Katalyse der jeweiligen Reaktion essentiellen Aspartatreste an den C-terminalen Enden der β -Stränge 1 und 5 zur Deckung kommen (Lang *et al.*, 2000; Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001). In Tabelle 4.9. sind eine Reihe weiterer Eigenschaften von tHisA und tHisF gegenübergestellt.

Tabelle 4.9.: Vergleich wichtiger Eigenschaften von tHisA und tHisF.

Eigenschaft	tHisA	tHisF
Struktur	$\beta\alpha_8$ -Barrel ^{a)}	
Sequenzähnlichkeit	26% identische und 41% ähnliche Aminosäurereste ^{a)}	
Molekulare Masse	27028 Da ^{b)}	27719 Da ^{b)}
Anzahl Aminosäuren	241 ^{b)}	253 ^{b)}
Molarer Extinktionskoeffizient bei 280nm	12,95 mM ⁻¹ cm ⁻¹ ^{c)}	11,5 mM ⁻¹ cm ⁻¹ ^{d)}
Tryptophanreste	Trp138 in Loop $\beta_5\alpha_5$ ^{b)}	Trp 156 in α -Helix 5 ^{b)}
Fluoreszenzmaximum nach Anregung bei 280 nm	345 nm ^{e)}	325 nm ^{e)}
Katalytisch essentielle Reste	Asp8 (in β -Strang 1) ^{c)} Asp127 (in β -Strang 5) ^{h)} Thr164 (in β -Strang 6) ^{c)}	Asp11(in β -Strang 1) ^{e)} Asp130 (in β -Strang 5) ^{e)} Thr171(in β -Strang 6) ^{g)}
Spaltung durch Trypsin	nach Arg27 ^{f)}	nach Arg27 (und Lys 58) ^{e)}
Oligomerisierungsgrad	Monomer ^{c)}	Heterodimer mit tHisH ^{e)}

a) Lang *et al.* (2000)

b) Thoma (1998)

c) Schmidt (1999)

d) Beismann-Driemeyer (2000)

e) Beismann-Driemeyer und Sterner (2001)h) Ergebnisteil 4.2.

f) Schwander (1997)

g) Ergebnisteil 4.3.2.

Struktur			SSSSSS	SSS	SSSSS	S	SSSS	S	HHHHHH	HHHHH	S				
HisA	1		MLVVP	PAI	DLFRG	KVARM	IKGRK	ENTIF	YEKDP	VELVE	KLIEEG	FTLI			
cons			v	pai	Dl	g	v	l	G	D	y	g	i		
cons			*	.*	.	.	.	*****	.	*.	.		
cons			R	i	cL	d	VVK	f	Gd		g	DE			
HisF	1		MLAKRII	ACL	DVKDGR	VVKG	SNFE---	NLR	DSGDP	VELGK	FYSEIG	IDEL			
Struktur			SSSSSS	SSS	SSS				HHHHHH	HHHH	SS				
Struktur			SSSS	HHHH		HHH	H	S	SSSS	H	HHHHHHHHH				
HisA	48		HVV	DL	SNAIE	N-SGEN	LPVL	EKLSE	F	AH-EH	IQIGGG	GIRSL	DYAEK	LRKLG	
cons			HvvdL	ga		n	l	l		i	igG	gir		g	
cons			.*	*	.	*	..	***	*	.	*****	.	.	*	*
cons			f	di	a				P	V	GG			G	
HisF	48		VFLDI	-TASV	EKRK	TMLELV	EKVAE	QIDIP	FTVGG	GIHDF	ETASE	LILRG			
Struktur			SSSSS		HHHHHHHHH	HHHH	S	SSSS	H	HHHHHHHHH					
Struktur			SSSSS	HHH	H	HHHHHH	H	SSS	SSSSSS	SS	S				
HisA	96		YRRQIV	SSKV	LEDPS	F	FLKSL	REIDV	--EPV	FSLD	TRGG--	-RV-A	FKGWL		
cons			rvivgs	a	l	l		l	l	ld	g	v	gW		
cons		*	.*	*	..*	.	.		
cons			adK	s	n	A	P	Q	v	d					
HisF	97		ADKVS	SINTAA	VENP	SLITQI	AQTFGS	QAVV	VAIDAK	RVDG	EFMV	F	FTYSGK		
Struktur			SSSS	HHH	H	HHHHHH	HHH	SSS	SSSSSSSS	SSSSSSS	S				
Struktur			HHHH	HHHHHH	S	SSSSSS	HHH	HH	HH	HHHHHHHH					
HisA	140		AEEEI	DPVSL	LKRL	KEYGLE	EIVHTE	IEKD	GTLQE	HDFSL	TKKIA	IEAEV			
cons							v	t	i	d	g	l	g	i	
cons			.	*	.	.	*	**	*	.*	.*	**	*	.	.
cons					GaG	Ei	l	d	G	G	d				
HisF	147		KNTGILL	RDW	VVEVE	KRGAG	EILLT	SIDRD	GTKSG	YDTEM	IRFVR	PLTTL			
Struktur			SSS	SSSHHH	HHHHHH	SSSSSS	HHH	HHHHHH							
Struktur			SSSSS	HHHHHHHHH	HHH	SS	SSS	HHHHH	HHHHHHH						
HisA	190		KVLAAG	GISS	ENSLK	T	AQKV	HTETN	G	LLKG	VIVGRA	FLEG	ILTVE	VXKRY	
cons			Ggi	i	dl		G	g	ivg	al					
cons			..*	.*	.	.	*	.	.	.	*	.	*	*	
cons			P	i	As										
HisF	197		PIIAS	G	GAGK	MEHFLE	AFL-	-----	AGADA	ALAAS	V	FHFR	EIDV	RELKEY	
Struktur			SSSSS	HHHHHHHHH	SS	SSS	HHHH	HHHHHHH							
Struktur			HisA	240	AA										
HisF	241		LKKH	G	V	N	V	R	L	E	G	L			
Struktur			HHH												

Abbildung 4.15.: Strukturbasiertes Alignment von *tHisA* und *tHisF*. Die Sekundärstrukturelemente lassen sich sehr gut superpositionieren. Das Alignment wurde mit dem Programm SwissPDBViewer erstellt, die Sekundärstrukturen sind aus Lang et al. (2000) entnommen, wobei in grün *b*-Stränge, in rot *a*-Helices dargestellt sind. Die Konsensus-Sequenzen der konservierten Reste stammen aus 24 *HisA*-Sequenzen und 25 *HisF*-Sequenzen (Anhang A und B). Großbuchstaben entsprechen total konservierten Resten, Kleinbuchstaben sind in 80% der alignnten Sequenzen konserviert. *entsprechen identischen Resten, . entsprechen ähnlichen Aminosäureresten im strukturbasierten Alignment zwischen *tHisA* und *tHisF*.

Diese Ähnlichkeiten legen nahe, daß HisA und HisF durch divergente Evolution aus einem gemeinsamen Vorläuferenzym unbekannter Funktion entstanden sind. Im Rahmen des vorliegenden Teilprojekts der Promotionsarbeit sollte nach weiteren experimentellen Hinweisen für die evolutionäre Verwandtschaft von HisA und HisF gesucht werden. Dazu wurden beide Enzyme daraufhin untersucht, ob sie die Reaktion des jeweils anderen katalysieren können. Eine dabei gemessene geringe Aktivität sollte gegebenenfalls durch zielgerichtete Mutagenese bzw. mittels gerichteter Evolution verbessert werden.

4.3.1. *In vitro* Messung der HisA-Aktivität von tHisF und der HisF-Aktivität von tHisA

Zunächst wurde überprüft, ob tHisF nachweisbare HisA-Aktivität zeigt. Falls dies so ist, würde tHisF zunächst ProFAR in PRFAR umwandeln (HisA-Fremdaktivität) und daraus ImGP und AICAR synthetisieren (intrinsische HisF-Aktivität). Der entsprechende Aktivitätstest wurden in Anwesenheit von tHisH und Glutamin durchgeführt (Glutamin-abhängige HisF-Aktivität; Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001). Alternativ wurde Glutamin durch Zugabe von Ammoniumacetat ersetzt, und die Reaktion ohne Gabe von tHisH durchgeführt (Ammonium-abhängige tHisF-Reaktion; Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001). In beiden Fällen konnte für tHisF in hoher Konzentration signifikante HisA-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 4.16.).

In den Tabellen 4.10. und 4.11. werden die *steady-state* enzymkinetischen Parameter der HisA-Aktivität von tHisF mit denen des Wildtypenzym tHisA verglichen. Die Daten von tHisF wurden durch einen Fit der Umsatzkurven mit der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung erhalten (Eberhard, 1995; 3.5.7.).

Tabelle 4.10.: tHisF zeigt HisA-Aktivität *in vitro* (Daten aus Analyse der Kurve ROT in Abb. 4.16.)

tHisF		tHisA	
k_{cat} [1/s]	K_M^{ProFAR} [μ M]	k_{cat} [1/s]	K_M^{ProFAR} [μ M]
$2,3 \times 10^{-4}$	1,97	0,67	0,60

Tabelle 4.11.: *tHisF* zeigt *HisA*-Aktivität in vitro (Daten aus Analyse der Kurve GRÜN in Abb. 4.16.)

tHisF		tHisA	
k_{cat} [1/s]	K_M^{ProFAR} [μM]	k_{cat} [1/s]	K_M^{ProFAR} [μM]
$3,2 \times 10^{-4}$	3,98	0,67	0,60

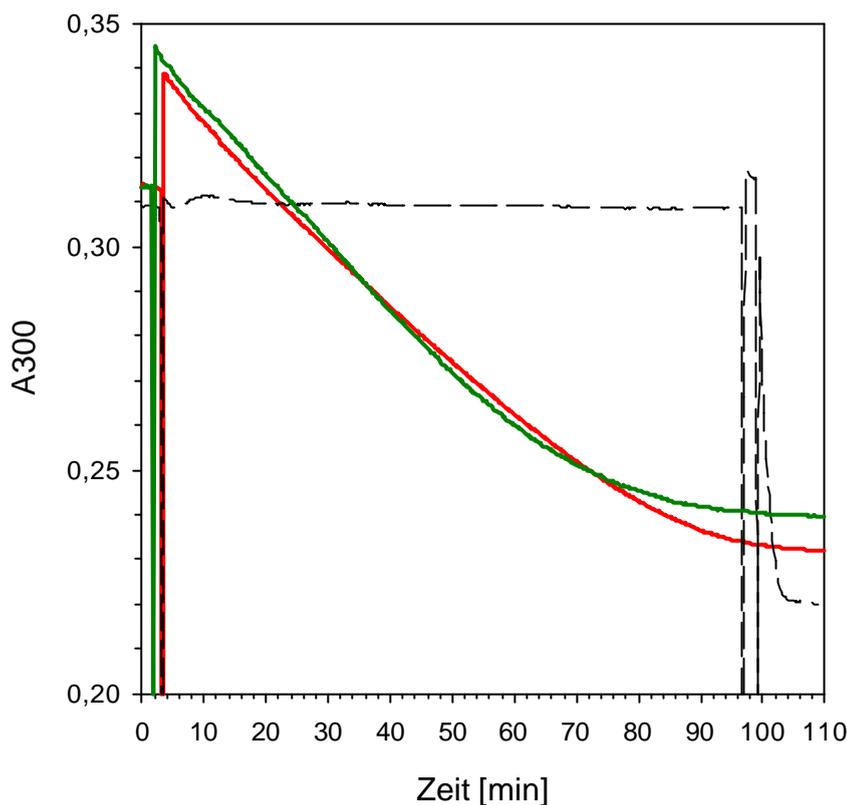


Abbildung 4.16.: *tHisF* hat signifikante *HisA*-Aktivität. Gezeigt sind durch *tHisF* katalysierte Umsatzkurven von ProFAR nach ImGP und AICAR. ROT: Glutamin-abhängige *HisF*-Reaktion, Bedingungen: 20 μM *tHisH*, 5 mM Gutamin, 20 μM ProFAR in 50 mM Tris/HCl- Puffer, pH 7,5 1mM EDTA, 1mM DTT, $T=25^\circ\text{C}$. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 20 μM *tHisF*. GRÜN: Ammonium-abhängige *HisF*-Reaktion, Bedingungen: 200 mM Ammoniumacetat, 20 μM ProFAR in 50 mM Tris/HCl Puffer, pH 8,0, 1mM EDTA, 1mM DTT. In SCHWARZ (Kontrolle): Bedingungen wie bei GRÜN, jedoch wurde *tHisF* durch ein entsprechendes Volumen an Kaliumphosphat-Puffer ersetzt. Nach ~ 100 min wurden *tHisA* und *tHisF* (je 1 μM) zugesetzt.

Die k_{cat} und K_M^{ProFAR} -Werte der *HisA*-Fremdaktivität von *tHisF* stimmen bei beiden Messungen gut überein. Während die Wechselzahl von *tHisF* um mehrere Größenordnungen unterhalb der des Wildtypenzym *tHisA* liegt, liegen die K_M^{ProFAR} -Werte von *tHisA* und *tHisF* in der gleichen Größenordnung. Dies bedeutet, daß *tHisF* das *HisA*-Substrat ProFAR mit recht hoher Affinität bindet, vermutlich weil es seinem eigenen

Substrat PRFAR sehr ähnlich ist (Abbildung 1.5.).

Vergleichbare Messungen in Anwesenheit von 20 μM tHisA anstelle von tHisF zeigten keinen messbaren Umsatz von ProFAR zu ImGP und AICAR (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass zwar tHisF die HisA-Reaktion katalysieren kann, jedoch tHisA nicht die HisF-Reaktion.

Frühere Untersuchungen an tHisF haben gezeigt, dass die Aspartatreste an den Positionen 11 und 130 essentiell für die Katalyse der Wildtyp-Reaktion sind. Es sollte deshalb untersucht werden, ob die zur Katalyse der HisF-Reaktion nicht mehr fähigen Varianten tHisF_D11N und tHisF_D130N noch messbare HisA-Aktivität haben. Die Messungen wurden analog den in Abbildung 4.16. gezeigten durchgeführt. Jedoch wurden 1 μM Wildtyp tHisF als Hilfsenzym zugesetzt. In dieser Konzentration zeigt tHisF noch keine messbare HisA-Fremdaktivität, könnte aber durch die tHisF-Varianten erzeugtes PRFAR zu ImGP und AICAR umsetzen. Es zeigte sich jedoch, dass die Zugabe von 15 μM tHisF_D11N oder tHisF_D130N zu keiner messbaren Abnahme der Absorption bei 300 nm führte (Abbildung 4.17.). Dies bedeutet, dass die für die Katalyse der HisF-Reaktion verantwortlichen Aspartatreste auch für die HisA-Fremdaktivität unerlässlich sind.

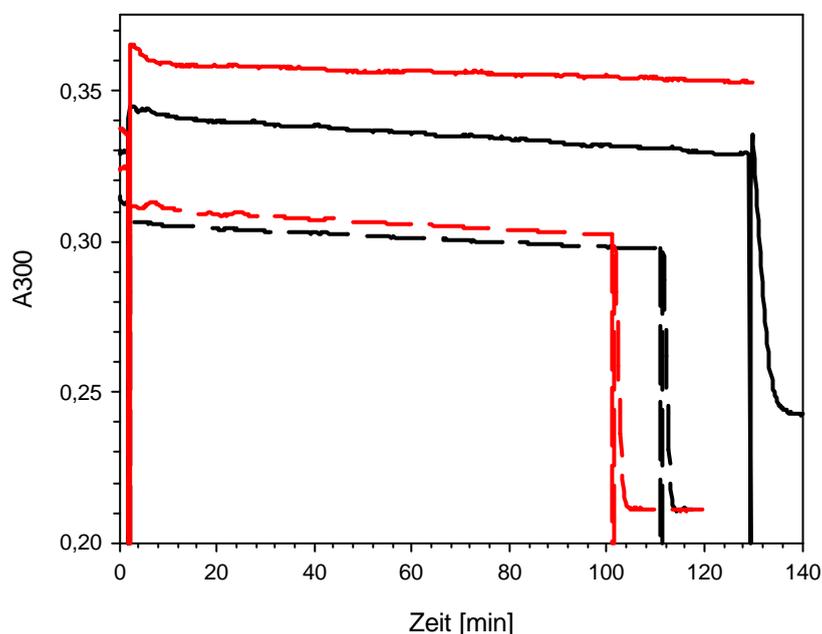


Abbildung 4.17.: Die Varianten tHisF_D11N und tHisF_D130N zeigen keine signifikante HisA-Aktivität. ROT: 15 μM tHisF_D130N, SCHWARZ: 15 μM tHisF_D11N. Reaktionsbedingungen wie GRÜN in Abbildung 4.16. jedoch in Anwesenheit von 15 μM tHisH und 1 μM tHisF-Wildtypenzym. Gestrichelt ROT bzw. SCHWARZ (Kontrollen): Bedingungen wie bei GRÜN, jedoch wurde tHisF durch ein entsprechendes Volumen an Kaliumphosphat-Puffer ersetzt. Nach 100 min wurden tHisA und tHisF (je 1 μM) zugesetzt.

4.3.2. Test auf HisA-Aktivität von tHisF *in vivo*

4.3.2.1. Das *in vivo* Selektionssystem

Es wurde getestet, ob die gemessene schwache HisA-Aktivität von tHisF ausreicht, um die *hisA*-Defizienz des HfrG6 Stammes ($\Delta hisA$) zu komplementieren (vergleiche Kapitel 4.1. und 4.2.). Zur Untersuchung dieser Frage wurde das *thisF*-Gen in das Plasmid pTNA (2.2.4.) kloniert, $\Delta hisA$ -Zellen mit dem Konstrukt pTNA_*thisF* und als Postivkontrolle mit pTNA_*thisA* transformiert, und anschließend auf Minimalmedium (mit Ampicillin ohne Histidin) sowie auf Vollmedium (LB_{amp}) ausgestrichen (3.2.3.1.).

Während sowohl die mit pTNA_*thisA* als auch die mit pTNA_*thisF* transformierten $\Delta hisA$ -Zellen nach Inkubation bei 37°C über Nacht auf Vollmedium sichtbare Kolonien bildeten, wuchsen auf Minimalmedium nur die mit pTNA_*thisA* transformierten Zellen heran. Dagegen bildeten die mit pTNA_*thisF* transformierten $\Delta hisA$ Zellen auch nach einer Woche keine sichtbaren Kolonien auf Minimalmedium (Abbildung 4.18.). Dies bedeutet, dass die HisA-Aktivität von tHisF nicht ausreichte, um unter den gegebenen Bedingungen die *hisA*-Defizienz von HfrG6 zu komplementieren.

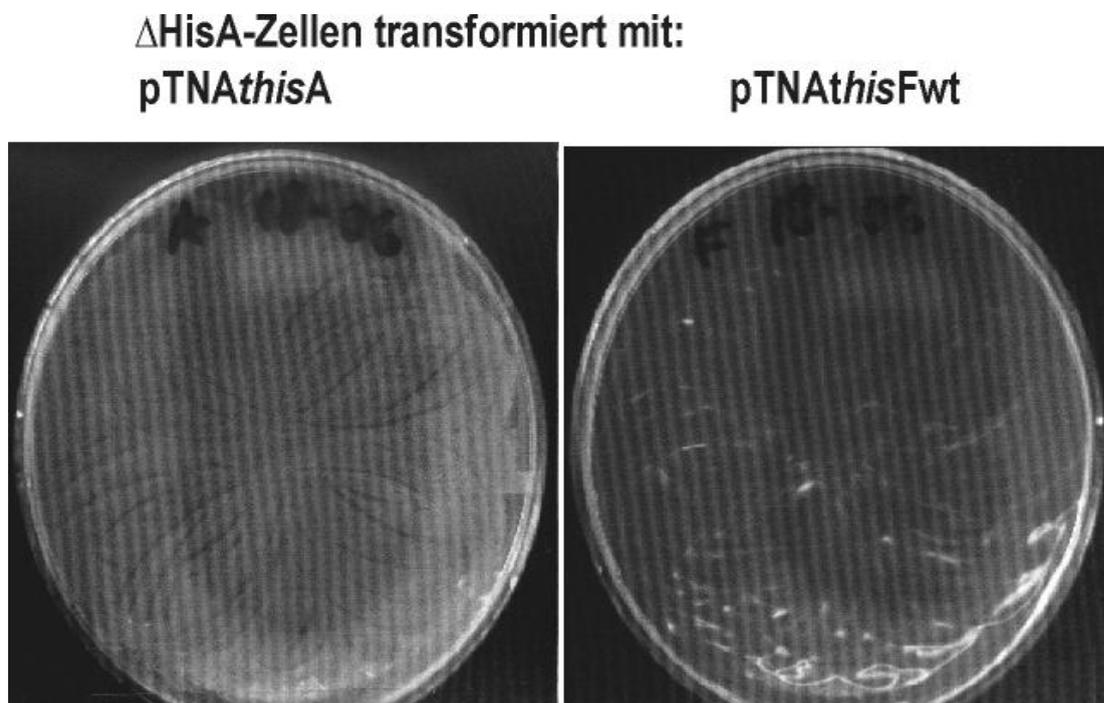


Abbildung 4.18.: tHisF kann die *hisA*-Defizienz des HfrG6-Stammes ($\Delta hisA$) nicht komplementieren. Nach Transformation mit pTNA_*thisF* zeigten $\Delta hisA$ -Zellen kein Wachstum auf Minimalmedium (RECHTS), während nach Transformation mit pTNA_*thisA* (Postivkontrolle, LINKS) über Nacht ein Bakterienrasen sichtbar wurde.

4.3.3. Verbesserung der HisA-Aktivität von tHisF

Die schwache HisA-Aktivität von tHisF sollte durch gerichtete Evolution verbessert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Repertoire aus *thisF*-Genen erzeugt, um daraus mit Hilfe des oben beschriebenen Selektionssystems Varianten mit verbesserter HisA-Aktivität zu isolieren.

4.3.3.1. Herstellung einer Repertoires an *thisF*-Genen

Zur Herstellung eines Repertoires an mutagenisierten *thisF*-Genvarianten wurde DNA-Shuffling verwendet (Stemmer, 1994, 1995). Dieses Verfahren wurde zur Kombination von Genvarianten mit gewünschten bzw. verbesserten Eigenschaften entwickelt. Da dabei aber auch zusätzliche Mutationen erzeugt werden, eignet es sich auch zur Erstellung primärer Genrepertoires (Merz *et al.*, 2000; Jürgens *et al.*, 2000). Um die Ausbeute an mutagenisierten Genen für die Klonierung zu erhöhen, wurden für die abschließende PCR innenliegende ("nested") Primer benutzt (Volkov und Arnold, 2000; 3.3.8.2.1.). Das Produkt der abschließenden PCR wurde mit den Restriktionsenzymen *PaeI* und *BamHI* gespalten, über Sucrosegradienten-Zentrifugation (3.3.4.2.) gereinigt und mit einem in gleicher Weise vorbehandelten pTNA-Vektor ligiert. Mit dem Ligationsprodukt wurden elektrokompetente *E. coli* DH5 α Zellen transformiert (3.2.2.1.4.) und auf acht 100 ml LB_{amp}-Platten ausplattiert (3.2.3.). Mit Hilfe von Verdünnungsreihen wurde ermittelt, dass das Repertoire ca. 3×10^6 unabhängige Klone enthält.

Durch das DNA-Shuffling sollten 1-2 Nukleotidaustausche pro Gen eingeführt werden. Mit der Formel nach Kucher und Arnold (1997) kann berechnet werden wie viele Varianten (K, Kombinationen) bei Einführung von M Mutationen an N Positionen eines Gens erzeugt werden. Hierbei ist auch berücksichtigt, daß pro Position X Möglichkeiten für eine Veränderung der Sequenz gegeben sind:

$$K = X^M \left[\frac{N!}{(N-M)! M!} \right]$$

Für *thisF* (754 Nukleotide) ergibt sich danach für 2 Nukleotidaustausche die Mindestgröße des Repertoires zu:

$$K = 3^2 \left[\frac{754!}{(754-2)! 2!} \right] = \underline{2,9 \times 10^6}$$

Die ermittelte Größe des Repertoires von 3×10^6 reicht also theoretisch aus, um alle

Kombinationen von Doppelmutanten zu untersuchen.

4.3.3.2. Die Qualität des *thisF*-Genrepertoires

Zur Überprüfung der tatsächlich eingeführten Zahl der Mutationen, sowie ihrer Art und Verteilung im *thisF*-Gen wurden acht unselektierte Klone sequenziert. Dadurch wurde ermittelt, dass die Mutationen gleichmäßig über das *thisF*-Gen verteilt waren (Nukleotid- und Aminosäureaustausche unselektierter Klone, Anhang D). Die Anzahl der Nukleotidaustausche unterschied sich jedoch zwischen den einzelnen Klonen beträchtlich und war weit höher als erwartet. Im Schnitt wurden pro Gen 7,75 Mutationen eingeführt, was durchschnittlich 4,75 Aminosäureaustausche zur Folge hatte (Tabelle 4.12.).

Tabelle 4.12.: Aminosäureaustausche in unselektionierten Klonen des *thisF*-Repertoires.

Anzahl Aminosäureaustausche	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Anzahl Klone	1	-	-	3	-	1	1	1	-	-	-	1

4.3.3.3 Selektion *in vivo* auf verbesserte HisA-Aktivität von *tHisF*-Varianten

Die Kolonien des in 4.3.3.1 erzeugten *thisF*-Genrepertoires wurden von den LB_{amp}-Platten mit Ampicillin-haltigem dYT-Medium ab gespült und aus der resultierenden Zellsuspension Plasmid-DNA präpariert (3.3.3.2.). Sechs Aliquots frischer elektrokompenter $\Delta hisA$ -Zellen wurden mit jeweils 2 μ g dieser Plasmid-DNA transformiert. Ein Aliquot wurde in verschiedenen Verdünnungen auf LB_{amp} plattiert, um die erzielte Transformationseffizienz zu überprüfen. Sie lag bei $8,2 \times 10^9$ Transformanten pro μ g DNA. Die restlichen Aliquots wurden nach dreimaligem Waschen mit Minimalmedium auf VB_{amp}-Platten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Nach zwei Tagen waren ca. 300 Kolonien auf diesen Selektionsplatten sichtbar. Mit pTNA-*thisA* transformierte $\Delta hisA$ -Zellen (Positivkontrolle) bildeten über Nacht einen Bakterienrasen aus, während mit pTNA-*thisF* transformierte $\Delta hisA$ -Zellen (Negativkontrolle) auch nach mehrtägiger Inkubation nicht heranwuchsen (vergleiche Abbildung 4.18.).

Von den Selektivplatten wurden 20 Kolonien gepickt, in Vollmedium mit Ampicillin angezogen und daraus Plasmid-DNA präpariert (3.3.3.1.2.). Die Plasmid-DNA von 14 dieser Klone enthielt ein Insert erwarteter Größe. Mit diesen Plasmiden wurde der $\Delta hisA$ -Stamm erneut transformiert. Dies führte jedoch unerwarteter Weise nur in zwei Fällen zum Wachstum auf Selektivplatten. Die Sequenzierung eines dieser Klone ergab die *thisA*_{wt} Sequenz, der zweite Klon (pTNA-*thisF*₄₀) enthielt acht Mutationen, die zu

insgesamt 4 Aminosäureaustauschen führten (Tabelle 4.13.). Alle ermittelten Austauschungen liegen in am sogenannten „Stabilitäts-Pol“ (Höcker *et al.*, 2001b) des $(\beta\alpha)_8$ -Barrels von tHisF und damit weit entfernt vom aktiven Zentrum. Die Transformation eines $\Delta hisF$ -Stammes mit pTNA_ *thisF*_40 führte über Nacht zum Wachstum sichtbarer Kolonien auf Selektivmedium. Die Ergebnisse ließen insgesamt darauf schließen, daß tHisF_40 eine verbesserte HisA-Aktivität unter Beibehaltung signifikanter HisF-Aktivität aufweist.

Tabelle 4.13.: Mutationen in *thisF*_40. Resultierende Aminosäureaustausche sind **fett** markiert.

Betroffenes Basenpaar	Wildtypsequenz von <i>thisF</i>	Sequenz von <i>thisF</i> _40	Resultierender Aminosäureaustausch	Bemerkung
47	CGT	CGC	R16 → R	still
198	GAA	AAA	E67 → K	Helix α_2
214	CAG	CGG	Q72 → R	Loop $\alpha_2\beta_3$
318	GCT	GCC	A106 → A	still
402	GTG	GTA	V125 → V	still
583	ACA	GCA	T195 → A	Loop $\alpha_6\beta_7$
660	GCT	GCA	A220 → A	still
725	AAA	AGA	K242 → R	Helix β_8

4.3.3.4. Produktion von tHisF_40

Zur heterologen Expression in *E. coli* wurde *thisF*_40 vom pTNA- in den pDS-Vektor (2.2.1.) unter Verwendung der gemeinsamen Schnittstellen für *PaeI* und *BamHI* umkloniert. Die Expression des Gens erfolgte nach im pDS-pDM-Expressionssystem, die Reinigung von tHisF_40 wurde nach Beismann-Driemeyer (2000) durchgeführt. Das Reinigungsprotokoll beinhaltete einen Verdau mit Benzonase (3.4.2.3.), einen Hitzeschritt (3.4.2.4.), sowie Anionenaustauschchromatographie über eine HQ20-Säule (Perfusionschromatographie, 3.4.2.6.). Aus einem Liter Kulturmedium, entsprechend 4 g Zellen (Nassgewicht), konnten ca. 50 mg sauberes Protein gewonnen werden.

4.3.3.5. Messung der enzymatischen Aktivitäten von tHisF_40 *in vitro*

Sowohl die Ammonium-abhängige HisF-Aktivität (3.5.7.2.) als auch die HisA-Aktivität (3.5.7.1.) von gereinigtem tHisF_40 wurden *in vitro* unter *steady-state* Bedingungen gemessen. Es zeigte sich, dass die HisF-Aktivität von tHisF_40 gegenüber dem Wildtypenzym nur leicht herabgesetzt ist (Tabelle 4.14.). Dagegen kann tHisF_40 im Gegensatz zum Wildtypenzym tHisF auch in einer Konzentration von 20 μM die HisA-Reaktion nicht katalysieren. Die enzymkinetischen Messungen *in vitro* stehen damit im

Widerspruch zur den Versuchen zur Komplementation *in vivo*. Während gereinigtes tHisF messbare HisA-Aktivität zeigt, ist es zur Komplementation der *hisA*-Defizienz nicht fähig (Abbildung 4.16. ; 4.3.1.). Für tHisF_40 gilt gerade das Umgekehrte (4.3.3.3. und Tabelle 4.14.).

Tabelle 4.14.: Die HisF-Aktivität von tHisF_40 ist im Vergleich zum Wildtypenzym leicht herabgesetzt. Ammonium-abhängige HisF-Reaktion, Bedingungen: 300 mM Ammoniumacetat, 20 μ M ProFAR in 50 mM Tris/HCl Puffer, pH 8,0, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1 μ M tHisF_wt

	k_{cat} [1/s]	K_M^{PRFAR} [μ M]	k_{cat}/K_M^{PRFAR} [1/ μ M s]
tHisF_40	3,2	8,0	0,4
tHisF*	2,2	1,7	1,29

*aus Beismann-Driemeyer und Sterner (2001)

4.3.4. Diskussion

tHisF zeigt *in vitro* signifikante HisA-Aktivität (4.3.2; Abbildung 4.16.). Da die beiden Varianten tHisF_D11N und tHisF_D130N hingegen weder HisF- noch HisA-Aktivität zeigen, sind offensichtlich die gleichen Aminosäuren in tHisF an der Katalyse der beiden unterschiedlichen Reaktionen beteiligt. Bezeichnenderweise liegen die beiden für die Katalyse entscheidenden Reste in tHisA, Asp8 und Asp127, an der gleichen Stelle der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur wie Asp11 und Asp130 in tHisF (Lang *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse sind eindeutige Hinweise darauf, dass HisA und HisF durch Genduplikation und Diversifikation aus einem gemeinsamen Vorläufer mit $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur entstanden sind (Höcker *et al.*, 2001b). Obwohl die Aktivität dieses Vorläuferenzym nicht bekannt ist, hatten zwei Aspartatreste an den C-terminalen Enden der β -Stränge 1 und 5 vermutlich bereits eine wichtige katalytische Funktion. Auffallend ist, tHisF einen nur etwa 10-fach höheren K_M -Wert für das „fremde“ Substrat ProFAR aufweist als tHisA (4.3.1; Tabelle 4.11.). Dies deutet darauf hin, dass die beiden aktiven Zentren ähnliche Substrat-Bindetaschen aufweisen. Vor diesem Hintergrund erscheint es unwahrscheinlich, daß die Unfähigkeit von tHisA zur Katalyse der HisF-Reaktion (4.3.1.) auf eine unzureichende Bindung des Substrates PRFAR zurückgeht. Eher ist anzunehmen, daß zur Katalyse der relativ komplizierten HisF-Ringschlußreaktion neben den beiden erwähnten und zwischen tHisF und tHisA konservierten Aspartatresten noch weitere Aminosäuren notwendig sind, die in tHisA fehlen. Die Identifizierung dieser Aminosäuren sollte die Etablierung von HisF-Aktivität auf dem Proteingerüst von tHisA möglich machen.

Die Verbesserung der HisA-Aktivität von tHisF durch gerichtete Evolution ist im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen. Zwar konnten aus einem umfangreichen Repertoire an *thisF*-Genen durch Selektion *in vivo* eine Reihe vielversprechender Kandidaten isoliert werden

(4.3.3.3.). Es zeigte sich jedoch, daß es sich zum großen Teil um „falsch-positive“ Klone handelte, die entweder bei einer Kontrolltransformation die *hisA*-Defizienz nicht mehr komplementieren konnten oder nach Reinigung keine meßbare HisA-Aktivität *in vitro* zeigten (4.3.3.5.).

Was könnte die Ursache für das Auftretens einer hohen Anzahl falsch-positiver Klone sein? Denkbar wären (i) die Kontamination der *thisF*-Genbank mit *thisA*-DNA oder (ii) die Kontamination des transformierten $\Delta hisA$ -Stammes mit Zellen, die zur Synthese von Histidin in der Lage und gleichzeitig Ampicillin-resistent sind. Gegen die erste Möglichkeit spricht, daß es in den meisten Fällen nach Retransformation von $\Delta hisA$ -Zellen mit Plasmid-DNA aus selektierten Zellen zu keinem Wachstum auf Minimalmedium mehr kam. Gegen die zweite Möglichkeit spricht, daß offenbar alle selektierten $\Delta hisA$ -Zellen pTNA-Plasmide tragen, in die in 14 von 20 Fällen auch ein Insert mit der Größe des *thisF*-Gen einkloniert wurde. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass (iii) Zellen Histidin von abgestorbenen benachbarten Kolonien beziehen („cross-feeding“) und dadurch auf Selektivmedium wachsen können. Dies würde jedoch wiederum nicht erklären, warum isoliertes tHisF_40 auch nach der Retransformation von $\Delta hisA$ zur Kompletation *in vivo* fähig ist (4.3.3.3.), ohne *in vitro* signifikante HisA-Aktivität zu zeigen (4.3.3.5.). Vermutlich sind verschiedene Gründe für die zahlreichen falsch-positiven Klone verantwortlich.

Das durch DNA-Shuffling erzeugte *thisF*-Repertoire umfasste ca. 3.0×10^6 unabhängige Klone. Bei einem geplanten Austausch von zwei Nukleotiden pro Gen, würde diese Größe zum Test aller möglichen Doppelmутanten genügen (4.3.3.1.). Es stellte sich jedoch heraus, dass die tatsächliche Zahl der eingebauten Mutationen im Schnitt wesentlich höher lag und zwischen den untersuchten Klonen sehr stark differierte (4.3.3.2.). Dies bedeutet, daß die Qualität der verwendeten Genbank zum Erreichen des angestrebten Zieles vermutlich nicht ausreicht. Zwei Nukleotidaustausche führen im Schnitt zu 1,5 Aminosäureaustauschen (Hettwer, persönliche Mitteilung). Eine höhere Anzahl von Austauschen ist nicht nur wegen der limitierten Größe der Bank nicht sinnvoll; sie ist sogar kontraproduktiv, weil sie die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass ein vorteilhafter Austausch durch einen nachteiligen kompensiert wird (Arnold und Moore, 1997). Um bei der Herstellung eines neuen *thisF*-Genrepertoires die Zahl der Mutationen zu senken, sollte die *primerless*-PCR mit einer zum *proof-reading* befähigten DNA-Polymerase durchgeführt werden (Zhao und Arnold, 1997). Des weiteren sollten in der *primerless*-PCR nur DNase-Fragment mit einer Größe von mindestens 200 bp verwendet werden, da die Mutationshäufigkeit mit abnehmender Fragmentgröße zunimmt (Arnold und Volkov, 2000).

4.3.5. Bedeutung der Aminosäure Threonin 171 von tHisF

Wie in Tabelle 4.9. in Kapitel 4.3.1. gezeigt, besitzen tHisA und tHisF eine Reihe ähnlicher Eigenschaften. Unter anderem sind in beiden Enzymen jeweils zwei konservierte Aspartatreste an den C-terminalen Enden der β -Stränge 1 und 5 an der Katalyse essentiell beteiligt. Dabei handelt es sich in tHisA um Asp8 und Asp127, in tHisF um Asp11 und Asp127. In tHisA ist zusätzlich Thr164 an der Katalyse beteiligt, wie an den deutlich eingeschränkten Aktivitäten *in vitro* und *in vivo* der Varianten tHisA_T164A und tHisA_T164H zu erkennen ist (Kapitel 4.2.6.; Tabelle 4.8.). Dieser Threoninrest, der am C-terminalen Ende von β -Strang 6 liegt, ist in allen bekannten HisA-Sequenzen konserviert und findet sich als Thr171 auch an entsprechender Stelle in tHisF (Abbildung 4.15.). Da Thr171 jedoch nicht in allen bekannten HisF-Sequenzen konserviert ist, wurde er bisher nicht auf seine Bedeutung für die Katalyse getestet (Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001). Dies sollte im Rahmen dieser Arbeit nachgeholt werden.

4.3.5.1. Herstellung von *thisF_T171A* und Komplementation *in vivo* eines **DhisF**-Stammes

Ausgehend vom Konstrukt pTNA_*thisF* wurde mit der modifizierten QuikChange-Methode (3.3.8.1.2.) das Codon für Thr171 durch ein Alanin-Codon ersetzt. Gleichzeitig wurde eine neue Schnittstelle für das Enzym *Sfa*NI eingeführt, welche die Identifizierung von Klonen mit dem gewünschten Aminosäureaustausch erleichterte. Nach Verifizierung der geplanten Mutationen mittels DNA-Sequenzierung, wurde der *E. coli hisF*-Defizienstamm UTH 860 ($\Delta hisF$, Goldschmidt *et al.*, 1970) mit dem Plasmiden pTNA_*thisF_T171A* bzw. pTNA_*thisF* (Positivkontrolle) transformiert, auf VB_{amp}-Platten plattiert und bei 37°C inkubiert. Sowohl die mit pTNA_*thisF_T171A* als auch die mit pTNA_*thisF* transformierten Zellen bildeten über Nacht sichtbare Kolonien aus. Dies schließt aus, dass Thr171 eine essentielle Rolle in der Katalyse der HisF-Reaktion spielt.

4.3.5.2. Herstellung von tHisF_T171A und enzymkinetische Charakterisierung *in vitro*

Das Gen *thisF_T171A* wurde über die Schnittstellen *Pae*I und *Bam*HI in den pDS-Vektor (2.2.1.) umklont. Die anschließende Expression des Gens erfolgte im pDS-pDM-Expressionssystem, die Reinigung des Proteinproduktes erfolgte nach Beismann-Driemeyer (2000), wie auch für tHisF_40 in Kap. 4.3.3.4 beschrieben. Aus einem Liter Kulturmedium, entsprechend etwa 4 g Zellen (Nassgewicht), wurden 21 mg sauberes Protein gewonnen.

Das gereinigte Protein tHisF_T171A wurde *in vitro* auf Ammonium-abhängige HisF-Aktivität (3.5.7.2.) hin untersucht. Tabelle 4.15. zeigt, dass der k_{cat} -Wert von tHisF_T171A im Vergleich zum Wildtypenzym um den Faktor 32 herabgesetzt ist, während sich der K_M^{PRFAR} um den Faktor 3 erhöht. Dies führt zu einer ca. 100-fachen Abnahme der katalytischen Effizienz.

Tabelle 4.15.: Die HisF-Aktivität von tHisF_T171A ist deutlich schwächer als die des Wildtypenzym. Ammonium-abhängige HisF-Reaktion, Bedingungen: 300 mM Ammoniumacetat, 20 μ M ProFAR in 50 mM Tris/HCl Puffer, pH 8,0, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1 μ M tHisF_wt.

	k_{cat} [1/s]	K_M^{PRFAR} [μ M]	k_{cat}/K_M^{PRFAR} [1/ μ Ms]
tHisF_T171A	0,069	5,35	0,013
tHisF_wt*	2,2	1,7	1,29

*aus Beismann-Driemeyer und Sterner (2001)

Verändert der Austausch Thr171Ala die Fähigkeit von tHisF zur Katalyse der HisA-Reaktion *in vitro*? (siehe Kapitel 4.3.1.). Für diese Messungen, die analog denen mit tHisF_D11N und tHisF_D130N durchgeführt wurden (Abbildung 4.17.), wurden 62,5 μ M tHisF_T171A und 1 μ M Wildtyp tHisF als Hilfsenzym zugesetzt.

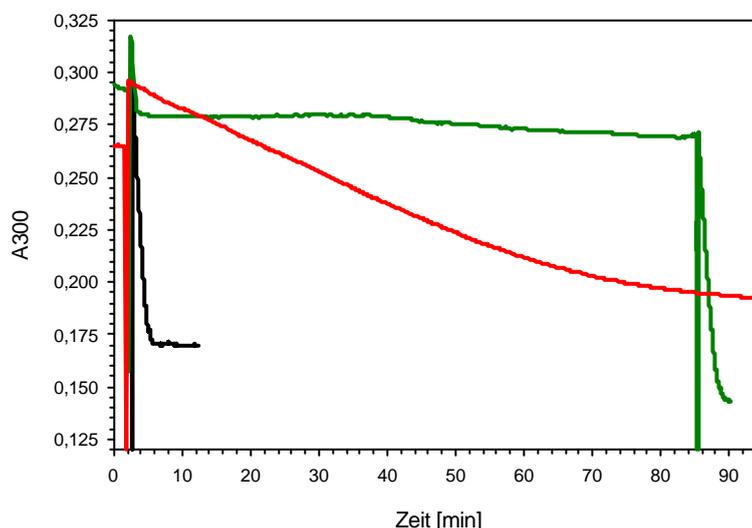


Abbildung 4.19.: tHisF_T171A zeigt keine signifikante HisA-Aktivität. SCHWARZ: 0,625 μ M tHisA, ROT: 20 μ M tHisF, GRÜN: 62,5 μ M tHisF_T171A. Reaktionsbedingungen, wobei nach 86 min die Zugabe von 0,3 μ M tHisA erfolgte. Reaktionsbedingungen: 300 mM Ammoniumacetat, 20 μ M ProFAR in 50 mM Tris/HCl Puffer, pH 8,0, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1 μ M tHisF

In dieser Konzentration zeigt tHisF noch keine messbare HisA-Fremdaktivität, könnte aber

durch tHisF-T171A erzeugtes PRFAR zu ImGP und AICAR umgesetzt werden. Es zeigte sich jedoch keine messbare Abnahme der Absorption bei 300 nm (Abb. 4.19.). Dies bedeutet, daß die für die Thr164 für die HisA-Fremdaktivität von tHisF unerlässlich sind.

4.3.5.3. Diskussion

4.3.5.3.1. Komplementation *in vivo* versus Enzymaktivität *in vitro*

Es fällt auf, dass tHisF_T171A ebenso wie das Wildtypenzym die *hisF*-Defizienz des Stamms UTH860 über Nacht komplementieren kann, obwohl die Aktivität *in vitro* durch den Aminosäureaustausch stark beeinträchtigt ist (Tabelle 4.15.). Dabei ist zu beachten, dass *in vivo* tHisF zusammen mit HisH aus *E. coli* (eHisH) die *Glutamin*-abhängige ImGP-Synthase Reaktion katalysiert, vermutlich innerhalb eines tHisF-eHisH Komplexes. Hierbei kommt es am aktiven Zentrum von eHisH zur Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und Ammoniak, welcher an das aktive Zentrum von tHisF transportiert wird und dort mit PRFAR zu ImGP und AICAR reagiert (Klem und Davisson, 1993; Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001). Dagegen wurde *in vitro* die Ammonium-abhängige ImGP Synthase Reaktion in Abwesenheit von HisH gemessen. Ammoniak wird hier in Form von Ammoniumacetat zugegeben. Um zu klären, worauf die beobachteten Unterschiede zwischen Aktivität *in vivo* und *in vitro* zurückzuführen sind, müßte die Glutamin-abhängige Reaktion einer Mischung von gereinigtem tHisF und eHisH gemessen werden. Vermutlich reicht aber auch eine stark verminderte HisF-Aktivität für eine Komplementation *in vivo* noch aus. So kommt es nach Transformation des $\Delta hisF$ -Stammes mit *thisF_D130E* nach zwei Tagen zur Koloniebildung auf Selektivmedium, obwohl die Variante im Vergleich zum Wildtypenzym einen 440-fach verringerten k_{cat} -Wert und einen 17-fach erhöhten K_M^{PRFAR} -Wert zeigt (Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001).

4.3.5.3.2. Katalytische Funktion von Thr171 in tHisF und Thr164 in tHisA

Der Austausch Thr171Ala in tHisF führt zu einer 32-fachen Abnahme des k_{cat} -Wertes und zu einer 3fachen Erhöhung von K_M^{PRFAR} (Tabelle 4.15.). In ähnlicher Weise führt der Austausch Thr164Ala in tHisA zu einer 37-fachen Abnahme des k_{cat} -Wertes und zu einer 9-fachen Erhöhung von K_M^{ProFAR} (Kapitel 4.2.6.; Tabelle 4.8.). Damit spielen diese beiden Threoninreste, welche an identischen Positionen am C-terminalen Ende von β -Strang 6 liegen (Abbildung 4.15.), eine wichtige Rolle in der Katalyse der jeweiligen Reaktion, ohne jedoch essentiell zu sein. In Kapitel 4.2.7. wurde diskutiert, dass Thr164 in tHisA eine Wassermolekül aktivieren könnte und das resultierende Hydroxylion als allgemeine Base in die Reaktion eingreift. Alternativ könnten die Threoninreste aber auch eine Rolle bei der Orientierung der Substrate ProFAR bzw. PRFAR an den aktiven Zentren spielen.

Abbildung 4.20. zeigt das aktive Zentrum von tHisF mit modelliertem Substrat PRFAR (Michael Hennig, unveröffentlichte Daten). Es wird deutlich, dass die Hydroxylgruppe der Seitenkette von Thr171 in ein Netz aus Wasserstoffbrücken eingebunden ist, zu dem außerdem ein komplexiertes Wassermolekül und mehrere Atome des Substrates PRFAR gehören. Es kann vermutet werden, dass Thr164 am aktiven Zentrum von tHisA an der Ausbildung eines ähnliches Netzes aus Wasserstoffbrücken beteiligt ist. Der Austausch der beiden Threonine hätte zur Folge, daß dieses Netz nicht mehr gebildet werden kann, wodurch das Substrat nicht mehr optimal positioniert wäre. Dies könnte die verringerten enzymatischen Aktivitäten von thisF_T171A und tHisA_T164A erklären.

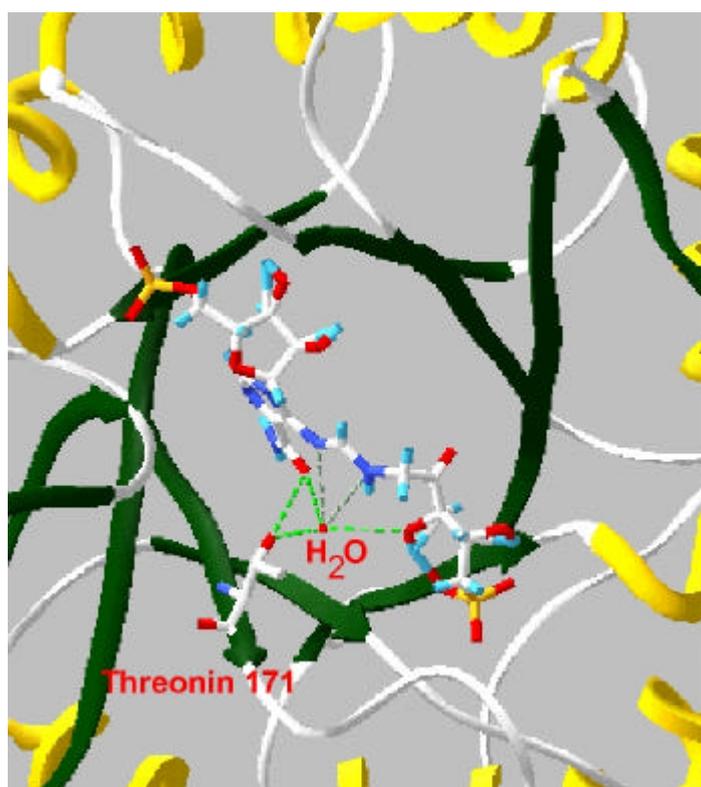


Abbildung 4.20.: Netz aus Wasserstoffbrücken am aktiven Zentrum von tHisF zwischen, Threonin 171, einem H₂O-Molekül und dem Substrat PRFAR. PRFAR wurde in das aktive Zentrum modelliert (Michael Hennig, unveröffentlichte Daten), das H₂O-Molekül ist in der Röntgenstruktur von tHisF zu erkennen (Lang et al., 2000).

Für diese Hypothese spricht ein weiteres Argument. In allen bekannten HisF-Sequenzen, die an der Position 171 (Zählweise tHisF) kein Threonin besitzen, findet sich eine Asparaginrest (Alignment Anhang B; aus Beismann-Driemeyer, 2000), dessen Seitenkette ebenfalls Wasserstoffbrücken ausbilden und damit eine analoge Rolle in der Katalyse wie das Threonin spielen könnte. Auch die fehlende HisA-Fremdaktivität der Variante tHisF_T171A ließe sich mit der Unfähigkeit der aliphatischen Seitenkette des Alanins zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum Substrat ProFAR erklären (Kapitel 4.3.5.2.).

4.3.6. Chimäre ($\beta\alpha$)₈-Barrel Enzyme aus tHisA und tHisF

Die Röntgenstrukturen von tHisA und tHisF sind generell sehr ähnlich (Lang *et al.*, 2000). Auffallende Unterschiede bestehen hauptsächlich in dem Bereich zwischen β -Strang 1 und α -Helix 1. Während sich in tHisF dort eine wenig strukturierte Loopregion befindet, bildet tHisA ein zusätzliches antiparalleles β -Faltblatt aus, das aus den Strängen $\beta 1'$ und $\beta 1''$ besteht (Abbildung 4.21.).

4.3.6.1. Strukturvergleiche zwischen tHisA und tHisF

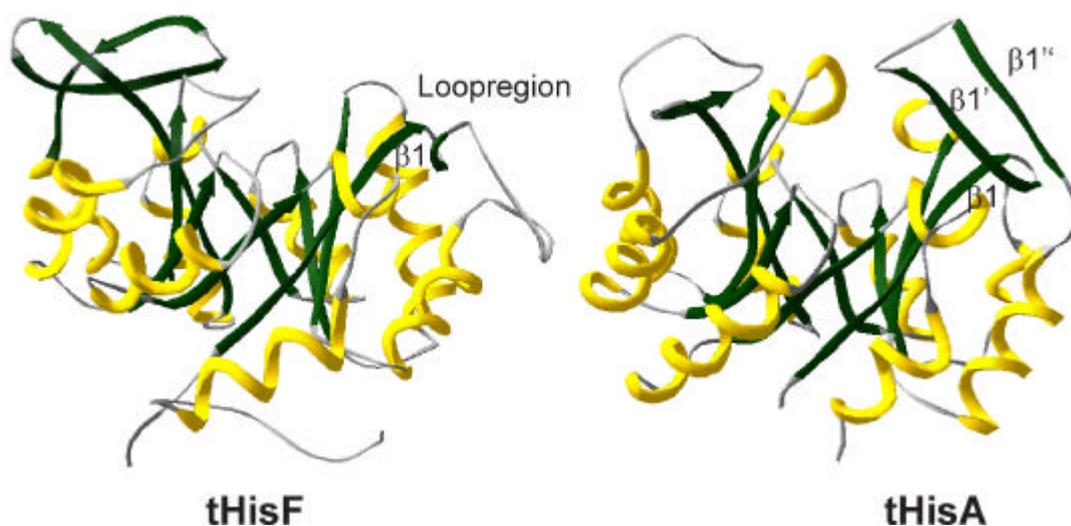


Abbildung 4.21.: Vergleichende Darstellung der Backbone-Strukturen von tHisA und tHisF. Seitenansicht auf das zentrale β -Barrel. Ein auffallender Unterschied findet sich im Bereich zwischen β -Strang 1 und α -Helix 1, wo sich in tHisF ein unstrukturierter Loop und in tHisA die antiparallelen Stränge $\beta 1'$ und $\beta 1''$ befinden.

Da dieser Bereich in der Nähe der aktiven Zentren an den C-terminalen Enden der zentralen β -Barrels liegt („Katalyse-Pol“, Höcker *et al.*, 2001b), könnte er eine wichtige funktionelle Bedeutung haben. Dafür spricht auch, dass diese Loopregion in tHisF sehr flexibel ist und sich ihre Konformation bei der Katalyse vermutlich ändert (Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001). Um der Rolle dieser Region weiter nachzugehen, sollten die N-terminalen Bereiche von tHisA und tHisF bis zum Beginn von α -Helix 1 wechselseitig ausgetauscht werden. Die Charakterisierung der resultierenden chimären Enzyme tHisA(1-34)-tHisF und tHisF(1-34)-tHisA sollte weitere Aufschlüsse über die evolutionäre Verwandtschaft von tHisA und tHisF liefern, sowie Einblicke in die Rolle des ausgetauschten Bereiches für die unterschiedlichen Reaktionen der beiden Enzyme zulassen.

4.3.6.2 Konstruktion und Klonierung der chimären Gene *thisA(1-34)-thisF* und *thisF(1-34)-thisA*

Abbildung 4.22. zeigt ein Struktur-basiertes Sequenzalignment der N-terminalen Bereiche von tHisA und tHisF. Diese Darstellung macht die strukturellen Unterschiede nach β -Strang 1 nochmals deutlich, identifiziert aber gleichzeitig fünf aufeinanderfolgende Aminosäuren in α -Helix1 (Asp31-Leu35), die in tHisA und tHisF identisch sind. Der Konservierung auf Aminosäureebene entspricht eine hohe Ähnlichkeit auf DNA-Ebene, die zur Konstruktion der Chimären genutzt wurde.

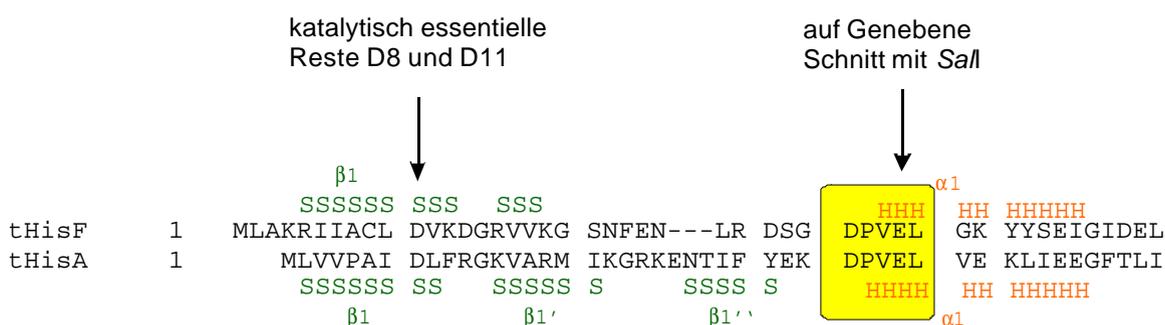


Abbildung 4.22.: Struktur-basiertes Alignment der N-terminalen Aminosäuren von tHisA und tHisF (erstellt mit dem SwissPDBViewer). Der zur Konstruktion der Chimären genutzte konservierter Sequenzblock in α -Helix 1 ist gelb markiert, Sekundärstrukturelemente sind in grün (β -Stränge) und rot (α -Helices) gezeigt.

Dazu wurde innerhalb des konservierten Sequenzabschnittes in die *thisA* und *thisF* Gene, welche in pTNA kloniert vorlagen, durch gerichtete Mutagenese (QuikChange, 3.3.8.1.2.) jeweils eine neue *SalI*-Schnittstelle eingeführt. Durch kompletten Verdau von pTNA_*thisA* bzw. Partialverdau von pTNA_*thisF* mit *SalI* und *NdeI* wurden jeweils zwei Fragmente der Größe 2,2 bzw. 1,8 kb erzeugt, gereinigt und kreuzweise ligiert. Nach Transformation von DH5 α -Zellen mit den beiden Ligationsprodukten wurden die Genkonstrukte pTNA_*thisA(1-34)-thisF* und pTNA_*thisF(1-34)-thisA* erhalten. Es ist zu beachten, dass es in beiden Konstrukten durch den Einbau der neuen *SalI*-Schnittstelle zum Aminosäureaustausch Glu34Asp kommt.

4.3.6.3. Test auf Aktivität *in vivo*

Es wurde getestet, ob eines oder beide der chimären Proteine die *hisA*- bzw. *hisF*-Defizienz der *E. coli* Mangelstämme HfrG6 bzw. UTH860 komplementieren können (vergleiche Kapitel 4.3.2.1.). Zu diesem Zweck wurden beide Stämme mit pTNA_*thisA(1-34)-thisF* oder pTNA_*thisF(1-34)-thisA* transformiert, auf Selektivplatten ohne Histidin ausplattiert und bei 37°C inkubiert. In keinem Fall kam es innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 6 Tagen zum sichtbaren Wachstum von Kolonien.

4.3.6.4. Expression der chimären Gene und versuchte Anreicherung der Proteinprodukte

Die chimären Gene wurden mit Hilfe der Schnittstellen *PaeI* und *BamHI* in den pDS-Vektor umkloniert (Kap. 2.2.1). Die Expression erfolgte in *E. coli* KK8-Zellen (2.1), die das pDM-Helferplasmid enthielten.

Nach der Expression fand sich etwa die Hälfte des Proteinproduktes tHisA(1-34)-tHisF im löslichen Teil des Zellextraktes und konnte durch einen Hitzeschritt (10 min bei 70°C; 3.4.2.4.) angereichert werden. Im Gegensatz zu den Wildtypenzymen tHisA und tHisF kam es dabei jedoch zu signifikanten Verlusten des chimären Proteins. Es wurde anschließend versucht, tHisA(1-34)-tHisF durch Anionenaustauschchromatographie über eine HQ20-Säule weiter anzureichern, was jedoch aus unbekanntem Gründen zum fast vollständigen Verlust des Proteins führte.

Auch die Chimäre tHisF(1-34)-tHisA fand sich nach der Expression etwa zur Hälfte im löslichen Teil des Zellextraktes. Deshalb wurde in Analogie zum Wildtypenzym tHisA versucht, das Protein mittels Affinitätschromatographie über Red Sepharose (3.4.2.5.) aufzureinigen. Im Gegensatz zu tHisA eluierte tHisF(1-34)-tHisA jedoch bereits unter großen Verlusten bei niedrigen NaCl-Konzentrationen zwischen 10 und 50 mM. Weitere Aufreinigungsversuche von tHisA(1-34)-tHisF und tHisF(1-34)-tHisA konnten aus Zeitmangel im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

4.3.6.5. Diskussion

Keine der beiden chimären Proteine tHisA(1-34)-tHisF und tHisF(1-34)-tHisA zeigt signifikante HisA- oder HisF-Aktivität *in vivo* (Kapitel 4.3.6.3.). Dies ist insofern erstaunlich, da beide Proteine die für die Katalyse beider Reaktionen essentiellen Aminosäuren besitzen. tHisA(1-34)-tHisF enthält Asp8 aus tHisA, welches Asp11 in tHisF entspricht (Abbildung 4.22.), sowie Asp130 und Thr171 aus tHisF. tHisF(1-34)-tHisA enthält Asp11 aus tHisF, welches Asp8 in tHisA entspricht (Abbildung 4.22.), sowie Asp127 und Thr164 aus tHisA. Eine mögliche Erklärung für fehlende Aktivität wäre mangelnde Stabilität der chimären Proteine. Beide Chimären lassen sich jedoch in löslicher Form herstellen und tHisA(1-36)-tHisF ist sogar thermostabil (Kapitel 4.3.6.4.). Leider ist es bisher nicht gelungen, die beiden Chimären aufzureinigen und auf Spuren enzymatischer Aktivität *in vitro* zu untersuchen. Es wäre dabei besonders interessant, ob die schwache HisA-Aktivität von tHisF (Kapitel 4.3.1.) in einer der chimären Proteine erhalten geblieben oder vielleicht sogar verbessert worden ist. Die Tatsache, dass beide Chimären sich in löslicher Form herstellen lassen läßt aber darauf schließen, daß es sich um gefaltete Proteine mit definierter ($\beta\alpha$)₈-Barrel Struktur handelt. Eine aus der N-terminalen Hälfte von tHisA und der C-terminalen Hälfte von tHisF bestehende Chimäre

lässt sich ebenfalls in löslicher Form herstellen und zeigt weder HisA- noch HisF-Aktivität (Birte Höcker, persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Module zwischen tHisA und tHisF ausgetauscht werden können, ohne daß dies zum Verlust einer geordneten $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur führt. Dies ist ein weiterer starker experimenteller Beleg für die evolutionäre Verwandtschaft der beiden Enzyme (Höcker *et al.*, 2001b). Hingegen scheint die Anordnung der für die Reaktionen essentiellen Aminosäuren am aktiven Zentrum in den chimären Proteinen soweit gestört zu sein, daß es zu keiner effizienten Katalyse mehr kommen kann. Auch von anderen Enzymen ist bekannt, daß schon kleinste strukturelle Perturbationen am aktiven Zentrum zu einem drastischen Rückgang der katalytischen Effizienz führen können (Knowles, 1991).

4.3.7. Diskussion

Die in Kapitel 4.3. vorgestellten Ergebnisse liefern eine Reihe von experimentellen Hinweisen für eine evolutionäre Verwandtschaft von HisA und HisF. Weitere Indizien weisen auf eine evolutionäre Verwandtschaft zwischen diesen beiden $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen der Histidinbiosynthese und den $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen Phosphoribosyl-anthranilat-Isomerase (TrpF) und Indolglyzerinphosphat Synthase (TrpC) hin. HisA und TrpF katalysieren Amadori-Umlagerungen von Aminoaldosen in Aminoketosen, während HisF und TrpC die Synthese des Imidazol- bzw. des Indolringes katalysieren (Abbildung 4.23.). HisA, HisF, TrpF und TrpC gehören innerhalb der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Faltung zur Superfamilie der Phosphat-bindenden Enzyme, da sie doppelt- bzw. einfach phosphorylierte Substrate umsetzen (Copley und Bork, 2000).

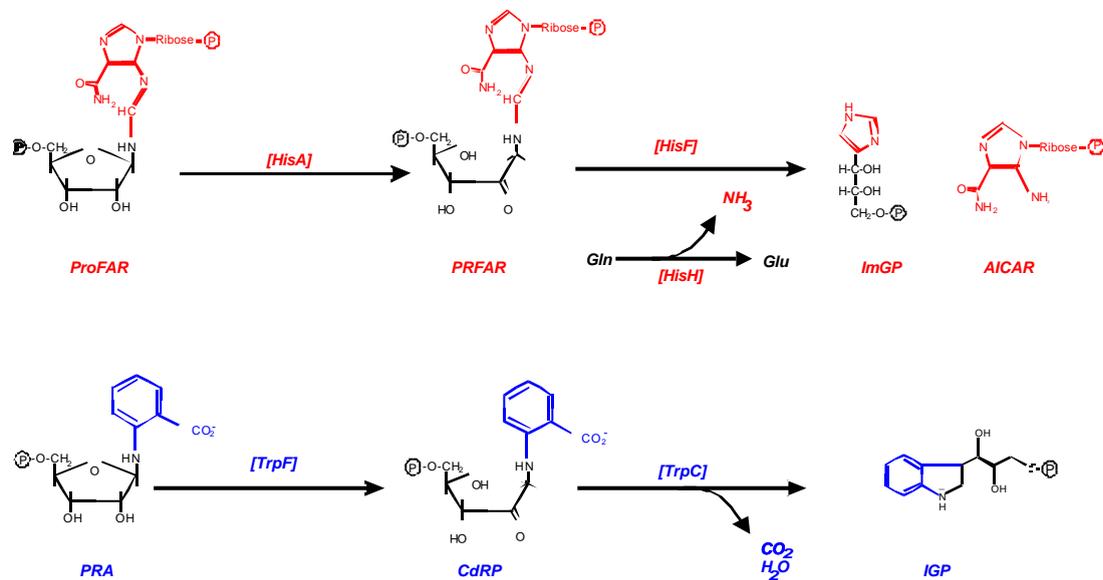


Abbildung 4.23.: Verwandte $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme katalysieren aufeinanderfolgende und ähnliche Reaktionen in der Histidin- und Tryptophanbiosynthese. HisA und TrpF katalysieren Amadori-Umlagerungen von Aminoaldosen in Aminoketosen. HisF und TrpC katalysieren Ringschlussreaktionen, die zur Bildung von Imidazolglycerinphosphat (ImGP) und Indolglycerinphosphat (IGP) führen. HisF bildet einen Bienzymkomplex mit HisH, welches durch die Hydrolyse von Glutamin Ammoniak für die HisF-Reaktion bereitstellt (Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001). Das zweite Produkt der HisF-Reaktion, AICAR, geht in die de novo Biosynthese von Purinen ein (nach Henn-Sax et al., 2001).

In Tabelle 4.16. werden eine Reihe von Eigenschaften der vier Enzyme verglichen.

Tabelle 4.16.: Gemeinsamkeiten und Unterschiede der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme HisA, HisF, TrpF und TrpC.

	tHisA	tTrpF	tHisF	eTrpC
Aminosäurereste, die für die Katalyse essentiell oder wichtig sind	D8 ^{a)} D127 T164 ^{a)}	C7 ^{b)} D126	D11 D130 ^{c)} T171	K55 E163 N183 (K114) ^{d)}
Lokalisation dieser Reste	β 1 β 5 β 6 ^{e)}	β 1 β 6 ^{b)}	β 1 β 5 β 6 ^{e)}	β 1 β 5 β 6 ^{f)}
Katalyse-mechanismus	allgemeine Säure-Base-Katalyse			
Spaltung durch Trypsin	R21 ^{g)} (im Loop β 1 α 1)	Resistent gegen Trypsin ^{h)}	R27 ^{g)} (im Loop β 1 α 1) K58 (im Loop β 2 α 2)	R26 ^{h)} (im Loop α 0 α 00)
Anzahl der Phosphatbindestellen	zwei ^{e)}	eine ^{b)}	zwei ^{e)}	eine ⁱ⁾
Oligomerisierungsgrad	Monomer ^{a)}	Dimer ^{h)}	Heterodimer mit tHisH ^{c)}	Monomer ^{f)}

a) Schmidt (1999)

b) Thoma (1998)

c) Beismann-Driemeyer und Sterner (2001)

d) Darimont *et al.* (1998)

e) Lang *et al.* (2000)

f) Hennig *et al.* (1995; TrpC aus *S. solfataricus*)

g) Schwander (1997)

h) Sterner *et al.* (1996)

i) Darimont (1994; TrpC aus *S. solfataricus*)

j) Wilmanns *et al.* (1992)

Besonders bemerkenswert ist, dass sowohl der prinzipielle Katalysemechanismus (allgemeine Säure-Base-Katalyse), wie auch die chemische Natur und die Lokalisation der entscheidenden Reste zwischen den vier Enzymen weitgehend konserviert ist. Die katalytischen Reste von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen liegen generell am C-terminalen Ende des zentralen β -Barrels („Katalyse-Pol“, Höcker *et al.*, 2001b), in den hier verglichenen Enzymen jedoch ausschließlich an den C-terminalen Enden der β -Stränge 1, 5 und 6. Dieser Vergleich legt die Vermutung nahe, dass HisA, HisF, TrpF und TrpC aus einem gemeinsamen Vorläuferenzym mit $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur hervorgegangen sind. Diese Hypothese wird durch eine Reihe experimenteller Befunde gestützt, die in Abbildung 4.24. zusammengefaßt sind.

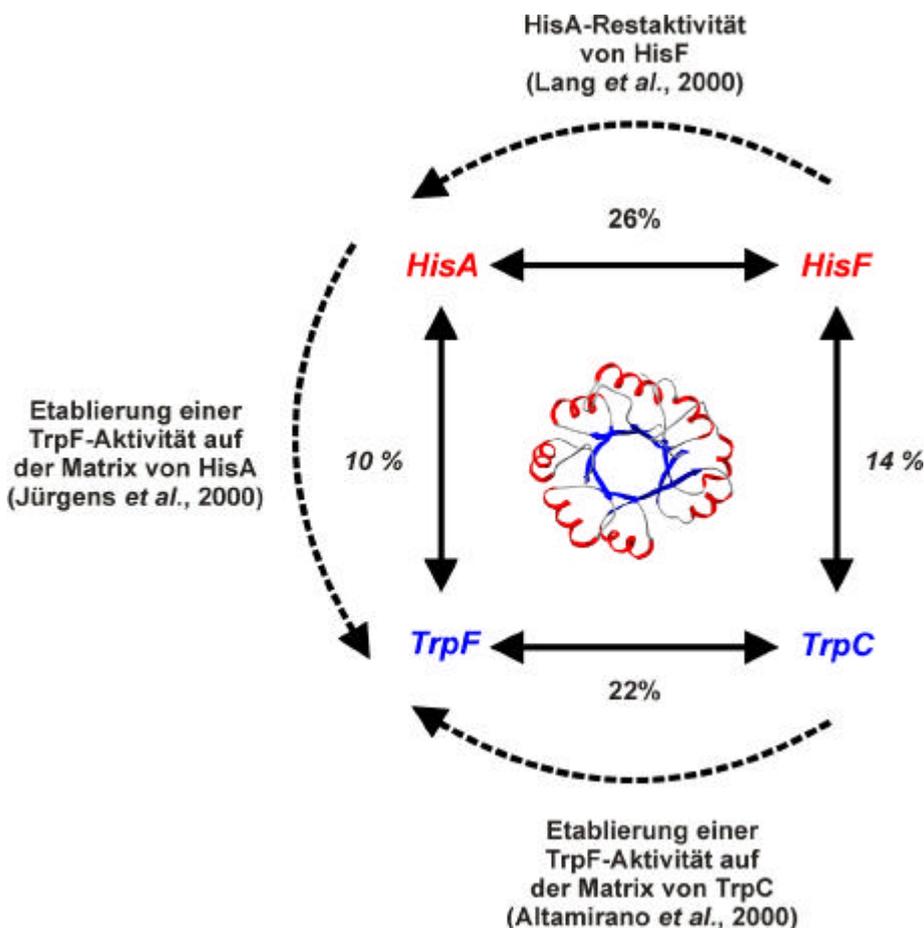


Abbildung 4.24.: Experimentelle Evidenzen für die evolutionäre Verwandtschaft von HisA, HisF, TrpF und TrpC. Die HisA-Aktivität von HisF und die Umwandlung von HisA und TrpC in TrpF werden durch gestrichelte Pfeile angedeutet. Die Prozentzahlen geben den Anteil an identischen Resten in paarweisen Struktur-basierten Sequenzalignments an (nach Henn-Sax et al., 2001).

Neben der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen HisA-Aktivität von tHisF (Lang et al., 2000), sind die Umwandlungen von TrpC bzw. HisA in TrpF dargestellt. (Altamirano et al., 2000; Jürgens et al., 2000). Während es zur Etablierung der katalytischen Aktivität von TrpF auf dem Proteingerüst von TrpC einer Kombination aus rationalem Design und gerichteter Evolution bedurfte, wobei eine ganze Reihe von Aminosäuren ausgetauscht wurden, genügte zur Etablierung der TrpF-Aktivität auf dem HisA-Grundgerüst der Austausch einer einzigen Aminosäure. Diese Experimente bestätigen die Annahmen von Jensen (1976) und Roy (1999), dass sich die heutigen Enzyme aus unspezifischen Vorläufern entwickelt haben könnten, die verwandte Reaktionen innerhalb verschiedener Biosynthesewege katalysierten.

Literatur

- Alifano, P., Fani, R., Lio, P., Lazcano, A., Bazzicalupo, M., Carlomagno, M.S., and Bruni, C.B.** (1996) Histidin biosynthetic pathway and genes: structures, regulation and evolution. *Microbiol Rev*, 60: 44 – 69
- ***Altamirano, M.M., Blackburn, J.M., Aguayo, C., and Fersht, A.R.** (2000) Directed evolution of new catalytic activity using the α/β -barrel scaffold. *Nature* 403, 617 – 622
- Arnold, F.H. and Moore, J.C.** (1997) Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 58: 1 - 14
- Arnold, F.H., Wintrode, P.L., Miyazaki, K., Gershenson, A.** (2001) How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *TIBS*, 26: 100 – 106
- Arrhenius, S.** (1889) *Z Physik Chem*, 4: 226 – 48
- Auerbach, G., Herrmann, A., Bracher, A., Bader, G., Gutlich, M., Fischer, M., Neukamm, M., Garrido-Franco, M., Richardson, J., Nar, H., Huber, R., Bacher, A.** (2000) Zinc plays a key role in human and bacterial GTP cyclo-hydrolase I. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13567 – 13572
- Babbitt, P.C. and Gerlt, J.A.** (2000) New functions from old scaffolds: how nature reengineers enzymes for new functions. *Adv. Protein Chem.* 55: 1 – 28
- Babbitt, P.C., Hasson, M.S., Wedekind, J.E., Palmer, D.R., Barrett, W.C., Reed, G.H., Rayment, I., Ring, D., Kenyon, G.L. and Gerlt, J.A.** (1996) The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalysed abstraction of the alpha-protons of carboxylic acids. *Biochemistry* 35: 16489 – 501
- Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Pogson, C.I., Wilson, I.A., Corran, P.H., Furth, A.J., Milman, J.D., Offord, R.E., Priddle, J.D. and Waley, S.G.** (1975) Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature*, 255: 609-14
- Barik, S.** (1998) Mutagenesis by Megaprimer PCR., in *Genetic engineering with PCR* (Horton, R.M., and Tait, R.C., Eds.) Volume 5: 25 – 38, Horizon Scientific Press, Norfolk, UK.
- Beauregard, M., Goraj, K., Goffin, V., Heremans, K., Goormaghigh, E., Ruyschaert,**

* Altamirano MM, Blackburn JM, Aguayo C, Fersht AR.

retraction: Directed evolution of new catalytic activity using the alpha/beta-barrel scaffold. *Nature*. 2002 May 23;417(6887):468.

- J.M. and Martial, J.A.** (1991) Spectroscopic investigation of structure in octarellin (a *de novo* protein designed to adopt the alpha/beta-barrel packing). *Protein Eng.* 4: 745 –749
- Becerra, A. and Lazcano, A.** (1996) The Role of Gene Duplication in the Evolution of Purine Nucleotide Salvage Pathways. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 28: 539 – 553
- Beismann-Driemeyer, S. and Sterner, R.** (2001) Imidazole glycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima*. Quaternary structure, steady-state kinetics, and reaction mechanism of the hienzyme complex. *J Biol Chem* 276: 20387 - 203
- Beismann-Driemeyer, S.** (2000) Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Bienenzymkomplexes Imidazolglycerinphosphat-Synthetase aus *Thermotoga maritima*. *Inaugural-Dissertation, Universität zu Köln*
- Blasi, F. und Bruni, C.B.** (1981) Regulation of the histidine operon: translation-controlled transcription termination (a mechanism common to several biosynthetic operons) *Curr. Top. Cell Regul.* 19: 1 – 45
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J., Gotschlich, E.C.** (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphate-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem*, 136: 175 - 179
- Bork, P., Gellerich, J., Groth, H., Hoof, R., Martin, F.** (1995) Divergent evolution of a beta/alpha-barrel subclass: detection of numerous phosphate-binding sites by motif search. *Protein Sci.* 4: 268 – 274
- 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*, 253: 164 – 70
- Bracher, A., Eisenreich, W., Schramek, N., Ritz, H., Gotze, E., Hermann, A., Gutlich, M., Bacher, A.** (1998) Biosynthesis of Pteridines. NMR studies on the reaction mechanisms of GTP cyclohydrolase I, pyruoyltetrahydropterin synthase, and sepiapterin reductase. *J Biol Chem*, 273: 28132 –28141
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry*, 72: 248 – 54
- Bränden, C. und Tooze, J.** (1999) *Introduction to protein structure. 2nd Edition*. Garland Publishing Inc., New York,
- Brenner, M. und Ames, B.N.** (1971) The histidine operon and its regulation. *Metabolic pathways*, vol 5 (ed H. J. Vogel) New York: Academic Press Inc.
- Brownlee, M. and Cerami, A.** (1981) The Biochemistry of the Complications of Diabetes Mellitus. *Ann Rev Biochem*, 50: 385 – 432

- Buchanan, J.M.** (1973) The amidotransferases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 39: 91 – 183.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M.T. and Dobberstein, B.:** A T5 promotor-based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vitro* and *in vivo*. 1987, *Methods Enzymol*, 155: 416 – 495
- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G., Blake, J.A., Fitzgerald, L.M., Clayton, R.A. Gocayne J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S., Venter, J.C.** (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 1058 –1073
- Burrows, L.L., Charter, D.F. und Lam, J.S.** (1996) Molecular characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5 (PAO1) B-band lipopolysaccharide gene cluster. *Mol. Mikrobiol.* 22: 481 – 495
- Carlomagno, M.S., Chiariotti, L., Alifano, P., Nappo, A.G. and Bruni, C.B.** (1988) Structure and function of the *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* K-12 histidine operons. *J. Mol. Biol.* 203: 585 – 606
- Certa, U., Bannwarth, W., Stuber, D., Gentz, R., Lanzer, M., Le Grice, S., Guillot, F., Wendler, I., Hunsmann, G. and Bujard, H.** (1986) Subregions of a conserved part of the HIV gp41 transmembrane protein are differentially recognized by antibodies of infected individuals. *EMBO J.* 5: 3051 – 3056
- Chakrabarti, P.** (1993) Anion Binding Sites in Protein Structures. *J Mol Biol*, 234: 463 - 482
- Charlebois, R.L., Sensen, C.W., Doolittle, W.F. and Brown, J.R.** (1997) Evolutionary analysis of the his CGABdFDHI gene cluster from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *J. Bacteriol.* 179: 4429 – 32
- Copley, R.R. and Barton, G.J.** (1994) A structural analysis of phosphate and sulphate binding sites in proteins. Estimation of propensities for binding and conservation of phosphate binding sites. *J Mol Biol*, 242: 321 - 329
- Copley, R.R. and Bork, P.** (2000) Homology among ($\beta\alpha$)₈ Barrels: Implications for the Evolution of Metabolic Pathways. *J. Mol. Biol.* 303: 627 – 640
- Creighton, T. (1993)** *Proteins: Structures & molecular properties.*, 2nd Edition W. H. Freeman & Co., New York.
- Harcourt, A.V.** (1867) *J Vhem Soc*, 20: 460 – 492
- Dall'Acqua, W. and Carter, P.** (2000) Substrate-assisted catalysis: molecular basis and biological significance. *Protein Science*, 9:1-9
- Dandekar, T., Snel, B. Huyenen, M. and Bork, P.** (1998) Conservation of gene order: a

- fingerprint of proteins that physically interact. *TIBS*, 23: 324 – 8
- Darimont, B.** (1994) Studies on catalysis, folding and evolution of indoleglycerol phosphate synthase, an eightfold $\beta\alpha$ barrel involved in tryptophan biosynthesis. *Doktorarbeit, Universität Basel, Schweiz*
- Darimont, B., Stehlin, C., Szadkowski, H. and Kirschner, K.** (1998) Mutational analysis of the active site of indoleglycerole phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Protein Science*, 7:, 1221 – 1232
- Davisson, V.J., Deras, I.L., Hamilton, S.E., and Moore, L.L.** (1994) A plasmid-based approach for the synthesis of a histidine biosynthetic intermediate. *J Org Chem* 58: 137 – 143
- 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
- Eberhard, M.** (1990) A set of programs for analysis of kinetic and equilibrium data. *Comp. Appl. Biosci.*, 6: 213 –221
- Eberhard, M., Tsai-Pflugeder, M., Bolewska, K., Hommel, U., Kirschner, K.** (1995) Indoleglycerol Phosphate Synthase-Phosphoribosyl Anthranilate Isomerase: Comparison of the Bifunctional Enzyme from *Escherichia coli* with Engineered Monofunctional Domains. *Biochemistry*; 34: 5419 - 5428
- Eder, J. and Kirschner, K.** (1992) Stable Structures of Eightfold $\beta\alpha$ -Barrel Proteins: Fragment Complementation of Phosphoribosylanthranilate Isomerase. *Biochemistry*, 31: 3617 –3625
- Fani, R., Lio, P. and Lazcano, A.** (1995) Molecular evolution of the histidine biosynthetic pathway. *J. Mol. Evol.* 41: 760 – 74
- Fani, R., Mori, E., Tamburini, E. and Lazcano, A.** (1998) Evolution of the structure and chromosomal distribution of histidine biosynthetic genes. *Orig. Life Evol. Biosp.*, 28: 555 – 570
- Fani, R., Lio, P., Chiarelli, I., Bazzicalupo, M.** (1994) The evolution of the histidine genes in prokaryotes: a common ancestor for the hisA and hisF genes. *J. Mol. Evol.* 38: 489 – 495
- Farber, G.K.** (1993) An α/β -barrel full of evolutionary trouble. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 3: 409 - 412
- Farber, G.K. and Petsko, G.A.** (1990) The Evolution of α/β barrel enzymes. *TIBS*, 15: 228 –234
- Fersht, A.** (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science – A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, Freeman & Co.
- Fling, S.P. and Gregerson, D.S.** (1986) Peptide and protein molekular weight

- determination by using a high molarity Tris-buffer system without urea. *Anal Biochem*, 155: 83 – 88
- Freist, W., Sternbach, H., Pardowitz, I., Cramer, F.** (1998) Accuracy of protein biosynthesis: quasi-species nature of proteins and possibility of error catastrophes. *J Theor. Biol*, 193: 19 – 38
- Gerlt, J.A., Babbitt, P.C.** (2001) Divergent Evolution Of Enzymatic Function: Mechanistically Diverse Superfamilies and Functionally Distinct Suprafamilies. *Annu Rev Biochem*. 70: 209-246.
- Gerlt, J.A.** (2000) New wine from old barrels. *Nat Stuc Biol*, 8: 5 – 7
- Gerstein, M.** (1997) A structural census of genomes: comparing bacterial, eukaryotic, and archaeal genomes in terms of protein structure. *J. Mol. Biol.* 274: 562 – 576
- Goldschmidt, E.P., Cater, M.S., Matney, T.S., Butler, M.A. and Greene, A** (1970) Genetic analysis of the histidine operon in *Escherichia coli* K 12. *Genetics* 66: 219 – 229
- Goraj, K., Renard, A., Martial, J.A.** (1990) Synthesis, purification and initial structural characterization of octarellin, a *de novo* polypeptide modelled on the alpha/beta-barrel proteins. *Prot Eng*, 3: 259 - 266
- Granick, S.** (1965) Evolution of heme and chlorophyll. 67 – 88. In V. Bryson and H.J. Vogel (ed.), *Evolving genes and proteins*. Academic Press, Inc., New York
- Hamilton, S.E.** (1995) Biochemical characterization of an enzymatic amadori rearrangement in histidine biosynthesis. *PhD thesis, Purdue University*.
- Hannahan, D.** (1984) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids., *J. Mol. Biol.*, 166: 557 – 580
- Harcourt, A.V.** (1867) *J Vhem Soc*, 20: 460 – 492
- Harris, T.K., Cole, R.N., Comer, F.I., Mildvan, A.S.** (1998) Proton transfer in the mechanism of triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 37: 16828 - 16838
- Hegyí, H. and Gerstein, M.** (1999) The Relationship between Protein Structure and Function: a Comprehensive Survey with Application to the Yeast Genome. *J. Mol. Biol.* 288: 147 – 64
- Hennig, M., Janosinius, J.N., van Schletinga T.A.C., Dijkstra, B.W. and Schlesier, B.** (1995) Crystal structure of concavalin B at 1.65 Å resolution. An „activated“ chitinase from seeds of *Canavalina ensiformis*. *J. Mol. Biol*, 154: 237 – 246
- Hennig, M., Schlesier, B., Dauter, Z., Pfeffer, S., Betzel, C., Hohne, W.E. and Wilson K.S.** (1992) A TIM barrel protein without enzymatic activity? Crystal structure of Narbonin at 1.8 Å resolution. *FEBS Lett.*, 306: 80 - 84
- Henn-Sax, M., Höcker, B., Wilmanns, M. and Sterner, R.** Divergent Evolution of (β α)₈-barrel enzymes. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, in Druck.

- Henot, F. and Pollak, R.M.** (2000) Catalytic activity of the D38A mutant of 3-oxo- Δ -steroid isomerase: recruitment of aspartate-99 as the base. *Biochemistry*, 39: 3351 – 3359
- Höcker, B.** (1999) Untersuchung zur Evolution des $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyms HisF aus *Thermotoga maritima*. Diplomarbeit, Universität Göttingen
- Höcker, B., Beismann-Driemeyer, S., Hettwer S., Lustig, A., Sterner, R.** (2001a) Dissection of a $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzyme into two folded halves. *Nat. Struct. Biol.* 8: 32-36
- Höcker, B., Jürgens, C., Wilmanns, M. and Sterner, R.** (2001b) Stability, catalytic versatility and evolution of the $(\beta\alpha)_8$ -barrel fold. *Curr Opin in Biotechnol*, 12: 376-381
- Hommel, U., Eberhard, M., and Kirschner, K.,** (1995) Phosphoribosyl anthranilate isomerase catalyses a reversible amidation reaction. *Biochemistry*, 34: 5429 - 5439
- Horowitz, N.H.** (1945) On the evolution of biochemical synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 31: 153 -7
- Horowitz, N.H.** (1965) The evolution of biochemical syntheses-retrospect and prospect. In Bryson V. & Vogel H.J., editors, *Evolving genes and Proteins*. Pages 15 –23. Academic press, New York and London
- Houbrechts, A., Moreau, B., Abagyan, R., Mainfroid, V., Preaux, G., Lamproye, A., Poncin, A., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.M., Martial, J.A.,** (1995) Second-generation octarellins: two new *de novo* $(\beta/\alpha)_8$ polypeptides designed for investigating the influence of beta-residue packing on the alpha/beta-barrel structure stability. *Protein Eng.* 8:249 - 259
- Hough, D.W. and Danson, M.J.** (1999) Extremozymes. *Curr Opin Chem Biol*, 3: 39 - 46
- Huber, R., Langworthy, T.A., König, H., Thomm, M., Woese, C.R., Sleytr, U.B. and Stetter, K.O.** (1986) *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Arch Microbiol*, 144: 324 – 33
- Hwang, K.Y., Song, H.K., Chang, C., Lee, J., Lee, S.Y., Kim, K.K. Choe, S., Sweet, R.M., Suh, S.W.** (1997) Crystal structure of thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* refined at 1.7 Å resolution. *Mol Cells*, 7: 251 - 258
- Inoue, H. Nojima, H. and Okyama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96: 23 - 28
- Isbell, H.S. and Frush, H.L.** (1958) Mutarotation, Hydrolysis and Rearrangement Reaction of Glycosylamines. *J Org Chem*, 23: 1309 - 1319
- Jacob, F. and Monod, J.** (1961) Genetic regulatory mechanism in synthesis of proteins. *J Mol Biol*, 3: 318 – 356
- Jacobs, M., Wendt, S. and Stahl, U.** (1990) High efficiency electro transformation of

- Escherichia coli* with DNA from ligation mixtures. *Nuc Acids Res*, 23: 1309 – 1319
- Jaenicke, R.** (1991) Protein Stability and molecular adaption to extreme conditions. *Eur. J. Biochem* 202: 715 – 728
- Jaenicke, R.** (2000) Do ultrastable proteins from hyperthermophiles have high or low conformational rigidity? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2962 – 2964
- Jaenicke, R. and Böhm, G.** (1998) The stability of proteins in extreme environments. *Current opinion in structural biology* 8: 738 – 748
- Jensen, R.A.** (1976) Enzyme recruitment in evolution of new function. *Ann Rev Microbiol*, 30: 419 - 25
- Jensen, R.A.** (1996) Evolution of metabolic pathways in enteric bacteria. In Neidhardt FC, Ingrahm J.L., Low, K.B., Magasanik B., Schaechter, M. and Umberger, H.E., editors, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Volume 2, pages 2649 –2662. ASM Press, Washington.
- Jürgens, C.** (2000) Änderung des Substratspektrums der 5'-ProFAR-Isomerase aus *Thermotoga maritima* durch gerichtete Evolution. *Diplomarbeit, Universität Göttingen*
- Jürgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns. M. and Sterner, R.** (2000) Directed evolution of a $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9925 –9930
- Kansai, T.** (1974) Regulation of the expression of the histidine operon in *Salmonella typhimurium*. *Nature* 249: 523 – 7
- Klem, T.J. and Davisson V.J.** (1993) Imidazole glycerol phosphate synthase: the glutamine amidotransferase in histidine biosynthesis. *Biochemistry* 32: 5177 – 86
- Knowles, J.R.** (1991) Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature*, 350: 121 – 124
- Knowles, J.R.** (1987) Tinkering with enzymes: what are we learning?, *Science*, 236: 1252 – 1258
- Krahn, J.M., Kim, J.H., Burns, M.R., Parry, R.J., Zalkin, H. and Smith, J.L.** (1997) Coupled formation of an amidotransferase interdomain ammonia channel and a phosphoribosyltransferase active site. *Biochemistry* 36: 11061 – 11068
- Kucher, O. and Arnold, F.H.** (1997) Directed Evolution of enzyme catalysts. *TIBTECH*, 15: 523 –530
- Kuenzler, M., Balmelli, T., Egli, C.M., Paravicini, G. and Braus, G.H.** (1993) Cloning, primary structure, and regulation of the HIS7 gene encoding a bifunctional glutamine amidotransferase: cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 175: 5548 - 5558
- Lang, D., Thoma, R., Henn-Sax, M., Sterner, R. and Wilmanns, M.** (2000) Structural Evidence for Evolution of the β/α Barrel Scaffold by Gene Duplication and Fusion.

- Science*, 289, 1546 – 50
- Lanzer, M. and Bujard, H.** (1988) Promotors largely determine the efficiency of repressor action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8973 – 8977
- Larrade, R., Robertson, M.P. and Miller, S.L.** (1995) Rates of Decompositon of Ribose and other Sugars: Implications for Chemical Evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 92: 8158 – 60
- Larsen, T.M., Boehlein, S.K., Schuster, S.M., Richard, N.G., Thoden, J.B., Holden, H.M. and Rayment, I.** (1999) Three-dimensinal structure of *Escherichia coli* Asparagin syntetase B: a short journey from substrate to product. *Biochemistry*, 38: 16146-57
- Lazcano, A., Fox, G.E., and Otó, J.** (1992) Life before DNA: the origin and evolution of early archaela cells. *Booca Raton: CRC Press*.
- Lazcano, A. and Miller, S.L.** (1999) The origin and early evolution of life, perbiotic chemistry, the pre-RNA world, and time, *Cell*, 85; 793 – 8
- Lesk, A.M., Brändén, C.I. and Chothia, C.** (1989) Structural principals of alpha/beta barrel proteins: the packing of the interior of the sheet. *Proteins* 5: 139 – 48
- Luger, K., Hommel, U., Herold, M., Hofstenge, J., Kirschner, K.** (1989) Correct folding of Circularly permuted Variants of a $\beta\alpha$ Barrel Enzyme *in Vivo*. *Science*, 243: 206 – 210
- Margolis, M.N. and Goldberger, R.F.** (1966) Isolation of the fourth (isomerase) of histidine biosynthesis from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, 241: 3262 - 3269
- Martin, A.C.R., Orengo, A.O., Hutchinson, E.G., Jones, S. Karmirantzou, M. Laskowski, R.A., Mitchell. J.B.O., Taroni, C., Thornton, J.M.** (1998) Protein folds and functions. *Structure*, 6:875 –84
- Massière, F. und Badet-Denisot, M.A.** (1998) The mechanism of glutamine-dependent amidotransferases. *Cell Mol Life Sci* 54, 205 – 222
- Mathney, T.S., Goldschmidt, E.P., Erwin, N.S. and Scroggs, R.S.:** A preliminary map of genomic sites for F-attachment in *Escherichia coli* K12. 1964, *BBRC*, 17: 278 – 281
- Merz, A., Knöchel, T., Jansonius, J.N., Kirschner, K.** (1999) The hyperthermostable indoleglycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima* is destabilized by mutaional 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., Kirschner, K.** (2000) Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures. *Biochemistry* 39: 880 – 889
- Michal, G.** (Edt.) (1999) *Biochemical Pathways/Biochemischer Atlas*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

- Miyazaki, K. Wintrode, P.L., Gryling, R.A., Rubingh, D.N., Arnold, F.H.** (2000) Directed evolution study of temperature adaption in a psychrophilic enzyme. *J. Mol. Biol.* 297: 1015 – 1026
- Moore, J.C., Arnold, F.H.** (1996) Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nat Biotechnol*; 14: 458 - 467
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335 –50
- Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T. and Chothia, C.** (1995) SCOP: A Structural Classification of Proteins Database for the Investigation of Sequences and Structures. *J. Mol. Biol.* 247, 536 – 540
- Nagano, N., Hutchinson, E. G. and Thornton, M.** (1999) Barrel structures in proteins: Automatic identification and classification including a sequence analysis of TIM barrels. *Protein Science* 8: 2072 – 2084
- Nar, H., Huber, R., Auerbach, G., Fischer, M., Hosl, C., Ritz, H., Bracher, A., Meining, W., Eberhardt, S., Bacher, A.** (1995) Active site topology and reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 12120 - 5
- Ourisson, G., and Nakatani, Y.** (1994) The terpenoid theory of the origin of cellular life: the evolution of terpenoids to cholesterol. *Chem Biol* 1: 11 - 23
- 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 Science* 4, 2411 – 2423
- Palmer, D.R., Garrett, J.B., Sharma, V., Meganathan, R., Babbitt, P.C., Gerlt, J.A.** (1999) Unexpected divergence of enzyme function and sequence: “N-acylamino acid racemase” is o-succinylbenzoate synthase. *Biochemistry*, 6, 38 (14) 4252-4258
- Peracchi, A.** (2001) Enzyme catalysis: removing chemically „essential“ residues by site directed mutagenesis. *TIBS*, 26: 497 – 503
- Plapp, B.V.** (1995) Site directed mutagenesis: a tool for studying enzyme catalysis. *Methods Enzymol.* 249: 91 – 119
- Pries, F., Kingma, J., Janssen, D.B.** (1995) Activation of an Asp124 →Asn mutant of haloalkane dehalogenase by hydrolytic deamidation of asparagine. *FEBS Lett.* 358: 171 –174
- Priestle, J.P. Grutter, M.G., White, J.L., Vincent, M.C., Kania, M., Wilson, E., Jardetzky, T.S., Kirschner, K. and Jansonius, J.N.** (1987) Three dimensional structure of the bifunctional enzyme N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase-indole-3-glycerol-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 5690 - 5694
- Pujadas, G. and Palau, J.** (1999) TIM barrel fold: structural, functional and evolutionary characteristics in natural and designed molecules. *Biologia Bratislava*, 54: 231 –54

- Pujadas, G. and Palau, J.** (2001) Evolution of alpha-Amylases: Architectural Features and Key Residues in the Stabilization of the $(\beta/\alpha)_8$ -Scaffold. *Mol. Biol. Evol.* 18:38 - 54
- Rayment, I., Ringe, D., Kenyon, G.L., Gerlt, J.A.** (1996) The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the alpha-protons of carboxylic acids. *Biochemistry*, 35: 16489 - 16501
- Reardon, D. and Farber, G. K.** (1995) The structure and evolution of α/β barrel proteins. *FASEB J.* 9, 497 – 503
- Rehaber, V. and Jaenicke, R.** (1992) Stability and Reconstitution of D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from the Hyperthermophilic Eubacterium *Thermotoga maritima*. *J. Biol. Chem.* 267, 10999 – 11006
- Richardson, J.S., Kneller, D., Osguthorpe, D. and Sharf, M.** (1987) Heidelberg: European Molecular Biology Laboratory (Sander, C. ed), 21 - 39
- Roy, S.** (1999) Multifunctional Enzymes and Evolution of Biosynthetic Pathways: Retro-Evolution by Jumps. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 37: 303 – 309
- 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 – 91
- Sakar, G. and Sommer, S.S.** (1990) The „megaprimer“ method of site directed mutagenesis. *Biotechniques* 8: 404 – 407
- Sambrook, J., Fritsch, E.E. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.*, Cold Spring Harbor, New York
- Sander, C., Vriend, G., Bazan, F., Horovitz, A., Nakamura, H., Ribas, L., Finkelstein, A.V., Lockhart, A. Merkl, R., Perry, L.J. et al.** (1992) Protein design on computers. Five new proteins: Shpilka, Grendel, Fingerclasp, Leather, and Aida. *Proteins* 12, 105-110
- Schimmel, P.** (1989) Hazards of deducing enzyme structure-activity relationships on the basis of chemical application of molecular biology. *Acc Chem Res*, 22: 232 – 233
- Schmid, F.X.** (1997) Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Protein structure: A practical approach.*, (ed. T. E. Creighton), pp. 259 – 295. Oxford: IRL Press
- Schmidt, S.** (1999) Identifizierung von katalytisch essentiellen Aminosäuren der 5'-ProFAR-Isomerase aus *Thermotoga maritima*. *Diplomarbeit, Universität Göttingen*
- Schneider, W.P., Nichols, B.P. and Yanofsky, C.** (1981) Procedure for production of hybrid genes and proteins and its use in assessing significance of amino acid differences in homologous tryptophan synthetase alpha polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 2169 - 2173

- Schwander, M.** (1997) Cloning of the *hisA* gene from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*; expression, purification and characterization of 5'-ProFAR isomerase. *Diploma thesis, Universität Basel, Schweiz*
- 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. Matthews, B.W.** (1995) A relationship between protein stability and protein function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 452 – 456
- Smith, D.E. and Ames, B.N.** (1964) Intermediates in the early steps of histidine biosynthesis. *J Biol Chem* 239: 1848 – 1855
- Somero, G.N.** (1978) *Annul. Rev. Ecol. Syst.* 9: 1 – 29
- Stansfield, I., Jones, K.M., Herbert, P., Lewendon, A., Shaw, W.V., Tuite, M.F.** (1998) Missense translation errors in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, 282: 13 -24
- Stemmer, W.P.C** (1995) The evolution of molecular computation. *Science*. 270:1510.
- Stemmer, W.P.C.** (1994) Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature*, 370: 389 – 391
- Sterner, R. and Liebl, W.** (2001) Thermophilic adaptation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 36: 39 - 106
- Sterner, R., Kleemann, G.R., Szadkowski, H., Lustig, A., Hennig, M., Kirschner, K.** (1996) Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer. *Protein. Science* 5: 2000 – 2008.
- Steyaert, J., Hallenga, K., Wyns, L., Stanssens, P.** (1990) Histidine 40 of ribonuclease T1 acts as a base catalyst then the true catalytic base, glutamic acid-58, is replaced by alanin. *Biochemistry*, 29: 9064 – 9072
- Stoll, V.S. and Blanchard, J.S.** (1990) Buffers Principles and Practice. *Meth. Enzymol.*, 182: 24-38
- Stüber, D., Matile, H. and Garotta, G.** (1990) System for high-level products in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: applications to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function., *Immunol Methods*, 4: 121 – 52
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of clones genes. *J Mol Biol* 189: 60 –89
- Tepljakov, A., Obmolova, G., Badet-Denisot, M.A., Badet, B.** (1999) The mechanism of sugar phosphate isomerization by glucosamine 6-phosphate synthase. *Protein Science*. 8: 596 - 602.
- Terwisscha van Scheltinga, A.C., Hennig, M., Dijkstra, B.W.** (1996) The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of

- conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. *J. Mol. Biol.* 262:243 - 257
- Thoden, J.B., Holden, H.M. Wesenberg, G. Rauschel. F.M. and Rayment, I.** (1997) structure of carbamoyl phosphate synthetase: a journey of 96 Å from substrate to product. *Biochemistry* 38: 16158 –16166
- Thoma, R.** (1998) The isomerases of the histidine and tryptophan biosynthetic pathway from the hyperthermophilic organism *Thermotoga maritima*. *Inaugural-Dissertation, Universität Basel*
- 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
- Thoma, R., Obmolova, G., Lang, D.A., Schwander, M., Jenö, P., Sterner, R., Wilmanns, M.** (1999) Efficient expression, purification and crystallisation of two hyperthermostable enzymes of histidine biosynthesis. *FEBS Letters*, 454: 1 – 6
- Thoma, R., Schwander, M., Liebl, W., Kirschner, K., Sterner, R.** (1998) A histidine gene cluster of the hyperthermophilic *Thermotoga maritima*: sequence analysis and evolutionary significance. *Extremophiles* 2: 379 – 389
- Thompson, T.B., Garrett, J.B., Taylor, E.A., Meganathan, R., Gerlt, J.A., Rayment, I.** (2000) Evolution of enzymatic activity in the enolase superfamily: structure of α -succinylbenzoate synthase from *Escherichia coli* in complex with Mg^{+2} and α -succinylbenzoate. *Biochemistry* 5, 39 10662 – 10676
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Sci USA* 76: 4350 -4354
- Traut, T.W. and Temple, B.R.S.** (2000) The Chemistry of the Reaction Determines the Invariant Amino Acids during the Evolution and Divergence of Orotidine-5'-Monophosphate Decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 275, 28675 – 28681
- Urfer, R. and Kirschner, K.** (1992) The importance of surface loops for stabilizing an eightfold $\beta\alpha$ barrel protein. *Protein Science*, 1: 31 - 45
- van den Burgh, B., Vriend, G., Veltman, O.R., Venema, G., Eijsink, V.G.H.** (1998) Engineering an enzyme to resist boiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2056 - 2060
- Vogel, H.J. and Bonner, D.M.** (1956) Acetylornithinase of *E. coli*: partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.*, 218: 97 – 106
- Volkov, A.A. and Arnold, F.H.** (2000) Methods for *in vitro* DNA recombination and random chimeragenesis. *Methods Enzymol* 328: 447 - 56
- Waley, S.G.** (1969) Some aspects of the evolution of metabolic pathways. *Comp Biochem Physiol*, 30: 1 – 7

- Weber, A.L. and Miller, S.L.** (1981) Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acids. *J Mol Evol* 17: 273 – 284
- Whitlow, M., Howard, A.J., Finzel, B.C., Poulos, T.L., Winborne, E., Gilliland, G.L.** (1991) A metal-mediated hydride shift mechanism for xylose isomerase based on the 1.6 Å *Streptomyces rubiginosus* structures with xylitol and D-xylose. *Proteins*, 9: 153 - 173
- White, H. B.** (1976) Coenzymes as fossils of an earlier metabolic state. *J Mol Evol*, 7: 101 –17
- Wilmanns, M. and Eisenberg, D.** (1993) Three-dimensional profiles from residue-pair preferences: identification of sequences with $\beta\alpha$ -barrel fold. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 1379 – 1383
- Wilmanns, M. and Eisenberg, D.** (1995) Inverse protein folding by residue pair preference profile method: estimating the correctness of alignments of structurally compatible sequences. *Prot Eng*, 8: 627 - 39
- Wilmanns, M., Hyde, C.C., Davies, D.R., Kirschner, K. and Jansonius, J.N.** (1991) Structural conservation in parallel $\beta\alpha$ -barrel enzymes that catalyze three sequential reactions in the pathway of tryptophan biosynthesis. *Biochemistry*, 30: 9161 – 9169
- Wilmanns, M., Priestle, J.P., Niermann, T. and Jansonius, J.N.** (1992) Three-dimensional structure of the bifunctional enzyme phosphoribosylanthranilate isomerase :indolglycerolphosphate synthase from *Escherichia coli* refined at 2,0 Å resolution. *J Mol Biol*, 223: 477 – 507
- Wilson, G.G. and Murray, N.E.** (1991) Restriction and Modification systems. *Ann Rev Genetics*, 25: 585 – 627
- Winkler, M.E.** (1986) Biosynthesis of histidine. Washington: *American Society for Microbiology*
- Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L.** (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 4576 - 79
- Wolf, W.A. and Brown, G.M.** (1969) The Biosynthesis of folic acid. X. Evidence for an Amadori rearrangement in the enzymatic formation of dihydroneopterin triphosphate from GTP. *Biochim Biophys Acta*, 192: 468 – 78
- Wray, J.W., Baase, W.A., Lindstrom, J.D., Weaver, L.H., Potete, A.R., 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.
- Wrba, A., Jaenicke, R., Huber, R. and Stetter, K.O.** (1990) Lactate Dehydrogenase from the Extreme Thermophile *Thermotoga maritima*, *Eur J Biochem*, 188: 195 -201

- Yanisch-Perron, C., Vierira, J. and Messing, J.** (1985) Improves M13 phage cloning vectors and host strain nucleotide sequences of the m13 mp 18 and pUC 19 Vectors. *Gene*, 33: 103 – 119
- Yanofsky, C.** (1981) Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature*, 289: 751 – 58
- Yanofsky, C.** (2001) Advancing our Knowledge in Biochemistry, Genetics, and Microbiology through studies on Tryptophan Metabolism. *Annu Rev Biochem*, 70: 1 – 37
- Yaylayan, V. and Huyghues-Despointes, A.** (1994) Chemistry of Amadori-Rearrangement products: Analysis, kinetics, reactions and spectroscopic properties. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 34: 321 - 69
- Ycas, M.** (1974) On earlier states of the biochemical system. *J Theor Biol*, 44: 145 - 60
- Zalkin, H. and Smith, J.L.** (1998) Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 72: 87 – 144
- Závodszky, 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. USA* 95: 7406 – 7411
- Zhao, H. and Arnold F. H.** (1999) Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Prot Engneen*, 12: 47 – 53
- Zhao, H., Giver, L. Shoa, Z., Affholter, J.A. and Arnold, F.H.** (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination. *Nat. Biotech*, 16: 258 – 261

Anhang

A. Alignment von HisA

(aus Schmidt, 1999)

Das nachfolgende Alignment wurde mit ClustalX (Vers. 1.64b, Gap Opening:10, Gap Extension: 0.05, Delay Divergent Sequences: 40%, Protein Weight Matrix: BLOSUM series, Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt und mit BOXSHADE (Fraction of sequence: 0.8, Hofman & Baron, 1999) koloriert. Schwarz hinterlegt sind diejenigen Reste, die in mehr als 80 % der Sequenzen konserviert sind. Die grau hinterlegten Reste entsprechen konservierten Gruppen von Resten mit ähnlichen Eigenschaften, die in mehr als 80 % der Sequenzen vorkommen (Gruppeneinteilung: FZW, ILVM, RK, DE, GA, TS, NQ). In der „Consensus“-Zeile sind diejenigen Reste bzw. Gruppen von Resten angegeben, die hochkonserviert (Großbuchstaben) oder zu 80 % konserviert sind. ECOLI: *Escherichia coli* (Acc.nr. P10371), AQUAE: *Aquifex aeolicus* (Acc.nr. O67328), ARCFU: *Archaeoglobus fulgidus* (Acc.nr. O29276), ATHAL: *Arabidopsis thaliana* (Fujimori *et al.*, 1988), AZOBR: *Azospirillum brasilense* (Acc.nr. P26720), BACSU: *Bacillus subtilis* (Acc.nr. O35006), CGLUT: *Corynebacterium glutamicum* (Jung *et al.*, 1998), HAEIN: *Haemophilus influenzae* (Acc.nr. P44435), LACLA: *Lactococcus lactis* (Acc.nr. Q02131), METJA: *Methanococcus jannaschii* (Acc.nr. Q58927), METTL: *Methanococcus thermolithotrophicus* (Acc.nr. Q50757), METVA: *Methanococcus vanniellii* (Acc.nr. P05324), METVO: *Methanococcus voltae* (Acc.nr. P05325), MYCTU: *Mycobacterium tuberculosis* (Acc.nr. O06588), PFURI: *Pyrococcus furiosus* (www.combdna.umbi.umd.edu), RHOCA: *Rhodobacter capsulatus* (Acc.nr. O30725), SALTU: *Salmonella typhimurium* (Acc.nr. P10372), SCHPO: *Schizosaccharomyces pombe* (Acc.nr. Q1018), STRCO: *Streptomyces coelicolor* (Acc.nr. P16250), SULSO: *Sulfolobus solfataricus* (Acc.nr. O33772), SYNY3: *Synechocystis sp.* (Acc.nr. P74561), TMARI: *Thermotoga maritima* (Thoma *et al.*, 1988), YEAST: *Saccharomyces cerevisiae* (Acc.nr. P40545).

B. Alignment von HisF

(aus Beismann-Driemeyer, 2000)

Die HisF-Sequenzen entstammen der SwissProt-Datenbank.

Das Alignment wurde mit dem Programm Pile Up aus dem GCG-Package (Wisconsin University) erstellt.

Die angegebenen Sekundärstrukturen beziehen sich auf tHisF aus dem tHisH:F-D11N-Komplex (M. Walker, M. Wilmanns, unveröffentlichte Arbeiten).

Tmarit: *Thermotoga maritima*

Kpneum: *Klebsiella pneumoniae*

Ecoli : *Escherichia coli*

Styphi: *Salmonella typhimurium*

Hinflu: *Haemophilus influenzae*

Baphid: *Buchnera aphidicola*

Cjejuni: *Campylobacter jejuni*

Rsphae: *Rhodobacter sphaeroides*

Rcapsu: *Rhodobacter capsulatus*

Abrasi: *Azospirillum brasilense*

Mtuber: *Mycobacterium tuberculosis*

Cgluta: *Corynebacterium glutamicum*

Ssolfa: *Sulfolobus solfataricus*

Tethan: *Thermoanaerobacter ethanolicus*

Aaeoli: *Aquifex aeolicus*

Afulgi: *Archeoglobus fulgidus*

Mjanna: *Methanococcus jannaschii*

Bsubti: *Bacillus subtilis*

Synech: *Synechocystis sp. (strain PCC 6803)*

Llacti: *Lactococcus lactis*

Mtherm: *Methanobacterium*

thermoautotrophicum

Dradio: *Deinococcus radiodurans*

Lpneum: *Legionella pneumophila*

Paerug: *Pseudomonas aeruginosa*

Scerev: *Saccharomyces cerevisiae*

25 Sequenzen, Kons: streng konserviert, kons: in min 22 (max. 3 Abweichungen)

	$\beta 1$	$\beta 1'$	$\beta 1''$	$\alpha 1$	$\beta 2$
2° strk	SSSSSSSSSSSS	SSS	SSS	HHHHHHHHH	SSSSSS
kons	R i cLd	VV K	f	Gd	g DE f di
Tmarit	MLAKRIIACLDVK...	DGRVV.KGTN.	FENLRDSGDPVELGKFYSEI	GIDELVFLDIT
Kpneum	MLAKRIIPCLDVR...	DGQVV.KGVQ.	FRNHEIIGDIVPLAKRYADE	GADELVFYDIT
Ecoli	MLAKRIIPCLDVR...	DGQVV.KGVQ.	FRNHEIIGDIVPLAKRYAEE	GADELVFYDIT
Styphi	MLAKRIIPCLDVR...	DGQVV.KGVQ.	FRNHEIIGDIVPLAKRYADE	GADELVFYDIT
Hinflu	MLAKRIIPCLDVR...	DGQVV.KGVQ.	FRNHEIIGDIVPLAQRYAQE	GADELVFYDIT
Baphid	MLAKRIIACLDVN...	NGVVV.KGIQ.	FKNHEIVGDIISLSKRYTKE	GIDELVFYDIT
Cjejun	MLTKRIIACLDVK...	DGRVV.KGTQ.	FKNHKDMGDIIELARYYSQN	GIDELVFYDIA
Rsphae	MLKTRIIIPCLDVA...	DARVV.KGVN.	FVDLRDAGDPVEAARAYDAA	GADELCFLDIH
Rcapsu	MLKTRIIIPCLDVA...	DGRVV.KGVN.	FVNLIDAGDPVEAAKAYDAA	GADELCFLDIH
Abrasi	MLKMRVIPCLDVK...	DGRVV.KGVN.	FVDLIDAGDPVEQARVYDRE	GADELTFLDIT
Mtuber	MYADRDLPGAGGLAVRVIPCLDVD	DGRVV.KGVN.	FENLRDAGDPVELAAVYDAE	GADELTFLDVT
Cgluta	MGVAIRVIPCLDVD...	NGRVV.KGVN.	FENLAMLADPVELAKRYDEE	GADELTFLDVT
Ssolfa	MTTKRIIACLDVK...	DGNVV.KGVN.	FLNLQLKGPVSLASLYEEE	GADEIVFLDIT
Tethan	MVTKRIIPCLDVH...	NGRVV.KGVN.	FVNIRDAGDPVEIASYYDKA	GADELTFLDIT
Aaeoli	MLAKRIIPCLDVD...	KGRVV.KGVK.	FLNLRDAGDPVEVAKRYEEE	GADELVFLDIT
Afulgi	MLAKRIIPCLDVTLDSEARVV	KGVE.	FVNLRDAGDPVELAKRYDEE	GADELVFLDIT
Mjanna	MLTKRIIPCLDIK...	DGRVV.KGTK.	FLNLRDAGDPVELAQYYDDE	GADELVFLDIT
Bsubti	MITKRIIPCLDVK...	EGRVV.KGIQ.	FLELKDAGDPVELAEVYDRE	GADELVFLDIS
Synech	MTLAKRILPCLDVN...	AGRVV.KGIN.	FVDLQDAGDPVELARAYNEA	GADELVFLDIT
Llacti	MLTKRIIPCLDIK...	NGKVV.KGIN.	FVGLREIGDPVELAKIYEEQ	CADEIVFLDIT
Mtherm	MLAKRIIPCLDCDLQVPNGRVV	KGVE.	FKQIRYAGDPVELATRYED	GADEIVFLDIT
Dradio	MLRGVLAKRIVPCLDVQ...	NGRVV.KNVRFFEDHRDAGDPLVLAQAYEAQ	QADELVFYDIT	
Lpneum	MSNVRLIARLDIKGP.	NLI...KGVH.	LEGLRVVGNPNEYAMAYYA	QGADELIYMDTV
Paerug	MVRRRVIPCLLLK...	DRGLV..KTV.	FKEPKYVGDPIAIRIFNE	KEVDELILLDID
Scerev	GLTRRIIACLDVRTNDQGDLVVTKGDQYDVREKSDGKGVNRLGKPVQLAQ	KYYQQGADEVTFLNIT	

	$\alpha 2$	$\beta 3$	$\alpha 3$	$\alpha 3$	$\beta 4$	$\alpha 4'$	$\alpha 4$	$\beta 5$
2° strk	HHHHHHHHH	SSSS	HHHH	HHHHH	SSSS	HHHH	HH-----	HHHHHHH
kons a		P V GG			GadK s n A p			Q v
Tmarit	ASVE...KRKTMLELVEKVAEQIDIPFTVGGGIHDFETA.....			SELILRGADKVSINTAAVENPSL.....				ITQIAQTFGSQAVV
Kpneum	ASSD...GRVVDKSWVSRVAEVIDIPFCVAGGIKSLDDA.....			AQILSFGADKISINSPALADPTL.....				ITRLADRFGVQCIV
Ecoli	ASSD...GRVVDKSWVSRVAEVIDIPFCVAGGIKSLEDA.....			AKILSFGADKISINSPALADPTL.....				ITRLADRFGVQCIV
Styphi	ASSD...GRVVDKSWVARVAEVIDIPFCVAGGIRSIDDA.....			AKILSFGADKISINSPALADPTL.....				ITRLADRFGVQCIV
Hinflu	ASSD...GRTVDKSWVERIAQVIDIPFCVAGGIKTIEDA.....			EKLFAFGADKISINSPALADPTL.....				ISRLADRFGVQAIV
Baphid	ACTN...NKLVDRSWIKKVAEIIINIPFCVAGGIKSVEDA.....			QNILSFGADKISINSSALIDPDL.....				ITKIANRFGVQCTV
Cjejuna	ASAR...KERISREWVSEVAKNINISFCVAGGIKSEEDA.....			AELLANGADKISINSPALNDPSL.....				ITRLAKSFGVQCIV
Rspheae	ATHE...NRGTMFDLVTRTAEQCFMPLTVGGGVTRTHQDV.....			RALLLAGADKVSFNAAVADPGV.....				VP.SRRPLRSQCIV
Rcapsu	ATHE...NRGTMFDLVTRTAEQCFMPLTVGGGVTRTHQDV.....			RALLLAGADKVSFNAAVANPDV.....				VR.SRRSLRSQCIV
Abrasi	ASHE...NRDTIIDVVRTAEQVFMPLTVGGGVTRTVDDI.....			RKLLLAGADKVSINTAAIHRPEF.....				VQEAEEKFGAQCV
Mtuber	ASSS...GRATMLEVVRTAEQVFIPLTVGGGVTRTVADV.....			DSLLRAGADKAVNTAAIACPDL.....				LADMARQFGSQCV
Cgluta	ASKH...GRGTMLDVVRTADQVFIPLTVGGGVTRSEEDV.....			DQLLRAGADKVSNTSAIARPEL.....				LSELWKRFGAQCV
Ssolfa	ATIE...ARKALYNVIKDTASVLSIPLTVGGGIRTPDDV.....			SMALRSAGADKVSINTAAVSSQI.....				VKKSAAEFFGSQAVV
Tethan	ASAE...LRNIMIDVRRVAEQVFIPTVGGGIRTVEDF.....			REILKAGADKVSINSAAVKRPEL.....				ISEAASRFGSQCVV
Aaeoli	ASAE...DREIMIDVKKVAETVFMPTVGGGIRSLIDM.....			RRLLEAGADKISINTAAVKNPNL.....				IYEGAKRFGSQCV
Afulgi	ASPE...GRRTMIDVIERTAEQVFIPTVGGGIKSIEDI.....			NTILSAGADKVSINTAAVKNPEF.....				VREAADIFGSQCIV
Mjanna	ASAE...KRDIIIDVVERTAEKVFIPFTVGGGIKSIEDF.....			RRILRAGADKVSINTAAVKNPNL.....				IKEASEIFGSQCIV
Bsubti	ASHE...GRKTMVDVVEQVAAKLAIPFTVGGGINQLSDM.....			KTILRAGADKVSNTAAVLRPEL.....				ITEGAEFFGSQCIV
Synech	ATHE...QRDTIIDVVRTAEVFIPLTVGGGISTLEHI.....			KNLLRAGADKVSNTAAVLRPDF.....				ISRASDRFGRQCIV
Llacti	ASFE...EREIIGELIGRAARELSIPLTVGGGIRSIDDF.....			RRILRAGADKVSNTAAIENPEL.....				IRQAANRFGVQCIV
Mtherm	ASHE...RRETMTHTVIEATTENVFVPICVGGGIRKPEDY.....			FKMLKAGADKVSNTAAIKNPEL.....				INEASDLVGSQCV
Dradio	ATHE...GRSLMLDVAARVAEQVMMPLTVGGGVGALSDF.....			RQLLLAGADKISVNSGAVKRPEL.....				IREASDHVGAQCIV
Lpneum	ASLY...GRNNLSEIVKTTAENVFIPITVGGGIRSVDDA.....			EQLLRGADKVAINTAATKNPTL.....				ISDIARRFGSQCVV
Paerug	ASRL...NQEPNYELIAEVAGECFMPCYGGGIKTLEHA.....			EKIFSLGVEKVSINTAALMDLSL.....				IRRIADKFGSQSVV
Scerev	SFRDCPLKDTPMLEVLKQAARTVFVPLTVGGGIKDIVDVGTKIPALEVASLYFRSGADKVSIGTDAVYAAEKYYELGNRGDGTSP IETISKAYGAQAVV							

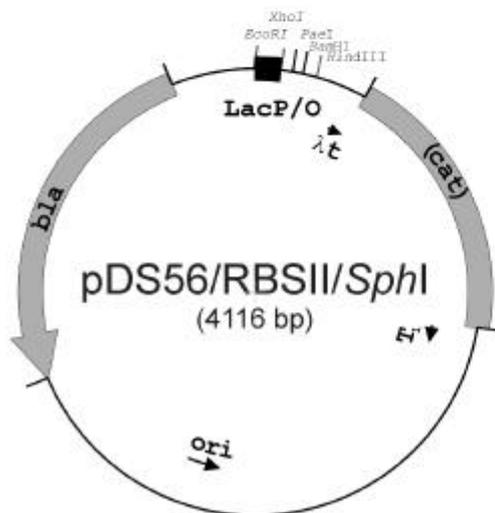
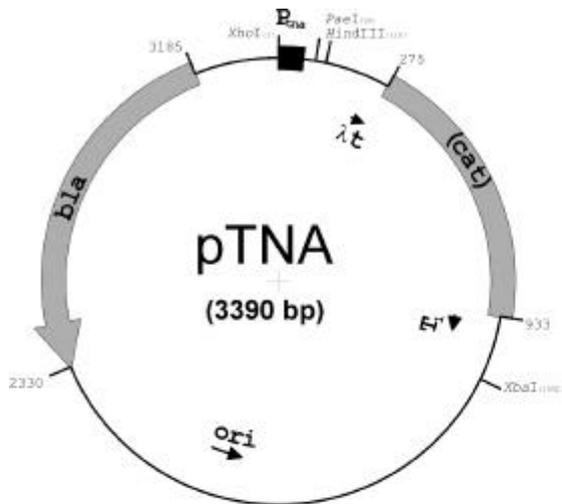
	$\beta 5$	$\beta 5'$	$\beta 5''$	$\alpha 5$	$\beta 6$	$\alpha 6'$	$\alpha 6$	$\beta 7$
2° strk	SSSSSSSS	SSSSSSS	SSSSS	HHHHHHHHH	SSSSSSHHS		HHHHHHHHHH	SSSSS
kons	d			w	GaGei l	dG	G d	P ias
Tmarit	VAIDAKRVDG.....	EFMVFTYSGKNTGILLRDWVVEVEKRGAGEILLTSIDRDGTSKGYDTEMIRFVRPLTT.LPIIAS						
Kpneum	VGIDT.....	WFDAASGKYHVNQYTGDESR.....	TRVTQWETLDWVQEVQKRGAGEIVLNMMNQDGVNRNGYDLEQLSKVRA.VCRVPLIAS					
Ecoli	VGIDT.....	WYDAETGKYHVNQYTGDESR.....	TRVTQWETLDWVQEVQKRGAGEIVLNMMNQDGVNRNGYDLEQLKKVRE.VCHVPLIAS					
Styphi	VGIDT.....	WFDDATGKYHVNQYTGDENR.....	TRVTQWETLDWVQEVQQRGAGEIVLNMMNQDGVNRNGYDLTQLKKVDR.VCRVPLIAS					
Hinflu	VGIDS.....	WFEQETGKYWVNQYTGDETR.....	TRQTHWQLLDWVKEVQCCGAGEIVLNMMNQDGLRNGYDLAQLKLVRG.VCRVPLIAS					
Baphid	VGIDS.....	WFSDSKKYMVQYTG DANR.....	TYQTDWETIDWVEKVQKKGAGEIVLNMMNQDGLQNGYDLSQLNEIRK.KCKVPLIAS					
Cjejun	VGIDS.....	FKDENGNLKVFQYTGDEKT.....	SKHSGKSTLEWVKKVQDLGAGEIVLNMMNQDGVKNGYDLEQLAVYK.ICKVPLIAS					
Rspheae	VAIDTKTVAPGR.....	WEIFTHGGRATGIDAVAFACEMASRGAGEILLTSMRDGTRAGFNLPLTRAI SDAVP.IPVIAS						
Rcapsu	VAIDAKTVEPGR.....	WEIFTHGGRKSTGIDAVEFARHVEAKGAGEILLTSMRDGTRAGFNLPLTRAIADAVK.IPVIAS						
Abrasi	VAIDAKQVEPGR.....	WEIFTHGGRKATGIDAEWAKRMESYGAGEILLTSMRDGTRKSGFDLALTRKVADGLR.IPVIAS						
Mtuber	LSVDARTVPVGSAPT PSG.....	WEVTTHGGRGTGMDAVQWAARGADLGVGEILLNSMDADGTRAGFDLALLRAVRAAVT.VPVIAS						
Cgluta	LSVDARRVPEGTPQPSG.....	FEVTTHGGSKSAELDAIEWAKRGEELGVGEILLNSMDGDGTRKNGFDLELLEKVVRAAVS.IPVI.S						
Ssolfa	VAIDVKKVSGN.....	WIVFTKSGTYNTRLDIAIKWAKKVEELGAGEILLTSIDRDGTRGLGYDLELTRKIVDSVN.IPVIAS						
Tethan	VAIDAKRRDDNSG.....	WDVYINGGRINTGKDAVEWAVEVEKLGAGEILLTSMDCDGTCKGYDIELTRKVSESVRMIPVIAS						
Aaeoli	VAIDAKRRKNS.....	WEVYIHGGRTPGLDAVEWAKKVELGAGEILLTSMRDGTRKDGTDIELNRAISEAVN.IPVIAS						
Afulgi	VAIDCRRNFDSLKGEYIVELEDGTKA.....	WYEVVIYGGRPV GIDAVWAKRVEELGAGEILLTSMNRDGTGDFDIPITRKISEEVN.IPVIAS						
Mjanna	VAIDAKRHVNEDEIDKINKNVKVEDGYC....	WFEVVIYGGRKETGIDAINWAKKVEELGAGEILLTSIDKDGTSKGYDLILTKEISKSVK.LPVIAS						
Bsubti	LAIDAKYDKESD.....	TYKVYTHGGRKTDWEVTAWAKEGVKRGAGEILLTSMDSGEEKGF DHTLTKLVSEAV.PPVIAS						
Synech	VAIDARRRLDADNP.....	GWDVYVRGGRENTGLDAIAWAEVAKRGAGELLVTSMDGDGTQAGYDLALTAIAAERVE.IPVIAS						
Llacti	VAIDAKKRADHRG.....	YDVYIKGGRENAGLDLVDWAKK CERL GAGEILLTSMKDGTGTYDLEMLNDVCTAVN.IPVVAS						
Mtherm	VAIDAKRRIYI.ENPRESDERFIEVDDGYC....	WYECVIYGGREFTGIDAVKWAMECQDRGAGEILLTSMRDGTRKMGYDIPLTRTMSENLD.IPVIAS						
Dradio	LSIDAKRRPGGQG.....	WTVHIGGGRVDTGLDLLAWARRQELGAGELCNLVMDADGTRAGFDLEATRAVAREVD.LPVIAS						
Lpneum	LSIEAKRTVNGR.....	WEVMTDNGREHTGMDVVDWARNGEKF GAGEILLTSIDQEGTRKGF DLELVKQVSSMVS.IPVIAS						
Paerug	GSIDCRK.....	GFWG....GHSVFSENGRTRMDKRSPLEWAQALEEAGVGEIFLNSIDRDGVQKGF DNALVENIASNV.HVPVIAC						
Scerev	ISVDPKRVIYVNSQADTKNKVFE TEY PGPNGEKYCWYQCTIKGGRESRDLGVWELTRACEALGAGEILLNCIDKDG SNSGYDLELIEHVKDAV.KIPVIAS							

	$\alpha 7$	$\beta 8$	$\alpha 8'$	$\alpha 8$
2° strk	HHHHHHHHHH	SSSS	HHHH	HHHHHHHHHHH
kons	gG G	laA	fh	k g r
Tmarit	GGAGKMEHFLEAF.LAGADAALAASVFHFREIDVRELKEYLKKHGVNVRLEGL.....			
Kpneum	GGAGTMEHFLEAFRDASVDGALAASVFHKQIINIGELKTYLAAQGV EIRVC.....			
Ecoli	GGAGTMEHFLEAFRDADVDGALAASVFHKQIINIGELKAYLATQGV EIRIC.....			
Styphi	GGAGTMEHFLEAFRDADVDGALAASVFHKQIINIGELKAYLAGQGV EIRIC.....			
Hinflu	GGAGKMVHFRDAFIEAKVDGALAASVFHKQIEIGELKSYLVQSAIEIRSE.....			
Baphid	GGAGCADHFYQAFDHANVDGVLAAASVFHKIVNIKDLKYFLIQKGL EIRIC.....			
Cjejun	GGAGKMEHFLEAFK.LGIDGALAASVFHQKLIDIKELKIYLNQGLSIRI.....			
Rsphae	GGVGTLDHLVEGVTEGGASAVLAASIFHFGEFTIGEAKAHMAAAGIPVRLA.....			
Rcapsu	GGVGTLDHLVEGVTEGHASAVLAASIFHFGTYTIGEAKAHMAPAGIPMRLA.....			
Abrasi	GGVGTLDHLVEGIREGHATAVLAASIFHFGTYTIGQAKAALAEAGIPVRPARMAEAAHG			
Mtuber	GGAGAVEHFAPAVAAG.ADAVLAASVFHFRELTIGQVKAALAEGITVR.....			
Cgluta	GGAGKAEHFPPAVARG.ANAVLAATIFHFREVTIAEVKGAIKDAGFEVRK.....			
Ssolfa	GGAGKMEHFYEVFSLAKADAALAAGIFHDGIIKIKDLKSYLSQKGEVIRM.....			
Tetahn	GGAGTMEHFREALVEGKADAVLAASLFHYREIEIMELKKYLKENGIEIRM.....			
Aaeoli	GGAGKKEHFYEVFSKTKVEAALAASVFHFREISIPELKEYLLERGINVRPLD.....			
Afulgi	GGAGTKEHFYEGFVEGKADACLAASIFHYREIGIREIKEYLAERGVQVRL.....			
Mjanna	GGCGKPEHVYEAFFVYKADAALMAGILHYREYTIIEIKKYCADRGIPMRLTAVCG....			
Bsubti	GGAGNAQHMLEAFTKGEADAALAASIFHYKETSIKEVKSYLKEYGVNVR.....			
Synech	GGAGNCQHVYEAFTEGKAEALLASLLHYGQLTIGELKTFLEARQIPVRH.....			
Llacti	GGCGKISDIVEVFQNTRSDAALFASLFHYGEEQLMKLKTNL.....			
Mtherm	GGVGEPEHIYEAFDTGKADAALAASIFHFNEYVPAVKEYLRSRGPVIRL.....			
Dradio	GGAGKVQDFYDVLTAGEDAALAASVFHFGELTVPQVKTSLAAQGVVPRPEWRGATE..			
Lpneum	GGMGKLEEFN.....			
Paerug	GGAGSIADLIDLFERTCVS AVAAGSLVFVHGKHRAVLISYPDVNKLVDG.....			
Scerev	SGAGVPEHFEEAFLKTRADACLGAGMFHRGEFTVNDVKEYLLEHGLKVRMDEE.....			

C. Plasmidkarten

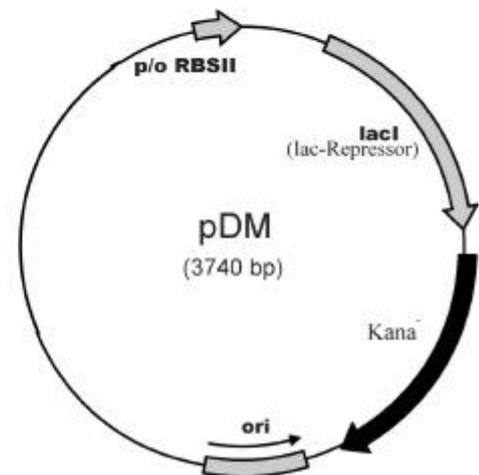
A. pTNA-Vektor

Der pTNA-Vektor hat sein Haupteinsatzgebiet bei *in vivo* Komplementationsexperimenten.



B. pDS56/RBSII/SphI

pDS und pDM-Vektor werden gemeinsam zur Expression von Proteinen eingesetzt (2.2.3.)



C. pDM-Vektor

D. Sequenzierung der unselektierten Klone des *tHisF*-Repertoire

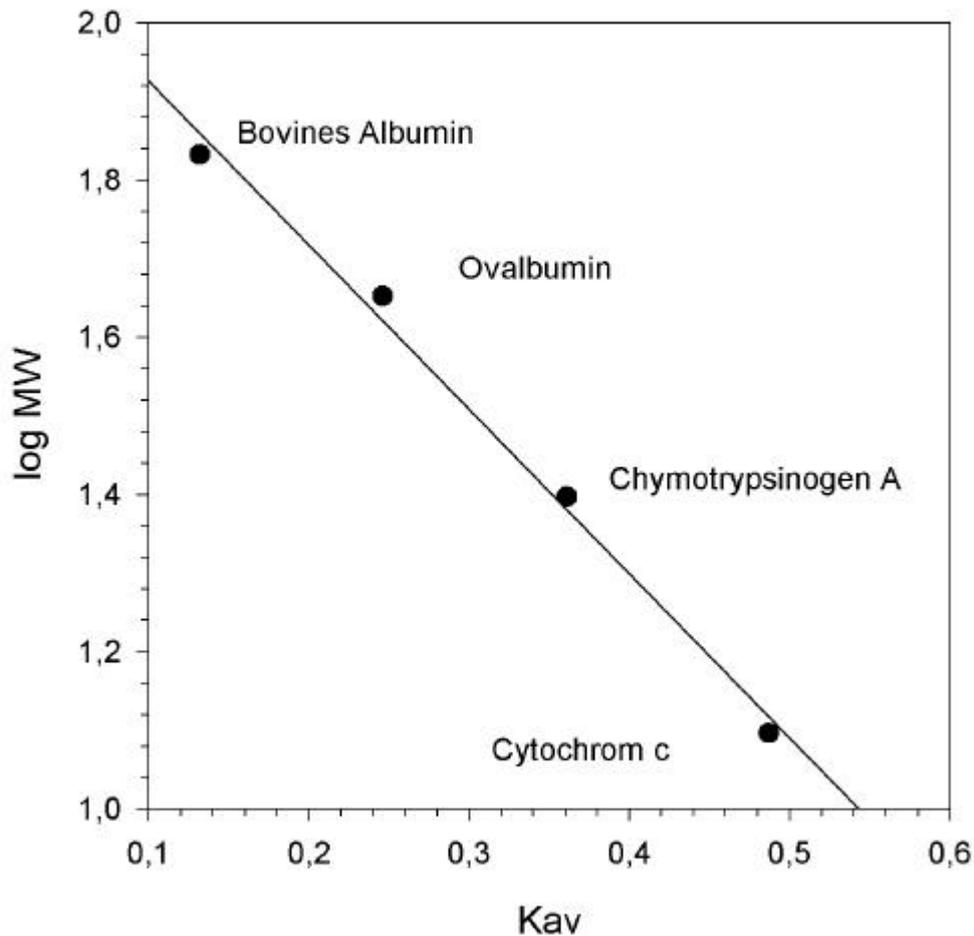
Sekundärstruktur					b1													b1'				
AS-Sequenz	M	L	A	K	R	I	I	A	C	L	D	V	K	D	G	R	V	V	K	G		
Nukleotidsequenz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
	ATG	CTC	GCT	AAA	AGA	ATA	ATC	GCG	TGT	CTC	GAT	GTG	AAA	GAC	GGT	CGT	GTG	GTG	AAG	GGA		
1																		GTA V				
2																						
3																		GTA V				
4																	ATG M					
5																CGC R						
6																						
7								GCA A				GG !					CTT L					
8											AAT N											

Die Tabelle zeigt die Aminosäure- und Nukleotidsequenz, sowie Sekundärstrukturelemente des Enzyms *tHisF*. In hellgrau sind die stillen Mutationen dargestellt, dunkelgrau die Aminosäure-Austausche, die durch DNA-Shuffling (4.3.1.2.) eingebracht wurden. Dabei werden jeweils Nukleotidsequenz und gegebenenfalls die veränderte Aminosäuresequenz angegeben. Frame Shift-Ereignisse werden durch ein ! gekennzeichnet, * kennzeichnen ein Stop-Codon. Die Nummern 1 – 8 kennzeichnen die unselektierten sequenzierten Klone des *tHisF*-Repertoires.

Sekundärstruktur						b1''			a1											
AS-Sequenz	T	N	F	E	N	L	R	D	S	G	D	P	V	E	L	G	K	F	Y	S
Nukleotidsequenz	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1	ACG	AAC	TTC	GAA	AAC	CTC	AGG	GAC	AGC	GGT	GAT	CCT	GTC	GAA	CTG	GGA	AAG	TTC	TAT	TCC
2																				TCC
3																				F
4														CAA						
5														Q						
6																				
7								GGC										AAA		
8								G										K		

Sekundärstruktur							a 7														
AS-Sequenz	S	G	G	A	G	K	M	E	H	F	L	E	A	F	L	A	G	A	D	A	
Nukleotidsequenz	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	
1	TCC	GGT	GGT	GCG	GGA	AAA	ATG	GAA	CAT	TTC	CTT	GAA	GCC	TTC	CTG	GCA	GGT	GCC	GAC	GCT	
2																					
3																					
4			GGG G																		
5																					
6																					
7								GGA G												GCA A	
8															CCG P						

E. Kalibrierungskurve der Superdex-75-Gelfiltrationssäule



Protein/Marker	M_R	$\log (M_r \times 10^{-3})$	K_{av}	V_e
10%iges Aceton	= Totvolumen			8,4 ml
Blue Dextran	= Totalvolumen			19,77 ml
Cytochrom C	12.500	1,0970	0,4870	13,94 ml
Chymotrypsinogen A	25.000	1,3980	0,3610	12,50 ml
Ovalbumin	45.000	1,653	0,2460	11,20 ml
BSA	68.000	1,833	0,1320	9,90 ml

$$K_{av} = V_e - V_0 / V_t - V_0$$

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Evolution und der Katalysemechanismus des thermostabilen $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyms ProFAR Isomerase (tHisA) aus der Histidinbiosynthese von *Thermotoga maritima* untersucht.

Es wurde postuliert, dass die Entwicklung des Lebens bei hohen Temperaturen begonnen hat und dass die Evolution von hyperthermophilen zu mesophilen Mikroorganismen verlaufen ist. Um diese Entwicklung im Labor auf molekularer Ebene nachzuvollziehen, sollte im ersten Teil der Arbeit die katalytische Aktivität von tHisA bei mesophilen Temperaturen durch gerichtete Evolution erhöht werden. Dazu wurde eine Selektionssystem etabliert und getestet, das jedoch zur Identifizierung katalytisch verbesserter tHisA-Varianten nicht empfindlich genug war.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden sechs konservierte Aminosäuren am aktiven Zentrum von tHisA durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht und über die Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität *in vitro* und *in vivo* die Bedeutung dieser Reste für die Katalyse ermittelt. Zwei der ausgetauschten Aspartatreste und ein Threoninrest sind danach für die Katalyse der HisA-Reaktion wichtig. Sie wirken in dem postulierten Katalysemechanismus als allgemeine Säure/Base bzw. sind an der Ausrichtung des Substrates ProFAR am aktiven Zentrum beteiligt.

Im dritten Teil der Arbeit wurden eine Reihe von experimentellen Evidenzen für die evolutionäre Verwandtschaft von tHisA mit tHisF erbracht, das den nachfolgenden Schritt in der Histidinbiosynthese katalysiert. So wurde gezeigt, (i) dass tHisF die HisA-Reaktion *in vitro* –wenn auch mit schwacher Effizienz- katalysieren kann, (ii) die für die Katalyse entscheidenden Aminosäuren in HisA- und HisF chemisch identisch sind und an identischen Stellen in der in der Struktur liegen, (iii) chimäre Proteine aus tHisA und tHisF in löslicher Form hergestellt werden können. Weitergehende Analysen zeigten, dass HisA und HisF vermutlich Teil eines größeren evolutionären Netzwerkes phosphat-bindender $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme sind.

Summary

In this work, the molecular evolution and the catalytic mechanism of the thermostable ($\beta\alpha$)₈-barrel enzyme ProFAR isomerase (tHisA) of the histidine biosynthesis pathway from *Thermotoga maritima* were investigated.

It was postulated that the evolution of life began at high temperatures and proceeded from hyperthermophilic to mesophilic organisms. In order to simulate this postulated evolutionary events on a molecular level, it was attempted to increase the catalytic activity of tHisA at mesophilic temperatures by directed evolution. To this end, a selection system was established and tested, which turned out, however, not be sensitive enough to detect tHisA variants with improved catalytic activity.

In the second part of the work, six conserved amino acid residues at the active site of tHisA were exchanged by site directed mutagenesis. From the enzymatic activities of the resulting tHisA variants, conclusions were drawn on the importance of the exchanged residues for catalysis. It was concluded that two exchanged aspartate residues and one threonine residues are essential or important. In the postulated catalytic mechanism, these residues act as general acid/base or are involved in positioning of the substrate ProFAR at the active site.

In the third part of the work, a number of experimental evidences for the evolutionary relatedness of tHisA and tHisF, which catalyses the subsequent step in histidine biosynthesis, are presented. It was shown (i) that tHisF is able to catalyse the HisA reaction, albeit with low efficiency, (ii) that the catalytically essential amino acids are chemically identical in tHisA and tHisF and are located at identical positions in the structure, (iii) that chimaeric proteins of tHisA and tHisF can be produced in soluble form. A further analysis provided evidence that HisA and HisF are part of a larger evolutionary network of phosphate-binding ($\beta\alpha$)₈-barrel enzymes.

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, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall 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 - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Sterner betreut worden. Die Promotionsarbeit wurde durch ein Stipendium der Hans-Böckler-Stiftung gefördert.

Teilpublikationen

Lang, D., Thoma, R., Henn-Sax, M., Sterner, R., and Wilmanns, M. (2000). Structural evidence for evolution of the beta/alpha barrel scaffold by gene duplication and fusion. *Science* 289, 1546 – 50

Henn-Sax, M., Höcker, B., Wilmanns, M. and Sterner, R. (in press). Divergent evolution of $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzymes. *Biological Chemistry, Hoppe-Seyler*

Lebenslauf

Martina Henn-Sax, geboren am 01.06.1970 in Gundelsheim/Neckar

Staatsangehörigkeit

deutsch

Familienstand

verheiratet

Schulausbildung

1976 – 1980

Grundschule Gundelsheim

1980 – 1986

Realschule Gundelsheim

1986 – 1989

Wirtschaftsgymnasium Ludwig-Erhardt-Schule
Mosbach/Baden

April 1989

Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

September 1989 – Februar 1993

Ausbildung zur Chemielaborantin in der Firma
Peter Kwasny GmbH & Co. KG, Gundelsheim

Berufserfahrung

Februar 1993 – September 1993

Chemielaborantin im Kernkraftwerk Obrigheim

Hochschulausbildung

November 1993 – Mai 1998

Studium der Biochemie an der Universität
Regensburg

Oktober 1997

Diplomprüfungen in Molekularbiologie,
Organischer Chemie und Biochemie

Dezember 1997 bis Mai 1998

Diplomarbeit bei Prof. Dr. Rainer Jaenicke am
Institut für Biophysikalische Chemie der
Universität Regensburg

Thema der Arbeit: Strukturelle und funktionelle
Charakterisierung des rekombinanten
Thermosoms aus dem hyperthermophilen
Archaeon *Methanopyrus kandleri*

Mai 1998

Diplom in Biochemie

September 1998 – September 2001

experimentelle Arbeiten zur vorliegenden
Dissertation bei Prof. Dr. Reinhard Sterner am
Institut für Mikrobiologie und Genetik,
Abteilung molekulare Genetik und präparative
Molekularbiologie der Universität Göttingen,
gefördert durch ein Promotionsstipendium der
Hans-Böckler-Stiftung

Die vorliegende Arbeit wurde vom September 1998 bis September 2001 am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung molekulare Genetik und präparative Molekularbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Reinhard Sterner (Institut für Biochemie, Universität zu Köln) angefertigt. Die Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der Hans-Böckler-Stiftung gefördert.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner für die Überlassung des interessanten Themas und für sein Interesse am Fortgang der Arbeit – auch bei einer Distanz von 400 km. Vor allem danke ich für die vielen engagierte wissenschaftlichen Diskussionen und das in mich gesetzte Vertrauen, das selbständiges Arbeiten zugelassen und die Beendigung dieser Arbeit in Göttingen möglich gemacht hat.

Herrn Prof. Dr. H. W. Klein danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. Hans Fritz bedanke ich mich dafür, dass ich fast zwei Jahre als „Gastforscherin“ in seiner Abteilung wirken und von der Vielfalt der Göttinger Abteilung für meine Arbeit profitieren durfte.

Bei Marita Kalck bedanke ich mich für ihre Unterstützung in verwaltungstechnischen Fragen, manch gute Auskunft und die Versorgung mit Büromaterial. Olaf Waase gilt Dank für seine Bereitschaft immer dann zur Seite zu stehen, wenn irgendein Gerät nicht so wollte wie ich. Rainer Merkl half mir so manches Mal beim Wiedereinrichten eines verschwundenen Profils und dem Auffinden bereits „gelöschter“ Dateien. Marlies Bartels und Angelika Löffers danke ich für ihre, wie durch Zauberhand hergestellten Vorräte an Medien und manch nette Unterhaltung in der Spülküche.

Bei „Kolmars“ und „Kramers“ bedanke ich mich für ihre freundliche Aufnahme in ihr Laborseminar nach dem Weggang der Sternerschen Arbeitsgruppe. Harald Kolmar gilt ein besonderer Dank für so manchen guten Tipp, nicht nur in wissenschaftlichen Fragestellungen. Den „Kolmarschen Jungs“ danke ich für viel Chaos und immer guten Laune im Labor. Bei Suse Behrens danke ich für ein immer offenes Ohr und ihrer Fähigkeit englische Texte zu optimieren. Anke Schürer gilt besonderer Dank für viele interessante Stunden und Diskussionen und so mancher helfende Hand, die für mich wirkte, wenn ich mal wieder in Köln war.

Für ihre ständige Diskussionsbereitschaft bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung für molekulare Genetik und präparative Molekularbiologie und ganz besonders

gerne werde ich mich an die witzigen Unterhaltungen in unserer Mittagsrunde erinnern.

Dank gilt der Kölner Arbeitsgruppe, vor allem den „Umgezogenen“ Birte, Cathi und Stefan. Danke auch für die schönen gemeinsamen Tagungen und Ausflüge während der drei Jahre. Birte Höcker, die immer wegen unserer nächtlicher wissenschaftlichen Diskussionen unter Schlafmangel leiden musste, wenn ich nach Köln kam, danke ich für ihre Gastfreundschaft und viele interessante Gespräche. Stefan Hettwer danke ich für eine schöne gemeinsame Göttinger Zeit und Hilfe in „Shuffling-Fragen“. Catharina Jürgens wird bei mir immer gute Laune induzieren, wenn ich irgendwo einen roten Haarschopf sehen sollte. Simona danke ich für das Packen der „Care-Pakete“ mit Laborbedarf und den guten Kuchen beim Arbeitsbericht. Bei Silke Allekotte hoffe ich mich bald für ihre wunderbaren Fits revangieren zu dürfen, die sie mir in letzter Minute angefertigt hat. Silke Beismann-Driemeyer danke ich für viele Enzymspenden aus ihren unerschöpflichen tHisF- und tHisH-Lagern. Michaela Häger, Sonja Leopoldseeder, Andreas Ivens und Satoshi waren mir liebe KollegInnen, obwohl ich kaum Gelegenheit hatte die „Neu-Kölner“ kennenzulernen. Steffen Schmidt danke ich für die Einführung in GCG in meinen Anfangszeiten und für eine sehr schöne Diplomarbeit, die vom vielen Nachlesen schon ganz zerfleddert ist. Allen Kölnern danke ich für schöne, interessante Laborseminare und Arbeitsberichte und eine herzliche Aufnahme, wann immer ich zu Gast war.

Ein lieber Dank gilt Uli, der meine etwas gewöhnungsbedürftigen Arbeitsrhythmen schon von der Diplomarbeit her kannte und der die wissenschaftlichen Hochs und Tiefs, die man mit nach Hause bringt, in den letzten drei Jahre sehr gut mit mir durchgehalten hat.