

**Experimentelle Rekonstruktion der Evolution von Proteinen
am Beispiel zweier $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme aus der
Histidinbiosynthese**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Birte Höcker

aus Bielefeld

Köln, 2002

Berichtersteller:

Prof. Dr. R. Sterner

Prof. Dr. H.W. Klein

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 12.02.2003

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	4
1.1 Die Bedeutung von Genduplikationen und Genfusionen für die Evolution von Proteinen	4
1.2 Protein Engineering <i>versus</i> Evolution	6
1.3 Das $(\beta\alpha)_8$ -Barrel	7
1.4 Die $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme der Histidinbiosynthese: HisA und HisF	10
1.4.1 Evolution von HisA und HisF durch Genduplikation und Genfusion aus einem Vorläufer halber Länge	12
1.5 Zielsetzung	14
2 Material	15
2.1 Bakterienstämme	15
2.2 Vektoren	15
2.2.1 pET-Vektoren (Studier <i>et al.</i> , 1990)	15
2.2.2 sk+/III P-P (Thoma <i>et al.</i> , 1998)	16
2.2.3 pCFN1 (Maxwell <i>et al.</i> , 1999)	17
2.2.4 pTNA	17
2.2.5 pZA22MCS1 (Lutz & Bujard, 1997)	17
2.3 Oligodesoxyribonukleotide	17
2.3.1 Primer zur Amplifizierung von <i>hisF</i> -N	18
2.3.2 Primer zur Amplifizierung von <i>hisF</i> -C	18
2.3.3 Primer zur Amplifizierung von <i>hisF</i>	19
2.3.4 Primer zur Amplifizierung von <i>hisA</i> -N und <i>hisA</i> -C	20
2.3.5 Sequenzierungsprimer für pET-Vektoren	20
2.3.6 Sequenzierungsprimer für pTNA (pDS56/RBSII/ <i>Sph</i> I)	20
2.3.7 Sequenzierungsprimer für pZA22MCS1	21
2.3.8 Sequenzierungs- und Mutationsprimer für pCFN1	21
2.4 DNA-Längenstandards	21
2.4 Proteinlängenstandard	21
2.5 Enzyme	21
2.6 Chemikalien	22

2.7	Geräte, Kits und sonstige Materialien	22
2.8	Nährmedien	24
2.9	Puffer und Lösungen	25
2.10	Software.....	26
3	Methoden.....	28
3.1	Vorbereitung von Geräten und Lösungen	28
3.2	Mikrobiologische Methoden.....	28
3.2.1	Anzucht und Lagerung von <i>E.coli</i> - Stämmen	28
3.2.2	Transformation von <i>E.coli</i>	28
3.2.3	<i>In vivo</i> Komplementationstest	29
3.2.4	<i>In vivo</i> Test auf erhöhte Löslichkeit eines Proteins nach Maxwell <i>et al.</i> (1999)	30
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	31
3.3.1	Fällung von DNA aus wäßrigen Lösungen	31
3.3.2	Extraktion von DNA aus wäßrigen Lösungen mit organischen Lösungsmitteln	31
3.3.3	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	32
3.3.4	Enzymatische Manipulation von doppelsträngiger DNA.....	32
3.3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis & Fallona, 1987; Saiki <i>et al.</i> , 1988).....	33
3.3.6	Kolonie-PCR	34
3.3.7	Einführen von Mutationen in Gene	34
3.3.8	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	36
3.3.9	Agarosegelelektrophorese	37
3.3.10	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	37
3.3.11	DNA-Sequenzierung	38
3.4	Proteinchemische Methoden.....	38
3.4.1	Expression und Anreicherung	38
3.4.2	Protein-Präparation aus der unlöslichen Zellfraktion.....	39
3.4.3	Protein-Reinigung.....	40
3.4.4	Einkonzentrieren von Proteinlösungen.....	41
3.4.5	Protein-Lagerung	41
3.5	Analytische Methoden.....	42
3.5.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42

3.5.2	Tris-Tricin Gele (Schägger & Jagow, 1987)	42
3.5.3	Trypsinspaltung	43
3.5.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	43
3.5.5	Analytische Gelfiltration	45
3.5.6	Dynamische Lichtstreuung.....	46
3.5.7	Fluoreszenz-Messungen	47
3.5.8	Circular Dichroismus-Messungen	47
3.5.9	Stabilitätsuntersuchungen mittels chemischer Denaturierung.....	48
3.5.10	Differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC).....	51
3.5.11	<i>Steady state</i> -Enzymkinetik von HisA und HisF	52
3.5.12	Ligandenbindung	52
3.6	Bioinformatische Methoden	54
3.6.1	PSI-BLAST (<i>Position Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool</i>)	54
3.6.2	HMMer (<i>profile hidden Markov models</i>).....	54
3.6.3	DALI (<i>Distance matrix Alignment</i>).....	55
3.6.4	STAMP (<i>Structural Alignment of Multiple Proteins</i>)	55
4	Ergebnisse und Diskussion.....	57
4.1	Evolutionäre Verwandtschaft der Halb-Barrel mit anderen Proteinen (Höcker <i>et al.</i> , 2002).....	57
4.1.1	Datenbankanalyse hinsichtlich Halb-Barrel ähnlicher Strukturen	57
4.1.2	Die $(\beta\alpha)_4$ Halb-Barrel Struktur im Vergleich mit der Flavodoxin-ähnlichen Faltung	59
4.1.3	Ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung zweier elementarer Enzym-Faltungen	61
4.2	Duplikation der $(\beta\alpha)_4$ -Hälften von HisF und Optimierung hinsichtlich einer kompakteren Barrel-Struktur.....	62
4.2.1	Klonierung der Konstrukte HisF-NN, HisF-NwNw und HisF-CC	62
4.2.2	Expression und Reinigung.....	63
4.2.3	Biophysikalische Charakterisierung.....	64
4.2.4	Erstes Resumée: Effekt der Duplikation und Fusion eines Halb-Barrel ...	69
4.2.5	Optimierung der Kontaktfläche in HisF-CC	70

4.2.6	Zweites Resumée: Optimierung der Kontaktflächen zwischen zwei Halb-Barrel	80
4.2.7	Selektion auf Löslichkeit von Proteinen nach Maxwell <i>et al.</i> (1999)	81
4.2.8	Zufallsmutagenese der N-terminalen HisF-C Hälfte von HisF-CmutC durch DNA- <i>Shuffling</i>	83
4.2.9	Selektionssystem zur Etablierung einer katalytischen Aktivität	84
4.2.10	Zusammenfassung	86
4.3	Herstellung und Charakterisierung von chimären Proteinen aus HisA und HisF	87
4.3.1	Klonierung der Konstrukte HisAF und HisFA.....	88
4.3.2	Expression der Gene und Reinigung der Proteinprodukte	89
4.3.3	Biophysikalische Charakterisierung.....	90
4.3.4	Aktivitätsmessungen <i>in vitro</i>	98
4.3.5	Untersuchung der Komplexbildung mit HisH durch analytische Gelfiltration	98
4.3.6	Ligandenbindung.....	99
4.3.7	Zufallsmutagenese durch DNA- <i>Shuffling</i> und Selektion auf HisAF-Varianten mit katalytischer Aktivität	102
4.3.8	Zusammenfassung	104
4.4	Diskussion	104
4.5	Ausblick.....	109
5	Literatur	111
6	Anhang	119
6.1	Abkürzungsverzeichnis	119
6.2	Aminosäuresequenzen der Konstrukte	121
7	Kurzzusammenfassung.....	126
8	Abstract.....	127
9	Lebenslauf	130

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Das “Rosetta Stone Modell” der Evolution von Protein-Protein Interaktionen.....	5
Abbildung 1.2: Die $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Faltung.....	8
Abbildung 1.3: Die N- und C-terminalen Hälften von HisF haben sehr ähnliche Strukturen	12
Abbildung 1.4: Modell für die Evolution von HisA, HisF und anderen $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen.....	13
Abbildung 3.1: Der CAT-Fusions-Vektor pCFN1	30
Abbildung 3.2: Vergleich der Fluoreszenzspektren von nativem und denaturiertem Protein am Beispiel von HisAF	49
Abbildung 4.1: Strukturelle Ähnlichkeiten der Halb-Barrel mit Proteinen der Flavodoxin-ähnlichen Faltung (aus Höcker <i>et al.</i> , 2002).....	60
Abbildung 4.2: Konstrukt mit in Tandem fusionierten und durch einen Linker verbundenen Hälften, gezeigt am Beispiel von pET24a(+)- <i>hisF</i> -NN.....	63
Abbildung 4.3: Heterologe Herstellung in <i>E.coli</i> und Rückfaltung von HisF-NN, HisF-CC und HisF-NwNw, dokumentiert durch SDS-PAGE (12,5% Acrylamid)....	64
Abbildung 4.4: Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von HisF-CC über analytische Gelfiltration	65
Abbildung 4.5: Die Fern-UV CD-Spektren von HisF-NwNw und HisF-CC sind typisch für α -helikale Proteine und entsprechen denen der isolierten Hälften.	66
Abbildung 4.6: Die Fluoreszenzspektren von HisF-NwNw und HisF-CC entsprechen denen der isolierten Hälften.....	67
Abbildung 4.7: HisF-CC ist stabiler gegen Denaturierung mit Harnstoff als HisF-C ..	68
Abbildung 4.8: Monomerisierung und Stabilisierung durch Genduplikation und Tandemfusion.....	69
Abbildung 4.9: Schematische Darstellung der <i>Layer</i> struktur im zentralen β -Barrel von HisF	70
Abbildung 4.10: Heterologe Herstellung und Rückfaltung von HisF-CC_E167R und HisF-CC_E167K, dokumentiert durch SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).....	72
Abbildung 4.11: Die Fern-UV CD- (a) und die Fluoreszenz-Emissionspektren (b) von HisF-CC_E167R und HisF-CC_E167K entsprechen denen von HisF-CC.....	73

Abbildung 4.12: Herstellung des Fragments <i>hisF-C*</i> durch Megaprimer (MP)- und SOE-PCR.....	74
Abbildung 4.13: Die Fern-UV CD- (a) und Fluoreszenz-Emissionsspektren (b) von HisF-C*C entsprechen denen von HisF-CC.....	75
Abbildung 4.14: Superpositionierung <i>in silico</i> von HisF-CC mit HisF und Konstruktion des vierten <i>Layer</i> (HisF-CmutC).....	76
Abbildung 4.15: Heterologe Herstellung in <i>E.coli</i> , Rückfaltung (a) und spektroskopische Charakterisierung (b-d) von HisF-CmutC	77
Abbildung 4.16: Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von HisF-CmutC über analytische Gelfiltration	78
Abbildung 4.17: Auffaltung von HisF-CC und HisF-CmutC mit Harnstoff.....	79
Abbildung 4.18: Optimierung der Kontaktfläche von verdoppelten und fusionierten Halb-Barrels	81
Abbildung 4.19: Analyse des DNA- <i>Shuffling</i> von <i>hisF-Cmut</i>	84
Abbildung 4.20: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der Chimären HisAF und HisFA aus den jeweiligen Hälften von HisA und HisF.....	87
Abbildung 4.21: Heterologe Herstellung und Rückfaltung von HisAF, dokumentiert durch SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).....	89
Abbildung 4.22: Bestimmung des Molekulargewichts der Chimäre HisAF über analytische Gelfiltration	91
Abbildung 4.23: Das Fern-UV CD-Spektrum von HisAF gleicht sowohl dem von HisA wie dem von HisF.....	92
Abbildung 4.24: Das Nah-UV CD-Spektrum von HisA <i>linkF</i> gleicht denen von HisF und HisF-C	93
Abbildung 4.25: Das einzige Tryptophan ist in HisAF und in HisF gleich gut vom Lösungsmittel abgeschirmt.....	93
Abbildung 4.26: Auffaltung von HisAF mit Harnstoff (a) und daraus abgeleitete thermodynamische Stabilität ΔG als Funktion der Harnstoffkonzentration (b) 94	
Abbildung 4.27: Auffaltung von HisA und HisF mit Guanidiniumchlorid (a) und daraus abgeleitete thermodynamische Stabilitäten ΔG als Funktion der GdmCl-Konzentrationen (b).....	95
Abbildung 4.28: DSC-Messungen mit HisAF (a) und HisF (b).....	96
Abbildung 4.29: HisAF ist stabiler gegenüber Trypsinolyse als HisA und HisF.....	97

Abbildung 4.30: HisAF bildet mit HisH keinen Komplex	98
Abbildung 4.31: Titration von HisAF mit rCdRP	101
Abbildung 4.32: Bindung von rCdRP an HisAF	101
Abbildung 4.33: Analyse des DNA- <i>Shuffling</i> von <i>hisAlinkF</i>	103
Abbildung 4.34: Evolutionsmodell des modularen Aufbaus der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel	108
Abbildung 4.35: Modell für die Evolution der γ -Crystalline	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Zusammensetzung 12,5%iger SDS-PAGE Gele.....	42
Tabelle 3.2: Zusammensetzung von Tris-Tricin Gelen.....	43
Tabelle 4.1: DALI-Suche mit den HisF-N und HisF-C Halb-Barrel-Proteinen identifizieren signifikante Strukturähnlichkeiten zu anderen ($\beta\alpha$) ₈ -Barrel-Proteinen und Enzymen der <i>Flavodoxin-ähnlichen Faltung</i> (aus Höcker <i>et al.</i> , 2002).....	58
Tabelle 4.2: Molekulargewichte (MW) unter Berücksichtigung des HisTag, molare und spezifische Extinktionskoeffizienten der Varianten und Anzahl von Tryptophan- (W) und Tyrosin- (Y) Resten.....	64
Tabelle 4.3: Aminosäureaustausche in HisF-C*C zur Optimierung der Kontaktfläche.....	73
Tabelle 4.4: Wachstum transformierter <i>E.coli</i> JM101-Zellen auf Medium mit verschiedenen Chloramphenicol-Konzentrationen.....	82
Tabelle 4.5: Komplementation von <i>E.coli</i> Δ hisF-Zellen durch verschiedene Proteinvarianten.....	85
Tabelle 4.6: Molekulargewichte (MW) unter Berücksichtigung des His-Tag, molare und spezifische Extinktionskoeffizienten der Chimären und Anzahl von Tryptophan- (W) und Tyrosin-(Y) Resten.....	90

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Evolution von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Proteinen, einer großen und vielseitigen Strukturklasse von Enzymen, theoretisch und experimentell untersucht. Die Grundlage der Arbeit war ein Modell, wonach die $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme N'-[(5'-phosphoribosyl)-formimino]-5-amino-imidazol-4-carboxamid-ribonukleotid Isomerase (HisA) und Imidazolglyzerinphosphat Synthase (HisF) durch eine Reihe von Genduplikationen, Genfusionen und Diversifikationen aus einem gemeinsamen Vorläufer halber Länge, einem $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barrel, entstanden sind. Die sequenz- und strukturverwandten N-terminalen (HisA-N und HisF-N) bzw. C-terminalen Hälften (HisA-C und HisF-C) der heutigen HisA und HisF Enzyme würden demnach direkt von diesem ursprünglichen $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barrel abstammen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden mittels Datenbankanalysen signifikante strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den $(\beta\alpha)_4$ -Strukturen von HisF-N und HisF-C und den $(\beta\alpha)_5$ -Strukturen von Enzymen mit der Flavodoxin-ähnlichen Faltung identifiziert. Diese strukturellen Ähnlichkeiten, sowie Sequenzidentitäten an wichtigen Positionen, unterstützten die Hypothese eines gemeinsamen Ursprungs von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel und Flavodoxin-ähnlichen Enzymen, die sich divergent aus einem unabhängig evolvierenden Halb-Barrel entwickelt haben könnten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die postulierte Evolution von HisF aus einem $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barrel zu einem stabilen und aktiven $(\beta\alpha)_8$ -Barrel experimentell nachvollzogen. Dazu wurde zunächst das *hisF-C* Gen in tandem dupliziert und fusioniert. Anschließend wurde das Proteinprodukt durch heterologe Expression in *Escherichia coli* hergestellt, gereinigt und mittels analytischer Gelfiltration, sowie Circular Dichroismus- und Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert. Im Vergleich zum weitgehend dimeren und labilen HisF-C Ausgangsprotein, war das HisF-CC Fusionsprotein teilweise monomer und stabiler, zeigte jedoch noch immer starke Aggregationstendenz. Im nächsten Schritt wurde die Kontaktfläche der beiden $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barrel von HisF-CC mittels rationalen Proteindesigns optimiert, wobei die Kontaktfläche zwischen HisF-N und HisF-C im nativen HisF Enzym als Vorbild

diente. Dabei wurden Aminosäureaustausche in HisF-CC eingeführt, die zur Wiederherstellung einer nativ-ähnlichen Schichtstruktur im Inneren des β -Barrels führen sollten. Das resultierende Protein HisF-CmutC war monomer und deutlich löslicher, stabiler und kompakter als HisF-CC. HisF-CmutC ist somit ein ideales Grundgerüst, um in zukünftigen Experimenten katalytische HisF-Aktivität mittels einer Kombination aus Zufallsmutagenese und Selektion *in vivo* zu etablieren.

Im dritten Teil der Arbeit wurde die evolutionäre Verwandtschaft von HisA und HisF, sowie der modulare Aufbau von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Proteinen aus $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barrels durch die Herstellung und Charakterisierung chimärer Proteine weiter untersucht. Dazu wurden die Gene *hisA-N* und *hisF-C* zu *hisAF*, sowie die Gene *hisF-N* und *hisA-C* zu *hisFA* fusioniert. Die Proteine HisAF und HisFA wurden durch heterologe Genexpression in *E.coli* hergestellt und gereinigt. Während das HisFA Protein instabil und weitgehend unlöslich war, bildete HisAF laut analytischer Gelfiltration und dynamischer Lichtstreuung ein monomeres Protein, dessen Circular Dichroismus- und Fluoreszenzspektren auf native Sekundär- und Tertiärstrukturen, ähnlich denen der Elternproteine HisA und HisF, hindeuten. Die Auffaltung in chaotropen Agenzien wies HisAF als ein kompakt gefaltetes Protein aus, das nach dem Zweizustandsmodell, d.h. ohne die Ausbildung eines Intermediates, denaturiert. Die aus den Auffaltungskurven ermittelte thermodynamische Stabilität $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ lag mit $32,5^{\text{kJ}}/\text{mol}$ zwischen den Werten von HisA und HisF. Gleiches gilt für den m-Wert von $8,1^{\text{kJ}}/\text{molM}$, welcher die Kooperativität der Auffaltung quantifiziert.

HisAF zeigte keine meßbare katalytische HisA- oder HisF-Aktivität. Titrationsexperimente belegten jedoch, daß es den Liganden reduziertes 1-(o-carboxyphenyl-amino)-1-deoxyribulose-5-phosphat (rCdRP), ein Produktanalogon des mit HisA verwandten Enzyms Phosphoribosylanthranilat Isomerase (TrpF), mit hoher Affinität bindet und somit über ein weitgehend intaktes aktives Zentrum verfügen muß. Die Etablierung katalytischer Aktivität auf dem Grundgerüst von HisAF mittels rationalem Proteindesign oder einer Kombination aus Zufallsmutagenese und Selektion *in vivo* erscheint daher als ein realistisches und lohnenswertes Ziel zukünftiger Experimente. Dieses Ziel wäre vermutlich auf der Basis einer hochaufgelösten Röntgenstruktur von HisAF leichter zu erreichen, weshalb entsprechende Kristallisationsversuche initiiert wurden.

Insgesamt unterstützen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse die Hypothese, daß es sich bei $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barreln um unabhängig evolvierende Strukturmodule handelt, die hierarchisch unterhalb der Ebene von Proteindomänen einzuordnen sind. $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barrel haben sich vermutlich durch kleine Änderungen in ähnliche Faltungstypen, wie z.B. die $(\beta\alpha)_5$ -Barrels der Flavodoxin-ähnlichen Enzyme, umgewandelt oder sind assoziiert. Dabei können sich entweder zwei identische oder zwei unterschiedliche Hälften zu einem kompakten $(\beta\alpha)_8$ -Barrel zusammengelagert haben, entsprechend den hier hergestellten HisF-CmutC und HisAF Varianten. Eine große Herausforderung bleibt es, mögliche Funktionen der evolutiven Zwischenstufen zu ermitteln und experimentell zu manifestieren.

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Genduplikationen und Genfusionen für die Evolution von Proteinen

Die Entstehung des heute bekannten komplexen und vielfältigen Netzwerks von Stoffwechselwegen ist eine häufig diskutierte Frage. Wie entstanden aus den geschätzten 20-100 Enzymen des letzten gemeinsamen Vorfahren aller heute bekannten Mikroorganismen (Lazcano & Miller, 1996, 1999), die mehr als 1 000 spezifischen Enzyme, die wir in einem Bakterium wie *E.coli* beobachten? Enzyme können *de novo* entstehen, doch bietet die Umwandlung eines bereits existierenden Proteingerüsts einen weitaus effizienteren Weg neue Katalysemechanismen oder Spezifitäten zu entwickeln. Dementsprechend spielt neben horizontalem (lateralem) Gentransfer zur Rekrutierung bereits in anderen Mikroorganismen existierender Enzyme (Ochmann *et al.*, 2000; Jain *et al.*, 2002) die Duplikation der entstandenen Kopien eine entscheidende Rolle bei der Enzymevolution (Becerra & Lazcano, 1996). Es wird geschätzt, daß *E.coli* mindestens 10-15% aller Gene durch horizontalen Gentransfer erworben hat (Huynen & Bork, 1998) und, daß etwa 50% aller Gene in Mikroorganismen durch Genduplikation entstanden sind (Fani *et al.*, 1998; Lynch & Conery, 2000). Die Häufigkeit von intra-genomischen Duplikationen wird auch anhand des sequenzierten menschlichen Genoms deutlich, in dem eine große Anzahl von längeren und kürzeren DNA-*repeats* gefunden wurden (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

Wird eine Kopie einer Sequenz angelegt, ob als Tandem-Repeat oder an einer entfernt liegenden Stelle im Genom, gibt es mehrere Möglichkeiten: entweder beide Kopien behalten Wildtyp-Aktivität oder Mutationen in einer der Kopien führen zu ihrer Inaktivierung. In nur seltenen Fällen, bedingt durch die Sensitivität von Proteinstruktur und Funktion, kann sich in einer der Kopien eine neue, für den Organismus vorteilhafte Funktion entwickeln (Lutz & Benkovic, 2002).

In frühen Vorstellungen zur Evolution metabolischer Netzwerke wie der Hypothese der „Retrograden Evolution“ (Horowitz, 1945, 1965) und der „Patchwork Hypothese“ (Ycas, 1974; Jensen, 1976) spielt Genduplikation bereits eine Hauptrolle. Dabei wurde vorgeschlagen, daß ganze Stoffwechselwege oder größere Teile davon durch

Duplikation und anschließende Spezialisierung rekrutiert wurden. Als Beispiele werden die Histidin-, Tryptophan- und die Serinbiosynthese genannt (Jensen, 1976). Nähere Untersuchungen zur Evolution des Histidinbiosyntheseweges zeigten jedoch, daß neben und Genduplikationen (*hisG*, *H*, *A*, *F*, *C*) auch Genfusionen stattgefunden haben könnten (*hisB*, *hisIE*; Fani *et al.*, 1994, 1995, 1998). Die kovalente Verknüpfung, also Fusion von Proteinen (Domänen) führt zu einer Erniedrigung der Translations- und Rotationsentropie des ungefalteten Zustandes und somit zu einer gegenseitigen Stabilisierung (Terwilliger, 1995). Bei dem homodimeren Gen-V-Protein des Bakteriophagen *ϕ1* wurde z.B. festgestellt, daß Genfusion der Untereinheiten zu erhöhter Stabilität und Faltungsrates führt (Liang *et al.*, 1993). Dabei wurden die Untereinheiten über kurze *Linker*-Peptide fusioniert, wobei die *Linker*-Schleife nur minimale Interaktion mit dem Rest des Proteins einging. Die Tendenz zur Assoziation wird dabei dadurch gesteigert, daß der mit der Dissoziation verbundene Entropiegewinn durch die kovalente Verknüpfung der Domänen wegfällt (Erickson, 1989; Nagi & Regan, 1997). Ein ähnlicher Effekt zur Reduzierung der Entropie des ungefalteten Zustandes monomerer Proteine kann bei der Einführung von *cross-links* beobachtet werden (Matsumura *et al.*, 1989). Dies kann experimentell z.B. durch Exposition eines Proteins gegenüber einem bifunktionalen Reagenz wie Glutaraldehyd erreicht werden (Azem *et al.*, 1995).

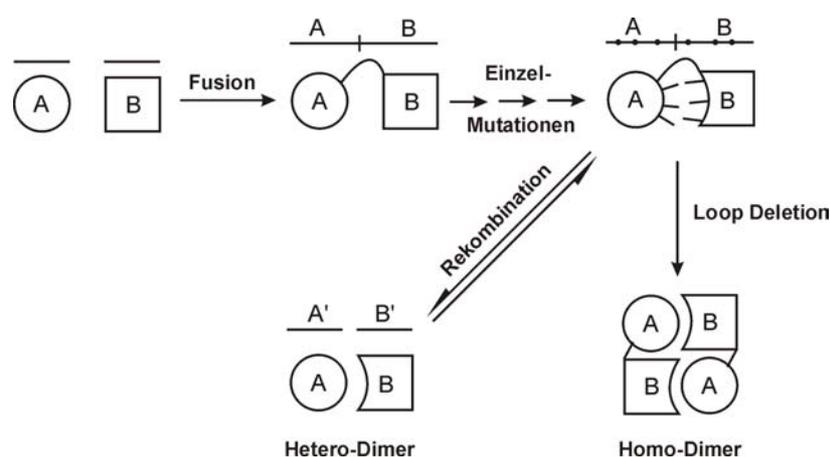


Abbildung 1.1: Das "Rosetta Stone Modell" der Evolution von Protein-Protein Interaktionen

Das Modell beginnt mit der Fusion von Genen, die für die Proteine A und B kodieren. Dies führt zu einem Fusionsprotein AB, in welchem die Domänen zunächst unspezifisch wechselwirken und sich durch wenige Mutationen eine einfache Kontaktfläche ausbildet. Diese wird durch sukzessive Mutationen optimiert. Danach können die interagierenden Domänen wieder getrennt werden, wodurch ein Heterodimer A'/B' entsteht. Eine weitere Möglichkeit ist die Bildung eines *domain-swapped* Homodimers durch eine Deletion in der die Domänen verbindenden Schleife (aus Marcotte *et al.*, 1999).

Der Mechanismus des Assoziationsprozesses zunächst unabhängiger Proteine und die darauffolgende Optimierung der Kontaktfläche wird durch das "Rosetta Stone Modell" in allgemeiner Weise beschrieben (Marcotte *et al.*, 1999; Abbildung 1.1). Nach der Fusion von zwei nicht-interagierenden Genen A und B, wobei $A=B$ oder $A \neq B$, kommt es innerhalb des Fusionsproteins zu einer unspezifischen Wechselwirkung der Domänen, die durch Mutationen an der Kontaktfläche sukzessive optimiert werden kann. Ist die Bindung stark genug, kann das Fusionsprotein wieder in zwei weiterhin interagierende Monomere zerfallen. Unterstützt wird das "Rosetta Stone Modell" durch die Beobachtung, daß Kontaktflächen zwischen Proteinen (inter-molekulare Flächen) denen innerhalb von Proteinen (intra-molekulare Flächen) ähneln (Bennett *et al.*, 1995; Tsai & Nussinov, 1997a, b; Tsai *et al.*, 1997).

1.2 Protein Engineering *versus* Evolution

In der Natur lassen sich vielfach Anpassungen der Struktur und Funktion von Proteinen an sich verändernde Umgebungen beobachten. Diese Mechanismen natürlicher molekularer Evolution eignen sich sehr gut als Vorbild für Evolution im Labor und Protein Design. Auf der anderen Seite ermöglicht die Nachahmung natürlicher Prozesse im Labor das tiefere Verständnis derselben.

So haben in den letzten Jahren neben dem rationalen Design von Proteinen solche Techniken zunehmend an Bedeutung gewonnen, die sich der Zufallsmutagenese und/oder Rekombination von Genen, kombiniert mit Selektion oder Screening bedienen. Diese Ansätze werden unter dem Begriff der „gerichteten Evolution“ zusammengefaßt (Cohen *et al.*, 2001; Chen, 2001, Arnold *et al.*, 2001). Dabei kommen neben der klassischen Zufallsmutagenese durch *error-prone* (Fehler-behafteten)-PCR (Cadwell & Joyce, 1994) Methoden wie DNA-*Shuffling* (Stemmer, 1994a,b), StEP (Staggered Extension Process, Zhao *et al.*, 1998) oder ITCHY (incemental truncation for the creation of hybrid proteins, Ostermeier *et al.*, 1999) zur Anwendung.

Die meisten Design-Ansätze beschäftigen sich mit der Veränderung der Funktion oder Stabilität eines Proteins. Ein anderer interessanter Aspekt beschäftigt sich mit der Frage, wie eine Faltung im Laufe der Evolution entstanden sein könnte. Hier kann das *de novo* Design von Proteinen erste Anhaltspunkte bieten. Das Ziel dabei ist es, eine Polypeptidkette zu entwerfen, die sich signifikant von jeder natürlichen Proteinsequenz unterscheidet und eine vorhergesagte 3D-Struktur bildet. Bisher gibt es jedoch nur

wenige Beispiele, bei denen dieser Ansatz erfolgreich war. Um jedoch Evolutionsmechanismen wie Genduplikation und Genfusion zur Entwicklung von neuen Strukturen aus kleineren Einheiten näher zu untersuchen, ist ein abgewandeltes *de novo* Design möglich, wobei definierte strukturelle Einheiten, die identisch oder unterschiedlich sein können, miteinander kombiniert werden.

1.3 Das $(\beta\alpha)_8$ -Barrel

Das $(\beta\alpha)_8$ -Barrel ist eine häufig auftretende Faltungstopologie, welche in mehr als 10% aller zurzeit bekannten Proteinstrukturen zu finden ist (Gerstein, 1997; Gerlt, 2000). Neben Rossmann-, Ferredoxin-, alpha-beta-Hydrolase- und P-Loop-Hydrolase-Faltung gehört die $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Faltung zu den wahrscheinlich ursprünglichsten Motiven (Chotia & Finkelstein, 1990; Hegyi & Gerstein, 1999; Wirenga, 2001). Für fast alle $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Proteine ist eine enzymatische Aktivität bekannt, Ausnahmen bilden nur Concavalin B, Narbonin, Nonfluorescent Flavoprotein, Phosphodiesterase Homology Protein und Yeast Hypothetical Protein. Sie katalysieren eine große Bandbreite verschiedener Reaktionen, wobei sie in allen EC-Klassen mit Ausnahme der Ligasen vertreten sind (Pujadas & Palau, 1999). Das $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Strukturmotiv ist auch unter dem Namen TIM-Barrel bekannt, da die Faltung zuerst bei der Triosephosphat Isomerase (TIM) in *Gallus gallus* beobachtet wurde (Banner *et al.*, 1975).

Das geschlossene $(\beta\alpha)_8$ -Barrel besteht aus acht sich wiederholenden Einheiten rechtsgängiger $\beta\alpha$ -Sekundärstrukturelemente (Levitt & Chotia, 1976; Abbildung 1.2a). Der hydrophobe Kern wird aus acht verdrehten, parallelen β -Strängen gebildet, dem β -Faß (engl. Barrel). Dies ist von acht α -Helices umgeben, welche die β -Stränge miteinander verbinden (Abbildung 1.2b). In der Struktur sind sie für Stabilität und Funktion zuständigen Elemente klar getrennt. In allen bekannten $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen liegen die katalytisch essentiellen Aminosäuren am C-terminalen Ende der β -Stränge und in den darauffolgenden Schleifen, die die Stränge mit den α -Helices verbinden. Die Schleifen am N-terminalen Ende des Fasses sind dagegen wichtig für die Stabilität der Struktur, wie vor allem durch Untersuchungen an der Phosphoribosylanthranilat Isomerase gezeigt werden konnte (PRAI; Luger *et al.*, 1989; Urfer & Kirschner, 1992; Thoma *et al.*, 2000). Somit kann von einem Katalysepol und

einem Stabilitätspol des Barrel gesprochen werden (Höcker *et al.*, 2001a; Abbildung 1.2b).

In einer Reihe von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen wurden Abweichungen von der in Abbildung 1.2 gezeigten Grundstruktur beobachtet. Ein Beispiel für Deletion und Substitution der Grundform verdeutlicht der Vergleich der bakteriellen Luciferase (1luc) mit dem Nichtfluoreszierenden Flavoprotein (NFP; 1nfp) aus dem Photobakterium.

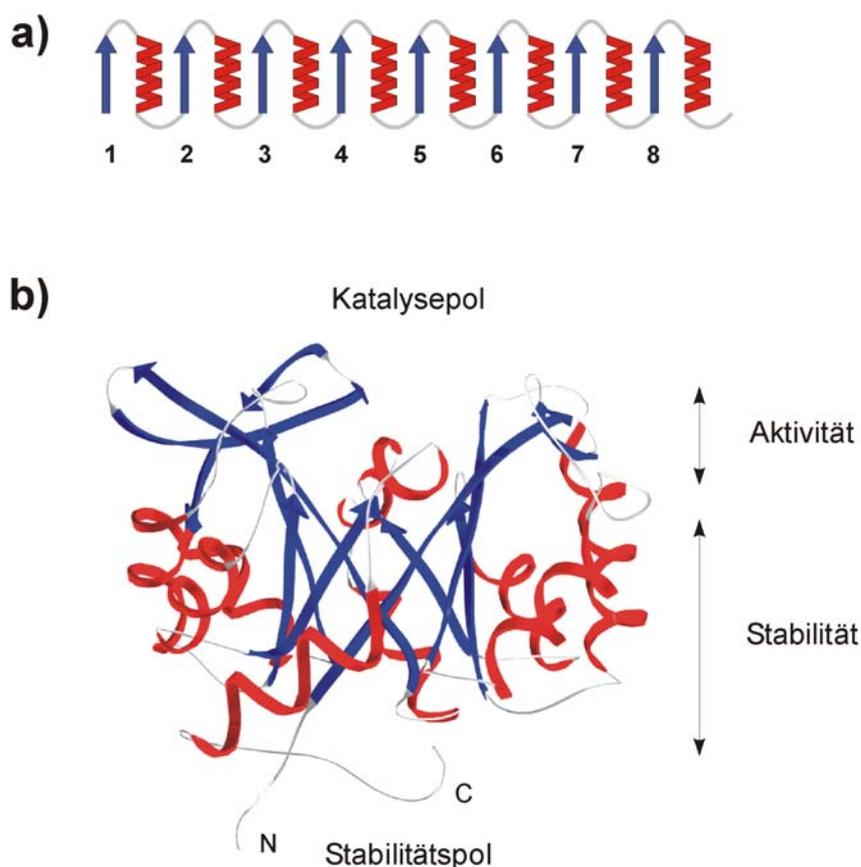


Abbildung 1.2: Die $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Faltung

a) Topologische Darstellung der rechtsgängigen $\beta\alpha$ -Supersekundärstruktur.

b) Seitenansicht des $(\beta\alpha)_8$ -Barrel HisF aus *Thermotoga maritima* (Lang *et al.*, 2000). β -Stränge sind in blau, α -Helices in rot gezeigt. Die katalytisch essentiellen Reste befinden sich wie in allen $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen am C-terminalen Ende der β -Stränge und den darauffolgenden Schleifen; diese Seite des Fasses wird als „Katalysepol“ bezeichnet. Der übrige Teil der Faltung einschließlich der gegenüberliegende Seite des Fasses („Stabilitätspol“) ist wichtig für die konformationelle Stabilität (nach Höcker *et al.*, 2001b).

Während die Luciferase aus den üblichen acht $\beta\alpha$ -Modulen besteht, sind in dem ihm verwandten NFP zwei $\beta\alpha$ -Einheiten und eine α -Helix durch einen einzelnen β -Strang in antiparalleler Orientierung ersetzt (Grishin, 2001). Abweichungen von der

klassischen $(\beta\alpha)_8$ -Topology wurden auch in anderen Proteinfamilien gefunden, so z.B. in Quinolinsäure Phosphoribosyltransferasen (Eads *et al.*, 1997), welche aus nur sieben $\beta\alpha$ -Modulen bestehen, oder in Enolasen, die eine $\beta\beta\alpha\alpha(\beta\alpha)_6$ -Faltung aufweisen (Lebioda, 1989; Gerlt & Babbitt, 2001a). Am häufigsten sind Variationen in den Schleifen am Katalysepol zu finden, ganze Domänen können dort integriert sein (z. B. bei α -Amylase aus *Bacillus licheniformis*, Hwang *et al.*, 1997). Trotz der insgesamt hohen Konservierung der Struktur sind auf der Ebene der Primärstruktur große Differenzen zwischen den verschiedenen $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen festzustellen. Die Sequenzidentitäten liegen meist weit unter 20%, was als Schwellenwert evolutionärer Verwandtschaft angesehen wird (Rost, 1999). Aufgrund dieser geringen Sequenzähnlichkeiten sowie prinzipieller Unterschiede in der Geometrie des zentralen Barrels argumentierten Lesk *et al.* (1989), daß die $(\beta\alpha)_8$ -Barrel durch konvergente Evolution entstanden sein müßten. Dagegen wurde die konservierte Lage des aktiven Zentrums am Katalyse-Pol der Faltung als Argument für die divergente Evolution aus einem gemeinsamen Vorläuferenzym durch Genduplikation und Diversifikation herangezogen (Faber & Petsko, 1990; Reardon & Farber, 1995). Eine aktuelle Übersicht über den Stand der Diskussion gibt Henn-Sax *et al.* (2001).

Divergente Evolution kann in jedem Fall zu einer starken Veränderung der Primärstruktur führen, so dass Sequenzhomologien unter einen detektierbaren Schwellenwert fallen. Dies gilt auch für Proteine mit ähnlicher Enzymaktivität, da oft nur sehr wenige Reste für die Katalyse verantwortlich sind (Martin *et al.*, 1998; Traut & Temple, 2000). Neuere Entwicklungen in der vergleichenden Analyse von Sequenzen haben jedoch die Detektion entfernter Verwandtschaftsbeziehungen ermöglicht. Dazu gehört das Programm PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997), welches durch iterative Profilsuche auch geringe Ähnlichkeiten herausfiltern kann. Diese Methode wurde von Copley & Bork (2000) angewandt, um Verwandtschaften ausgehend vom $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzym 5'-ProFAR Isomerase (HisA) zu detektieren. Die Analyse deutet darauf hin, daß 12 der 23 SCOP (*Structural Classification of Proteins*; Murzin *et al.*, 1995) $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Superfamilien einen gemeinsamen evolutionären Ursprung haben. Neuere experimentelle Arbeiten unterstützen die Hypothese der divergenten Evolution für eine Reihe von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen (Höcker *et al.*, 2001a). So gelang es, durch einen einzelnen Aminosäureaustausch auf dem Proteingerüst von HisA die katalytische Aktivität der PRA Isomerase (TrpF) zu

etablieren (Jürgens *et al.*, 2000). Beide Enzyme gehören zur Superfamilie der Phosphat-bindenden ($\beta\alpha$)₈-Barrel und katalysieren ähnliche Reaktionen in der Biosynthese der Aminosäuren Histidin und Tryptophan (Henn-Sax *et al.*, 2002). Auch unter den Mitgliedern der Enolase Superfamilie wurden Beispiele für divergente Evolution gefunden. So reichte ebenfalls ein einziger Aminosäureaustausch, um sowohl auf dem Gerüst der L-Ala-D/L-Glu-Epimerase als auch dem des Muconat-laktonisierenden Enzyms aus *E.coli* o-Succinylbenzoat Synthase Aktivität zu etablieren (Gerlt, *pers. Mitteilung*). Ein Enzym aus der gleichen Superfamilie aus dem Organismus *Amycolaptosis sp.* ist in der Lage zwei verschiedene Reaktionen mit substantiell unterschiedlichen Substraten zu katalysieren, es wirkt sowohl als *N*-acyl-Aminosäure-Racemase als auch als o-Succinylbenzoat Synthase (Palmer *et al.*, 1999).

1.4 Die ($\beta\alpha$)₈-Barrel Enzyme der Histidinbiosynthese: HisA und HisF

Die Enzyme HisA und HisF katalysieren aufeinanderfolgende Reaktionen in der Histidinbiosynthese. HisA, die N⁷-[(5'-phosphoribosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid (5'ProFAR) Isomerase, katalysiert den vierten Schritt des Biosyntheseweges, nämlich die Amadori-Umlagerung von 5'ProFAR, einer Aminoaldose, zu N⁷-[(5'-phosphoribulosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid (5'PRFAR), einer Aminoketose (Margolies & Goldberger, 1966). Der folgende Schritt wird von der Imidazolglycerinphosphat (ImGP)-Synthase (Klem & Davisson, 1993) katalysiert, einem 1:1 Bienzymkomplex, der sich aus HisF und HisH zusammensetzt und zu der Klasse der Glutaminamidotransferasen gehört. Die von dieser Enzymklasse katalysierten Transamidierungsreaktionen gliedern sich in zwei Teilschritte an unterschiedlichen aktiven Zentren, welche häufig auf verschiedenen Polypeptiden (Untereinheiten) lokalisiert sind (Massière & Badet-Denisot, 1998; Zalkin & Smith, 1998). An der Glutaminase-Untereinheit, HisH in der ImGP-Synthase, wird Glutamin zu Glutamat und NH₃ hydrolysiert. Letzteres lagert sich an der Synthase-Untereinheit (HisF in der ImGP-Synthase) an ein für die jeweilige Glutaminamidotransferase spezifisches Akzeptorsubstrat (5'PRFAR für die ImGP-Synthase) an. Die Produkte der Reaktion sind ImGP und AICAR (5'-phosphoribosyl-4-carboxamid-5-aminoimidazol). ImGP wird im Verlauf des Biosyntheseweges weiter zu Histidin umgewandelt, während AICAR in die Purinbiosynthese eingeht. Vieles

deutet darauf hin, daß das am Zentrum von HisH gebildete NH_3 durch einen vom Lösungsmittel abgeschirmten Kanal durch das Faßinnere des HisF-Barrel zum aktiven Zentrum von HisF weitergeleitet wird (Haeger, 2001; Douangamath *et al.*, 2002). Derartige Ammoniakkanäle wurden auch bei anderen Glutaminamidotransferasen nachgewiesen (Miles *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2001).

Vergleiche der Gene *hisA* und *hisF* aus verschiedenen Organismen deuten auf eine enge Verwandtschaft der beiden Enzyme hin. Die Aminosäuresequenzen der beiden Genprodukte aus verschiedenen Mikroorganismen sind sich sehr ähnlich (Alifano *et al.*, 1996), z.B. besitzen HisA und HisF aus *Thermotoga maritima* 26% identische und 41% ähnliche Aminosäuren (Thoma *et al.*, 1998). Zudem liegen an äquivalenten Positionen in der N- bzw. C-terminalen Hälfte der Sequenz zwei Phosphatbindestellen, die für die Bindung der jeweils zweifach phosphorylierten Substrate, 5'ProFAR und 5'PRFAR, wichtig sind (Thoma *et al.*, 1998). Vergleiche der Kristallstrukturen der beiden Proteine aus *T.maritima* verdeutlichen diese Ähnlichkeit (Lang *et al.*, 2000). Die $\text{C}\alpha$ -Atome von HisA und HisF, die der Superfamilie der Ribulose-Phosphat-bindenden $(\beta\alpha)_8$ -Barrel angehören (SCOP 3.1.2 (Murzin *et al.*, 1995); PDB 1qo2 bzw. 1thf), lassen sich mit einem RMSD von nur 1,79Å superpositionieren. Zusätzlich wurden in beiden Enzymen die gleichen katalytisch essentiellen Aminosäurereste an äquivalenten Positionen der Struktur identifiziert, jeweils ein Aspartat am C-Terminus von β -Strang 1 und β -Strang 5 (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001; Henn-Sax *et al.*, 2002). Der weitaus stärkste Hinweis auf einen gemeinsamen Ursprung von HisA und HisF ist jedoch, daß HisF in der Lage ist die HisA-Reaktion zu katalysieren, wenn auch 10 000-fach langsamer als HisA selbst. Für die Fremdaktivität sind die gleichen Aspartate verantwortlich, die auch essentiell für die HisF-Aktivität sind (Lang *et al.*, 2000).

Ein analoges Paar von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen wie HisA und HisF findet sich auch in der Tryptophanbiosynthese. Dort katalysieren TrpF und die Indolglycerolphosphat Synthase (TrpC) den fünften und sechsten Schritt. TrpF und TrpC haben ähnliche Strukturen und zeigen signifikante Sequenzähnlichkeit in ihren Phosphat-bindenden Regionen (Wilmanns *et al.*, 1991).

1.4.1 Evolution von HisA und HisF durch Genduplikation und Genfusion aus einem Vorläufer halber Länge

Neben den starken Ähnlichkeiten zwischen den beiden $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen HisA und HisF fällt auch eine starke innere Symmetrie bzw. Ähnlichkeit zwischen den N-terminalen Hälften, bestehend aus $\beta\alpha$ -Modulen 1-4, (HisA-N, HisF-N) und den C-terminalen Hälften, bestehend aus $\beta\alpha$ -Modulen 5-8, (HisA-C, HisF-C) auf. Auf Sequenzebene besitzen die Hälften von HisA und HisF aus *T.maritima* eine Identität von 25% (Thoma *et al.*, 1998); ähnliche Werte wurden bei anderen Mikroorganismen gefunden (Fani *et al.*, 1994, 1995). Dabei steht *T. maritima* von den bisher untersuchten Mikroorganismen der phylogenetischen Trennung in die drei Gruppen Bacteria, Archaea und Eucarya und somit dem letzten gemeinsamen Vorfahren wahrscheinlich am nächsten (Woese *et al.*, 1990; Stetter, 1996).

Die Ähnlichkeit in den Primärstrukturen der beiden Hälften von HisA und HisF aus *T. maritima* spiegelt sich in einer guten Superpositionierbarkeit der Sekundär- und Tertiärstruktur wider: Abbildung 1.3 zeigt eine Superpositionierung des Proteinerückgrades von HisF-N und HisF-C mit einem RMSD-Wert von nur 1,58Å (Lang *et al.*, 2000).

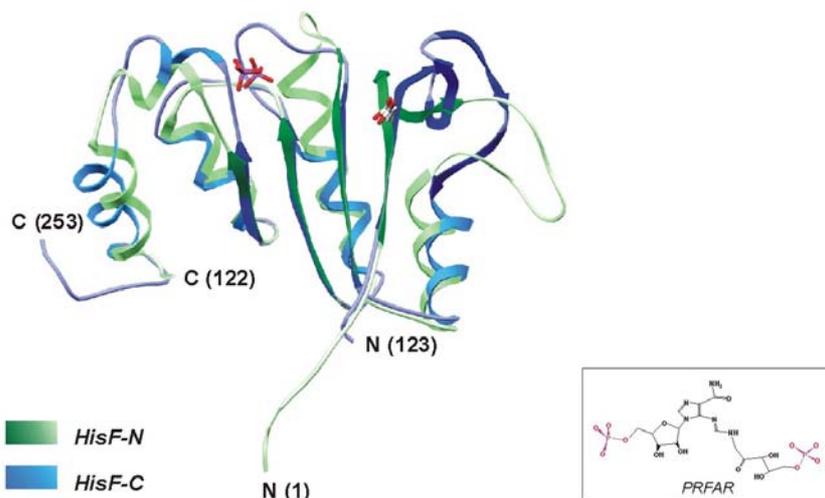


Abbildung 1.3: Die N- und C-terminalen Hälften von HisF haben sehr ähnliche Strukturen

Die *Backbone*-Atome von $(\beta\alpha)_{1-4}$ (HisF-N, Aminosäure 1-122, in grün) und $(\beta\alpha)_{5-8}$ (HisF-C, Aminosäure 123-253, in blau) superpositionieren mit einem RMSD von 1,58 Å. Die konservierten und katalytisch essentiellen Reste Asp 11 ($\beta 1$) und Asp 130 ($\beta 5$, die Seitenketten sind gezeigt) und die zwei Phosphat-Ionen (nahe dem C-Terminus von $\beta 4$ und $\beta 8$, dargestellt als Tetraeder), welche den zwei Phosphatgruppen des Substrats 5'PRFAR (s. Kasten) entsprechen, liegen an äquivalenten Positionen (aus Höcker *et al.*, 2001b).

Zudem superpositionieren sowohl die zwei in der Kristallstruktur von HisF gebundenen Phosphate, welche den Phosphatgruppen des symmetrischen Substrats PRFAR entsprechen, als auch die zwei katalytisch essentiellen Aspartate (Abbildung 1.3, Höcker *et al.*, 2001). Diese Ähnlichkeiten legten nahe, daß HisF aus zwei Domänen besteht, die HisF-N und HisF-C entsprechen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden HisF-N und HisF-C getrennt durch heterologe Expression der entsprechenden Gene in *E.coli* hergestellt und charakterisiert (Höcker *et al.*, 2001b). Einzeln sind HisF-N und HisF-C gefaltete, aber katalytisch inaktive Proteine. *In vivo* koexprimiert oder gemeinsam *in vitro* rückgefaltet assemblieren sie zu einem stöchiometrischen HisF-NC-Komplex, der HisF-Wildtypaktivität zeigt.

Diese Experimente stützen das von Fani *et al.* (1994) vorgeschlagene Evolutionsmodell, nach dem HisF und HisA aus einem gemeinsamen Vorgängermolekül halber Länge durch zwei Duplikationsschritte und anschließende Diversifikation entstanden sind. Dieses Modell läßt sich aufgrund der bereits erwähnten Ähnlichkeiten auf TrpF und TrpC und eventuell auch auf weitere $(\beta\alpha)_8$ -Barrel ausweiten (Abbildung 1.4; Höcker *et al.*, 2001).

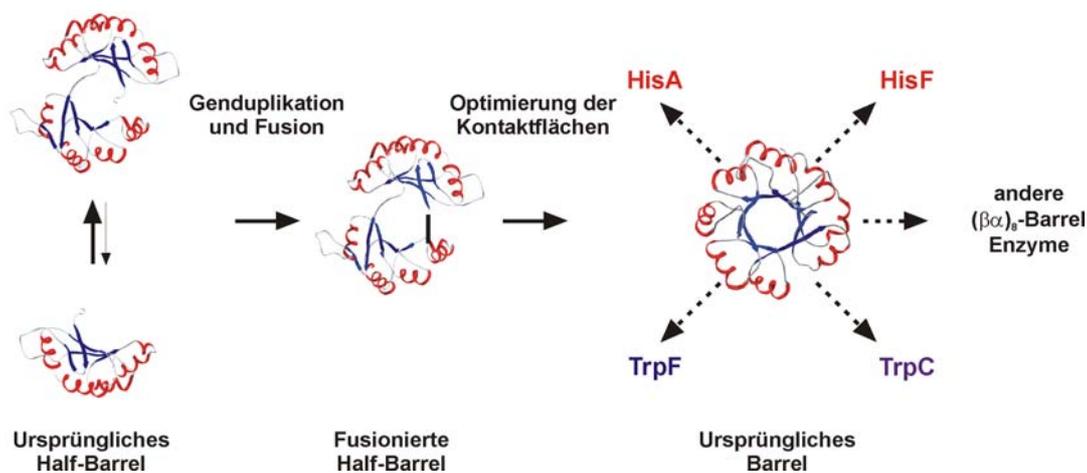


Abbildung 1.4: Modell für die Evolution von HisA, HisF und anderen $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen

Ausgehend von einem Gen, das für ein „ursprüngliches Half-Barrel“ mit unbekannter Funktion kodierte, führte eine Reihe von Duplikationsereignissen mit anschließender Diversifikation zu den heutigen Genen, die für HisA, HisF, TrpF, TrpC und möglicherweise auch andere $(\beta\alpha)_8$ -Barrel kodieren.

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Modell für die molekulare Evolution der Enzyme HisA und HisF (Abbildung 1.4) im Detail zu untersuchen und die darin postulierten Schritte experimentell zu rekonstruieren. Dadurch sollten generelle Einblicke in die Mechanismen der Evolution von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen und in die Mechanismen von Proteinevolution ganz allgemein gewonnen werden.

Mehrere Ansätze sollten verfolgt werden:

- Die Hypothese eines unabhängig evolvierten Halb-Barrel würde stark unterstützt werden durch die Identifikation äquivalenter Domänen in anderen Proteinstrukturen als dem $(\beta\alpha)_8$ -Barrel. Aus diesem Grunde sollten Datenbanksuchen durchgeführt werden, um mögliche evolutionäre Verwandtschaften aufzuspüren.
- In aufeinanderfolgenden Schritten sollten die Ereignisse nach der postulierten Duplikation der $(\beta\alpha)_4$ -Module und ihrer Fusion zu einem $[(\beta\alpha)_4 - (\beta\alpha)_4]$ Protein rekonstruiert werden. Die zentrale Aufgabe bestand hierbei in der Optimierung der Kontaktflächen zwischen den anfänglich identischen Protein-Modulen mittels Protein-Design zur Erzeugung eines stabilen und kompakten $(\beta\alpha)_8$ -Barrel.
- Um die gemeinsame Evolution von HisA und HisF aus einem Vorläufer halber Länge zu untermauern, wurden zudem Chimären aus den beiden Enzymen hergestellt und charakterisiert. Diese Experimente sollten zudem Aufschluß geben über den modularen Aufbau von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen.

Es wurde mit HisA und HisF aus dem Organismus *T. maritima* gearbeitet, da diese biochemisch gut untersucht (Beismann-Driemeyer *et al.*, 2001; Henn-Sax *et al.*, 2002) und ihre Kristallstrukturen aufgeklärt sind (Lang *et al.*, 2000). Zudem wurden bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit Hälften von HisF hergestellt und charakterisiert (Höcker, 1999; Höcker *et al.*, 2001b).

2 Material

2.1 Bakterienstämme

Es wurde ausschließlich mit *E.coli*-Stämmen gearbeitet:

DH5 α (Hanahan, 1983)

[F⁻, *endA1*, *hsdR17* (r_k⁻m_k⁻), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA* (Nal^r), *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*)U169, Φ 80*lacZ* Δ M15]

BL21(DE3) (Studier & Moffatt, 1986)

hsdS, *gal* [λ cI, *ts857*, *cmd1*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*]

Bei BL21(DE3)c+ werden Gene von einem zusätzlichen Plasmid coexprimiert, welche für eine Reihe von seltenen Codon-tRNAs kodieren (Arginin: AGG und AGA, Isoleucin: AUA, Leucin: CUA). Das Plasmid enthält die Antibiotikaresistenz für Chloramphenicol.

JM101 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

F⁻, *traD36*, *proAB*, *lacI^q*, Δ (*lacZ*)M15/ Δ (*lac-proAB*), *glnV*, *thi1*

HfrG6 (Δ *hisA*, Matney *et al.*, 1964)

λ^- , *hisA323* (stable)

UTH860 (Δ *hisF*, Goldschmidt *et al.*, 1970)

ara-14, *glnV44* (AS), *galK2*, λ^- , *hisF860* (stable), *rpsL145* (strR), *malT1* (λ^R), *xylA5*, *mtl-1*

2.2 Vektoren

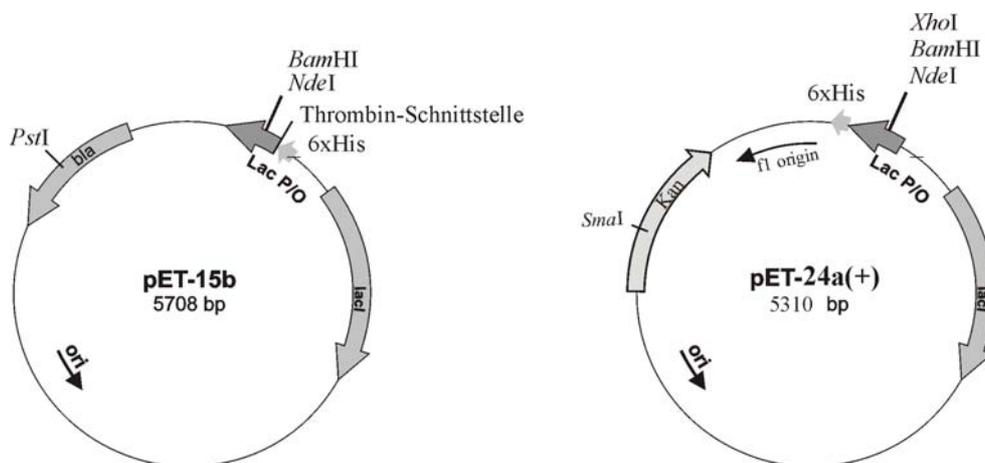
2.2.1 pET-Vektoren (Studier *et al.*, 1990)

Gene in pET-Vektoren werden von der T7-RNA Polymerase transkribiert. So können sie nur in Stämmen exprimiert werden, die eine chromosomale Kopie des T7-RNA Polymerase-Gens besitzen (z.B. BL21(DE3)). Die Expression der Polymerase erfolgt unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotor-Operators und wird durch Zugabe von IPTG induziert. Die Expression des in den pET-Vektor einklonierten Gens erfolgt über einen T7-Promoter und ist in den meisten pET-Vektoren ebenso über einen Lac-

Operator reguliert. Das dazu erforderliche lac-Repressor-Gen (*lacI*) ist plasmidkodiert und wird konstitutiv exprimiert.

2.2.1.1 pET-15b (NOVAGEN)

Der pET15b-Vektor ist so aufgebaut, daß stromaufwärts von der multiplen Klonierungsstelle sechs Histidin-Codone liegen, gefolgt von einem Bereich, der für eine Thrombinschnittstelle kodiert. Das exprimierte Protein trägt dann N-terminal einen Hexahistidin-Tag und eine Thrombinschnittstelle zu dessen Abspaltung. Das Plasmid kodiert das β -Lactamase-Gen (*bla*), so daß plasmidtragende Zellen gegenüber Ampicillin resistent sind.



2.2.1.2 pET-24a(+) (NOVAGEN)

Der pET-24a(+)-Vektor ist so aufgebaut, daß stromabwärts von der multiplen Klonierungsstelle sechs Histidin-Codone liegen. Das exprimierte Protein trägt dann C-terminal einen Hexahistidin-Tag. Als Selektionsmarker dient das Kanamycin-nucleotidyltransferase-Gen.

2.2.2 sk+/III P-P (Thoma *et al.*, 1998)

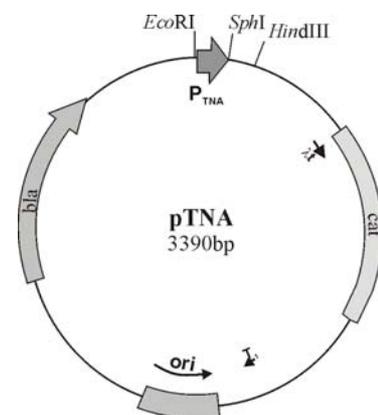
Dieses Plasmid besteht aus pBlueskript II SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) mit einem *PstI-PstI*-Insert (5,65kb), das für den 3'-terminalen Teil des Histidin-Operons aus *T. maritima* kodiert.

2.2.3 pCFN1 (Maxwell *et al.*, 1999)

Der CAT-Fusions Vektor pCFN1 beinhaltet einen starken IPTG-induzierbaren Promotor P_{trc} , Phagen f1 und pBR322 Replikationsursprünge, ein Ampicillin-resistenzgen, sowie ein *lacI^q* Gen. Das Plasmid wurde so konstruiert, daß am N-Terminus des Fusionsproteins sechs Histidine und ein FLAG-Epitop kodiert sind. Es folgen direkt die Klonierungsstellen *Bgl*III und *Xba*I, ein Amber Stopcodon und das CAT-Gen. Auf diese Weise ist es möglich in einem Amber-Supressorstamm (z.B. JM101) das Fusionsprotein herzustellen, während in einem anderen Stamm die Expression nach dem einklonierten Gen abbricht (Abbildung 3.1).

2.2.4 pTNA

Der pTNA-Vektor (Yanofsky, Stanford) entspricht mit Ausnahme des Promoterbereichs dem pDS/RBSII/*Sph*I-Vektor (Bujard *et al.*, 1987; Stüber *et al.*, 1990). Statt der Lac-Promotor-Operator-Region ist eine verkürzte Variante des Tryptophanase-Operon-Promotors von *E.coli* eingebaut, welcher zu schwach konstitutiver Expression einklonierter Gene führt. Das Plasmid besitzt einen ColE1 Replikationsursprung und eine Ampicillinresistenz aufgrund einer funktionellen β -Lactamase-Aktivität.



2.2.5 pZA22MCS1 (Lutz & Bujard, 1997)

Das Plasmid pZA22MCS1 besitzt einen p15A Replikationsursprung. Selektion erfolgt über die Kanamycinresistenz des Plasmids. Als regulatorische Einheit dient der IPTG-sensitive Promotor P_{LacO-1} .

2.3 Oligodesoxyribonukleotide

Bei Mutationsprimern sind diejenigen Basen, die von der Originalsequenz abweichen, kursiv gedruckt.

2.3.1 Primer zur Amplifizierung von *hisF-N*

5'*hisF-N*₁ (mit *NdeI*-Schnittstelle)

5'- AGC CAT ATG CTC GCT AAA AGA ATA ATC GCG -3'

3'*hisF-N*₁ (mit *BamHI*-Schnittstelle)

5'- GCC GGA TCC ACT CCC AAA AGT TTG -3'

5'*hisF-N*₂ (mit *BamHI*-Schnittstelle)

5'- ATA GGA TCC GGT CTC GCT AAA AGA ATA ATC -3'

3'*hisF-N*₂ (mit *XhoI*-Schnittstelle)

5'- GCC CTC GAG ACT CCC AAA AGT TTG AGC -3'

3'*hisF-N* (mit *HindIII*-Schnittstelle)

5'- CCT GGA AGC TTA ACT CCC AAA AGT TTG AGC -3'

2.3.2 Primer zur Amplifizierung von *hisF-C*

5'*hisF-C*₁ (mit *NdeI*-Schnittstelle)

5'- ATA CAT ATG CAG GCC GTT GTC GTG GCG ATA -3'

3'*hisF-C*₁ (mit *BamHI*-Schnittstelle)

5'- ATA GGA TCC CAA CCC CTC CAG TCT CAC GTT -3'

5'*hisF-C*₂ (mit *BamHI*-Schnittstelle)

5'- ATA GGA TCC GGT CAG GCC GTT GTC GTG GCG -3'

3'*hisF-C*₂ (mit *XhoI*-Schnittstelle)

5'- GTG CTC GAG CAA CCC CTC CAG TCT CAC GTT -3'

5'*hisF-C*_E167R/K

5'- AAG AGA GGA GCA *ARA* GAG ATC CTG CTC -3'

3'*hisF-C*_E167R/K

5'- GAG CAG GAT CTC *TKT* TGC TCC TCT CTT -3'

5'*hisF-C*_V126I (mit *NdeI*-Schnittstelle)

5'- ATA CAT ATG CAG GCC GTT *ATC* GTG GCG ATA -3'

5'*hisF-C*_A124R_V126I (mit *NdeI*-Schnittstelle)

5'- ATA CAT ATG CAG *CGC* GTT *ATC* GTG GCG ATA -3'

3'*hisF-C*_L169V (mit *SpeI*-Schnittstelle)

5'- GAT ACT AGT GAG *CAC* GAT CTC TCC -3'

5'*hisF-C*_I199T (mit *NheI*-Schnittstelle)

5'- ACA CTT CCC ATC *ACT* GCT AGC GGT GGT -3'

3'hisF-C_I199T (mit *NheI*-Schnittstelle)

5'- ACC ACC GCT AGC **AGT** GAT GGG AAG TGT -3'

5'hisF-C_L222S

5'- GAC GCT GCC **TCT** GCG GCT TCT GTC -3'

5'hisF-C_A220K_L222S

5'- GAC **AAG** GCC **TCT** GCG GCT TCT GTC -3'

5'hisF-C₁ (mit *BglII*-Schnittstelle)

5'- ATA AGA TCT CAC AGG CCG TTG TCG TGG CGA -3'

5'hisF-C* (mit *BglII*-Schnittstelle)

5'- ATA AGA TCT CAC AGG CCG TTA **TCG** TGG CGA -3'

5'hisF-Cmut (mit *BglII*-Schnittstelle)

5'- ATA AGA TCT CAC AGC **GCG** TTA **TCG** TGG CGA -3'

5'hisF-C₂ (mit *BglII*/*BamHI*-Schnittstelle)

5'- ATA AGA TCT TTG GGA TCC GGT CAG GCC GTT GTC -3'

5'hisF-C (mit *EcoRI*-Schnittstelle)

5'- ACA GAA TTC ATG CAG GCC GTT GTC GTG GCG ATA -3'

3'hisFc (mit *BamHI*-Schnittstelle)

5'- GTG GGA TCC TTA CAA CCC CTC CAG TCT CAC GTT -3'

2.3.3 Primer zur Amplifizierung von *hisF*

5'hisF (mit *SphI*-Schnittstelle)

5'- AGC TGC ATG CTC GCT AAA AGA ATA ATC GCG -3'

5'hisF_R5A (mit *SphI*-Schnittstelle)

5'- TAT GAC GGC ATG CTC GCT AAA **GCA** ATA ATC -3'

3'hisF (*HindIII*-Schnittstelle)

5'- TAC ATT AAG CTT TCA CCC CTC CAG TCT CAC -3'

5'hisF (*BglII*-Schnittstelle)

5'- AGC AGA TCT CAC TCG CTA AAA GAA TAA TCG -3'

3'hisF-C (mit *XbaI*-Schnittstelle)

5'- AGT GTC TAG AAA CCC CTC CAG TCT CAC -3'

2.3.4 Primer zur Amplifizierung von *hisA-N* und *hisA-C*

5'*hisA-N* (mit *NdeI*-Schnittstelle)

5'- AGC CAT ATG CTC GTT GTC CCG GCG ATA GAT -3'

3'*hisA-N* (mit *BamHI*-Schnittstelle)

5'- GGC GGA TCC ATC GAT TTC TCT CAG GGA TTT -3'

3'*hisA-N_F27W*

5'- ATC TTT TTC GTA **CCA** GAT GGT GTT CTC -3'

5'*hisA-C*(mit *BamHI*-Schnittstelle)

5'- ATA GGA TCC GGT GTG GAG CCC GTG -3'

3'*hisA-C* (mit *NotI*-Schnittstelle)

5'- ATA GCG GCC GCT GCG AGC ATA TCT CTT CAT CAC -3'

5'*hisA* (mit *SphI*-Schnittstelle)

5'- TAT GAC GGC ATG CTC GTT GTC CCG GCG ATA -3'

3'*hisAF*

5'- CAC GAC AAC GGC CTG ATC GAT TTC TCT CAG -3'

3'*hisFA*

5'- GAA CAC GGG CTC CAC ACT CCC AAA AGT TTG -3'

2.3.5 Sequenzierungsprimer für pET-Vektoren

T7-Prom [#472-#453]

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

T7-Term [#255-#274]

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

2.3.6 Sequenzierungsprimer für pTNA (pDS56/RBSII/*SphI*)

CyRI [4094-4113]

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

CyPstI [900-884]

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

2.3.7 Sequenzierungsprimer für pZA22MCS1

pZA1

5'- CAA CAG TCT TTC GAC TGA -3'

2.3.8 Sequenzierungs- und Mutationsprimer für pCFN1

pCFNup

5'- AAC GGT TCT GGC AAA TAT TC -3'

pCFNdown

5'- TGG TTA TAG GTA CAT TGA G -3'

5'pCFN (*Xho*I)

5'- CTA CAA GGA CGA TGA CGA CTC GAG CTC ACG TCT AGA -3'

3'pCFN (*Xho*I)

5'- GCG AGC CTA CTC TAG ACG TGA GCT CGA GTC GTC ATC -3'

2.4 DNA-Längenstandards

SMART LADDER (Eurogentec)

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

Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas)

Polynukleotidgrößen [bp]: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80

2.4 Proteinlängenstandard

MidRange (Promega®)

Proteingrößen [Dalton]: 97000 (Phosphorylase A), 66000 (BSA), 45000 (Ovalbumin), 31000 (Carboanhydrase), 2100 (Trypsin Inhibitor), 14400 (α -Lactalbumin)

2.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen; New England Biolabs, Bad Schwalbach)

Ribonuklease A (RNase A) (Boehringer Mannheim, Mannheim)

T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim)

Taq-Polymerase (Promega, Madison, USA)

2.6 Chemikalien

Alle Chemikalien waren von höchster Reinheit und wurden, wenn nicht gesondert erwähnt, von **Merck** (Darmstadt), **Fluka** (Neu-Ulm), **Riedel-de Haen** (Seelze), **Roth** (Karlsruhe), **Serva** (Heidelberg) oder **Sigma-Aldrich** (Deisenhofen) bezogen.

Ampicillin (Natriumsalz), 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Boehringer Mannheim, Mannheim)

Bacto Agar, Trypton, Pepton Hefeextrakt (Difco, Dreieich)

BioRAD Protein Assay-Färbelösung (BioRAD, München)

Protogel (Biozym, Hessisch Oldendorf)

2.7 Geräte, Kits und sonstige Materialien

Absorptionsspektrophotometer:

Zweistrahl-UV/VIS-Spektralphotometer Cary Bio 100 (Varian Inc., Palo Alto, Californien, USA)

CD-Spektropolarimeter:

Jasco J-715 Spektropolarimeter (Jasco, Cremalla, Italien)

Chromatographieanlagen:

BioCAD SPRINT Perfusion Chromatography System (Perkin Elmer, Weiterstadt)

FPLC-Anlage (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Differentielle Scanning Kalorimetrie:

VP-DSC Microcalorimeter (Micro CalTM Inc, Northampton, MA, USA)

Dynamische Lichtstreuung:

Festwinkel DLS Photometer DynaPro 801 (ProteinSolutions, Charlottesville, VA, USA)

Elektroporation:

Elektroporator 2510 (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg)

Elektroporationsküvetten, 2mm Elektrodenabstand (Molecular Bioproducts, San Diego, Californien, USA, bzw. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Filtration:

Filtereinheiten Millex FG13; Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage (Millipore, Eschborn)

Minisart NML Sterilfilter 0,22µm (Sartorius, Göttingen)

Fluoreszenzspektrophotometer:

Fluoreszenz-Spektrometer Cary Eclipse (Varian, Inc., Palo Alto, Californien, USA)

Kits:

NucleoBond[®] AX DNA-Extraction Kit (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)

QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden)

LMW-Kalibrierungskit für Gelfiltration (Pharmacia, Mannheim)

Magnetrührer (beheizbar):

Ika RCT basic (Ika Labortechnik, Staufen)

Microliterpipetten:

Pipetman[®] P20, P200, P1000 (Gilson, Medical Electronics, Frankreich)

PCR-Gerät:

T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen)

pH-Meter:

pH-Meter (inoLab, Weilheim)

Proteinkonzentrierung:

Centricon-10-, Centriprep-10-Centrifugal Filter Devices (Millipore, Eschborn)

Proteinumpufferung:

NAP-5-, NAP-10-, NAP-25-Columns (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Quarzküvetten:

(Helma, Mühlheim)

Schüttelinkubatoren:

Innova 4000, 4400, 4430 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen)

SDS-Gelelektrophorese:

Hofer Elektrophoresekammer Mighty Small II und Multi Gel Caster Gelgießstand (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Thermoblock:

Thermoblock V2.0 (Waase, Göttingen)

Ultraschallgerät:

Branson Sonifier D-250 (Heinemann, Schwäbisch Gmünd)

Vortexer:

Reax Top (Heidolph, Kelheim)

Waagen:

SBA 52, Sba 33 (Scaltec, Heiligenstadt)

Zentrifugen:

Heraeus Biofuge *pico*, Heraeus Biofuge *fresco* (Schütt Labortechnik, Göttingen)

Kühlzentrifuge Roto Silenta/RP, Kühlzentrifuge Rotixa/RP (Hettich, Tuttlingen)

Zentrifuge RC-5C; Rotortypen SS34 und GSA (Sorvall, Bad Nauheim)

sonstige Geräte:

Glaswaren (Schott, Mainz, bzw. Fisher Scientific, Schwerte)

Petrischalen; Röhrchen 12ml (Greiner, Nürtingen)

Reaktionsgefäße 1,5ml; Röhrchen 50ml, 200 μ l und 1000 μ l Pipettenspitzen (Sarstedt, Nürnbrecht)

2.8 Nährmedien

dYT

1 % (w/v) Hefe-Extrakt; 1,6 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) NaCl

LB (Luria-Bertani; Sambrook et al., 1989)

0,5% (w/v) Hefe-Extract; 1% (w/v) Trypton; 1% (w/v) NaCl

LB-Agar

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

M9 ohne Stickstoff

1,7% (w/v) Bacto-Agar in Wasser, nach Autoklavieren hinzufügen: 0.4% (v/v) Glucose (steril), 20% (v/v) 5x M9-Salze ohne Stickstoff, 2mM MgSO₄, 0,1mM CaCl₂, 50mM Ammoniumsulfat oder 5mM Glutamin

SOB

0,5% (w/v) Hefe-Extrakt; 2% (w/v) Trypton; 0,05% (w/v) NaCl; nach dem Autoklavieren MgCl₂, MgSO₄ (je 10mM Endkonzentration) und KCl (2,5mM) zugeben.

Vogel-Bonner-Minimalmedium (Vogel & Bonner, 1956)

1,7% (w/v) Bacto-Agar in Wasser, nach Autoklavieren hinzufügen: 0.2% (v/v) Glucose (steril), 4% (v/v) 25x Vogel-Bonner-Mineralsalz, 0,01mM FeCl₃, 1mg Thiamin

Zur Sterilisation wurden die Nährmedien 20min bei 120°C autoklaviert. Selektivmedien wurden die entsprechenden Antibiotika nach dem Autoklavieren in Form von tausendfach konzentrierten, sterilfiltrierten Lösungen zugegeben.

2.9 Puffer und Lösungen

Ampicillin-Stammlösung

150mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert

APS-Stammlösung

10% APS, bei -20°C gelagert

dNTP-Stammlösung

je 100mM dNTP (N = A, C, G oder T); mit 50mM Tris/HCl auf pH 7 eingestellt, für PCR mit H₂O zu je 10mM dNTP verdünnt

Ethidiumbromidstammlösung

10mg/ml Ethidiumbromid

FeCl₃-Stammlösung

10mM FeCl₃, sterilfiltriert

IPTG-Stammlösung

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

Kanamycin-Stammlösung

75mg/ml Kanamycin-Sulfat in Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert

M9-Salze ohne Stickstoff

64% (w/v) Na₂HPO₄ · 7H₂O, 15% (w/v) KH₂PO₄, 2,5% (w/v) NaCl

SDS-PAGE Färbelösung

0,2% (w/v) Coomassie G250 und R250; 50% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Eisessig, sterilfiltriert, bei RT lichtgeschützt gelagert

SDS-PAGE Laufpuffer

25mM Tris; 0,1% (w/v) SDS; 0,2M Glyzin

SDS-PAGE Probenpuffer (2x)

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

SDS-PAGE Sammelgelpuffer

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

SDS-PAGE Trenngelpuffer

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

Sukrose-Farbmarker

60% (w/v) Sukrose; 0,1% (w/v) Bromphenolblau; 0,1% (w/v) Xylencyanol FF in 1xTAE

5 x TBE

89mM Tris, 89mM Borsäure, 2,5mM EDTA

TE-Puffer

10mM Tris-HCl, 0,5mM EDTA, pH 8,0

TFB I

100mM RbCl₂, 50mM MnCl₂, 30mM KOAc, 10mM CaCl₂, 15% (w/v) Glyzerin, pH 5,8-6,2 mit HOAc eingestellt

TFB II

10mM MOPS, 10mM RbCl₂, 75mM CaCl₂, 15% (w/v) Glyzerin, pH 7,0

Thiamin-Stamlösung

1mg/ml Thiamin, sterilfiltriert, bei 4°C gelagert

Tris-Tricin-Gel-Puffer

3M Tris, 0,3% (w/v) SDS, pH 8,45

Tris-Tricin-Laufpuffer I

0,1M Tris, 0,1M Tricin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,45

Tris-Tricin-Laufpuffer II

0,2M Tris-HCl, pH 8,9

Vogel-Bonner-Mineralsalz (Vogel & Bonner, 1956)

0,5% (w/v) MgSO₄·7H₂O, 5% (w/v) Citric acid, 12,5% (w/v) K₂HPO₄, 4,4% (w/v) NaNH₄HPO₄·4H₂O

2.10 Software

BioCAD Perfusion Chromatography Workstation, Version 3.01, Perseptive Biosystems

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

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

Chromas, Version 1.45, McCarthy 1996-1998

Dynamics, Graphical Size Analysis Software, ProteinSolutions

Origin, MicroCal Software

Sigma-Plot, Version 5, SPSS Inc. 1986-1999

SwissPDBviewer Version 3.70b, Guex 1995-1999, <http://www.expasy.ch/spdbv/>

POVRay for Windows Version 1999, <http://www.povray.org>

Wisconsin Package, GCG Version 10.2, Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, 1982-2001

3 Methoden

3.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Zur Sterilisation wurden alle hitzestabilen Lösungen 20min bei 121°C autoklaviert. Hitzelabile Lösungsbestandteile wurden als konzentrierte Stammlösung angesetzt und durch einen Membranfilter (Sartorius, Millipore) der Porengröße 0,2µm filtriert.

3.2 Mikrobiologische Methoden

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

E.coli-Stämme wurden bei 37°C unter Schütteln (150Upm) in dYT oder LB-Medium angezogen, dem bei plasmidtragenden Bakterien das entsprechende Antibiotikum zugegeben wurde (Ampicillin 150^{µg}/ml, Kanamycin 75^{µg}/ml). Das Wachstum wurde durch Trübungsmessungen bei einer Wellenlänge von 600nm (OD₆₀₀) gegen Medium verfolgt. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt: 1 ml einer frisch angezogenen Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 wurde mit 1ml 87% (^{w/v}) Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

3.2.2 Transformation von *E.coli*

3.2.2.1 Chemische Transformation von *E.coli* (nach Inoue *et al.*, 1990)

Zur Präparation der kompetenten Zellen wurden 300ml SOB-Medium in einem 3l Kolben mit Zellen des entsprechenden Stammes angeimpft und bei 37°C und 150Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 angezogen. Die Kultur wurde auf Eis gekühlt, in Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation (Eppendorf 5810 R, 4000Upm, 10min, 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 90ml eiskaltem TFB I-Puffer aufgenommen, für 10min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 12ml TFB II-Puffer resuspendiert, in 200µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. Die zur Transformation dienende DNA wurde in einem Volumen von maximal 20µl zugesetzt, der Ansatz wurde 5min auf Eis inkubiert und für 40s einem

Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Nach weiteren 5min auf Eis wurden 800µl dYT zugegeben und der Ansatz zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Aliquots auf Selektivmedien ausplattiert und üN inkubiert.

3.2.2.2 Transformation von *E.coli* mittels Elektroporationsmethode (Dower *et al.*, 1988)

Zur Präparation elektrokompetenter Zellen wurden Vorkulturen auf 50ml dYT überimpft, bei 37°C unter Schütteln inkubiert und die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 geerntet (Eppendorf 5810 R, 4 000Upm, 10min, 4°C). Das Pellet wurde in 30ml vorgekühltem Millipore-Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde 3 bis 5 mal wiederholt und das Pellet anschließend in 150µl 10% (v/v) Glycerin aufgenommen und in 50µl Aliquots bei -70°C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit salzfreier Plasmid-DNA versetzt (maximal 5µl pro 50µl Zellen) und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2mm) gefüllt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Eppendorf-Netheler-Hinz-Elektroporator bei 2500V, 25µF und 200Ω (die Zeitkonstante lag über 3,5). Anschließend wurden die Zellen sofort in LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen und 1h bei 37°C gekurt. Danach wurden Aliquots ausplattiert und üN inkubiert.

3.2.3 *In vivo* Komplementationstest

Die Histidin-auxotrophen *E.coli*-Stämme HfrG6 („ $\Delta hisA$ “, Matney *et al.*, 1964) bzw. UTH869 („ $\Delta hisF$ “, Goldschmidt *et al.*, 1970) wurden durch Elektroporation (3.2.2.2) transformiert, 1h bei 37°C in LB-Medium gekurt und vor dem Ausplattieren auf VB-Medium bzw. M9-Medium mindestens viermal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um anhaftendes Nährmedium zu entfernen. Im Falle von $\Delta hisA$ wurde die Komplementationsfähigkeit der transformierten Varianten auf reinem VB-Medium untersucht. Im Falle von $\Delta hisF$ wurde die Komplementationsfähigkeit der transformierten Varianten auf M9-Medium mit 50mM Ammoniumsulfat (Ammonium-abhängige Aktivität) oder mit 5mM Glutamin (Glutamin-abhängige Aktivität; setzt Interaktion mit HisH voraus) getestet.

3.2.4 *In vivo* Test auf erhöhte Löslichkeit eines Proteins nach Maxwell *et al.* (1999)

Dieses System beruht darauf, daß Zellen, die das Gen eines *unlöslichen* Proteins fusioniert an das Gen der Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) exprimieren, eine geringere Chloramphenicolkonzentration tolerieren als solche, die das Gen einer CAT-Fusion mit einem *löslichen* Protein exprimieren. Daher können lösliche Varianten eines unlöslichen Proteins fusioniert an CAT auf Platten mit erhöhten Chloramphenicolkonzentrationen selektiert werden. Maxwell *et al.* (1999) entwickelten ein geeignetes Plasmid für dieses System, den pCFN1-Vektor, welcher von den Autoren zur Verfügung gestellt wurde. Abbildung 3.1 zeigt die wichtigsten Elemente der Klonierungsregion.

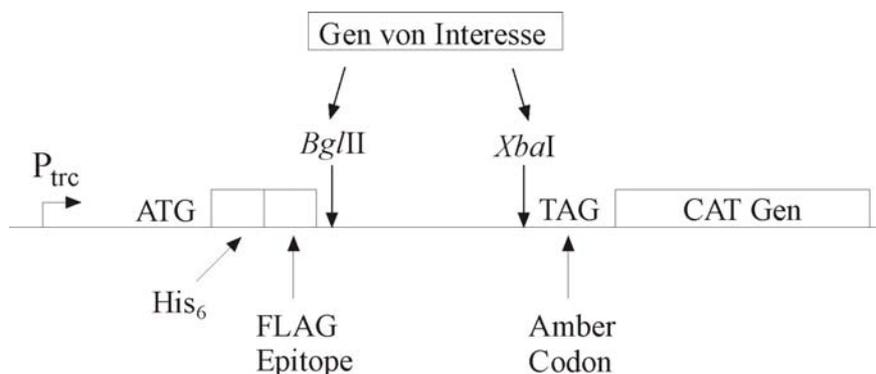


Abbildung 3.1: Der CAT-Fusions-Vektor pCFN1

Die wichtigen Elemente in der Klonierungsregion sind dargestellt. P_{trc} : starker IPTG-induzierbarer Promoter, His₆: His-Tag bestehend aus 6 Histidinen, FLAG Epitope: detektierbar durch Anti-FLAG Antikörper.

E.coli JM101, ein *amber-suppressor* Stamm, wurden mit dem entsprechenden pCFN1-Fusionskonstrukt transformiert. Die Zellen wurden anschließend in 1ml LB-Medium bei 37°C für 2h gekurt, wobei nach einer Stunde 200µg/ml IPTG zugegeben wurde, um die Expression des Fusionskonstruktes zu induzieren. Danach wurden die Zellen auf Medium mit IPTG (200µg/ml) und verschiedenen Konzentrationen Chloramphenicol ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Das Wachstum sichtbarer Kolonien wurde nach 16h überprüft.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Fällung von DNA aus wäßrigen Lösungen

DNA in wäßriger Lösung kann durch verschiedene Methoden ausgefällt werden. Dabei kann sowohl eine Reinigung der DNA erreicht werden, wenn Kontaminanten (z.B. Salze, Proteine) im Überstand gelöst bleiben, als auch eine Konzentrierung, indem die gefällte DNA in einem kleineren Volumen Lösungsmittel aufgenommen wird.

3.3.1.1 DNA-Fällung mit Ethanol

Die DNA-haltige Lösung wurde mit $\frac{1}{10}$ Vol 7M Ammoniumacetat-Lösung und 3 Vol 96% (v/v) Ethanol versetzt, 30min bei -20°C inkubiert und anschließend pelletiert (Heraeus Biofuge *fresco*, 13 000Upm, mind. 15min, 4°C). Das Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in Wasser oder TE-Puffer gelöst.

3.3.1.2 DNA-Fällung mit Isopropanol

Die Fällung mit Isopropanol erfolgte analog zur Fällung mit Ethanol, wobei jedoch nur 0,7 bis 1 Vol Isopropanol eingesetzt wurde. Ein Vorteil dieser Methode ist die verminderte Präzipitation von Salzen. Das Pellet wurde auch hier mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen.

3.3.2 Extraktion von DNA aus wäßrigen Lösungen mit organischen Lösungsmitteln

Phenol-, Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA dient zur Entfernung von Proteinen, Ethidiumbromid und anderen hydrophoben Kontaminanten. Anschließende Extraktion mit Chloroform entfernt Phenolreste aus der wäßrigen Phase. Die DNA-Lösung wurde mit 1 Vol des entsprechenden Lösungsmittels versetzt, gründlich gemischt und abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 13 000Upm, 3min, RT). Die obere wässrige Phase wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und weiterverarbeitet.

3.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mittels der Absorption bei 260 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt. Bei einer Schichtdicke von 1cm entspricht mit $0.1\% A_{260} = 20\text{cm}^2\text{mg}^{-1}$ eine Absorption bei 290nm (A_{260}) von 1 einer Konzentration von $50\mu\text{g}/\text{ml}$ dsDNA ($35\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA oder $33\mu\text{g}/\text{ml}$ ssDNA), somit errechnet sich die Konzentration sich folgendermaßen:

$$c_{\text{dsDNA}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (A_{260} \cdot 50 \cdot f) / 1\,000 \quad (3.1)$$

c = Konzentration

f = Verdünnungsfaktor

Außerdem wurde durch zusätzliche Messung der A_{280} und eines Absorptionsspektrums von 240 bis 350nm die Reinheit der Probe festgestellt. Dabei sollte der Quotient A_{260}/A_{280} mehr als 1,8 betragen. Außerdem sollte oberhalb von 300nm keine Absorption detektierbar sein, um eine Verfälschung der Meßergebnisse durch Lichtstreuung ausschließen zu können.

Eine Abschätzung der DNA-Konzentration kann auch durch einen Vergleich mit Längenstandards bekannter Konzentration (u.a. SMART LADDER, Eurogentec) in einem Agarosegel erfolgen.

3.3.4 Enzymatische Manipulation von doppelsträngiger DNA

3.3.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung wurden hier nur Restriktionsendonukleasen des Typs II (Sambrook *et al.*, 1989; Wilson, 1991) verwandt, welche eine symmetrische Sequenz erkennen und innerhalb dieser schneiden. Das Volumen der zugegebenen Enzymlösung(en) betrug höchstens 10% des Gesamtvolumens des Ansatzes. Es wurden 3-6u Enzym pro μg DNA eingesetzt und im vom Hersteller empfohlenen Puffer bei 37°C 1 bis 2 h inkubiert.

3.3.4.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Damit einfach restringiertes Vektorfragment bei der Klonierung nicht rezirkularisiert, wurden dessen Enden dephosphoryliert. So konnte nur dann eine Zirkularisation erfolgen, wenn das Vektorfragment über eine phosphorylierte Linker-DNA verbunden wurde. Pro μg DNA wurden 10u Alkalische Phosphatase eingesetzt und der Ansatz im vom Hersteller empfohlenen Puffer bei 37°C für 1h inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase durch 10-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

3.3.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Ein drei- bis fünffacher molarer Überschuß des Insert-Fragments zum Vektor-Fragment wurde mit 2u T4-DNA-Ligase im entsprechenden Puffer bei RT für mindestens 3h inkubiert, bei einem Gesamtvolumen von $10\mu\text{l}$. Dieser Ansatz wurde direkt zur chemischen Transformation kompetenter Zellen (3.2.2.1) eingesetzt.

3.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis & Fallona, 1987; Saiki *et al.*, 1988)

Durch selektive Amplifikation ermöglicht die PCR die Vervielfältigung kleinster Mengen DNA für analytische bzw. präparative Zwecke. Dabei wird doppelsträngige DNA hitzedenaturiert, so daß zwei kurze Oligonukleotid-Primer bei einer spezifischen Temperatur hybridisieren können (*Annealing*), die dann von einer thermostabilen DNA-Polymerase bei 72°C verlängert werden (*Extension*). Die neu synthetisierten Stränge stehen in der nächsten Amplifikationsrunde ebenfalls als Matrize zur Verfügung. So wird die von den Primern eingerahmte Sequenz idealerweise exponentiell vermehrt (Linz & Degenhardt, 1990).

In einem Gesamtvolumen von $50\mu\text{l}$ bzw. $100\mu\text{l}$ wurden ca. 10-20ng DNA-Matrize eingesetzt, sowie je 20-50pmol Primer, 50pmol dNTPs und zwischen 0,7 und 2u DNA-Polymerase. Die Reaktion wurde in dem zur DNA-Polymerase gehörenden Inkubationspuffer durchgeführt. Im PCR-Block wurden die Proben individuellen Temperaturzyklen ausgesetzt. In der Regel wurde für 30s bei 94°C denaturiert, 30s bei der für das Primer-Paar spezifischen Temperatur hybridisiert und $1^{\text{min}}/\text{kb}$ bei 72°C verlängert. Dieser Ablauf wurde 25 bis 30 mal wiederholt. Die *Annealing*-Temperatur wurde nach Chester & Marshak (1993) berechnet, wobei sowohl der GC-Gehalt als auch die Länge der hybridisierenden Bereiche der Primer berücksichtigt werden:

$$T_M = 69,3 + 0,41 \cdot (\% \text{ GC}) - 650/n \quad (3.2)$$

$$T_A = (T_{M1} + T_{M2})/2 - 3 \text{ } ^\circ\text{C} \quad (3.3)$$

T_M : Schmelztemperatur des Oligonukleotids [$^\circ\text{C}$]

T_A : *Annealing*-Temperatur [$^\circ\text{C}$]

% GC : GC-Gehalt des Oligonukleotids [%]

n : Anzahl der Nukleotide im Oligonukleotid

3.3.6 Kolonie-PCR

Um den Erfolg einer Transformation zu überprüfen, wurde eine PCR durchgeführt, der statt reiner DNA Zellen aus Kolonien zugesetzt wurden. Mit einer Pipettenspitze wurde ein Klon gepickt, in den PCR-Ansatz übertragen und gleichzeitig auf eine Agar-Platte überimpft. Der Ansatz wurde 2min bei 98°C erhitzt, so daß die Zellen aufgeschlossen und die DNA denaturiert wurde. Amplifiziert wurde wie in 3.3.5 beschrieben.

3.3.7 Einführen von Mutationen in Gene

3.3.7.1 Die “Megaprimer”-Methode (Sarkar & Sommer, 1990)

Die “Megaprimer”-Methode ist eine Form der DNA-Manipulation, die auf den Grundlagen der PCR aufbaut. Mit ihr lassen sich gerichtet Punktmutationen einführen. In einer ersten PCR wird der “Megaprimer” hergestellt, indem mit einem das Gen flankierenden und einem die Mutation enthaltenden Primer ein Fragment, der Megaprimer, amplifiziert wird. Dieser Megaprimer dient zusammen mit dem das Gen auf der anderen Seite flankierenden Primer zur Amplifizierung des gesamten Gens in einer zweiten PCR. Es ist von Vorteil den Mutationsprimer so zu definieren, daß eine Restriktionsschnittstelle wegfällt oder eine neue entsteht, weil dadurch die Identifizierung von Klonen mit mutationstragender Sequenz erleichtert wird.

Während die erste PCR zur Erstellung des “Megaprimers” nach beschriebener Methode (3.3.5) durchgeführt wurde, mußten bei der zweiten PCR die Zeiten für *Annealing* und *Extension* auf jeweils 1min festgelegt werden, um gute Ausbeuten an amplifizierter DNA zu erzielen.

3.3.7.2 *Splicing by Overlap Extension (SOE) -PCR*

Die SOE-PCR ähnelt der Megaprimer PCR. Hierbei werden jedoch in einer ersten PCR zwei sich überlappende „Megaprimer“ hergestellt, die in einer zweiten PCR als Matrize und Primer zugleich dienen. Zusätzlich werden endständige Primer eingesetzt, um eine maximale Ausbeute an Produkt zu erhalten.

3.3.7.3 Die *Quickchange-Methode*

Diese Methode erlaubt die Positions-spezifische Mutagenese einzelner Nukleotide eines Gens in einem doppelsträngigen Vektor. Die Mutagenese wurde wie in der Anleitung des „Quik-Change Mutagenesis-Kit“ von Stratagene beschrieben durchgeführt. Hierbei muss das zu mutagenisierende Gen bereits in einem Vektor kloniert vorliegen. Zunächst werden zwei gegenläufige, komplementäre Primer mit dem beabsichtigten Basenaustausch hergestellt; die veränderten Nukleotide liegen dabei in der Mitte der Primer. Anschließend wird eine PCR-Reaktion, bei der das gesamte Plasmid amplifiziert wird, durchgeführt. Dazu wurden in einem 50µl Ansatz 10% (v/v) *Pfu*-DNA-Polymerase-Puffer (10x), sowie 50ng DNA-Templat, je 125ng der Primer, 1mM dNTPs und 1u *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt. Nach einer Vordenaturierungsphase von 30s bei 95°C wurden 16 Zyklen mit je 30s bei 95°C, 1min bei entsprechender *Annealing*-Temperatur und $2^{\text{min}}/\text{kb}$ Plasmidlänge bei 68°C durchgeführt. Die *Annealing*-Temperatur wurde nach Gleichung (3.3) berechnet. Bei mehreren Nukleotidaustauschen wurde die Anzahl der Zyklen auf 18 erhöht, um eine bessere Ausbeute zu erzielen.

Anschließend wurde durch Zugabe von 10u *DpnI*, welches nur methylierte DNA spaltet, und Inkubation für 1h bei 37°C das Ursprungsplasmid verdaut. Von dem neu amplifizierten Plasmid wurden 10µl zur Transformation von chemisch-kompetenten *E.coli* DH5α Zellen (3.2.2.1) eingesetzt.

3.3.7.4 *DNA-Shuffling* (Stemmer, 1994a,b)

Zur Zufallsmutagenese eines Gens wurde das *DNA-Shuffling* in modifizierter Form angewandt (Volkov & Arnold, 2000). Zunächst wurde in einer ersten PCR (3.3.5) ausreichend Fragment für das weitere Verfahren hergestellt. Hierbei wurde wie in allen folgenden Schritten auch die *Taq*-DNA-Polymerase verwendet; da diese Polymerase

keine *proofreading*-Aktivität besitzt, werden bei der Amplifikation entstehende Mutationen nicht korrigiert. Als Templat diente das zu mutagenisierende Gen in einem geeigneten Vektor. Es wurden mehrere Amplifikationen mit Primern durchgeführt, die das Gen plus ca. 150bp Vektorsequenz auf beiden Seiten umschließen („äußere“ Primer). In einem nächsten Schritt wurde das erhaltene PCR-Produkt mit DNaseI gespalten, so daß 50-200bp Fragmente entstanden. Es wurden 0,2 bis 1,6u DNaseI pro 100µl PCR-Ansatz verwendet. Der Ansatz wurde 7min bei 20°C inkubiert und die Reaktion durch 20-minütiges Erhitzen auf 99°C abgestoppt. In einer anschließenden PCR wurden die Fragmente reassembliert, wobei sie sich selbst sowohl als Templat als auch als Primer dienten, so daß dem PCR-Mix nur noch dNTPs, Polymerase-Puffer und DNA-Polymerase zugegeben werden mußte. Bei dieser sogenannten *primerless*-PCR werden weitere Mutationen eingeführt, da es zu häufigen Primerverlängerungen durch die Polymerase kommt. Die *Annealing*-Temperatur wurde hierbei auf 52°C festgelegt, die Elongationszeit auf 70s und die Zyklenzahl auf 50 erhöht.

In einer abschließenden *primed*-PCR wurden vollständig assemblierte Gene amplifiziert, wobei zum Produkt aus der *primerless*-PCR das Gen unmittelbar flankierende („innere“) Primer in den Ansatz gegeben wurden. Das PCR-Programm entsprach wieder dem Standard (3.3.5). Die Produkte der einzelnen Schritte wurde mittels Agarosegelelektrophorese (3.3.10) analysiert.

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

3.3.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation) durch modifizierte alkalische Lyse

Der Mini-Präparation von Plasmid-DNA liegt das Prinzip der alkalischen SDS-Lyse (Le Gouill *et al.*, 1994) zugrunde. Hierbei werden die Zellen durch Zugabe von Natriumhydroxid und SDS aufgeschlossen und die Proteine sowie genomische DNA durch Neutralisation der Suspension unter Zugabe von Ammoniumacetat gefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt.

Von einer frischen üN-Kultur plasmidtragender Bakterien wurden 1,5ml abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 13.000Upm, 1min, RT). Das Pellet wurde in 100µl S1-Lösung des Nucleobond® AX-Kit (Machery-Nagel) resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 100µl S2-Lösung des Nucleobond® AX-Kit (Machery-

Nagel) für 5min bei RT lysiert. Durch Zugabe von 100µl S3-Lösung des Nucleobond® AX-Kit (Machery-Nagel) wurde der pH-Wert der Suspension neutralisiert und gleichzeitig Membranfragmente, chromosomale DNA, Proteine und SDS gefällt. Zur Extraktion von Proteinen wurden 300µl Chloroform hinzugegeben, die Lösung 30s geschüttelt und abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 13.000Upm, 3min, RT), und der plasmidhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt (3.3.1.1), bei RT getrocknet und in 30µl Wasser aufgenommen.

3.3.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen

Die präparative Reinigung erfolgte üblicherweise unter Verwendung des Nucleobond® AX-Kit von Machery-Nagel. Die plasmidtragenden Zellen einer 50ml üN-Kultur wurden geerntet (Eppendorf 5810 R, 4.000Upm, 10min, 4°C) und nach dem Protokoll für die Nucleobond®-Säule AX 100 nach dem Prinzip der alkalischen Lyse weiterverarbeitet.

3.3.9 Agarosegelelektrophorese

Im Agarosegel werden DNA-Fragmente ihrer Länge entsprechend aufgetrennt. Durch Zugabe des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid werden die Banden im Gel unter UV-Licht sichtbar (Sharp *et al.*, 1973).

Es wurden 1% bzw. 2,5% (^w/_v) Agarose in 0,5xTBE-Puffer unter Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5^{µg}/ml) zugesetzt, die Lösung in eine Gelschale bzw. auf eine saubere Glasplatte (die Oberflächenspannung ist ausreichend) gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt, der nach dem Erstarren wieder entfernt wurde. Das erkaltete Gel wurde in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 0,5xTBE Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit mindestens ¹/₅ Vol Sukrose-Farbmarker versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Feldstärke von 5 bis 10 ^V/_{cm}.

3.3.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA aus dem Gelstückchen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit® (Qiagen) nach Hersteller-Protokoll isoliert und gereinigt.

3.3.11 DNA-Sequenzierung

Die Nukleotidsequenz von Genen wurde durch Auftragssequenzierung des Service Labors des Zentrums für Molekulare Medizin Köln bestimmt. Dazu wurde das Kettenabbruchverfahren von Sanger *et al.* (1977) verwendet. In der Sequenzreaktion werden Fluoreszenzfarbstoff-markierte 2',3'-Dideoxynukleotide eingesetzt, welche zu 3'-terminal fluoreszenzmarkierten Einzelstrang-Abbruchfragmenten führen. Die so erhaltenen Fragmente werden über Gelelektrophorese aufgetrennt und können dann anhand des endständigen fluoreszierenden Nukleotids detektiert werden. In einem Ansatz dienten 200-500ng Plasmid-DNA als Matrize und es wurden 10 pmol Primer eingesetzt. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des GCG Wisconsin Package ausgewertet.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Expression und Anreicherung

3.4.1.1 Protein-Produktion in analytischem Maßstab ("Probeexpression")

Um zu testen, ob die Expression eines bestimmten Gens induziert werden kann und in welcher Fraktion des Zellextraktes sich das produzierte Protein anschließend befindet, wurden Präparationen in analytischem Maßstab durchgeführt. Hierzu wurden 20ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt, aus einer frischen üN-Kultur 1:100 inokuliert und bei 37°C und 150Upm geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde bei der Hälfte der Kultur die Genexpression mit 1mM IPTG induziert, während die andere Hälfte uninduziert blieb. Nach 4h Wachstum bei 37°C wurden die Zellen geerntet (Eppendorf 5810 R, 4 000Upm, 10min, 4°C). Das Pellet wurde in 1ml 10mM KP, pH 7,5 resuspendiert und die Zellen per Sonifikation (Stärke 1-2 (50%), 1min auf Eis) aufgeschlossen. Zur Analyse unlöslicher Bestandteile (Probe P = Pellet), wurden 100µl abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 13 000Upm, 10min) und das Präzipitat im gleichen Volumen 10mM KP, pH 7,5 aufgenommen. Zur Analyse der löslichen Fraktion (Probe CRX = *crude extract*) wurde die restliche Probe abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 13 000Upm, 10min) und der Überstand weiterverwendet. Alle Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit 2xSDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und

5min auf 100°C erhitzt. Die so behandelten Proben P, CRX und HS wurden mittels SDS-PAGE (3.5.1) analysiert.

3.4.1.2 Protein-Produktion in präparativem Maßstab

Zur präparativen Gewinnung der Proteine wurde 1l LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika in einem 3l Kolben aus einer frischen Vorkultur inokuliert, zu einer OD₆₀₀ von 0,6 herangezogen (37°C, 90Upm) und mit 1mM IPTG die Genexpression induziert. Nach 4h weiterem Wachstum wurden die Zellen geerntet (Sorvall/RC-5B, 4 000Upm, 30min, 4°C). Das Zellpellet (2-3g Nassgewicht) wurde mit 30 bis 60ml 10mM KP, pH 7,5 gewaschen und gegebenenfalls bei -20°C gelagert. Zum Zellaufschluß wurden die Zellen in 35ml des obigen Puffers aufgenommen und sonifiziert (Stärke 5 (50%), 2x2min auf Eis). Die Lösung wurde zentrifugiert (Sorvall/RC-5C, 12 000Upm, 5min, 4°C) und je nach Löslichkeit des zu reinigenden Proteins das Pellet (P) oder der Überstand (CRX) weiterverarbeitet.

3.4.2 Protein-Präparation aus der unlöslichen Zellfraktion

Befand sich das hergestellte Protein in der löslichen Fraktion des Zellextraktes (CRX), dann wurde dieser direkt für die Affinitätschromatographie verwendet (3.4.3.2). Befand sich das hergestellte Protein dagegen in der unlöslichen Fraktion (P) des Zellextraktes (*inclusion bodies*), so wurde es durch Solubilisierung in chaotropher Lösung und anschließende Rückfaltung zunächst schrittweise in eine lösliche Form überführt (Kleemann, 1995). Dazu wurde das Pellet nach zweimaligem Waschen mit 10mM KP, pH 7,5 in 10ml 6M Guanidinium-Chlorid (GdmCl) in 10mM KP, pH 7,5 aufgenommen und 30min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10ml 1M GdmCl in 10mM KP, pH 7,5 zugegeben und die Lösung durch Schwenken gemischt und für weitere 30min bei RT inkubiert und anschließend abzentrifugiert (Sorvall/RC-5C, 12000Upm, 30min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 50ml 2M GdmCl in 10mM KP, pH 7,5 gemischt. Daraufhin wurde die Lösung drei Mal gegen 5l 50mM KP, pH 7,5 dialysiert (3.4.3.1), wodurch das GdmCl praktisch vollständig entfernt und damit die Rückfaltung des Proteins induziert wurde. Das auf diese Weise in Lösung gebrachte Protein wurde durch Zentrifugation von dem unlöslichen Anteil getrennt.

3.4.3 Protein-Reinigung

3.4.3.1 Dialyse von Protein-Lösungen

Proteinlösungen wurden jeweils dreimal gegen einen mindestens 100-fachen Volumenüberschuß des Puffers dialysiert. Die Dialyse wurde in Spectra/Por[®]3 Dialyseschläuchen (mwco: 3,5 bzw. 10kDa) bei 4°C durchgeführt.

3.4.3.2 Perfusions-Chromatographie

Perfusions-Chromatographie erlaubt aufgrund der speziellen Porenstruktur des verwendeten Säulenmaterials hohe Flußraten ohne Verminderung der Auflösung oder der Kapazität (Vision User's Guide, 1997). Die Perfusions-Chromatographie wurde an der BioCAD[™] Sprint-Anlage (Perseptive Biosystems) mit einer Metall-Chelat-Affinitätssäule (Poros 20 MC, Vol = 7,9ml) durchgeführt. Poros 20 MC-Material besteht aus an Sepharose Fast Flow gebundenem Chelator Iminodiaktische Säure (IDA). IDA immobilisiert Metallionen (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} oder Fe^{3+}) an drei von sechs Koordinationsstellen, während die übrigen drei zur Komplexierung von Stickstoff- oder Schwefel-Atomen von Histidinen, Tryptophanen oder Cysteinen zur Verfügung stehen. Proteine mit einem N- oder C-terminalen Schwanz von sechs Histidinen ("His-Tag") binden, abhängig vom Metallion und vom pH-Wert des Puffers, sehr stark und spezifisch an das Material. Es dürfen jedoch keine chelatisierenden Stoffe wie EDTA oder reduzierende wie DTT in den Puffern enthalten sein, da ansonsten die Metallionen von der Säule entfernt oder zum elementaren Metall reduziert werden. In dieser Arbeit wurde mit Ni^{2+} als Metallion gearbeitet.

Nach Anschluß der Lösungen an das Gerät wurden die Schläuche kurz gespült. Anschließend wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina (SV) 1M NaCl behandelt, um eventuell vorhandenes "Altprotein" zu entfernen, und danach mit 10 SV 1M NaCl 50mM EDTA zur Entfernung restlicher Ni^{2+} -Ionen. Zur Entfernung des EDTA wurde die Säule mit Puffer gespült. Das Labeln der Säule erfolgte mit 150mM NiCl_2 -Lösung, die so lange durch das System gepumpt wurde, bis überschüssiges NiCl_2 als blaue Lösung in das Abfallbecherglas tropfte. Anschließend wurde mit 10 SV 1M NaCl gespült und mit 5 SV 100mM KP, pH 7,5 äquilibriert. Dann wurde die Reinigung mit einem definierten Programm gestartet. Dabei wurde nach kurzem Äquilibrieren die lösliche Fraktion des Zellextraktes (CRX) oder aus der unlöslichen Fraktion (P)

zurückgefaltetes Protein (3.4.2) auf die Säule aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit Äquilibrationpuffer wurde die Elution durch einen Imidazol-Gradienten induziert und über Absorptionmessungen bei 260 und 280nm verfolgt. Ein Waschschrift mit 1M NaCl und ein Regenerationsschrift mit Äquilibrationpuffer beendeten das Programm.

3.4.3.3 Präparative Gelfiltration

Zur Aufreinigung wurde ebenfalls eine Gelfiltration in präparativem Maßstab genutzt. Die Methode beruht auf dem Prinzip eines umgekehrten Molekularsiebes. Dabei passieren die Moleküle das poröse Säulenmaterial bei konstanter Flußrate, wobei kleine Moleküle wegen des größeren zur Verfügung stehenden Diffusionsraumes langsamer wandern und damit später eluieren als große. Präparative Gelfiltration wurde als letzter Schritt einer Reinigung durchgeführt, wenn das Protein schon relativ sauber war. Die Probe durfte nicht mehr als 1/100 des Säulenvolumens betragen, so daß sie gegebenenfalls vor Auftrag in den *Superloop* der FPLC-Anlage (Amersham Pharmacia Biotech) einkonzentriert werden mußte (3.4.4). Vom *Superloop* wurde die Probe auf die mit 50mM KP, 300mM KCl, pH 7,5 äquilibrierte Säule, eine HiLoad 26/60 Superdex[®]75 mit einem Volumen von 320ml (Pharmacia), gepumpt. Anschließend wurde mit einem Säulenvolumen des Äquilibrationpuffer eluiert, dabei betrug die Flußrate 0,5ml/min (Rückdruck: max. 0,3 mPa). Es wurden Fraktionen gesammelt, die mittels qualitativem Bradford-Assay (3.5.4.1) und SDS-PAGE (3.5.1) analysiert wurden.

3.4.4 Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden per Zentrifugation einkonzentriert. Dafür wurden, je nach Menge der Proteinlösung und Größe des Proteins, Centricon-10 (mwco: 10kDa), oder Centriprep-3 bzw. -10 (mwco: 3 bzw. 10kDa) (Amicon) nach Herstellerangaben verwendet.

3.4.5 Protein-Lagerung

Die konzentrierten Proteine wurden in flüssigen Stickstoff getropft und die gefrorenen Kügelchen bei -70°C gelagert.

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine werden durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und negativ geladen. Dabei bindet SDS an das Protein gewöhnlich in einem Verhältnis von einem Molekül SDS pro 1,4 Aminosäureresten. Die Eigenladung des Proteins kann neben der Negativladung des mit SDS komplexierten Proteins vernachlässigt werden, so daß SDS-beladene Proteine identische Ladungs-Masse-Verhältnisse zeigen. Die Auftrennung beruht daher allein auf dem Siebeffekt des Polyacrylamidgels, wobei die Proteine mit Geschwindigkeiten wandern, die dem Logarithmus ihrer Massen umgekehrt proportional sind (Laemmli, 1970).

Tabelle 3.1: Zusammensetzung 12,5%iger SDS-PAGE Gele

Die Mengenangaben gelten für 12 Gele

	Trenngel (12,5%)	Sammelgel (6%)
Trenn-/Sammelgel-Puffer	14,8ml	6,8ml
Acrylamid-SL (30%)	27,1ml	4,4ml
H ₂ O	23,0ml	15,2ml
TEMED	32,5µl	22µl
APS (250 ^{mg} /ml)	130µl	100µl

Es wurden standardmäßig 12,5%ige Polyacrylamidgele verwendet (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.1). Die Proben wurden vor dem Auftrag 1:1 mit 2x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt, 5min bei 100°C inkubiert und abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 13 000Upm, 1min). Von der Probe wurden 10µl in die Geltaschen aufgetragen und eine Spannung von 30mA angelegt. Die Dauer der Elektrophorese betrug 1-2h. Dann wurde das Gel mit SDS-PAGE Färbelösung für 15min angefärbt und anschließend durch mehrmaliges Aufkochen in Wasser (Mikrowellenherd, 600W, 3min) entfärbt.

3.5.2 Tris-Tricin Gele (Schägger & Jagow, 1987)

Diese hochprozentigen Gele dienen zur Auftrennung kleiner Proteine in einem Bereich von 1 bis 100kDa (Schägger & Jagow, 1987). Die Probenvorbereitung, das Färben und

Entfärben der Gele erfolgt wie bei der SDS-PAGE (3.5.1). Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 3.2 dargestellt. Tris-Tricin-Laufpuffer I wurde in die obere Elektrophoresekammer gefüllt, Tris-Tricin-Laufpuffer II in die untere. Die Laufzeit betrug 3-4h bei einer Spannung von 20mA.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung von Tris-Tricin Gelen

Die Mengenangaben gelten für 5 Gele

	Trenngel	Sammelgel
Tris-Tricin-Gel-Puffer	10ml	3,1ml
Acrylamid-SL (30%)	20ml	1,6ml
H ₂ O	-	7,6ml
TEMED	10µl	10µl
APS (250 ^{mg} /ml)	100µl	100µl

3.5.3 Trypsinspaltung

Die Serinprotease Trypsin spaltet spezifisch Peptidbindungen C-terminal von Lysin und Arginin (Hubbard, 1998). Die Spaltungen wurden in 1ml 50mM KP, pH 7,5 bei RT mit 1,6µg Trypsin durchgeführt, die Menge an Substrat-Protein betrug 150µg. Die Spaltungsreaktion wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten durch Zugabe eines identischen Volumens an 2xSDS-PAGE-Probenpuffer und fünfminütiges Erhitzen auf 100°C abgestoppt. Das Ergebnis der Spaltung wurde anschließend über Tris-Tricin-Gele analysiert.

3.5.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.5.4.1 Der Bradfordtest

Der Bradfordtest ist ein Verfahren zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts von wäßrigen Lösungen. Er beruht darauf, daß sich das Absorptionsmaximum einer sauren *Coomassie Brilliant Blue* G250-Lösung bei Bindung des Farbstoffes an Proteine von 465 auf 595 nm verschiebt (Bradford, 1976). Es handelt sich um eine unspezifische Bindung des Farbstoffes vorwiegend an kationische, nichtpolare und hydrophobe

Seitenketten. Die Intensitätszunahme der Farbreaktion ist über einen Bereich von 0,2-1,4mg Protein pro ml Lösung annähernd linear.

Es wurde der Protein-Assay Kit von Bio-Rad verwendet. Dabei wurden 200µl des *Coomassie*-Reagenz mit 800µl der Proteinlösung vermischt und nach ca. 5 min die Absorption der Lösung bei 595nm gemessen. Als Referenz wurde mit 200µl *Coomassie*-Reagenz versetzter Puffer verwendet. Eine Kalibrierungskurve wurde mit bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt. Es ist zu beachten, daß der Assay durch SDS (> 0,1 %) und starke Basen beeinflusst werden kann. Das Ergebnis ist jedoch auch abhängig von der Aminosäurezusammensetzung des Proteins, so daß die aus der BSA-Kalibrierungskurve abgeleiteten Protein-konzentrationen immer nur einen Anhaltspunkt darstellen.

3.5.4.2 UV-Absorption

Ultraviolettes (UV) Licht wird von den aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, sowie von Disulfidbrücken (Cystinen) in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 300nm unterschiedlich stark absorbiert. Aus der Aminosäuresequenz kann nach Pace *et al.* (1995) der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{280} und daraus, unter Einbeziehung des Molekulargewichtes, der spezifische Extinktionskoeffizient $^{0.1\%}A_{280}$ errechnet werden (Gleichung 3.4). Damit kann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt werden (Gleichungen 3.5). Absorption bei Wellenlängen größer als etwa 305nm geht auf Lichtstreuung zurück, um die die gemessene Absorption bei 280nm durch lineare Extrapolation korrigiert wurde.

$$^{0.1\%}A_{280} = \frac{\epsilon_{280}}{MW} = \frac{\sum \text{Trp} \cdot 5.500 + \sum \text{Tyr} \cdot 1.490 + \sum \text{Cystine} \cdot 125}{MW} \quad (3.4)$$

ϵ_{280} : Molarer Extinktionskoeffizient bei 280nm [$^1/M \text{ cm}$]

MW : Molekulargewicht des Proteins [$^g/mol$]

$$A = 0.1\% A_{280} \cdot c \cdot d \quad (3.5)$$

A : Absorption

$0.1\% A_{280}$: Spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280nm [cm^2/mg]

c : Proteinkonzentration [mg/ml]

d : Schichtdicke der Küvette [cm]

3.5.5 Analytische Gelfiltration

Mit Hilfe der analytischen Gelfiltrationschromatographie (GPC) läßt sich das apparente Molekulargewicht und somit auch der Oligomerisierungsgrad eines Proteins bestimmen. Die Methode beruht wie bereits erwähnt (3.4.3.3) auf dem Prinzip eines umgekehrten Molekularsiebes. Mit Hilfe von Kalibrierungsproteinen läßt sich das apparente Molekulargewicht bestimmen, da ein linearer Zusammenhang zwischen dem Elutionsvolumen und dem Logarithmus des Molekulargewichtes besteht.

Es wurde eine analytische Superdex[®]75-Säule HR10/30 (Pharmacia) mit einem Volumen von 24ml an einer BioCAD[™] Sprint-Anlage (Perseptive Biosystems) verwendet. Die Säulen wurden mit 50mM KP, 300mM KCl, pH 7,5 äquilibriert und zunächst mit Proteinen bekannten Molekulargewichtes kalibriert. Die Elution erfolgte mit einer Flußrate von $0,5\text{ml}/\text{min}$ und wurde durch Absorptionsmessung bei 280nm verfolgt. Aus den Elutionsvolumina der Kalibrierungsproteine lassen sich die Verteilungskoeffizienten K_{av} errechnen (Gleichung 3.6). Aus dem K_{av} -Wert des zu untersuchenden Proteins ergibt sich anhand der Kalibrierungsgeraden (Auftragung V_e gegen $\log\text{MW}$ der Kalibrierungsproteine) das apparente Molekulargewicht.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (3.6)$$

K_{av} : Verteilungskoeffizient

V_e : Elutionsvolumen des Proteins

V_t : Totalvolumen der Säule

V_0 : Ausschlußvolumen der Säule

3.5.6 Dynamische Lichtstreuung

Bei der dynamischen Lichtstreuung (DLS) wird die relative Bewegung von Makromolekülen in Bezug zum Lösungsmittel gemessen. In dieser Arbeit wurde DLS hauptsächlich verwendet, um die Monodispersität von Proteinlösungen, d.h. ihre Einheitlichkeit bezüglich Größe und Assoziationsgrad, zu testen. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Kristallisierbarkeit eines Proteins. Unter bestimmten Annahmen, welche vor allem eine sphärische Form des Moleküls voraussetzen, ist mittels DLS aber auch eine relativ verlässliche Abschätzung des Molekulargewichts globulärer Proteine möglich (Harding, 1997).

Bei der Messung wird Laserlicht auf eine Proteinlösung gerichtet und die Intensität des resultierenden Streulichtes mittels Photodetektor in einem oder mehreren Winkeln aufgenommen. Verursacht durch die Braunsche Molekularbewegung schwanken die Streuintensitäten mit der Zeit, wobei die Intensitätsfluktuationen von der Mobilität eines Proteinmoleküls abhängen. Größere oder asymmetrische Proteine, die sich langsamer bewegen, zeigen langsamere Fluktuationen als kleine oder globuläre Proteine. Aus den Meßdaten wird zunächst der translationale Diffusionskoeffizient (D_T) ermittelt und daraus dann der hydrodynamische Radius R_H berechnet:

$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot D_T} \quad (3.7)$$

R_H : hydrodynamischer Radius

k_B : Boltzmannkonstante

T : absolute Temperatur

η : Viskosität der Lösung

D_T : Translationaler Diffusionskoeffizient

Daraus wurde dann mit Hilfe einer Kalibrierungsgeraden mit globulären Proteinen als Standard das Molekulargewicht abgeschätzt.

Es wurde das DLS Photometer DynaPro 801 (ProteinSolutions) verwendet. Um die Proteinlösung von Staubpartikeln und größeren Aggregaten zu befreien, wurde sie vor Einfüllen in die Küvette filtriert (0,2 μ m). Die Messungen wurden mittels des Programms Dynamics durchgeführt und analysiert.

3.5.7 Fluoreszenz-Messungen

Die intrinsische Fluoreszenz eines Proteins beruht auf den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, wobei in der Regel die Tryptophanfluoreszenz dominiert. Sowohl die Intensität der Fluoreszenzemission als auch die Lage des Emissionsmaximums hängen stark von der unmittelbaren Umgebung des Chromophors ab. Liegt das Protein denaturiert vor und sind somit die Seitenketten der Tryptophane lösungsmittlexponiert, ist eine Rotverschiebung zu beobachten (Schmid, 1997): ein vollständig denaturiertes Protein hat ein Emissionsmaximum bei 350nm, während ein nativ gefaltetes Protein mit abgeschirmten Tryptophanen ein Emissionsmaximum zwischen 320 und 330nm aufweist. Die Messungen wurden an einem Fluoreszenz-Spektrometer Cary Eclipse (Varian) in einer vierseitig geschliffenen Quarzküvette durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 280nm (Tryptophan- und Tyrosinfloureszenz) oder 295nm (nur Tryptophanfluoreszenz) angeregt und das emittierte Signal in einem Bereich von 300 bis 450nm aufgenommen.

3.5.8 Circular Dichroismus-Messungen

Die Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie eignet sich besonders zu Untersuchungen von Proteinkonformationen. Bei dieser Methode wird die ungleiche Absorption von links- und rechtsdrehendem polarisiertem Licht optisch aktiver Substanzen ausgenutzt. Dabei sind die Chromophore entweder selbst asymmetrisch oder liegen in einer asymmetrischen Umgebung vor. Die Absorption im Wellenlängenbereich von 170 bis 250nm (Fern-UV CD) wird hauptsächlich von den Peptidbindungen bestimmt, so daß dieser Teil des Spektrums Aussagen über die Sekundärstruktur des Proteins ermöglicht. Die verschiedenen Sekundärstrukturelemente wie α -Helix, β -Faltblatt oder *Random-coil* besitzen sehr distinkte Fern-UV CD-Spektren (Johnson *et al.*, 1990). Aus diesen verschiedenen Signalen setzt sich ein Proteinspektrum zusammen (Stark, 1965), wobei α -Helices die anderen Strukturelemente in der Signalintensität übertreffen. Die Absorption im Bereich von 250 bis 320nm (Nah-UV CD) ist auf die aromatischen Aminosäuren zurückzuführen. Kleine Änderungen in der Umgebung der Chromophoren führen hierbei zu einer deutlichen Änderung des Signals. Das Nah-UV CD-Spektrum ist somit eine

empfindliche Methode zur Untersuchung der Tertiärstruktur von Proteinen (Schmidt, 1997).

Die CD-Messungen wurden an einem Jasco J-715 Spektralphotometer bei 22°C durchgeführt. Die Schichtdicke der Küvette betrug 0,1cm (Fern-UV CD) oder 1cm (Nah-UV CD). Das CD-Signal, gemessen als Elliptizität Θ_{obs} , wurde in Abständen von 1,0nm aufgenommen (Scan-Geschwindigkeit 20^{nm}/min, Mittelwertbildung aus 10 Spektren). Die Werte wurden in molare Elliptizität Θ umgewandelt, welche die Elliptizität einer 1^{dmol}/cm³ Lösung bei einer Schichtdicke von 1cm in Grad beschreibt. Die Werte im Fern-UV CD werden oft als Θ_{MRW} angegeben, was der durchschnittlichen molaren Elliptizität pro Aminosäurerest entspricht. Die Umrechnung erfolgte nach folgender Formel (Schmid, 1997):

$$[\Theta_{\text{MRW}}] = \frac{\Theta_{\text{obs}} \text{MRW}}{cd} = \frac{\Theta_{\text{obs}} \text{MW}}{cdN_A} \quad (3.8)$$

Θ_{MRW} : durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure [^{deg}*cm²/dmol]

Θ_{obs} : gemessene Elliptizität [mGrad]

MRW : mittleres Molekulargewicht der Aminosäuren [^g/mol]

c : Konzentration der Proteinlösung [^{mg}/ml]

d : Schichtdicke der Küvette [cm]

MW : Molekulargewicht des Proteins [^g/mol]

N_A : Anzahl der Aminosäuren

3.5.9 Stabilitätsuntersuchungen mittels chemischer Denaturierung

Zur Untersuchung der Stabilität von Proteinen gegenüber chaotropen Reagenzien, wurde natives Protein unterschiedlichen Konzentrationen an Denaturierungsmittel ausgesetzt. Bei weniger stabilen Proteinen wurde Harnstoff verwendet, während die Wildtypproteine HisA und HisF unter Verwendung des stärker denaturierenden Agens Guanidiniumchlorid entfaltet wurden. Dazu wurde aus einer Proteinlösung, einer Pufferstammlösung ohne Denaturierungsmittel (50mM KP, pH 7,5) und einer hochkonzentrierten Denaturierungsmittel-Lösung (10M urea bzw. 8M GdmCl in 50mM KP, pH 7,5) eine Meßreihe mit gleichbleibender Protein- aber ansteigender Denaturierungsmittelkonzentration erstellt. Die Auffaltungsexperimente fanden bei

Raumtemperatur statt. Die Einstellung des Gleichgewichts wurde durch Fluoreszenzmessung (3.5.6) nach mehreren Zeitpunkten überprüft. Veränderten sich die Messpunkte mit der Zeit nicht mehr, galt das Gleichgewicht als erreicht. Es wurde die relative Intensität der Emission nach Anregung bei 280nm bei derjenigen Wellenlänge gemessen, bei der die Differenz zwischen nativem und völlig denaturiertem Protein am größten war (ein Beispiel ist in Abbildung 3.2 gezeigt). Für HisA, in dem das einzige Tryptophan relativ lösungsmittlexponiert vorliegt, war dies bei einer Wellenlänge von 340nm, bei allen anderen untersuchten Varianten bei einer Wellenlänge von 320nm der Fall. Über die Fluoreszenzspektroskopie wurde die Entfaltung der Tertiärstruktur verfolgt. Um diese Ergebnisse mit der Entfaltung der Sekundärstruktur vergleichen zu können, wurden dieselben Proben mit CD-Spektroskopie (3.5.7) im Fern-UV-Bereich vermessen. Dabei wurden für jede Denaturierungsmittelkonzentration 10 Meßpunkte bei 222nm aufgenommen und gemittelt. Die Meßwerte wurden anschließend als Funktion der Konzentration an Denaturierungsmittel aufgetragen.

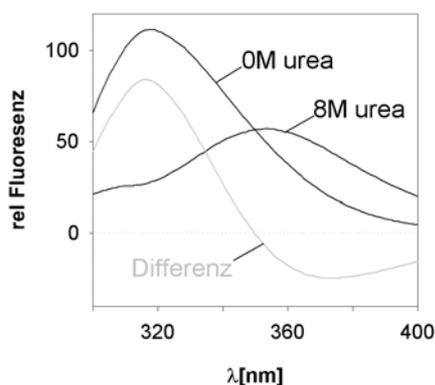


Abbildung 3.2: Vergleich der Fluoreszenzspektren von nativem und denaturiertem Protein am Beispiel von HisAF

Es wurden Fluoreszenzspektren von nativem (0M urea) und denaturiertem (8M urea) HisAF ohne His-Tag aufgenommen. Gezeigt sind die Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei einer Wellenlänge von 280nm. Die Differenz beider Spektren ist in grau gezeigt.

Um die Auffaltung der Tertiär- und Sekundärstruktur vergleichen zu können, wurden die Meßpunkte normiert. Dabei wurde angenommen, daß das Protein nur in zwei Zuständen vorliegt, entweder nativ (N) oder vollständig denaturiert (U).

Die Anteile an gefaltetem (F_N) und ungefaltetem Protein (F_U) summiert sich damit zu 1:

$$F_N + F_U = 1 \quad (3.9),$$

Damit lässt sich jeder Wert y im Diagramm beschreiben durch die Formel

$$y = y_N F_N + y_U F_U, \quad (3.10).$$

wobei y_N und y_U den für N bzw. U (bei der jeweiligen Konzentration an Denaturierungsmittel) typischen Signalwert darstellen. Durch Kombination der beiden Gleichungen 3.8 und 3.9 ergibt sich für F_U :

$$F_U = \frac{(y_N - y)}{(y_N - y_U)} \quad (3.11)$$

Die Änderung der y -Werte im Prä- bzw. Postübergangsbereich zeigt die Abhängigkeit von y_N bzw. y_U von der Denaturierungsmittelkonzentration an. Ist diese Abhängigkeit linear, dann lassen sich y_N und y_U mittels linearer Regression für jede Konzentration an Denaturierungsmittel ermitteln.

Aus der Analyse der Übergangsregion der Denaturierung kann die freie Enthalpie der Auffaltung errechnet werden. Dazu werden zunächst die Gleichgewichtskonstanten K bei den verschiedenen Denaturierungsmittelkonzentrationen ermittelt:

$$K = \frac{F_U}{F_N} = \frac{F_U}{1 - F_U} \quad (3.12)$$

Um den Fehler möglichst klein zu halten werden nur Werte für K zwischen 0,1 und 10 verwendet (Pace & Scholtz, 1997). Aus der Gleichgewichtskonstante bei einer gegebenen Konzentration an Denaturierungsmittel ergibt sich die entsprechende freie Enthalpie ΔG nach:

$$\Delta G = - RT \ln K \quad (3.13)$$

R: Gaskonstante ($8,314 \text{ J/Kmol}$)

T: Temperatur (298 K)

Trägt man die ΔG -Werte gegen die Denaturiermittelkonzentration auf, ergibt sich eine lineare Abhängigkeit. Durch Extrapolation läßt sich auf diese Weise die freie Enthalpie der Auffaltung in Wasser ($\Delta G(\text{H}_2\text{O})$) ermitteln. Allerdings ist dieser Wert mit Vorsicht zu betrachten, da durch die lange Extrapolation kleine Abweichungen der Steigung einen großen Fehler hervorrufen können. Aus diesem Grund wird immer auch die Steigung m angegeben, sowie die Konzentration an Denaturierungsmittel, bei der $F_N = F_U$. Sie wird als $[\text{D}]_{1/2}$ bezeichnet. Es bestehen folgende Beziehungen zwischen den verschiedenen Größen:

$$\Delta G = \Delta G(\text{H}_2\text{O}) - m[\text{D}] \quad (3.14)$$

$$[\text{D}]_{1/2} = \frac{\Delta G(\text{H}_2\text{O})}{m} \quad (3.15)$$

Für die Auffaltungen von HisA und HisF wurde Protein verwendet, das freundlicherweise von Ralf Thoma bzw. Nina Mohrlüder zur Verfügung gestellt wurde.

3.5.10 Differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC)

Bei der Differentiellen Scanning Kalorimetrie werden Proben elektrisch mit einer vorgegebenen Heizrate schrittweise erwärmt. Dabei werden eine Proben- und Referenzzelle simultan aufgeheizt. Vollzieht sich in der Meßzelle eine temperaturinduzierte Reaktion, führt dies zu einer minimalen Temperaturdifferenz ΔT . Ein solches Temperaturungleichgewicht zwischen Meß- und Referenzzelle wird von dem Gerät erkannt und der Heizstrom um ΔI korrigiert, so daß die Bedingung $\Delta T = 0$ eingestellt wird. Durch Registrierung von ΔI lassen sich somit thermotrophe Übergänge von Biopolymeren in Lösung, z.B. das „Aufschmelzen“ von Proteinstrukturen, nachvollziehen. Diese Methode kann Aufschluß geben über den Schmelzpunkt T_m von Proteinen (Temperatur, bei der $F_U = F_N = 0,5$), sowie die Enthalpieänderung während der thermischen Denaturierung und die Anreicherung von Auffaltungsintermediaten.

Die DSC-Messungen wurden an einem VP-DSC Microcalorimeter mit einer Scan-Rate von 60K/h durchgeführt. Es wurden circa 40 μ M Protein in 50mM KP, pH 7,5 eingesetzt und gegen Puffer gemessen.

3.5.11 *Steady state*-Enzymkinetik von HisA und HisF

Die Messungen der HisA- und HisF-Aktivitäten wurden mit einem gekoppelten Test durchgeführt, wobei die HisA-Reaktion der HisF-Reaktion vorangestellt ist (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001; Henn-Sax *et al.*, 2002). Dies bedeutet, daß das HisF-Substrat 5'-PRFAR durch HisA als Hilfsenzym aus 5'-ProFAR *in situ* synthetisiert wird bzw. das HisA-Produkt 5'-PRFAR durch HisF als Hilfsenzym rasch weiter umgesetzt wird.

Die Kopplung der Reaktionen ist notwendig, weil (a) das HisF-Substrat 5'-PRFAR extrem labil ist und deshalb nicht isoliert und gelagert werden kann und (b) da die Umsetzung von 5'-ProFAR zu 5'-PRFAR, katalysiert durch HisA, spektroskopisch nicht detektierbar ist. Erst die HisF-Reaktion von 5'-PRFAR zu AICAR und ImGP läßt sich durch einen Abfall der Absorption bei 300nm verfolgen und mit $\Delta\epsilon_{300}(5'-PRFAR-AICAR) = 5,64\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ quantifizieren (Klem & Davisson, 1993).

Die Messungen wurden in einem Volumen von 1ml bei RT in 50mM Tris/Cl, pH 8,0 in einer Quarzküvette an einem Cary 100 Spektrophotometer (Varian) durchgeführt. Alle Proben enthielten 50mM NH_4Cl , $1\mu\text{M}$ des Hilfsenzym (HisA oder HisF) und $10\mu\text{M}$ 5'-ProFAR. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe der jeweils untersuchten Proteinvariante. 5'-ProFAR wurde nach einer Vorschrift von Davisson *et al.* (1994) enzymatisch hergestellt und gereinigt. Seine Konzentration wurde durch Absorptionsmessung bei 300nm bestimmt: $\epsilon_{300}(5'-ProFAR) = 6,069\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Klem & Davisson, 1993). Der Quotient A_{290}/A_{260} gibt Auskunft über die Reinheit von 5'-ProFAR und beträgt idealerweise 1,24. HisA wurde freundlicherweise von Ralf Thoma und HisF von Nina Mohrlüder zur Verfügung gestellt. Am Ende der Messung wurde durch Zugabe von Wildtyp-HisA bzw. -HisF das Substrat vollständig umgesetzt und damit auch die Reaktionsbedingungen überprüft.

3.5.12 Ligandenbindung

3.5.12.1 Bindung von 5'ProFAR

Die Bindung von 5'ProFAR, dem Substrat von HisA, an HisF konnte in der Variante HisF_F23W_W156F über die Verschiebung des Emissionsmaximums des einzigen Tryptophanrest in der Nähe des aktiven Zentrums fluorimetrisch detektiert werden

(Haeger, 2001). In dieser Arbeit wurde in analoger Weise HisAF_F27W_W156F mit 5'ProFAR titriert, um die Bindung fluorimetrisch zu verfolgen.

Die Konzentration von 5'ProFAR wurde spektroskopisch mit $\epsilon_{300}(5'\text{-ProFAR}) = 6,069 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmt (Klem & Davisson, 1993).

Die Messungen wurden in einem Volumen von 1ml bei RT in 50mM KP, pH 7,5 in einer vierseitig geschliffenen Quarzküvette an einem Cary ECLIPSE Fluoreszenzspektrometer (Varian) durchgeführt. 10 μM HisAF_F27W_W156F wurden vorgelegt und mit 5'ProFAR in 2,5 μM -Schritten bis zu einer Konzentration von 20 μM bzw. 100 μM titriert. Nach jedem Titrationsschritt wurde 30s gewartet und anschließend nach Anregung bei 295nm ein Emissionsspektrum von 300 bis 400nm aufgenommen.

3.5.12.2 Bindung von rCdRP

Reduziertes CdRP (rCdRP) ist ein Produktanalogon des Enzyms Phosphoribosylanthranilat Isomerase (TrpF; Bisswanger *et al.*, 1979), dessen Bindung über Förster-Transfer (Fluoreszenzenergietransfer) von intrinsischer Tryptophanfluoreszenz auf das aromatische Ringsystem von rCdRP verfolgt werden kann (Hommel *et al.*, 1995; Henn-Sax *et al.*, 2002). Durch Titration von HisA mit rCdRP konnte eine Bindung nachgewiesen und die thermodynamische Bindungskonstante K_d ermittelt werden (Leopoldseder, 2002). Analog wurde eine Titration von HisAF mit rCdRP durchgeführt.

Die Konzentration von rCdRP wurde durch Absorptionsmessung mit $\epsilon_{327}(\text{rCdRP}) = 3,43\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ermittelt. Der Quotient A_{252}/A_{278} gibt Auskunft über die Reinheit von rCdRP, er liegt für sauberes rCdRP bei 25 (Bisswanger *et al.*, 1979).

Die Messungen wurden in einem Volumen von 1ml bei RT in 50mM Tris/Cl, pH 7,5 in einer vierseitig geschliffenen Quarzküvette an einem Cary ECLIPSE Fluoreszenzspektrometer (Varian) durchgeführt. 5 μM HisAF wurden vorgelegt und mit rCdRP in Schritten von 1 bis 60 μM titriert. Nach jedem Titrationsschritt wurde 30s gewartet und anschließend nach Anregung bei 280nm ein Emissionsspektrum von 300 bis 450nm aufgenommen. Mit zunehmender rCdRP Konzentration nahm die Tryptophanfluoreszenz von HisAF bei 320nm ab und die rCdRP-Fluoreszenz bei ca. 415nm zu. Die Fluoreszenzintensität bei 320nm wurde über eine Minute gemittelt und nach Abzug des Nullwerts (Enzym in Puffer) gegen die rCdRP-Konzentration

aufgetragen. Durch einen Computerfit der resultierenden hyperbolischen Bindungskurve (Sigma Plot) wurde K_d^{rCDRP} errechnet.

3.6 Bioinformatische Methoden

3.6.1 PSI-BLAST (*Position Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool*)

Dieses Programm gehört zum NCBI-Toolkit (Altschul *et al.*, 1990), welcher Suchprogramme zur Detektion von Ähnlichkeiten zwischen Protein- oder Gensequenzen in einer gegebenen Protein- oder DNA-Datenbank enthält. Zusätzlich werden statistische Bewertungen der gefundenen Homologien geliefert.

Die Basis bildet das Programm BLAST (blastp: Suche einer Proteinsequenz gegen eine Proteinsequenz-Datenbank), das einen heuristischen Algorithmus benutzt, um lokale Sequenzähnlichkeiten zu entdecken. Dazu werden Fragmente gleicher Länge (3 Aminosäuren) aus Such- und Datenbanksequenz miteinander aligniert und bewertet. Wird ein gewisser Schwellenwert überschritten, werden die Fragmente (*Maximal Scoring Pairs*) soweit erweitert und miteinander vereinigt bis eine maximale Punktzahl erreicht wird. Diese lokalen Alignments werden auch HSP (*High Scoring Pairs*) genannt.

PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997) erstellt ergänzend zum herkömmlichen BLAST aus dem multiplen Alignment der gefundenen HSP einer Gapped BLAST Suche (Erstellung von Alignments, die Lücken enthalten dürfen) ein Profil (*Position Specific Scoring Matrix* - PSSM). Die Matrize besitzt die Dimension $L \times 20$ und gibt für jede Position des Alignments der Länge L die Wahrscheinlichkeiten für das Vorkommen jeder der 20 Aminosäuren an. Dieses Profil wird dann für eine weitere BLAST-Suche verwendet. Durch diese iterative Strategie wird die Sensitivität der Suche erhöht.

3.6.2 HMMer (*profile hidden Markov models*)

Dieses Programmpaket (Eddy, 1998) ermöglicht die Erstellung von *hidden Markov models* (HMM), ähnlich der oben erwähnten PSSM. Die HMM Profile repräsentieren Alignments durch Wahrscheinlichkeiten, die Lücken im Alignment berücksichtigen und damit die Sensitivität des Profils erhöhen. Mit diesen HMM werden weitere, dem Profil ähnliche Sequenzen aus einer Sequenzdatenbank gesucht.

3.6.3 DALI (*Distance matrix Alignment*)

Dieser Server (Holm & Sander, 1996; www.ebi.ac.uk/dali) dient zum Vergleich einer Proteinstruktur gegen eine Datenbank, die Strukturen aus PDB (*Protein Data Bank*, Bernstein *et al.*, 1977) enthält. Ausgegeben wird eine Datei mit einem multiplen Strukturalignment, das in der Datenbank gefunden wurde. Dazu werden der RMSD und ein sogenannter Z-Score angegeben, der die statistische Signifikanz des gefundenen Alignments angibt. Dieser Wert beruht dabei alleine auf der Superpositionierung der Strukturen. Ein Z-Score größer als 3,6 wird als signifikant angesehen.

Der Algorithmus errechnet eine Matrize, die die Abstände zwischen den C_{α} -Atomen zweier Strukturen enthält, und in einem weiteren Schritt in kleinere Matrizen gleicher Größe unterteilt wird, die sich überlappen dürfen. Jede dieser Matrizen entspricht damit einem Alignment von Fragmenten der zu vergleichenden Strukturen. Dann werden einzelne Matrizen, die sich überlappen, wieder zu einem gesamten Alignment zusammengesetzt und optimiert. Der Vorteil dieses Algorithmus beruht darauf, daß Lücken in den Sequenzen und Änderungen in der Reihenfolge der Sekundärstrukturen erkannt und berücksichtigt werden. Des weiteren liefert dieser Algorithmus nicht nur die beste Lösung des Alignments, sondern auch weitere Möglichkeiten für Superpositionierungen.

3.6.4 STAMP (*Structural Alignment of Multiple Proteins*)

Dieses Programmpaket (Russell & Barton, 1992) dient dem Alignieren von Proteinstrukturen aufgrund ihrer räumlichen Struktur. Das Ergebnis einer Suche besteht aus einem multiplen Alignment der Proteinsequenzen, das auf der bestmöglichen räumlichen Überlagerung der Strukturen beruht. Des weiteren werden die Koordinaten für die Superpositionierung der Strukturen angegeben, sowie die Statistiken für jede Superpositionierung, um die Güte der Übereinstimmungen abschätzen zu können.

Das Programmpaket beruht auf einem Algorithmus, der jeweils die Übereinstimmung der Superpositionierung zweier C_{α} -Atome in zwei Proteinstrukturen als eine Wahrscheinlichkeit ausdrückt (Rossmann & Argos, 1976; Russell & Barton, 1992). Daraus werden zwei Datensätze errechnet: ein Sequenzalignment und eine veränderte

Superpositionierung der Strukturen. Da sich die räumliche Anordnung der Strukturen damit geändert hat, werden die Wahrscheinlichkeiten für die Übereinstimmung der Positionen der C_{α} -Atome neu berechnet. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis eine optimale Lösung für das Sequenzalignment und die Superpositionierung erreicht wird.

Das Programm liefert als Statistik neben den RMSD-Werten auch eine Bewertung für die Ähnlichkeit der Strukturen (S_c -Wert), die neben der Superpositionierung der Strukturen auch auf dem darauf basierenden Sequenzalignment beruht.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Evolutionäre Verwandtschaft der Halb-Barrel mit anderen Proteinen (Höcker *et al.*, 2002)

Strukturelle und experimentelle Evidenzen weisen darauf hin, daß das häufig auftretende, vielseitige $(\beta\alpha)_8$ -Barrel aus einem Vorläufer halber Größe entstanden ist, bestehend aus vier $(\beta\alpha)$ Einheiten, die durch Dimerisierung stabilisiert wurden (Lang *et al.*, 2000; Höcker *et al.*, 2001a). Die Hypothese eines unabhängig evolvierenden Halb-Barrels würde stark unterstützt werden durch die Identifikation äquivalenter Domänen in anderen Proteinstrukturen als dem $(\beta\alpha)_8$ -Barrel.

Mit Hilfe intensiver Datenbanksuchen basierend sowohl auf Sequenz- als auch Strukturvergleichen sollten mögliche evolutionäre Verwandtschaften aufgespürt werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden in Kooperation mit Steffen Schmidt (EMBL Heidelberg) durchgeführt und sind in FEBS Letters 510, 133-135 (Höcker *et al.*, 2002) veröffentlicht.

4.1.1 Datenbankanalyse hinsichtlich Halb-Barrel ähnlicher Strukturen

Zunächst wurden unter Verwendung der Programme HMMer (3.6.2; Eddy, 1998) und PSI-BLAST (3.6.1; Altschul *et al.*, 1997) zugängliche Datenbanken nach Proteinen abgesucht, welche eine signifikante Sequenzähnlichkeit zu HisF-N oder HisF-C aufweisen. Diese spezifischen Methoden identifizierten jedoch nur andere $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme. Zwar bestimmt die Aminosäuresequenz die Struktur eines Proteins, aber die Tatsache, daß zwei Proteine keine signifikante Sequenzidentität aufweisen, schließt dagegen noch nicht deren evolutionäre Verwandtschaft aus (Hadley & Jones, 1999; Lichtarge, 2001). In der Natur wird auf strukturelle und funktionelle Integrität selektiert und nicht auf die Konservierung der Aminosäuresequenz (Dietmann & Holm, 2001). Um also weiter entfernte Verwandte der Halb-Barrel zu finden, wurde ein strukturbasiertes Alignment mit dem Programm DALI (3.6.3; Holm & Sander, 1993) durchgeführt. Dabei wurden die Koordinaten von HisF-N und von HisF-C, wie

sie im Gesamtmolekül vorliegen, mit den Koordinaten aller Strukturen in der *Protein Data Bank* (Berman *et al.*, 2000) verglichen. Es ergaben sich signifikante Treffer, nicht nur zu HisA, HisF und anderen $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen, sondern auch zu Proteinen mit der Flavodoxin-ähnlichen Faltung. Dabei wurden Z-Scores größer 6, sowie Aminosäure-Sequenzidentitäten von bis zu 22% erreicht (Tabelle 4.1). Die Signifikanz dieser Werte (Hadley & Jones, 1999; Lichtarge, 2001) deutet auf eine evolutionäre Verwandtschaft der Halb-Barrel mit der Flavodoxin-ähnlichen Faltung hin.

Tabelle 4.1: DALI-Suche mit den HisF-N und HisF-C Halb-Barrel-Proteinen identifizieren signifikante Strukturähnlichkeiten zu anderen $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Proteinen und Enzymen der Flavodoxin-ähnlichen Faltung (aus Höcker *et al.*, 2002)

Z-Score: relatives Maß für die Signifikanz eines Treffers, SeqID (%): prozentualer Anteil der Aminosäure-Sequenzidentität an äquivalenten Positionen, PEP Mutase: Phosphoenolpyruvat Mutase (PDB: 1pym), *NarL*: Nitrit Response Regulator (PDB: 1a04), *MMCoA*: Methylmalonyl-CoA Mutase (PDB: 1req), DHODA: Dihydroorotat Dehydrogenase A (PDB: 2dor), MLE: Muconat laktonisierendes Enzym (PDB: 1muc).

	Treffer #	Z-Score	SeqID (%)
HisF-N vs.			
HisF-N	1	26,5	100
HisF	2	22,1	99
HisA	3	11,3	24
PEP Mutase	4	6,4	12
<i>NarL</i>	5	6,4	19
<i>MMCoA</i>	6	6,3	22
HisF-C vs.			
HisF-C	1	28,0	100
HisF	2	20,8	100
HisA	3	9,5	19
<i>MMCoA</i>	4	6,4	9
DHODA	5	5,3	11
MLE	6	5,2	12

4.1.2 Die $(\beta\alpha)_4$ Halb-Barrel Struktur im Vergleich mit der Flavodoxin-ähnlichen Faltung

Die Flavodoxin-ähnliche Faltung ist eine $(\beta\alpha)_5$ -Faltung, welche aus fünf parallelen β -Strängen und fünf α -Helices besteht, die durch Schleifen miteinander verbunden sind. Diese häufig gefundene Struktur tritt sowohl als isolierte Domäne als auch als Teil von Multi-Domänen-Enzymen auf (Murzin *et al.*, 1995). Strukturvergleiche mit DALI (3.6.3; Holm & Sander, 1993) und STAMP (3.6.4, Russell & Barton, 1992) zeigen deutlich, daß vier der fünf $(\beta\alpha)$ -Module der Flavodoxin-ähnlichen Faltung mit den vier $(\beta\alpha)$ Einheiten der Halb-Barrel korrespondieren. Als Beispiel ist die Analogie der Topologien (Abbildung 4.1A) sowie die Superpositionierung (Abbildung 4.1B) der Methylmalonyl CoA Mutase (MMCoA, PDB: 1req) mit HisF-C gezeigt. Das zweite $(\beta\alpha)$ Modul, entsprechend α_1 und β_2 , befindet sich an analoger Position zu einem kurzen zusätzlichen doppel-strängigen β -Faltblatt der Halb-Barrel von HisA und HisF, welches in den Schleifen nach β -Strang 1 bzw. 5 liegt (Lang *et al.*, 2000). Wie die Superpositionierung des Rückgrades von HisF-C mit dem der $(\beta\alpha)$ Einheiten 1, 3, 4, und 5 von MMCoA zeigt (Abbildung 4.1B), sind die Strukturen sehr ähnlich, es ergibt sich ein RMSD-Wert von 1,6Å für 67 C_α -Atome.

In Abbildung 4.1C ist ein Struktur-basiertes Alignment der Halb-Barrel von HisA und HisF mit Flavodoxin-ähnlichen Domänen aus den Enzymen CheY (Response Regulator in Chemotaxis) aus *Thermotoga maritima*, NarL (Nitrit Response Regulator) aus *Escherichia coli* und MMCoA aus *Propionibacterium shermanii* gezeigt. Es unterstützt deutlich die Äquivalenz der einzelnen Sekundärstruktur-elemente der verschiedenen Enzyme. Zusätzlich wird deutlich, daß eine Anzahl konservierter Aminosäuren, die essentiell für die jeweiligen Enzymfunktionen sind, an strukturell äquivalenten Positionen in den Halb-Barreln und Flavodoxin-ähnlichen Enzymen liegen. Bei allen bekannten $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen finden sich die aktiven Reste am C-terminalen Ende der β -Stränge oder in den darauf folgenden Schleifen (Höcker *et al.*, 2001b). In HisA und HisF liegen die zwei katalytisch essentiellen Aspartate am Ende von β -Strang 1 und 5 (Lang *et al.*, 2000; Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Diese Aspartate überlagern mit dem konservierten Aspartatrest am C-terminalen Ende des β -Strang 1 von CheY und NarL, welcher für die Bindung eines essentiellen Mg^{2+} -Ion an das aktive Zentrum notwendig ist (Lukat *et al.*, 1990).

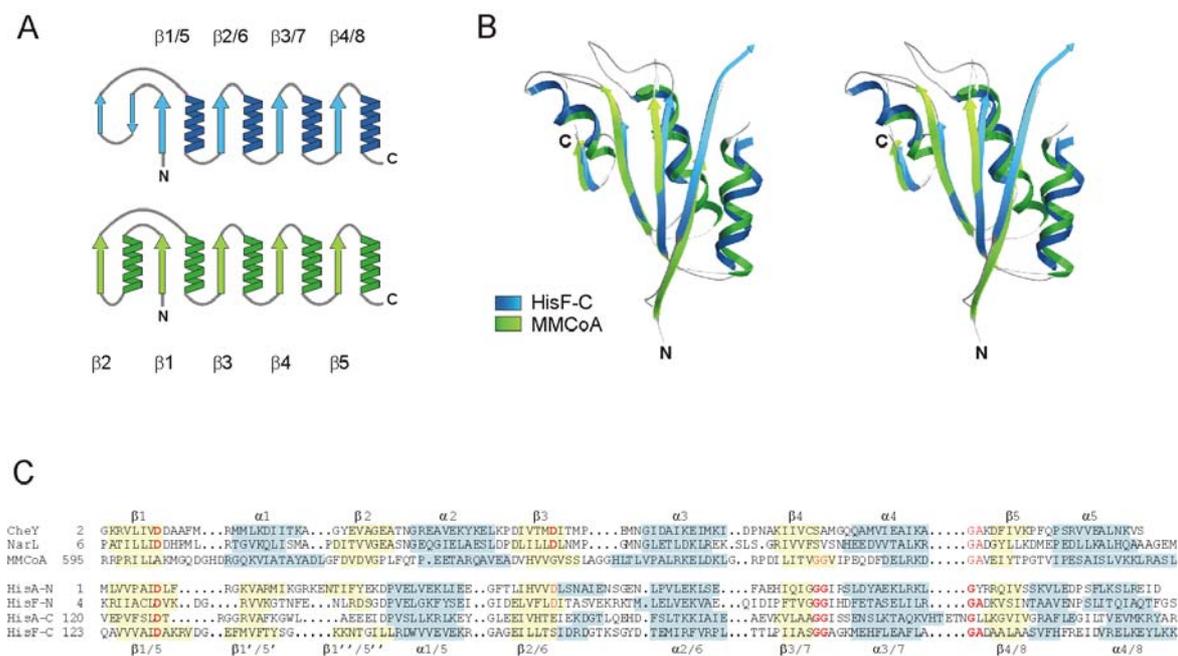


Abbildung 4.1: Strukturelle Ähnlichkeiten der Halb-Barrel mit Proteinen der Flavodoxin-ähnlichen Faltung (aus Höcker *et al.*, 2002)

A: Topologisches Diagramm der N-terminalen ($(\beta\alpha)_{1-4}$) und C-terminalen ($(\beta\alpha)_{5-8}$) Halb-Barrel (in blau) und der Flavodoxin-ähnlichen ($(\beta\alpha)_5$ -Faltung (in grün). B: Superpositionierung des Ribbon-Diagramms (in Stereo) von HisF-C aus *Thermotoga maritima* (in blau) und der Flavodoxin-ähnlichen Domäne der Methylmalonyl-CoA Mutase (MMCoA) aus *Propionibacterium shermanii* (in grün). Die Superpositionierung wurde mit dem Programm STAMP (Russell & Barton, 1992) durchgeführt, es ergab sich ein RMSD-Wert von 1,6Å für 67 C_α -Atome. Das zusätzliche zwei-strängige β -Faltblatt von HisF-C und die korrespondierenden Elemente α -Helix 1 und β -Strang 2 von MMCoA (siehe A), sowie die C-terminalen Helices wurden der Übersicht halber weggelassen. C: Struktur-basiertes Aminosäuresequenz-Alignment der Flavodoxin-ähnlichen Domänen CheY aus *T. maritima*, NarL aus *E.coli*, MMCoA aus *P. shermanii* mit den N- und C-terminalen Halb-Barrel-Proteinen HisA-N, HisF-N, HisA-C und HisF-C. Aminosäurereste, die für die Funktion des Enzyms essentiell sind, sind in rot und fett markiert, die entsprechenden Reste in den alignierten Enzymen in mattem rot. Aminosäuren, die zu β -Strängen und α -Helices gehören, sind gelb bzw. blau hinterlegt.

Ebenso ist das Aspartat am C-terminalen Ende des β -Strang 3 in CheY und NarL, dessen Phosphorylierung zur Aktivierung des Proteins im Zwei-Komponenten-System führt (Stock *et al.*, 2000), an äquivalenter Position eines konservierten Aspartat am C-terminalen Ende des β -Strang 3 in HisA-N und HisF-N zu finden. Darüber hinaus sind zwei Glycin-reiche Bereiche zwischen β -Strang 3/7 und 4/8, von denen einige für die Bindung der Phosphatanteile der bis-phosphorylierten Substrate von HisA und HisF verantwortlich sind (Thoma *et al.*, 1998), teilweise in CheY, NarL und MMCoA konserviert (Abbildung 4.1C).

4.1.3 Ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung zweier elementarer Enzym-Faltungen

Um den gemeinsamen evolutionären Ursprung zweier Proteine zu untermauern, ist ein umfassender Vergleich von Sequenz, Struktur und Funktion notwendig (Grishin, 2001). Die oben präsentierten Ergebnisse zeigen, daß die Strukturen der HisF-N und HisF-C Halb-Barrel eine auffallende Ähnlichkeit zu einer Reihe von Proteinen aufweisen, welche die Flavodoxin-ähnliche Faltung annehmen (Tabelle 4.1, Abbildung 4.1A, B). Hinzu kommt die lokale Konservierung von Aminosäureresten, die für die katalytische Aktivität essentiell sind (Abbildung 4.1C). Diese Ähnlichkeiten deuten auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung der $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barrel mit Proteinen der Flavodoxin-ähnlichen Faltung hin. Es ist nicht verwunderlich, daß keine allumfassende Sequenzidentität zwischen den beiden Faltungen besteht, wenn man die geringe Sequenzidentität zwischen verschiedenen $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen bedenkt, die meist nicht einmal mit sensitiven Methoden zu detektieren sind (Copley & Bork, 2000). Zum Beispiel zeigen die drei letzten Enzyme der Tryptophanbiosynthese, welche evolutionär verwandte $(\beta\alpha)_8$ -Barrel mit phosphorylierten Substraten darstellen, eine detektierbare Sequenzidentität nur im Bereich der Phosphatbindestellen (Wilmanns *et al.*, 1991). Der auffallendste Unterschied der beiden Faltungstypen ist die Anwesenheit eines zusätzlichen $(\beta\alpha)$ Moduls in der Flavodoxin-ähnlichen Faltung, welches einem zwei-strängigen β -Faltblatt in den Halb-Barrel-Proteinen von HisA und HisF entspricht (Lang *et al.*, 2000; Abbildung 4.1A). Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß ein Aminosäureaustausch ausreicht, um einen β -Strang in eine α -Helix an der Monomer-Monomer Grenzfläche des dimeren Arc-Repressor Proteins umzuwandeln (Cordes *et al.*, 1999). Ein analoges Ereignis könnte zu dem beobachteten Unterschied zwischen $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barrel-Proteinen und Proteinen der Flavodoxin-ähnlichen Faltung geführt haben. Die Abschirmung der hydrophoben Innenseite der Halb-Barrel vom Lösungsmittel wurde infolgedessen entweder durch Dimerisierung erreicht, wie bei den HisF-Hälften beobachtet (Höcker *et al.*, 2001), oder durch ein fünftes $(\beta\alpha)$ Modul, wie für die Flavodoxin-ähnlichen Proteine beobachtet. Die daraus resultierenden stabilen Faltungen finden sich in einer breiten Vielfalt heutiger Einzel- und Multi-Domänen Enzyme.

4.2 Duplikation der $(\beta\alpha)_4$ -Hälften von HisF und Optimierung hinsichtlich einer kompakteren Barrel-Struktur

In diesem Teil der Arbeit sollten die Ereignisse nach der postulierten Duplikation und anschließenden Fusion zweier $(\beta\alpha)_4$ -Module zu einem $[(\beta\alpha)_4 - (\beta\alpha)_4]$ kodierenden Gen in aufeinander folgenden Schritten rekonstruiert werden. Diese beinhalten Mechanismen der Anpassung der Kontaktflächen der Hälften aneinander, sowie der Stabilisierung und Kompaktierung der Struktur. Ziel ist es demnach, ausgehend von einer HisF-Hälfte, ein monomeres, stabiles, kompaktes und aktives $(\beta\alpha)_3$ -Barrel zu erzeugen.

In einem ersten Schritt (die Duplikation und Fusion der Hälften imitierend) wurden durch rekombinante DNA-Technologie zwei Kopien von HisF-N bzw. HisF-C hintereinander gesetzt und über einen kurzen, flexiblen Linker, GlySerGly, kovalent verbunden (HisF-NN bzw. HisF-CC). Die entsprechenden Gene wurden mittels des pET-Systems überexprimiert und die Proteinprodukte gereinigt und biophysikalisch charakterisiert. Dabei interessierten die Konformation, Stabilität, Löslichkeit und der Oligomerisierungszustand. In einem nächsten Schritt wurde versucht mittels rationalem Design der Kontaktflächen stabilere und kompaktere HisF-NN und HisF-CC Varianten herzustellen. Zudem wurde ein Assay zur Selektion von Proteinen mit erhöhter Löslichkeit getestet und für dieses System angepaßt. Gleiches gilt für ein System zur Selektion auf katalytische Aktivität.

4.2.1 Klonierung der Konstrukte HisF-NN, HisF-NwNw und HisF-CC

Zunächst wurden die Gene der HisF-Hälften HisF-N (Methionin 1 bis Aspartat 119, entsprechend β -Strang 1 bis einschließlich α -Helix 4) und HisF-C (Glutamin 123 bis Leucin 253) mittels PCR mit den Primerpaaren 5'*hisF-N*₂(*Bam*HI) und 3'*hisF-N*₂(*Xho*I) bzw. 5'*hisF-C*₂(*Bam*HI) und 3'*hisF-C*₂(*Xho*I) vom Plasmid sk+/III P-P (2.2.2) amplifiziert, wobei entsprechende Schnittstellen eingeführt wurden. Die amplifizierten Fragmente wurden jeweils als C-terminale Teile über *Bam*HI und *Xho*I in den Vektor pET24a(+) kloniert, wodurch pET24a(+)-*hisF-N*₂ bzw. pET24a(+)-*hisF-C*₂ entstanden. In einem zweiten Schritt wurden die mit den Primerpaaren 5'*hisF-N*₁(*Nde*I) und 3'*hisF-N*₁(*Bam*HI) bzw. 5'*hisF-C*₁(*Nde*I) und 3'*hisF-C*₁(*Bam*HI) amplifizierten Hälften als N-terminale Teile über *Nde*I und *Bam*HI in pET24a(+)-*hisF-*

N_2 bzw. pET24a(+)-*hisF*-C₂ kloniert, wodurch pET24a(+)-*hisF*-NN bzw. pET24a(+)-*hisF*-CC entstanden (Abbildung 4.2). Durch diese Konstruktion entsteht ein GlySerGly-Linker zwischen den beiden identischen Teilen und es wird bei der Expression C-terminal der Proteine ein His-Tag angehängt. Neben pET24a(+)-*hisF*-NN und pET24a(+)-*hisF*-CC wurde außerdem pET24a(+)-*hisF*-NwNw erstellt (basierend auf pET15b-*hisF*-Nw (Höcker *et al.*, 2000); das w steht jeweils für den Einbau eines Tryptophancodons, so daß in jeder Kopie der Austausch L56W entsteht), wodurch die spektroskopische Charakterisierung der fusionierten N-terminalen Hälften wesentlich erleichtert bzw. erst ermöglicht wird.

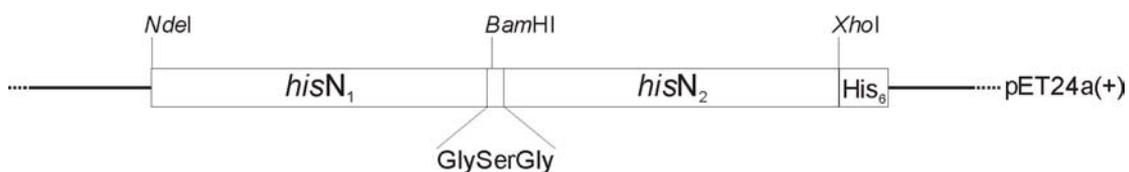


Abbildung 4.2: Konstrukt mit in Tandem fusionierten und durch einen Linker verbundenen Hälften, gezeigt am Beispiel von pET24a(+)-*hisF*-NN

Zunächst wurde *hisF*-N₂ über die Schnittstellen *Bam*HI und *Xho*I so in den Vektor pET24a(+) kloniert, daß bei der Expression ein His₆-Tag an das resultierende Protein gehängt wird. In einem zweiten Schritt wurde *hisF*-N₁ über die Schnittstellen *Nde*I und *Bam*HI in pET24a(+)-*hisF*-N₂ ligiert. Dadurch entsteht eine Insertion, die für einen GlySerGly-Linker zwischen den beiden Hälften kodiert.

4.2.2 Expression und Reinigung

Die Expression der Gene erfolgte in frisch transformierten *E.coli* BL21(DE3) Zellen induziert durch Zugabe von IPTG. Die Produktion wurde mittels Probeexpression (3.4.1.1) überprüft. Alle Konstrukte fanden sich ausschließlich in der unlöslichen Fraktion des Zellextraktes, aus welchem sie nach Solubilisierung in GdmCl durch Rückfaltung gewonnen werden konnten (Abbildung 4.3). Bei dieser Prozedur war bereits ein starker Reinigungseffekt zu beobachten, so daß nur in manchen Fällen unter Verwendung des angehängten His-Tags eine weitere Reinigung mittels Ni²⁺-Chelat-Affinitätschromatographie (3.4.3.2) nötig war.

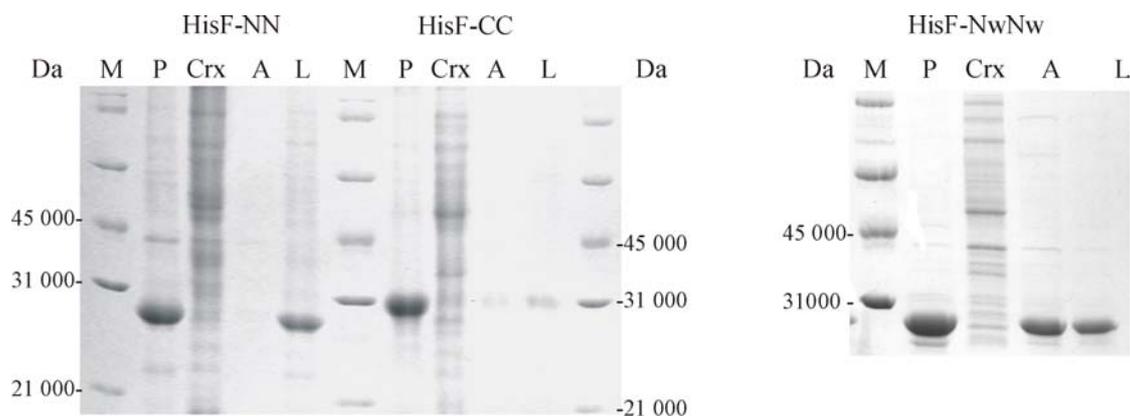


Abbildung 4.3: Heterologe Herstellung in *E.coli* und Rückfaltung von HisF-NN, HisF-CC und HisF-NwNw, dokumentiert durch SDS-PAGE (12,5% Acrylamid)

HisF-NN, HisF-CC und HisF-NwNw finden sich ausschließlich in der unlöslichen (P) Fraktion des Zellextraktes von *E.coli* BL21(DE3). Bei der Rückfaltung aus GdmCl fiel ein Teil des Proteins aus (A), der lösliche Teil (L) wurde weiter verwendet. Crx = lösliche Fraktion des Zellextraktes; M = Markerproteine.

4.2.3 Biophysikalische Charakterisierung

Die molaren und spezifischen Extinktionskoeffizienten der Varianten wurden aus den bekannten Aminosäuresequenzen und Molekulargewichten ermittelt (Pace *et al.*, 1995; Gleichung 3.4). Die Werte sind Tabelle 4.2 zu entnehmen.

Tabelle 4.2: Molekulargewichte (MW) unter Berücksichtigung des HisTag, molare und spezifische Extinktionskoeffizienten der Varianten und Anzahl von Tryptophan-(W) und Tyrosin-(Y) Resten

	HisF-NN (HisF-NwNw)	HisF-CC
MW [$\frac{g}{mol}$]	27 540 (27 690)	30 160
ϵ_{280} [$\frac{1}{M \cdot cm}$]	2 980 (13 980)	19 940
0.1% A_{280} [$\frac{cm^2}{mg}$]	0,11 (0,51)	0,66
Anzahl W + Y	0 + 2 (2 + 2)	2 + 6

4.2.3.1 Bestimmung des Oligomerisierungszustandes - analytische Gelfiltration

Mit Proteinen bekannten Molekulargewichts wurde auf einer Superdex-75-Gelfiltrationssäule nach Methode 3.5.5 eine Kalibrierungskurve erstellt und anschließend die Varianten analysiert.

HisF-NN und HisF-NwNw bestanden demnach fast ausschließlich aus Aggregaten (nicht gezeigt). HisF-CC zeigte neben einem großen Anteil an Aggregaten (Abbildung 4.4) einen Elutionspeak entsprechend eines Monomers mit einem Molekulargewicht von knapp 30000Da. HisF-C liegt dagegen hauptsächlich als Dimer vor (Höcker, 1999; Höcker *et al.*, 2001).

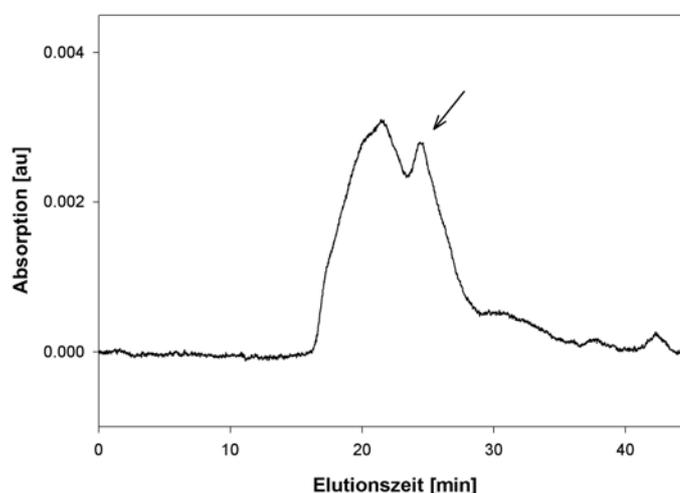


Abbildung 4.4: Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von HisF-CC über analytische Gelfiltration

Elutionsprofil von HisF-CC nach Auftrag auf eine Superdex-75-Säule. Die Elution des Proteins wurde bei 280nm verfolgt, die Flußrate betrug $0,5\text{ml}/\text{min}$ in 50mM KP-Puffer pH 7,5, 300mM KCl, RT. Es wurden 2,7nmol HisF-CC aufgetragen. Neben höhermolekularen Aggregaten wurde ein Peak detektiert (mit Pfeil gekennzeichnet), der einem Molekulargewicht von 29700Da und damit dem Monomer von HisF-CC entsprach.

4.2.3.2 Spektroskopische Untersuchung der Sekundär- und Tertiärstruktur

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur wurden CD-Spektren im Fern-UV-Bereich (170-250nm) aufgenommen. Die Fern-UV CD-Spektren von HisF-NwNw bzw. HisF-CC sind typisch für überwiegend α -helikale Proteine (Johnson, 1990; Abbildung 4.5). Sie ähneln den Fern-UV-Spektren der jeweiligen isolierten Hälften HisF-Nw bzw. HisF-C.

Zur Untersuchung der Tertiärstruktur und der Abgeschirmtheit der Tryptophane wurde Fluoreszenzspektroskopie nach Anregung bei 280nm durchgeführt. Die erhaltenen Emissionsmaxima von HisF-NwNw bzw. HisF-CC liegen bei 340nm bzw. bei 333nm und sind identisch mit denen der isolierten Hälften. Dies bedeutet, daß sowohl in HisF-Nw als auch in HisF-NwNw die Tryptophane dem Lösungsmittel weitgehend exponiert sind. Dies ist zu erwarten, da das an dieser Position im Wildtyp HisF liegende Leucin ebenfalls an exponierter Stelle liegt. In HisF-C und HisF-CC sind die Tryptophane dagegen weitgehend abgeschirmt, wenn auch nicht ganz so stark wie das entsprechende Tryptophan im Wildtypenzym HisF (Abbildung 4.6). Somit ist weder durch Fern-UV CD- noch durch Fluoreszenzspektroskopie ein Unterschied zwischen den isolierten und den in Tandem duplizierten und kovalent verknüpften Hälften festzustellen. Dies bedeutet, daß es durch die Verknüpfung zu keiner signifikanten Änderung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur kommt.

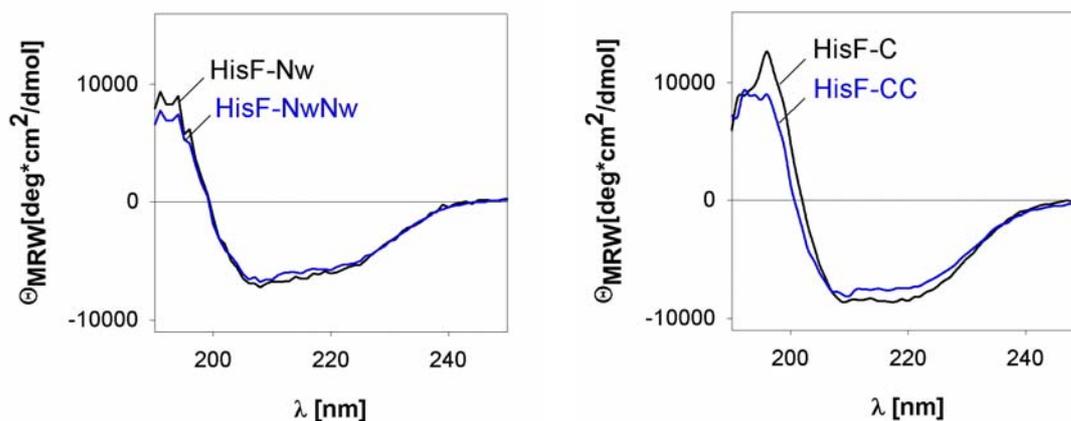


Abbildung 4.5: Die Fern-UV CD-Spektren von HisF-NwNw und HisF-CC sind typisch für α -helikale Proteine und entsprechen denen der isolierten Hälften.

Die Spektren wurden in 50mM KP-Puffer, pH 7,5 bei 23°C aufgenommen. Die Schichtdicke der Küvette betrug 0,1cm. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 0,07^{mg/ml} für HisF-Nw, 0,19^{mg/ml} für HisF-NwNw, 0,16^{mg/ml} für HisF-C, 0,14^{mg/ml} für HisF-CC. Die gezeigten Spektren sind das Mittel aus 10 übereinandergelegten Einzelspektren.

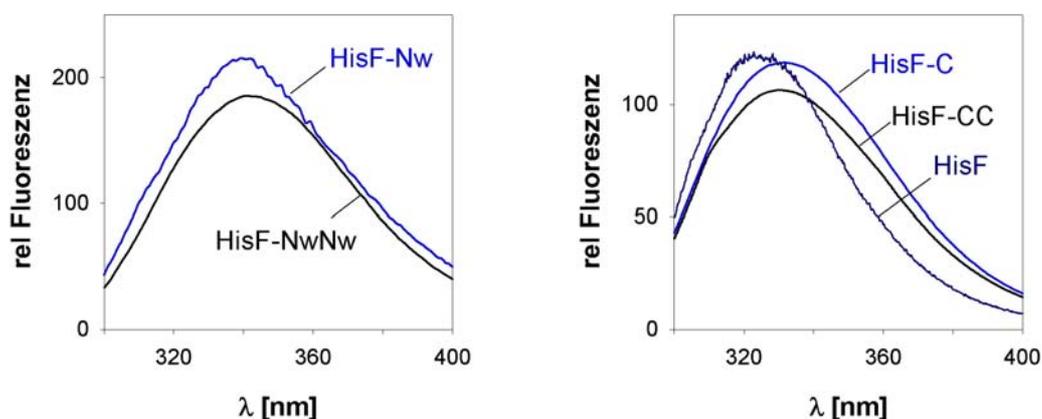


Abbildung 4.6: Die Fluoreszenzspektren von HisF-NwNw und HisF-CC entsprechen denen der isolierten Hälften

Die Fluoreszenzemissionsspektren wurden nach Anregung bei 280nm in 50mM KP, pH 7,5 bei 23°C aufgenommen. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 0,072^{mg}/_{ml} für HisF-Nw, 0,19^{mg}/_{ml} für HisF-NwNw, 0,17^{mg}/_{ml} für HisF-C, 0,16^{mg}/_{ml} für HisF-CC und 0,17^{mg}/_{ml} für HisF. Die Maxima der Fluoreszenzemission liegen für HisF-Nw und HisF-NwNw bei 340nm, für HisF-C und HisF-CC bei 333nm. Das Maximum des entsprechenden Tryptophanrestes im Wildtypenzym HisF befindet sich bei 323nm.

4.2.3.3 Messung der konformationellen Stabilität gegen chaotrophe Agenzien

HisF-C und HisF-CC wurden in unterschiedlichen Konzentrationen Harnstoff aufgenommen und mittels Fern-UV CD-Spektroskopie bei 222nm und Fluoreszenzemissionsspektroskopie bei 320nm (Anregung bei 280nm) analysiert (3.5.9). Dabei erwies sich HisF-C als deutlich weniger stabil als HisF-CC: Um 50% der HisF-C Moleküle zu denaturieren, sind nur 2,8M Harnstoff erforderlich, um 50% der HisF-CC Moleküle zu denaturieren dagegen 4,4M Harnstoff. Die über Fern-UV CD- bzw. Fluoreszenzspektroskopie verfolgten und normierten Auffaltungskurven erwiesen sich als deckungsgleich. Dies bedeutet, daß Sekundär- und Tertiärstruktur parallel verloren gehen und somit keine Hinweise auf ein signifikant populierte Auffaltungsintermediat vorliegen (Abbildung 4.7). Die Denaturierung von HisF-C und von HisF-CC kann damit in erster Näherung mit dem Zweizustandsmodell beschrieben werden. Die Steigungen der Kurven sind im Übergangsbereich relativ flach. Dies weist auf eine eher niedrige Stabilität und Kooperativität der Entfaltung hin. Für HisF-CC wurde durch Extrapolation ein $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Wert von 11,1^{kJ}/_{mol} bestimmt, der m-Wert betrug ca. 2,5^{kJ}/_{molM}. Im Vergleich sind die $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ - und die m-Werte von HisF mit

$26,3^{\text{kJ}}/\text{mol}$ und $8,3^{\text{kJ}}/\text{molM}$ deutlich höher (4.3.3.4). Wiederholung der Messungen bei gleichen Konzentrationen mittels Fluoreszenzspektroskopie führte für HisF-C zu einer ähnlichen Kurve, HisF-CC dagegen zeigte eine steilere Auffaltungskurve bei etwas höheren Harnstoffkonzentrationen ($\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = 21,0^{\text{kJ}}/\text{mol}$, $m = 4,0^{\text{kJ}}/\text{molM}$). Diese Unterschiede liegen wahrscheinlich in der Aggregationstendenz des Proteins begründet (Abbildung 4.4). Die Messungen müssen deshalb mit frisch präpariertem HisF-CC Protein noch einmal wiederholt werden.

Die Tatsache, daß HisF-C im Gegensatz zum monomeren HisF-CC vorwiegend als Dimer vorliegt, erschwert den Vergleich der beiden Varianten, da $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Werte monomerer Proteine unabhängig von der Proteinkonzentration sind, $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Werte dimerer Proteine dagegen mit zunehmender Proteinkonzentration ansteigen. Die Auffaltung der beiden Varianten bei gleicher Konzentration zeigt jedoch, daß deutlich mehr Harnstoff benötigt wird, um HisF-CC zu entfalten. Insofern belegen die Auffaltungsexperimente zumindest qualitativ, daß die kovalente Verknüpfung zweier HisF-C Hälften zu einer Stabilisierung gegenüber Denaturierung mit Urea führt.

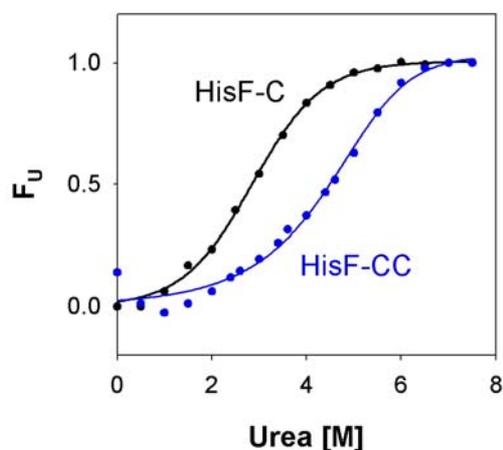


Abbildung 4.7: HisF-CC ist stabiler gegen Denaturierung mit Harnstoff als HisF-C

Die mit Fluoreszenzspektroskopie (Excitation bei 280nm, Emission bei 320nm) verfolgten Auffaltungskurven wurden in 50mM KP, pH 7,5 bei 23°C aufgenommen. Die unter der Annahme des Zweizustandsmodells ermittelten $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Werte betragen $9,2^{\text{kJ}}/\text{mol}$ für HisF-C und $11,1^{\text{kJ}}/\text{mol}$ für HisF-CC (3.5.9). Die entsprechenden m -Werte liegen bei $3,3^{\text{kJ}}/\text{molM}$ für HisF-C und $2,5^{\text{kJ}}/\text{molM}$ für HisF-CC. Die Proben enthielten $0,12^{\text{mg}}/\text{ml}$ HisF-C bzw. $0,11^{\text{mg}}/\text{ml}$ HisF-CC. Das fluorimetrische Signal wurde über eine Minute aufgenommen und gemittelt.

4.2.4 Erstes Resümée: Effekt der Duplikation und Fusion eines Halb-Barrel

HisF-NwNw (HisF-NN) besaß wie HisF-Nw (HisF-N) eine starke Aggregationstendenz, welches die weitere Charakterisierung vielfach erschwert, und zeigte bei den CD- und Fluoreszenzmessungen keine Unterschiede zu den Spektren der isolierten Hälften HisF-N bzw. HisF-Nw.

Vergleiche zwischen HisF-CC und der Hälfte HisF-C zeigten dagegen Unterschiede im Oligomerisierungszustand und bei der Entfaltung durch Harnstoff. HisF-CC ist im Gegensatz zum vorwiegend dimeren HisF-C (Höcker *et al.*, 2001) ein Monomer, besitzt aber eine vergleichbare Aggregationstendenz. Bei gleicher Konzentration der Proteine wird für die Entfaltung von HisF-CC mehr Harnstoff benötigt als für die von HisF-C, so daß von einer Stabilisierung durch kovalente Verknüpfung ausgegangen werden kann (Abbildung 4.8). Dies ist zu erwarten, da durch die Fusion von Proteinen die Translations- und Rotationsentropie des ungefalteten Zustandes erniedrigt wird, und sich damit die freie Energie der Stabilisierung $\Delta G (= G_N - G_U)$ erhöht (1.1; Terwilliger, 1995).

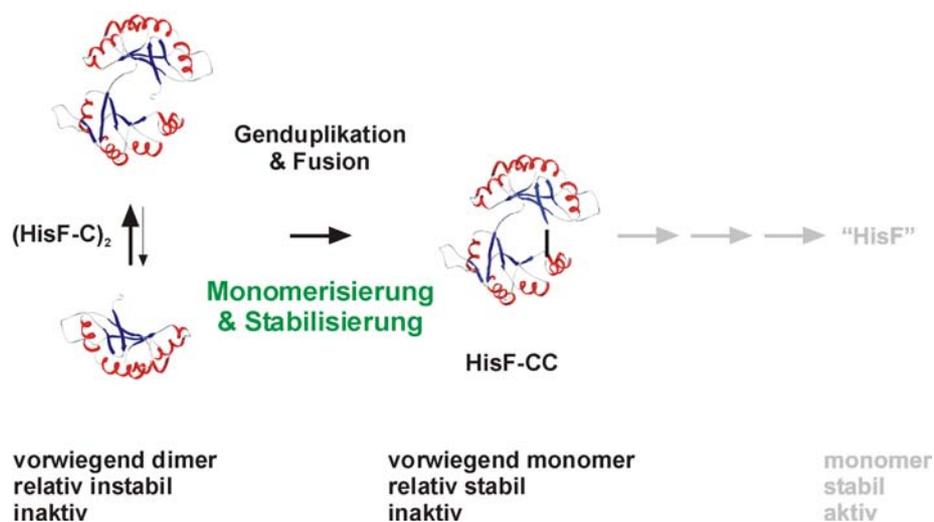


Abbildung 4.8: Monomerisierung und Stabilisierung durch Genduplikation und Tandemfusion

Analog zum ersten Schritt des Evolutionsmodells (Abbildung 1.3) wird der Effekt der Duplikation und Fusion des *hisF-C* Gens auf sein Genprodukt beschrieben. HisF-CC ist im Gegensatz zum dimeren HisF-C vorwiegend monomer und stabiler. Der noch zurückzulegende Weg zu einem „HisF“-ähnlichen Protein (monomer, stabil und aktiv) ist in hellgrau angedeutet.

Im folgenden wurde aufgrund der besseren Handhabung von HisF-CC mit dieser Variante weitergearbeitet.

4.2.5 Optimierung der Kontaktfläche in HisF-CC

Der nächste Schritt im Evolutionsmodell von HisF (Abbildung 1.3) fordert die Erzeugung einer stabilen und kompakten Struktur durch Optimierung des Kontaktflächen der beiden Hälften in HisF-CC. Dies wurde mittels rationalen Proteindesigns versucht.

In $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen kann das zentrale Faß in mehrere *Layer* (Schichten) unterteilt werden, die vom Katalysepol zum Stabilitätspol nummeriert werden (Lesk *et al.*, 1989; Wilmanns *et al.*, 1991). Innerhalb der ersten Schicht ragen Seitenketten von Aminosäuren der β -Stränge 1, 3, 5 und 7 ins Innere des Fasses, während Seitenketten der β -Stränge 2, 4, 6 und 8 in Kontakt mit den benachbarten α -Helices stehen. In der nächsten Schicht ist es dann umgekehrt, usw. (Abbildung 4.9).

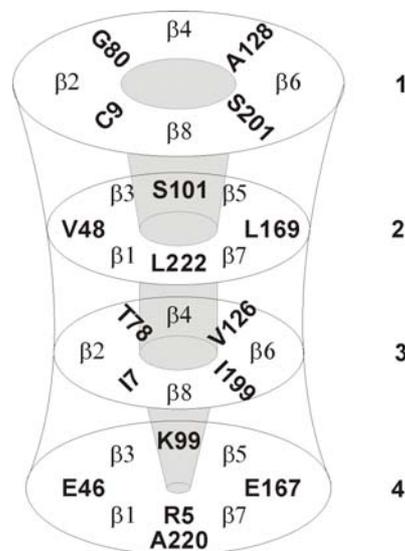


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung der Layerstruktur im zentralen β -Barrel von HisF

Die *Layer* sind durchnummeriert (1-4), ausgehend vom Katalysepol hin zum Stabilitätspol des Fasses. In jedem *Layer* ragen die Aminosäureseitenketten entweder der gerad- oder der ungeradzahligen β -Stränge ins Innere. Während die oberen drei *Layer* vorwiegend aus kleinen hydrophoben Resten gebildet werden, besteht das vierte *Layer* aus geladenen Seitenketten, die ein Salzbrückennetzwerk ausbilden. R5 paßt nicht in das übliche Muster, es positioniert jedoch seine lange Seitenkette vor die kleinere des A220, welches eigentlich Bestandteil des vierten *Layers* wäre. Die Positionen der nicht an der *Layer*bildung beteiligten β -Stränge sind jeweils angedeutet (nach Douangamath *et al.*, 2002).

Die Schichtung des β -Barrel von HisF wurde im Detail in der Diplomarbeit von M. Haeger (2001) analysiert. In den drei ersten Schichten von HisF ragen jeweils zwei Aminosäureseitenketten von HisF-N und HisF-C ins Innere, in der vierten Ebene liegt jedoch eine Besonderheit vor. Von den vier Resten, die dort ein Salzbrückennetzwerk

ausbilden, gehören drei Reste zu HisF-N (R5, E46, K99) und nur einer zu HisF-C (E167). Sollen sich nun die Kontaktflächen der beiden HisF-C-Hälften zusammenlagern, so treffen im vierten *Layer* zwei Glutamatreste aufeinander, deren negative Ladungen nicht kompensiert werden. Deshalb sollte zunächst die Kontaktfläche in *Layer* 4 optimiert werden. Um die energetisch ungünstige elektrostatische Abstoßung von zwei negativ geladenen Resten durch eine energetisch günstige Anziehung zu ersetzen, wurde das Glutamat in der C-terminalen HisF-C Einheit von HisF-CC durch die positiv geladenen Aminosäuren Arginin oder Lysin ersetzt. Dies wurde in den Varianten HisF-CC_E167R bzw. HisF-CC_E167K realisiert (4.2.5.1).

Zur Optimierung der Kontaktfläche in HisF-CC in den *Layern* 2 und 3 diente die native Kontaktfläche zwischen HisF-N und HisF-C im wildtypischen HisF als Vorbild. So wurden in der N-terminalen Kopie von HisF-C innerhalb von HisF-CC vier Aminosäuren durch die entsprechenden Reste aus HisF-N ersetzt. Dies führte zu der Variante HisF-C*C. Schließlich wurden die Austausche in den Schichten 2 bis 4 kombiniert, was zu den Varianten HisF-C*C_E167R und HisF-C*C_E167K führte (4.2.5.2). Schicht eins wurde unverändert gelassen, da - bedingt durch die konkave Geometrie des zentralen Barrel - die Seitenketten so weit voneinander entfernt liegen, dass eine sterische Behinderung unwahrscheinlich erschien.

All diese Varianten unterschieden sich jedoch weder in ihrer Löslichkeit noch in ihren spektroskopischen Eigenschaften von HisF-CC. Deshalb wurde schließlich eine weitere Optimierung in *Layer* 4 vorgenommen, mit dem Ziel das native Salzbrückennetzwerk soweit als möglich zu rekonstruieren, was zur Herstellung von HisF-CmutC führte (4.2.5.3).

4.2.5.1 Klonierung und Charakterisierung der Varianten HisF-CC_E167R und HisF-CC_E167K

Die Mutationen E167R und E167K wurden über SOE-PCR (3.3.7.2) in das *hisF-CC* Gen eingeführt. Dazu wurden in einer ersten PCR zwei überlappende Fragmente hergestellt, mit den Primern T7-Prom und 3'*hisF-C_E167R/K* bzw. 5'*hisF-C_E167R/K* und T7-Term, sowie pET24a(+)-*hisF-C₂* als Templat. Diese wurden in einer zweiten PCR ohne Templat zur Amplifikation des Volllängenproduktes eingesetzt. Dieses Fragment wurde dann über *Bam*HI und *Xho*I in den Vektor

pET24a(+) ligiert. Durch Sequenzierung konnte der Einbau der gewünschten Mutationen bestätigt werden. Daraufhin wurde jeweils mit Hilfe von *NdeI* und *BamHI* 5'-seitig ein weiteres *hisF-C* Gen inkloniert, wodurch die Konstrukte pET24a(+)-*hisF-CC_E167R* und pET24a(+)-*hisF-CC_E167K* erhalten wurden.

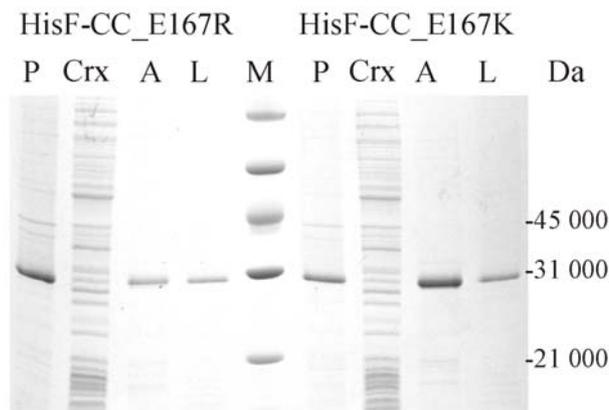


Abbildung 4.10: Heterologe Herstellung und Rückfaltung von HisF-CC_E167R und HisF-CC_E167K, dokumentiert durch SDS-PAGE (12,5% Acrylamid)

HisF-CC_E167R und HisF-CC_E167K finden sich ausschließlich in der unlöslichen Fraktion (P) des Zellextraktes von *E.coli* BL21(DE3). Bei der Rückfaltung aus GdmCl fiel ein Teil des Proteins aus (A), der lösliche Teil (L) wurde weiter verwendet. Crx = lösliche Fraktion des Zellextraktes; M = Markerproteine.

Die Expression der Gene wurde in *E.coli* BL21(DE3) durchgeführt, wobei die Proteine erneut ausschließlich im unlöslichen Teil des Zellextraktes zu finden waren (Abbildung 4.10). Durch Rückfaltung aus GdmCl wurden die Varianten in Lösung gebracht und gereinigt, so daß sie biophysikalisch charakterisiert werden konnten. Die Fern-UV CD- und Fluoreszenzspektren von HisF-CC_E167R und HisF-CC_E167K erwiesen sich dabei als identisch mit den Spektren von HisF-CC (Abbildung 4.11).

Der vorgenommene Einbau einer positiv geladenen Aminosäure in das vierte *Layer* von HisF-CC führte somit weder zu einer Verbesserung der Löslichkeit noch zu einer meßbaren Änderung der Sekundär- oder Tertiärstruktur.

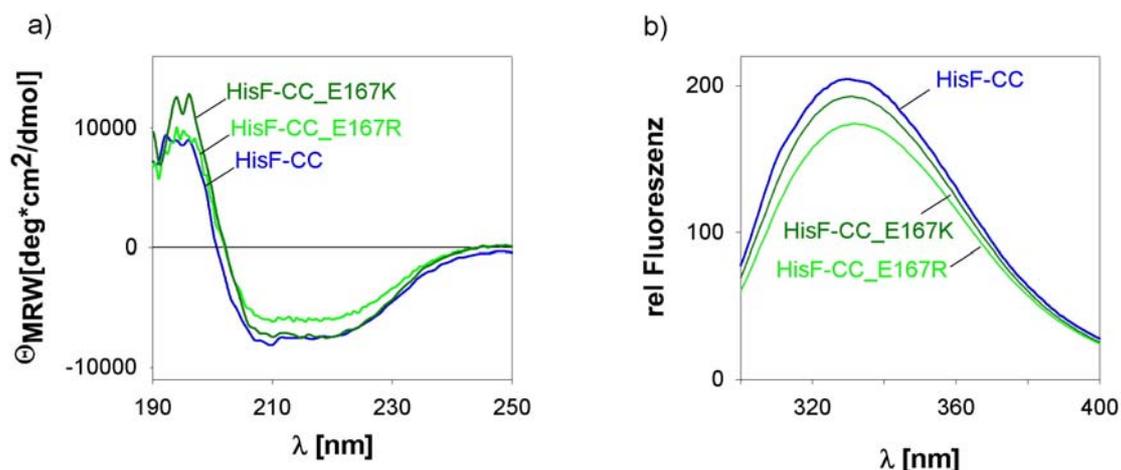


Abbildung 4.11: Die Fern-UV CD- (a) und die Fluoreszenz-Emissionsspektren (b) von HisF-CC_E167R und HisF-CC_E167K entsprechen denen von HisF-CC

Die Spektren wurden in 50mM KP-Puffer, pH 7,5 bei $T = 23^{\circ}\text{C}$ aufgenommen. a) Die eingesetzten Konzentrationen betragen $0,14\text{mg/ml}$ für HisF-CC und $0,16\text{mg/ml}$ für HisF-CC_E167R und E167K. Die gezeigten Spektren sind das Mittel aus 10 Einzelspektren. Die Schichtdicke der Küvette betrug $0,1\text{cm}$. b) Die Anregung erfolgte bei 280nm . Die eingesetzten Konzentrationen betragen $0,14\text{mg/ml}$ für HisF-CC und $0,48\text{mg/ml}$ für HisF-CC_E167R und E167K. Um die Spektren in einem Graph darzustellen, wurden die Werte für HisF-CC mit 2, die von HisF-CC_E167K mit 0,5 und die von HisF-CC_E167R mit 0,65 multipliziert. Die Maxima der Fluoreszenzemission liegen jeweils bei 333nm .

4.2.5.2 Klonierung und Charakterisierung der Varianten HisF-C*C, HisF-C*C_E167R und HisF-C*C_E167K

Zur Optimierung der Kontaktfläche in den *Layern* 2 und 3 wurden, nach dem Vorbild des wildtypischen HisF-Proteins, in der N-terminalen Kopie von HisF-C innerhalb von HisF-CC folgende vier Aminosäuresubstitutionen durchgeführt: V126I, L169V, I199T und L222S (Tabelle 4.3). Die neu entstandene Variante trägt den Namen HisF-C*C.

Tabelle 4.3: Aminosäureaustausche in HisF-C*C zur Optimierung der Kontaktfläche

Austausch	β -Strang in HisF	Layer	β -Strang in HisF-C*C
V126I	β_5	3	β_1
L169V	β_6	2	β_2
I199T	β_7	3	β_3
L222S	β_8	2	β_4

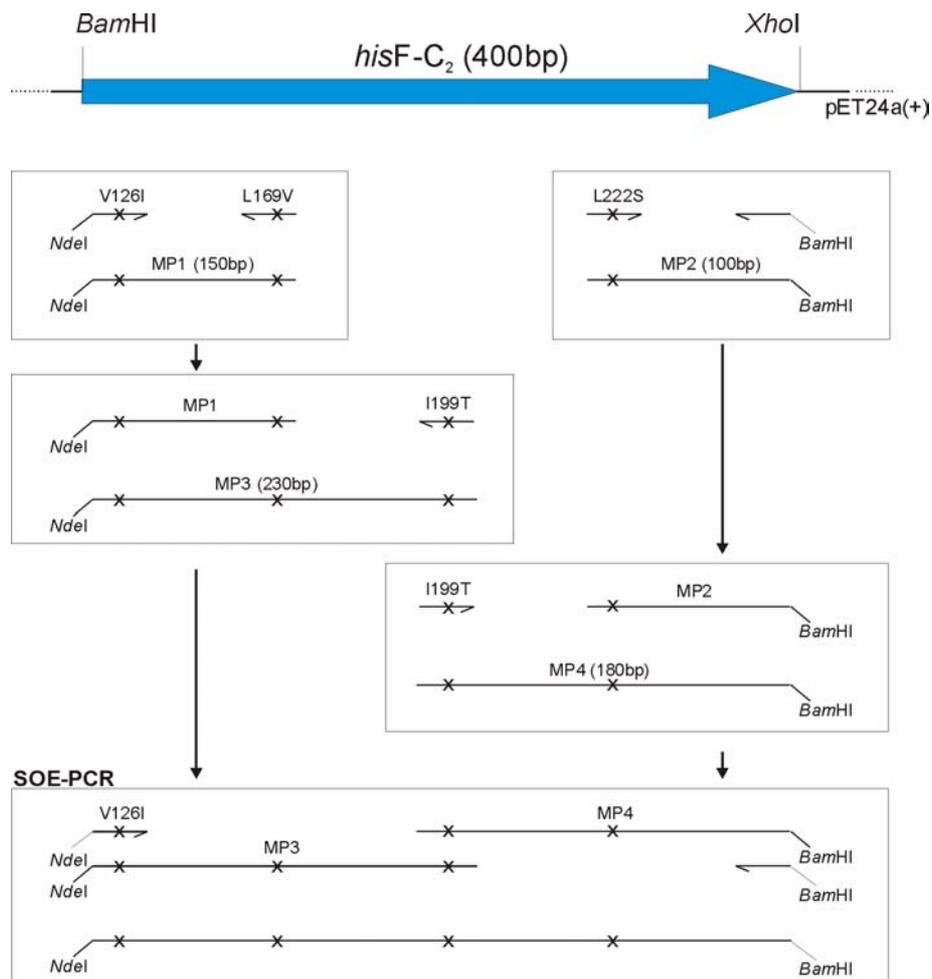


Abbildung 4.12: Herstellung des Fragments *hisF-C durch Megaprimer (MP)- und SOE-PCR**
 Oben im Bild ist das Konstrukt (*hisF-C₂* im Vektor pET24a(+)) gezeigt, welches in den vier MP-PCR-Reaktionen als Templat dient. In den mittleren vier Boxen sind die MP-PCRs mit den eingeführten Aminosäureaustauschen (im Einbuchstabencode) schematisch dargestellt. In der untersten Box ist die abschließende SOE-PCR gezeigt, bei der kein Templat zugegeben wurde.

Die Herstellung dieses Konstruktes erfolgte durch Kombination der Megaprimer-Methode (3.3.7.1) mit SOE-PCR (3.3.7.2; Abbildung 4.12). Als Templat diente pET24a(+)-*hisF-C₂*. Zunächst wurden Megaprimer (MP) 1 bzw. 2 unter Verwendung der Primer 5'*hisF_V126I(NdeI)* und 3'*hisF_L169V(SpeI)* bzw. 5'*hisF_L222S* und 3'*hisF-C₁(BamHI)* hergestellt. MP1 wurde in einer zweiten PCR als 5'Primer zusammen mit 3'*hisF_I199T(NheI)* eingesetzt, um MP3 herzustellen, und MP2 wurde als 3'Primer zusammen mit 5'*hisF_I199T(NheI)* eingesetzt, um MP4 herzustellen. MP3 und MP4 dienten dann als Templat in der darauf folgenden SOE-PCR, wobei die Primer 5'*hisF_V126I(NdeI)* und 3'*hisF-C₁(BamHI)* beigefügt wurden. Wenn möglich wurden mit den Mutationsprimern Schnittstellen durch stille Mutationen eingefügt, so

daß gelungene Austausche durch Restriktionsverdau zu detektieren waren. Das Volllängenprodukt *hisF-C** wurde in die Vektoren pET24a(+)-*hisF-C*₂, pET24a(+)-*hisF-C*₂_E167R und pET24a(+)-*hisF-C*₂_E167K kloniert und über Sequenzierung verifiziert. Nach Expression dieser Genkonstrukte entstehen die Varianten HisF-C*C, HisF-C*C_E167R und HisF-C*C_E167K.

Expression und Reinigung von HisF-C*C, HisF-C*C_E167R und _E167K erfolgte analog zu HisF-CC. Die Proteine waren wieder nur in der unlöslichen Fraktion des Zellextraktes zu finden, wurden daraus rückgefaltet und charakterisiert. Alle drei Varianten verhielten sich gleich. Beispielhaft für alle zeigt Abbildung 4.13 ein Fern-UV CD- und Fluoreszenzspektrum von HisF-C*C. Es war keine Veränderung verglichen mit HisF-CC festzustellen.

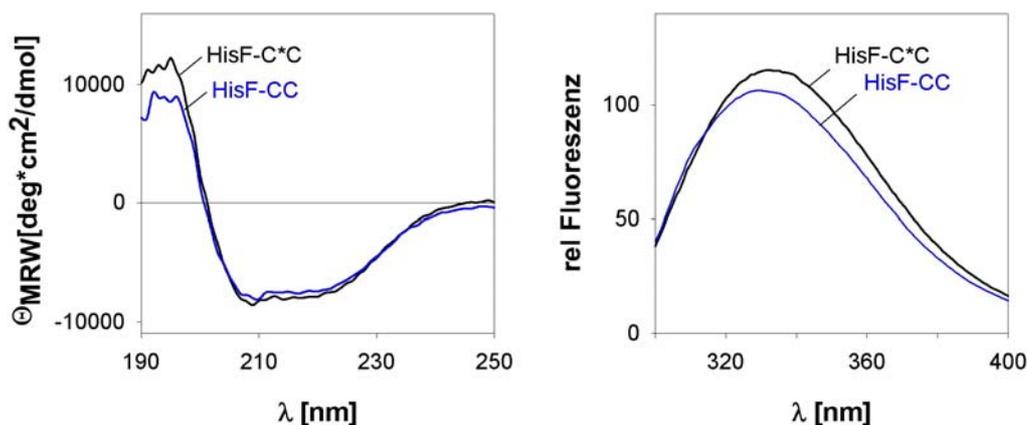


Abbildung 4.13: Die Fern-UV CD- (a) und Fluoreszenz-Emissionsspektren (b) von HisF-C*C entsprechen denen von HisF-CC.

Die Spektren wurden in 50mM KP-Puffer, pH 7,5 bei $T = 23^{\circ}\text{C}$ aufgenommen. a) Die eingesetzten Konzentrationen betragen $0,14^{\text{mg/ml}}$ für HisF-CC und $0,14^{\text{mg/ml}}$ für HisF-C*C. Die gezeigten Spektren sind das Mittel aus 10 Einzelspektren. Die Schichtdicke der Küvette betrug 0,1cm. b) Die Anregung erfolgte bei 280nm. Die eingesetzten Konzentrationen betragen $0,14^{\text{mg/ml}}$ für HisF-CC und $0,35^{\text{mg/ml}}$ für HisF-C*C. Um die Spektren in einem Graph darzustellen wurden die Werte für HisF-CC mit 1,3 multipliziert. Die Maxima der Fluoreszenzemission liegen bei 333nm.

4.2.5.3 Klonierung und Charakterisierung der Variante HisF-CmutC

Die Anpassung der *Layer 2* und *3* in HisF-CC an die HisF-Wildtypsituation, sowie der Austausch eines Glutamatrestes in *Layer 4* gegen eine positiv geladene Aminosäure, führten zu keiner meßbaren Veränderung der Löslichkeit und der spektroskopischen Eigenschaften.

Daher wurde eine alternative Variante zur Optimierung von *Layer 4* verfolgt, die auf die Rekonstruktion des im HisF-Protein angetroffenen Salzbrückennetzwerks zielt. Dazu wurden zunächst *in silico* zwei HisF-C Einheiten (entsprechend HisF-CC so mit HisF superpositioniert, daß eine Einheit mit HisF-N und die andere Einheit mit HisF-C zur Deckung kam (Abbildung 4.14). Dabei zeigte sich, daß die Reste R5 und K99 in HisF mit A124 und A220 in HisF-CC zur Deckung kommen. Der Austausch dieser beiden Alanine gegen Arginin und Lysin in der N-terminalen HisF-C Kopie von HisF-CC sollte somit wie im Wildtypprotein zur Ausbildung eines stabilisierenden Salzbrückennetzwerkes im vierten *Layer* führen. Die entsprechende Variante wurde HisF-CmutC genannt. Die Seitenkette von A220 superpositioniert exakt mit Lysin 99, während die Seitenkette von A124 in entgegengesetzte Richtung wie Arginin 5 weist. Werden die Austausche in der N-terminalen HisF-C Kopie in HisF-CC vorgenommen, ist A124 jedoch direkt am neuen N-Terminus von HisF-CC positioniert, so daß genügend Flexibilität für eine Umorientierung der neu eingebauten Arginin-Seitenkette vorhanden sein sollte (Abbildung 4.14).

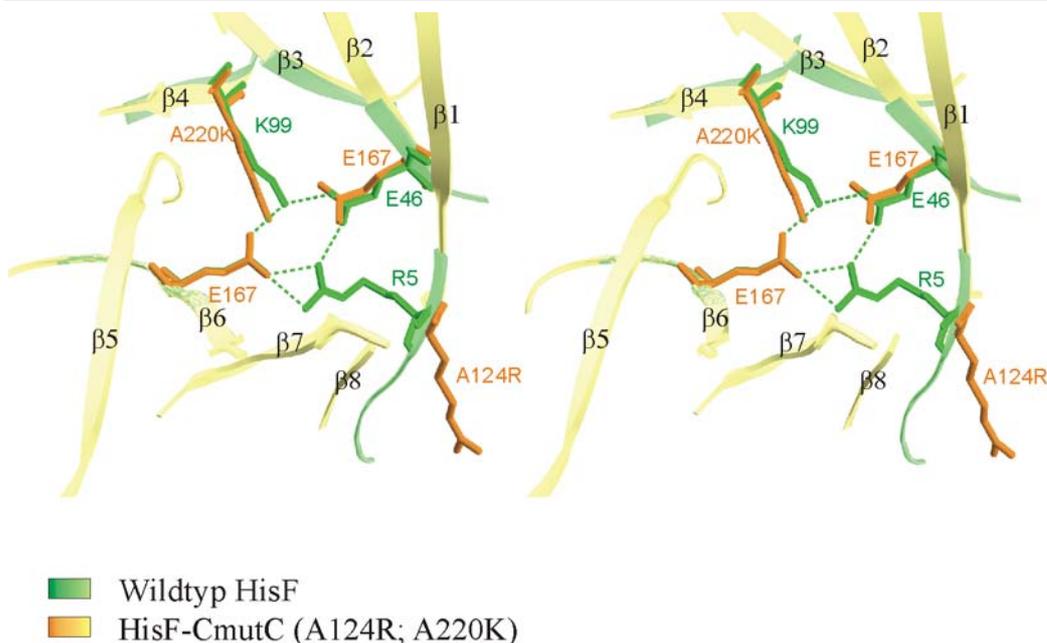


Abbildung 4.14: Superpositionierung *in silico* von HisF-CC mit HisF und Konstruktion des vierten *Layer* (HisF-CmutC)

Superpositionierung der β -Stränge und des *Layer 4* von HisF (grün) mit zwei HisF-C Einheiten, die *in silico* zu einem HisF-CC Protein (gelb-orange) verknüpft wurden. Die Seitenketten im *Layer 4* sind als Stabmodelle dargestellt, wobei in HisF-CC die Austausche A124R und A220K gezeigt sind, entsprechend der Variante HisF-CmutC. Während der neu eingefügte Rest K220 von HisF-CmutC direkt über K99 von HisF zu liegen kommt, zeigt die Seitenkette des neu eingefügten R124 im Gegensatz zu R5 von HisF zur Außenseite des Barrel. Das Salzbrückennetzwerk in HisF, gebildet durch R5, E46, K99 und E167, ist durch gestrichelte Linien angedeutet.

Zur Herstellung des *hisF*-CmutC Gens wurde zunächst das Fragment *hisF*-Cmut mittels PCR unter Verwendung des Templats pET15b-*hisFC** hergestellt, welches durch Umklonierung von *hisFC** über die Schnittstellen *Nde*I und *Bam*HI aus pET24a(+)-*hisFC**C in pET15b erzeugt worden war. Im ersten Schritt wurde mit den

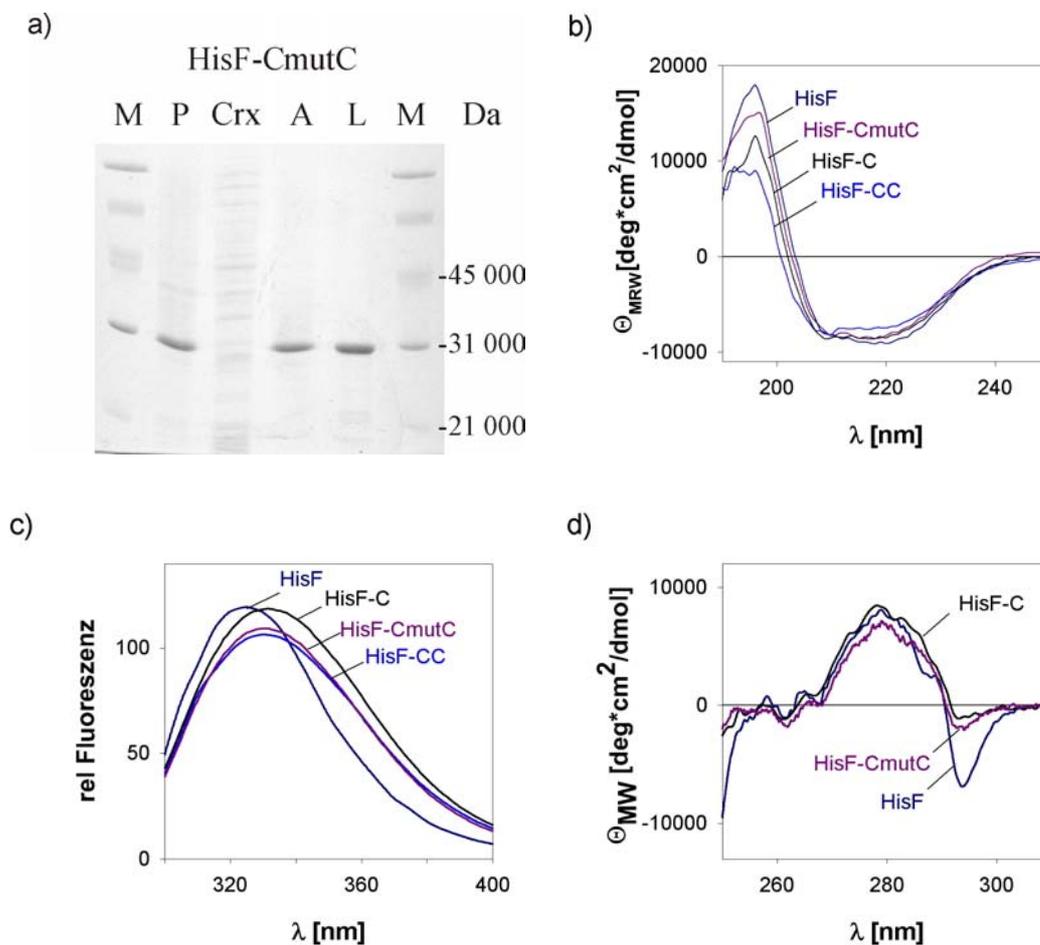


Abbildung 4.15: Heterologe Herstellung in *E. coli*, Rückfaltung (a) und spektroskopische Charakterisierung (b-d) von HisF-CmutC

a) HisF-CmutC findet sich ausschließlich in der unlöslichen Fraktion (P) des Zellextraktes von *E. coli* BL21(DE3). Bei der Rückfaltung aus GdmCl fiel ein Teil des Proteins aus (A), der lösliche Teil (L) wurde weiter verwendet. Crx = lösliche Fraktion des Zellextraktes; M = Markerproteine; 12,5% Acrylamid. b-d) Die Spektren wurden in 50mM KP-Puffer, pH 7,5 bei $T = 23^{\circ}\text{C}$ aufgenommen. b) Fern-UV CD-Spektren. Die eingesetzten Konzentrationen betragen $0,17^{\text{mg}}/\text{ml}$ für HisF, $0,16^{\text{mg}}/\text{ml}$ für HisF-C, $0,14^{\text{mg}}/\text{ml}$ für HisF-CC und $0,14^{\text{mg}}/\text{ml}$ für HisF-CmutC. Die gezeigten Spektren sind das Mittel aus 10 Einzelspektren. Die Schichtdicke der Küvette betrug 0,1cm. c) Fluoreszenzemissionsspektren. Die Anregung erfolgte bei 280nm. Die eingesetzten Konzentrationen betragen $0,16^{\text{mg}}/\text{ml}$ für HisF, $0,16^{\text{mg}}/\text{ml}$ für HisF-C, $0,14^{\text{mg}}/\text{ml}$ für HisF-CC und $0,10^{\text{mg}}/\text{ml}$ für HisF-CmutC. Um die Spektren in einem Graph darzustellen wurden die Werte für HisF mit 0,6, HisF-C mit 0,8 und HisF-CC mit 1,3 multipliziert. Die Maxima der Fluoreszenzemission liegen bei 323 für HisF und bei 333nm für die HisF-CC Varianten. d) Nah-UV CD-Spektren Die eingesetzten Konzentrationen betragen $0,17^{\text{mg}}/\text{ml}$ für HisF, $0,16^{\text{mg}}/\text{ml}$ für HisF-C und $1,57^{\text{mg}}/\text{ml}$ für HisF-CmutC. Die gezeigten Spektren sind das Mittel aus 10 übereinandergelegten Einzelspektren. Die Schichtdicke der Küvette betrug 5cm für HisF und HisF-C und 0,5cm für HisF-CmutC.

Primern 5'*hisF-C_A220K_L222S* und 3'*hisF-C₁(BamHI)* ein Megaprimer erstellt, der in einer zweiten PCR als 3'Primer diente zusammen mit 5'*hisF-C_A124R_V126I(NdeI)*. Das Vollängenprodukt wurde über die Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* mit dem Vektor pET24a(+)-*hisF-C₂* ligiert. Die beabsichtigte Basenabfolge des Konstruktes wurde über Sequenzierung verifiziert. Die Expression fand in BL21(DE3) statt, wobei HisF-CmutC nur in der unlöslichen Fraktion des Zellextraktes zu finden war und nach Solubilisierung mittels GdmCl rückgefaltet werden mußte (Abbildung 4.15a). Die Fluoreszenz- und CD-Spektren von HisF-CmutC stimmten mit denen der bisher charakterisierten HisF-CC Varianten überein (Abbildung 4.15). HisF-CmutC war jedoch deutlich besser löslich, da es sich bis zu einer Konzentration von 5^{mg/ml} einkonzentrieren ließ, ohne daß das Absorptionsspektrum Anzeichen von Aggregation aufwies. Auch die analytische Gelfiltration bestätigte die geringere Aggregationstendenz des Proteins. Das Elutionsprofil von HisF-CmutC zeigt einen einzigen zu Beginn flach ansteigenden und dann relativ symmetrisch verlaufenden Peak (Abbildung 4.16), dessen Lage einem Molekulargewicht von 30900Da entspricht. Dies bedeutet, daß ca. 90% des Proteins

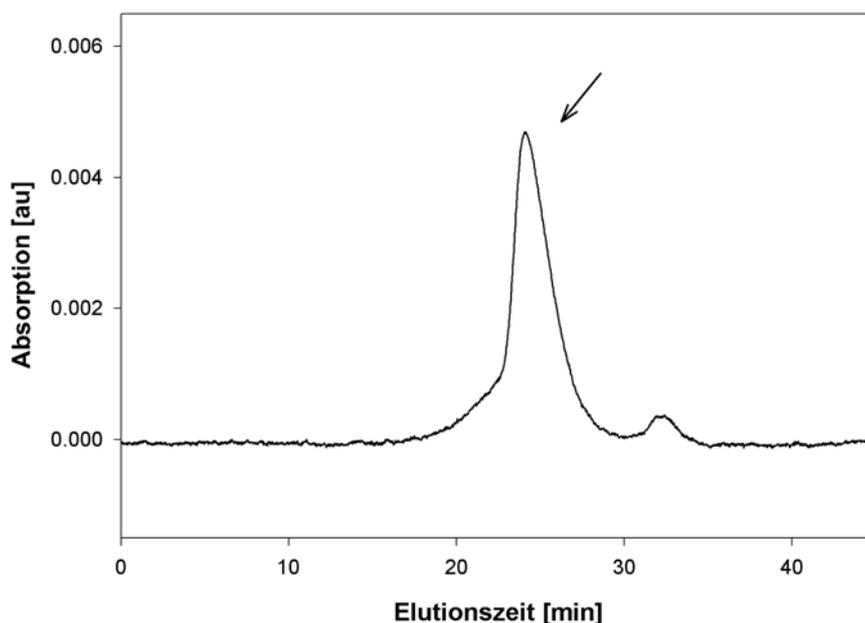


Abbildung 4.16: Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von HisF-CmutC über analytische Gelfiltration

Elutionsprofil von HisF-CmutC nach Auftrag auf eine Superdex-75-Säule. Die Elution des Proteins wurde bei 280nm verfolgt, die Flußrate betrug 0,5^{ml/min} in 50mM KP-Puffer pH 7,5, 300mM KCl, RT. Es wurden 1,5nmol HisF-CmutC aufgetragen. Der Hauptpeak (mit Pfeil gekennzeichnet) entsprach einem Molekulargewicht von 30900Da und damit dem Monomer von HisF-CmutC.

als Monomer (berechnetes Molekulargewicht: 30390Da) vorliegen. Unter dem ersten Teil des Peaks verbirgt sich vermutlich ein geringer Teil an Protein höheren Oligomerisierungsgrades.

Weitere Unterschiede konnten bei Entfaltung mit Harnstoff beobachtet werden. Während die mit Fern-UV CD und Fluoreszenzspektroskopie verfolgten Auffaltungskurven für HisF-CC deckungsgleich sind, erfolgt im Falle von HisF-CmutC die fluorimetrisch verfolgte Auffaltung bei niedrigeren Harnstoffkonzentrationen als die mittels Fern-UV CD verfolgte (Abbildung 4.17). Dies bedeutet, daß in HisF-CC Sekundär- und Tertiärstruktur parallel verloren gehen und es somit keinen spektroskopischen Hinweis für ein Auffaltungsintermediat gibt. Dagegen erfolgt die Auffaltung von HisF-CmutC über mindestens ein Intermediat, das ausgeprägte Sekundärstruktur bei fehlender Tertiärstruktur aufweist.

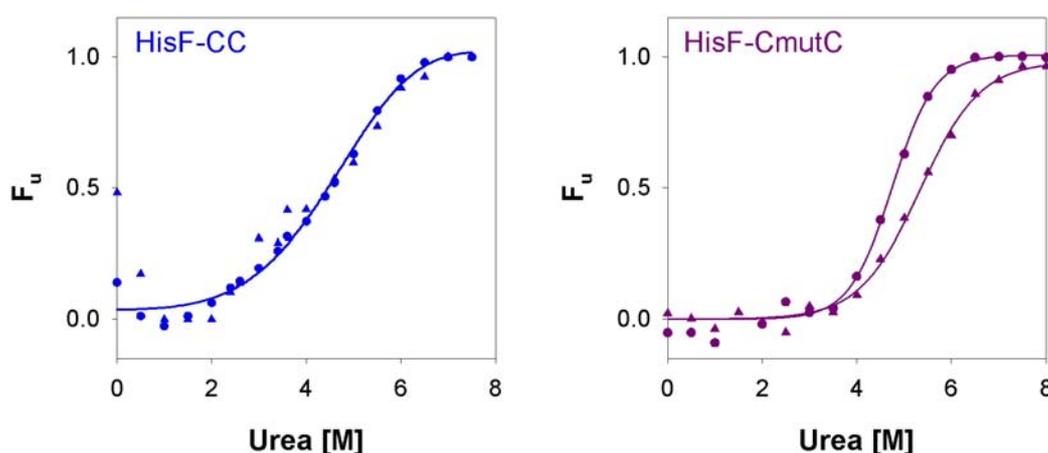


Abbildung 4.17: Auffaltung von HisF-CC und HisF-CmutC mit Harnstoff

Die mit Fluoreszenzspektroskopie (Excitation bei 280nm, Emission bei 320nm, O) und Fern-UV CD-Spektroskopie bei 222nm (Δ) verfolgten Auffaltungskurven von HisF-CC (linke Graphik) sind im Gegensatz zu denen von HisF-CmutC (rechte Graphik) deckungsgleich. Die Messungen wurden in 50mM KP, pH7,5 bei 23°C durchgeführt. Die Proben enthielten 0,11^{mg/ml} HisF-CC bzw. 0,13^{mg/ml} HisF-CmutC, sowie variierende Harnstoffkonzentrationen. Das fluorimetrische Signal wurde über eine Minute aufgenommen und gemittelt. Die Werte der CD-Spektroskopie sind das Mittel aus 10 Messungen, die Schichtdicke der CD-Küvette betrug 0,1cm.

Vergleicht man die fluorimetrisch aufgenommenen Auffaltungskurven, dann fällt auf, daß HisF-CmutC zwar bei ähnlichen Harnstoffkonzentrationen wie HisF-CC entfaltet ($[D]_{1/2} = 4,4$ bzw. 4,7M). Die Auffaltungskurve von HisF-CmutC ist jedoch steiler, d.h. die Denaturierung erfolgt mit höherer Kooperativität: $m(\text{HisF-CC}) = 2,5^{\text{kJ/molM}}$ und $m(\text{HisF-CmutC}) = 5,5^{\text{kJ/molM}}$. Vergleicht man die mittels Fern-UV CD-Spektroskopie aufgenommenen Auffaltungskurven, so zeigt sich, daß die Sekundärstruktur von HisF-

CmutC mit $[D]_{1/2} = 5,4\text{M}$ stabiler als die von HisF-CC mit $[D]_{1/2} = 4,7\text{M}$ ist. Die Steilheit der Auffaltungskurve der Sekundärstruktur von HisF-CmutC ist geringer ($m = 3,9^{\text{kJ}}/\text{molM}$) als die der Tertiärstruktur ($m = 5,5^{\text{kJ}}/\text{molM}$).

Sowohl die Auffaltung von HisF-CC als auch die von HisF-CmutC ist reversibel, da die denaturierten Proteine nach Verdünnung des Harnstoffs wieder native Sekundär- und Tertiärstruktur annehmen.

4.2.6 Zweites Resumée: Optimierung der Kontaktflächen zwischen zwei Halb-Barrel

Die Varianten HisF-CC_E167R/K, HisF-C*C und HisF-C*C_E167R/K, die zur Verbesserung der Ladungsverteilung im vierten *Layer* bzw. der Packung im zweiten und dritten *Layer* des Faßinneren hergestellt wurden, zeigten identische spektroskopische Eigenschaften wie HisF-CC und vergleichbare Aggregations-tendenz. Im Gegensatz dazu war die Variante HisF-CmutC, welche die Austausch in *Layer* 2 und 3 mit dem Versuch der Wiederherstellung eines Salzbrückennetzwerks in *Layer* 4 kombiniert, fast ausschließlich in monomerer Form vor, war besser löslich und entfaltete mit höherer Kooperativität. Auf der Basis der mittels Fern-UV CD-Spektroskopie gemessenen Denaturierung entfaltet HisF-CmutC auch bei höheren Harnstoffkonzentrationen als HisF-CC.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß HisF-CmutC eine stabilere und kompaktere Struktur hat als HisF-CC (Abbildung 4.18).

Eine weitere Erhöhung der Löslichkeit oder Stabilität von HisF-CmutC bzw. die Etablierung katalytischer Aktivität schien mittels rationalen Designs, d.h. gezielter Aminosäureaustausche auf der Basis von Strukturinformation, nicht mehr möglich. Daher sollten weitere Schritte in die gewünschte Richtung mittels gerichteter Evolution, d.h. Zufallsmutagenese kombiniert mit Selektion, durchgeführt werden.

Dazu wurden zwei verschiedene Systeme verwendet, eines zur Selektion auf erhöhte Löslichkeit (4.2.7) und ein anderes zur Selektion auf katalytische HisF-Aktivität (4.2.9).

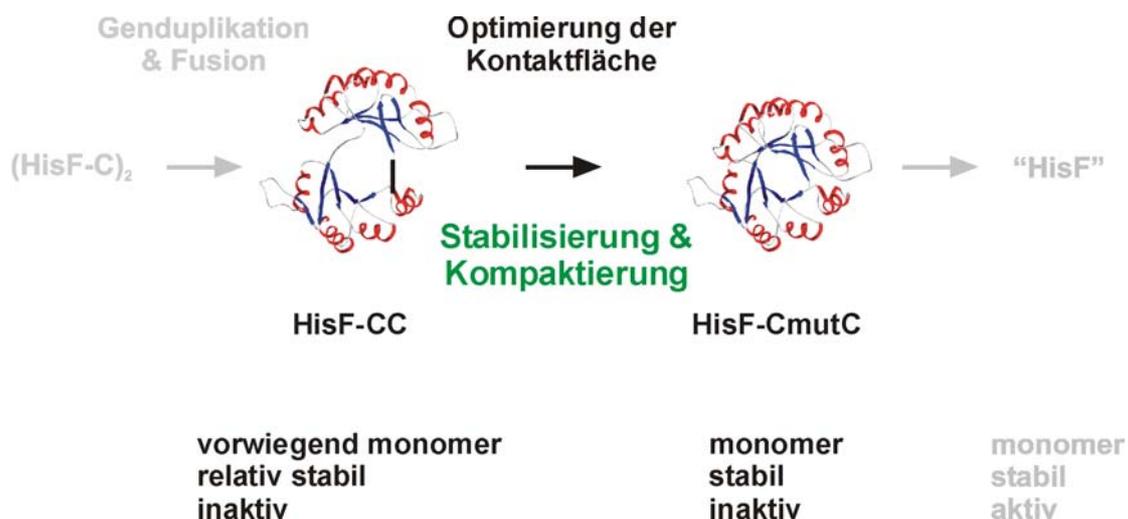


Abbildung 4.18: Optimierung der Kontaktfläche von verdoppelten und fusionierten Halb-Barrels
Analog zum zweiten Schritt des Evolutionsmodells (Abbildung 1.3) wird der Effekt der Optimierung der Kontaktflächen zweier kovalent verknüpfter HisF-C Einheiten beschrieben. HisF-CmutC liegt im Gegensatz zu HisF-CC fast ausschließlich als Monomer vor und ist stabiler und kompakter. Der bereits beschriebene (Abbildung 4.8) und der noch zu verfolgende Weg zu einem „HisF“-ähnlichen Protein (monomer, stabil und aktiv) sind in hellgrau angedeutet.

4.2.7 Selektion auf Löslichkeit von Proteinen nach Maxwell *et al.* (1999)

Bei diesem Selektionssystem wird ein Protein, dessen Löslichkeit erhöht werden soll, mit der Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) fusioniert. Je unlöslicher dieses Protein ist, desto höher ist die Tendenz des Fusionsproteins zur Präzipitation und umso niedriger damit die Konzentration an aktiver CAT. Dies hat eine hohe Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Chloramphenicol zur Folge. Eine Erhöhung der Löslichkeit des mit CAT fusionierten Proteins, z.B. durch Aminosäureaustausche, führt zu einer erhöhten Antibiotikaresistenz und ist damit selektierbar.

In den zum System passenden Vektor pCFN1 (Abbildung 3.1), der von Alan Davidson (University of Toronto, Kanada) erhalten werden konnte, wurden zunächst verschiedene Genvarianten kloniert, um das Selektionssystem auf seine Empfindlichkeit zu testen.

Das Konstrukt pCFN-*hisF* wurde hergestellt, indem *hisF* über PCR mit den Primern 5'*hisF*(*Bgl*III) und 3'*hisF*(*Xba*I) vom Templat sk+/III P-P (2.2.2) amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Bgl*III und *Xba*I in den Vektor ligiert wurde. Ebenso wurden die Konstrukte pCFN-*hisF*-CC, pCFN-*hisF*-C*C und pCFN-*hisF*-CmutC hergestellt, die in zwei Schritten kloniert werden mußten. Zunächst wurde die zweite

hisF-C-Hälfte über *Bgl*II und *Xba*I in den Vektor eingefügt, amplifiziert mit den Primern 5'*hisF*-C₂(*Bgl*II, *Bam*HI) und 3'*hisF*(*Xba*I) von der Matrize sk+/III P-P. Dann wurde die entsprechende erste Hälfte mit den Primern 5'*hisF*-C₁(*Bgl*II) bzw. 5'*hisF*-C*(*Bgl*II) oder 5'*hisF*-Cmut(*Bgl*II) und 3'*hisF*-C₁(*Bam*HI) von der Matrize sk+/III P-P bzw. pET15b-*hisF*-C* oder pET15b-*hisF*-Cmut amplifiziert und über *Bam*HI und *Xba*I in den Vektor pCFN-*hisF*-C₂ kloniert. Die Basenabfolge aller Konstrukte wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Mit diesen vier Konstrukten wurde das System getestet, wobei das Wachstum transformierter JM101-Zellen auf Selektivplatten mit Chloramphenicol nach 16h Inkubationszeit überprüft wurde (Tabelle 4.4). Während das HisF-CAT-Fusionsprotein die Zellen befähigt auf Medium mit bis zu 200^{µg}/ml Chloramphenicol zu wachsen, können Zellen mit den Varianten HisF-CC und HisF-CmutC nur auf Medium mit bis zu 150^{µg}/ml und mit HisF-C*C nur auf Medium mit bis zu 50^{µg}/ml Chloramphenicol wachsen.

Tabelle 4.4: Wachstum transformierter *E.coli* JM101-Zellen auf Medium mit verschiedenen Chloramphenicol-Konzentrationen

Die verwendeten Plasmidkonstrukte kodieren für Fusionsproteine aus unterschiedlichen HisF-Varianten mit CAT. +++, ++, + bezieht sich auf die Anzahl und Größe der Kolonien; - bedeutet kein sichtbares Wachstum nach 16h Inkubation.

[Chloramphenicol]	pCFN- <i>hisF</i>	pCFN- <i>hisF</i> -CC	pCFN- <i>hisF</i> -C*C	pCFN- <i>hisF</i> -CmutC
0 ^{µg} /ml	+++	+++	+++	+++
30 ^{µg} /ml	+++	+++	++	+++
50 ^{µg} /ml	+++	+++	+	+++
100 ^{µg} /ml	++	++	-	++
150 ^{µg} /ml	++	+	-	+
200 ^{µg} /ml	+	-	-	-

Das Selektionssystem spiegelt somit die erhöhte Stabilität und Löslichkeit von HisF im Vergleich zu den verschiedenen HisF-CC Varianten wider, ist jedoch offensichtlich nicht empfindlich genug, um die erhöhte Löslichkeit von HisF-CmutC im Vergleich zu den anderen HisF-CC Varianten anzuzeigen (4.2.6). Die niedrige Chloramphenicolresistenz nach Transformation des pCFN-*hisF*-C*C fällt in sofern aus dem Rahmen, als HisF-C*C *in vitro* nicht weniger löslich erschien als HisF-CC

(4.2.5.2). Die Ursache dieser Diskrepanz zwischen Löslichkeit *in vivo* und *in vitro* ist momentan nicht klar.

Zu einer Verbesserung der Löslichkeit von HisF-CmutC wurde Zufallsmutagenese mittels DNA-*Shuffling* durchgeführt. Da die zweite HisF-C Kopie der Wildtypsequenz entspricht und damit bereits „optimiert“ vorliegt, sowie aus technischen Gründen, wurde nur das Gen der N-terminalen HisF-C Kopie einem DNA-*Shuffling* unterzogen. Das mutagenisierte *hisF-C*₁ sollte anschließend in den Vektor pCFN-*hisF-C*₂ kloniert werden. Da bei Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bgl*III und *Bam*HI jedoch die gleichen Überhänge entstehen, ergibt sich ein starker Hintergrund an Religanden und die Möglichkeit, daß das Fragment in zwei Richtungen integriert werden kann. Bei der Klonierung einer Bank ist dies nicht zu tolerieren. Da in dem Vektor pCFN1 keine anderen Schnittstellen zur Verfügung stehen, wurde die Schnittstelle *Bgl*III in pCFN1 durch *Xho*I ersetzt. Dies geschah mittels *Quickchange*-Mutagenese (3.3.7.3) mit den Primern 5'pCFN(*Xho*I) und 3'pCFN(*Xho*I) und wurde durch Sequenzierung verifiziert.

4.2.8 Zufallsmutagenese der N-terminalen HisF-C Hälfte von HisF-CmutC durch DNA-*Shuffling*

Ausgangspunkt für die Mutagenese durch DNA-*Shuffling* (3.3.7.4; Stemmer, 1994) war das Gen für HisF-Cmut. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 4.19 dokumentiert. In einem ersten Schritt wurde das Gen von dem Konstrukt pET15b-*hisF-Cmut* mit den Primern T7-Prom und T7-Term amplifiziert (30 Zyklen: 45'' 95°C, 45'' 55°C, 45'' 72°C; Spur A in Abbildung 4.19). Es wurde wie in allen folgenden PCR-Schritten die *Taq*-Polymerase verwendet. Daraufhin wurde das entstandene Fragment bei 20°C für 7min mit DNaseI inkubiert, welche anschließend durch Hitze inaktiviert wurde (15' 98°C). Die Verwendung von 4u DNaseI ergab wie gewünscht Fragmente der Länge 50-100bp (Spur D). 8µl dieses Ansatzes wurden für die darauffolgende *Primerless* PCR verwendet (50 Zyklen: 30'' 95°C, 40'' 40°C, 55'' 72°C). Dabei ergab sich ein Schmier mit stärkster Intensität um 600bp (Spur PL).

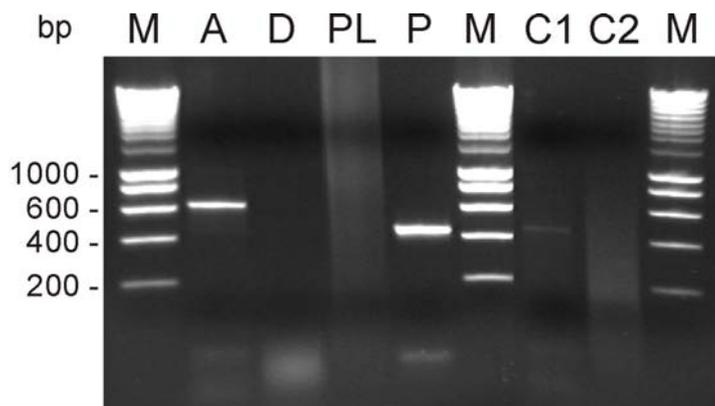


Abbildung 4.19: Analyse des DNA-Shuffling von *hisF*-Cmut

Alle Zwischenprodukte wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen. M: Smart-Ladder, A: PCR-Produkt als Templat für den DNaseI-Verdau, D: Fragmente nach DNaseI-Verdau, PL: Produkt der *Primerless* PCR, P: Produkt der *Primed* PCR mit inneren Primern, C1, 2: Kontrollreaktionen mit DNaseI-Fragmenten, sowohl mit inneren als auch mit äußeren Primern.

Eine Kontroll-PCR mit „inneren Primern“ ($5'$ *hisF*-C₁(*Bgl*II) und $3'$ *hisF*-C₁(*Bam*HI); Spur C1) und eine mit den T7-Primern (Spur C2) über 30 Zyklen ergab nur ein schwaches bzw. kein PCR-Produkt, was darauf hindeutet, daß keine signifikante Menge unverdautes Fragment nach Behandlung mit DNaseI mehr vorhanden war. In der abschließenden *Primed* PCR wurden die Volllängenfragmente unter Verwendung der „inneren Primer“ amplifiziert, was zu einer großen Menge eines Fragments mit der erwarteten Länge von knapp 400bp führte (Spur P).

Auf diese Weise erstellte Fragmente können nun genutzt werden, um Banken herzustellen, die in pCFN-*hisF*-C₂ kloniert auf erhöhte Löslichkeit oder in pTNA-*hisF*-C₂ kloniert auf Aktivität selektiert werden können.

4.2.9 Selektionssystem zur Etablierung einer katalytischen Aktivität

Um auf dem Gerüst von HisF-CmutC eine HisF-Aktivität zu etablieren, steht ein Selektionssystem bereit. In Δ *hisF*-Zellen (UTH860, Goldschmidt *et al.*, 1970) kann auf Medium, dem Ammonium zugesetzt wurde, die Ammonium-abhängige und auf Medium, dem Glutamin zugesetzt wurde, die Glutamin-abhängige HisF-Aktivität detektiert werden. Das System wurde überprüft, indem vier Varianten getestet wurden: HisF sollte auf beiden Medien komplementieren können, HisF_R5A (eine Mutation im vierten *Layer*) sollte nur auf Ammonium-haltigem Medium (Klem *et al.*, 2001) und HisA sollte auf keinem der Medien komplementieren. Zusätzlich wurde getestet, ob HisF-N zusammen mit HisF-C die Ammonium-abhängige Aktivität komplementieren

kann. *In vitro* bildet sich nach gemeinsamer Rückfaltung der beiden Hälften aus GdmCl ein HisF-NC Komplex mit Ammonium-abhängiger Wildtyp-, jedoch ohne meßbare Glutamin-abhängige Aktivität (Höcker *et al.*, 2001).

Die Variante *hisF_R5A* wurde mittels PCR hergestellt, wobei die Primer 5'*hisF_R5A*(*SphI*) und 3'*hisF*(*HindIII*) und die Matrize sk+/III P-P verwendet wurden. Das Amplifikationsprodukt wurde über *SphI* und *HindIII* in den Vektor pTNA kloniert. *hisF-N* wurde mit den Primern 5'*hisF*(*SphI*) und 3'*hisF-N*(*HindIII*) von derselben Matrize amplifiziert und ebenso über *SphI* und *HindIII* in den Vektor pTNA kloniert. *hisF-C* wurde mit den Primern 5'*hisF-C*(*EcoRI*) und 3'*hisF-C*(*BamHI*) von sk+/III P-P amplifiziert und über *EcoRI* und *BamHI* in den Vektor pZA22MCS1 kloniert. PZA22MCS1 (Lutz & Bujard, 1997) besitzt einen p15A Replikations-Ursprung und ein Kanamycin-Resistenzgen, während pTNA (Merz *et al.*, 2000) einen *ColE1* Replikations-Origin und eine Ampicillin-Resistenzgen beinhaltet. Dies ermöglicht die gleichzeitige Selektion auf beide Plasmide und ihre gleichberechtigte Replikation. Die korrekte Basenabfolge der Konstrukte wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Konstrukte pTNA-*hisA* (Jürgens *et al.*, 2000) und pTNA-*hisF* (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001) standen bereits zur Verfügung.

Δ *hisF*-Zellen wurden mit den Konstrukten transformiert und anschließend auf Ammonium- bzw. Glutamin-haltigen Selektivmedien ohne Histidin ausplattiert. Die Komplementationsergebnisse sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Tabelle 4.5: Komplementation von *E.coli* Δ *hisF*-Zellen durch verschiedene Proteinvarianten

Aufgezeichnet ist die Dauer bis zum Auftauchen sichtbarer Kolonien nach Plattierung von Δ *hisF*-Zellen, die mit den angegebenen Plasmiden transformiert worden waren.

Δ <i>hisF</i> transformiert mit	M9 + Ammonium	M9 + Glutamin
pTNA- <i>hisF</i>	über Nacht	über Nacht
pTNA- <i>hisF_R5A</i>	über Nacht	-
pTNA- <i>hisF-N</i> & pZA- <i>hisF-C</i>	nach 6 Tagen	-
pTNA- <i>hisA</i>	-	-

Die Ergebnisse entsprachen qualitativ den Erwartungen. Mit pTNA-*hisF-N* und pZA-*hisF-C* kotransformierte Zellen brauchten jedoch 6 Tage bis sichtbare Kolonien auf Medium mit Ammonium erschienen, obwohl die Ammonium-abhängige Aktivität des HisF-NC Komplexes *in vitro* der von HisF entspricht. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die zelluläre Konzentration von HisF-NC deutlich niedriger ist als die von HisF, vermutlich erfolgt die Komplexbildung der beiden Hälften nicht quantitativ. Eine mögliche Ursache dafür könnte darin liegen, daß der größte Anteil der exprimierten Hälften aggregiert und in *inclusion bodies* anfällt. Dafür spricht, daß bei Koexpression von *hisF-N* und *hisF-C* nur ein geringer Anteil des erzeugten Proteins in der löslichen Fraktion des Zellextraktes zu finden ist, während sich der Großteil in *inclusion bodies* findet (Höcker *et al.*, 2001).

Dieses Ergebnis ist für ein weiteres Vorgehen von Bedeutung, es bestätigt die Notwendigkeit vor der Aktivierung einer Variante zunächst die Löslichkeit zu optimieren. Ist die Löslichkeit einer Variante nicht mehr limitierend, so können auch geringe Aktivitäten detektiert werden.

4.2.10 Zusammenfassung

Die ersten Schritte der postulierten Evolution von HisF aus einem Halb-Barrel konnten experimentell nachvollzogen werden. Die Tandemduplikation und Fusion des *hisF-C*-Gens zu *hisF-CC* führte zu einer teilweisen Monomerisierung und Stabilisierung des Genproduktes. Die Optimierung der Kontaktfläche der beiden Halb-Barrel durch Aminosäureaustausche in den *Layern* zwei bis vier führte zur fast vollständigen Monomerisierung sowie einer weiteren Stabilisierung und vor allem einer kompakteren Struktur des resultierenden HisF-CmutC Proteins.

HisF-CmutC bildet somit einen guten Ausgangspunkt für die weitere Verbesserung der Löslichkeit und/oder die Aktivierung durch Zufallsmutagenese und Selektion. Eine entsprechende Genbank wurde bereits hergestellt und die Selektionssysteme erfolgreich getestet.

4.3 Herstellung und Charakterisierung von chimären Proteinen aus HisA und HisF

Zwischen den beiden $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen HisA und HisF bestehen signifikante Ähnlichkeiten in Sequenz, Struktur und Funktion (Fani *et al.*, 1994; Thoma *et al.*, 1998; Lang *et al.*, 2000). Auch findet sich in beiden Proteinen eine offensichtliche zweifache Symmetrie. Diese Beobachtungen und die Herstellung der stabilen HisF-Hälften HisF-N und HisF-C (Höcker *et al.*, 2001) führten zu den Hypothesen, daß (a) HisA und HisF durch divergente Evolution aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein hervorgegangen sind, welches seinerseits durch Tandemduplikation und Fusion eines Gens halber Länge entstanden ist (Abbildung 1.4); (b) entgegen der generell akzeptierten Ansicht zumindest die $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme HisA und HisF nicht aus einer, sondern aus zwei Domänen bestehen, die den Halb-Barreln entsprechen. Beide Hypothesen würden gestützt, wenn es gelänge chimäre Proteine aus HisA- und HisF-Hälften herzustellen.

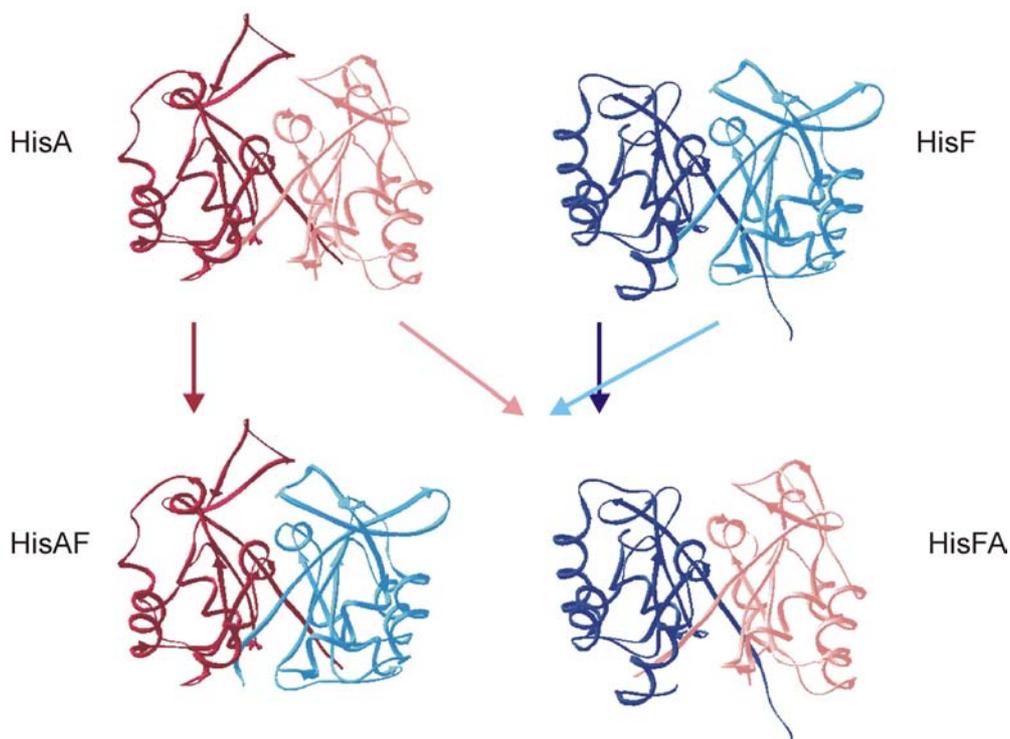


Abbildung 4.20: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der Chimären HisAF und HisFA aus den jeweiligen Hälften von HisA und HisF

HisA ist in rot, HisF in blau gezeigt, die N-terminalen Hälften (HisA-N und HisF-N) sind dunkel, die C-terminalen Hälften (HisA-C und HisF-C) hell dargestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb durch entsprechende Klonierungen HisA-N mit HisF-C (HisAF) und HisF-N mit HisA-C (HisFA) kovalent verknüpft (Abbildung 4.20). Beide Chimären wurden sowohl mit als auch ohne einen GlySerGly-Linker hergestellt (HisA*linkF* im Vergleich zu HisAF und HisF*linkA* im Vergleich zu HisFA). Die Gene wurden mittels pET-System überexprimiert und die resultierenden Proteinprodukte gereinigt und charakterisiert. Dabei interessierte besonders, ob die Kontaktflächen der Hälften HisA und HisF zueinander passen und eine typische $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Struktur ausgebildet wird. Es zeigte sich, daß nur die HisAF-Chimäre stabil war und umfassend biophysikalisch charakterisiert werden konnte. Darauf aufbauend wurde die Etablierung einer katalytischen Aktivität von HisAF durch Zufallsmutagenese kombiniert mit Selektion versucht.

4.3.1 Klonierung der Konstrukte HisAF und HisFA

Zunächst wurden die Chimären so kloniert, daß die Protein-Hälften über einen GlySerGly-Linker verbunden wurden. Dazu wurden die Hälften von *hisA* und *hisF* mittels PCR mit den Primerpaaren 5'*hisA*-N(*NdeI*) und 3'*hisA*-N(*BamHI*), 5'*hisF*-N₁(*NdeI*) und 3'*hisF*-N₁(*BamHI*), 5'*hisA*-C(*BamHI*) und 3'*hisA*-C(*NotI*) bzw. 5'*hisF*-C₂(*BamHI*) und 3'*hisF*-C₂(*XhoI*) vom Plasmid sk+/III P-P (2.2.2) amplifiziert, wobei entsprechende Schnittstellen eingeführt wurden. Zuerst wurden die C-terminalen Hälften (HisA-C - Valin 120 bis Arginin 241; HisF-C - Glutamin 123 bis Leucin 253) über *BamHI* und *NotI* bzw. *XhoI* in den Vektor pET-24a(+) kloniert. In einem zweiten Schritt wurden die N-terminalen Hälften (HisA-N - Methionin1 bis Aspartat 119; HisF-N – Methionin 1 bis Serin 122) über *NdeI* und *BamHI* in die neu entstandenen Vektoren pET24a(+)-*hisF*-C bzw. pET24a(+)-*hisA*-C hinzugefügt. Durch diese Konstruktion entsteht ein GlySerGly-Linker zwischen den beiden Hälften und es wird bei der Expression C-terminal des Proteins ein His-Tag angehängt. Die erwartete Basenabfolge der Chimären wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

Die Chimären wurden anschließend auch ohne *Linker* kloniert. Dazu wurde auf dem Templat pET24a(+)-*hisAlinkF* bzw. pET24a(+)-*hisFlinkA* mittels PCR mit den Primern T7-Prom und 3'*hisAF* bzw. 3'*hisFA* ein Megaprimer erstellt, der in einer zweiten PCR als 5'Primer diente und zusammen mit dem Primer 3'*hisF*-C(*BamHI*) bzw. T7-Term auf demselben Templat das Volllängenprodukt generierte. *hisAF* wurde über die Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* in den Vektor pET15b kloniert, so daß bei der

Expression N-terminal ein His-Tag angehängt wird. Für Expression ohne His-Tag wurde das Fragment in pET24a umklontiert. *hisFA* wurde wie zuvor in den Vektor pET24a(+) kloniert, so daß bei Expression an das Produkt C-terminal ein His-Tag angehängt wird.

4.3.2 Expression der Gene und Reinigung der Proteinprodukte

Die Expression erfolgte in frisch transformierten *E.coli* BL21(DE3)c+ Zellen induziert durch Zugabe von IPTG. Die Produktion wurde mittels Probeexpression (3.4.1.1) überprüft. HisAlinkF und HisAF fanden sich zum größten Teil in der unlöslichen Fraktion des Zellextraktes, aus welchem sie durch Rückfaltung gewonnen werden konnten. Protein konnte jedoch auch aus der löslichen Fraktion des Zellextraktes, in dem es nach der Expression in geringerem Maße zu finden war, gereinigt werden. Dies geschah unter Verwendung des angehängten His-Tags mittels Ni²⁺-Chelat-Affinitätschromatographie (3.4.3.2). HisFlinkA und HisFA wurden nach Expression dagegen ausschließlich im unlöslichen Teil des Zellextraktes gefunden, rückgefaltet und ebenso mittels Ni²⁺-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt. Anschließend wurde wenn notwendig eine präparative Gelfiltration durchgeführt (3.4.3.3).

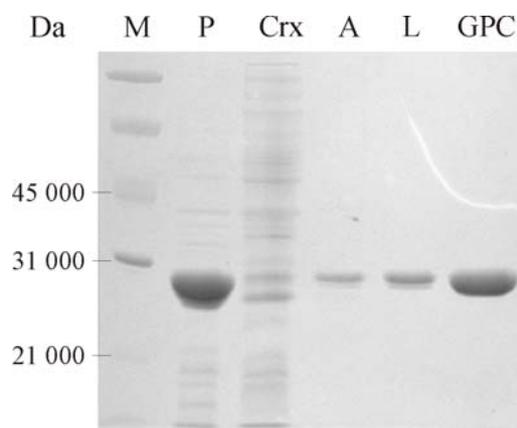


Abbildung 4.21: Heterologe Herstellung und Rückfaltung von HisAF, dokumentiert durch SDS-PAGE (12,5% Acrylamid)

HisAF ohne His-Tag findet sich vorwiegend in der unlöslichen (P), jedoch zu geringen Teilen auch in der löslichen (Crx) Fraktion des Zellextraktes von *E.coli* BL21(DE3)c+. Bei der Rückfaltung aus GdmCl fiel ein Teil des Proteins aus (A), der lösliche Teil (L) wurde über eine präparative Gelfiltration weiter aufgereinigt (GPC). M = Markerproteine.

In Abbildung 4.21 ist exemplarisch die Reinigung der His-Tag-freien Version von HisAF über Rückfaltung aus der unlöslichen Fraktion des Zellextraktes und anschließender präparativer Gelfiltration dargestellt.

4.3.3 Biophysikalische Charakterisierung

Die molaren und spezifischen Extinktionskoeffizienten der Chimären wurden aus den bekannten Aminosäuresequenzen und Molekulargewichten ermittelt (Pace *et al.*, 1995; Gleichung 3.4). Die Werte sind Tabelle 4.6 zu entnehmen.

Tabelle 4.6: Molekulargewichte (MW) unter Berücksichtigung des His-Tag, molare und spezifische Extinktionskoeffizienten der Chimären und Anzahl von Tryptophan- (W) und Tyrosin-(Y) Resten

oHis: ohne HisTag

	HisAlinKF	HisAF	HisAF _{oHis}	HisFlinkA	HisFA
MW [$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$]	29 260	30 150	27 990	28 020	27 820
ϵ_{280} [$\frac{1}{\text{M cm}}$]	14 440	14 440	14 440	9 970	9 970
$0.1\% A_{280}$ [$\frac{\text{cm}^2}{\text{mg}}$]	0,49	0,48	0,52	0,36	0,36
Anzahl W + Y	1 + 6	1 + 6	1 + 6	1 + 3	1 + 3

4.3.3.1 Bestimmung des Oligomerisierungszustandes durch analytische Gelfiltration

Mit Proteinen bekannten Molekulargewichts wurde auf einer Superdex-75-Gelfiltrationssäule nach Methode 3.5.5 eine Kalibrierungskurve erstellt und anschließend die Chimären analysiert.

HisAlinKF, sowie HisAF mit und ohne HisTag lieferten dabei jeweils einen einzigen scharfen Elutionspeak. Abbildung 4.22 zeigt exemplarisch das Elutionsprofil von HisAF ohne HisTag. Das Protein eluierte nach 22min, dies entspricht einem Molekulargewicht von 26300Da. Der so ermittelte Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem errechneten Molekulargewicht von 27990 für das Monomer (Tabelle 4.6). HisFlinkA eluierte dagegen bereits im Ausschlußvolumen und liegt daher vermutlich hauptsächlich als hochmolekulares Aggregat vor (nicht gezeigt).

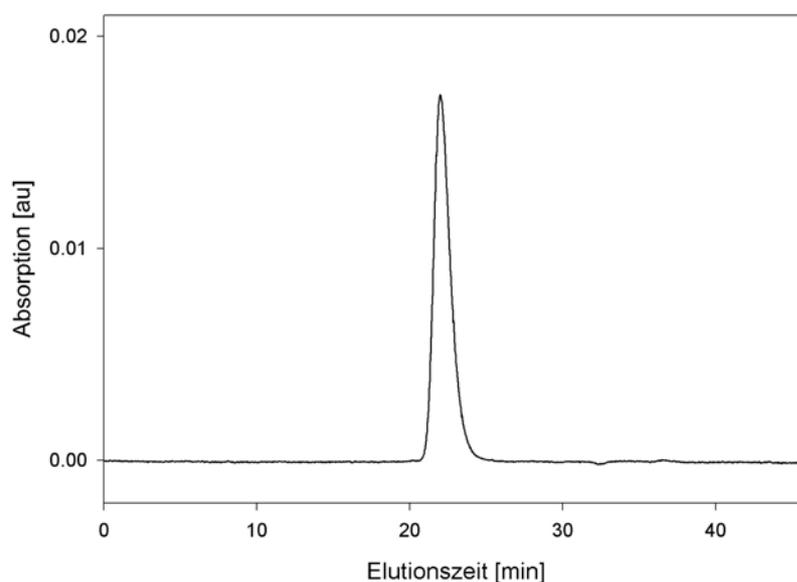


Abbildung 4.22: Bestimmung des Molekulargewichts der Chimäre HisAF über analytische Gelfiltration

Elutionsprofil von HisAF ohne His-Tag nach Auftrag auf eine Superdex-75-Säule. Die Elution des Proteins wurde bei 280nm verfolgt, die Flußrate betrug $0,5\text{ml}/\text{min}$ in 50mM KP, pH 7,5, 300mM KCl, RT. Es wurden 6,6nmol HisAF aufgetragen, welches bei einem Molekulargewicht von 26300Da, entsprechend dem Monomer, eluierte.

4.3.3.2 Dynamische Lichtstreuung

Die Chimäre HisAF wurde zusätzlich mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht (3.5.6). Es wurden $15\mu\text{l}$ einer $3,95\text{mg}/\text{ml}$ Lösung eingesetzt. Die Streukurve konnte gut mit einer monomodalen Funktion analysiert werden, d.h., daß die Proteinlösung monodispers war. Der hydrodynamische Radius betrug 2,6nm und das Molekulargewicht wurde unter der Annahme einer globulären Molekülform zu 28kDa bestimmt. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Gelfiltration (26300Da) und dem errechneten Molekulargewicht des Monomers (27990Da). Die Monodispersität der Lösung kann als gute Voraussetzung für die Kristallisation von HisAF gelten, die zu diesem Zweck an Cristina Vega-Fernandez und Francisco Fernandez aus der Gruppe von Matthias Wilmanns (EMBL-Outstation Hamburg) weitergereicht wurde.

4.3.3.3 Spektroskopische Untersuchung der Sekundär- und Tertiärstruktur

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur wurden CD-Spektren im Fern-UV-Bereich (170-250nm) aufgenommen. Das Fern-UV CD-Spektrum von HisAF ist typisch für überwiegend α -helikale Proteine (Johnson, 1990). Es ähnelt den Fern-UV-Spektren von HisA und HisF (Abbildung 4.23).

Um die Tertiärstruktur von HisAF zu untersuchen wurde sowohl Nah-UV CD- als auch Fluoreszenzemissionsspektroskopie durchgeführt. Dabei ist für die Ausbildung des CD-Signals die Immobilisierung aromatischer Aminosäuren im Inneren des Proteins von Bedeutung, während das fluorimetrische Signal durch Tryptophanfluoreszenz dominiert wird und eine Aussage über die Abschirmung dieser Aminosäure vom Lösungsmittel erlaubt. Da HisAF nur ein Tryptophan an Position 156 besitzt, welches aus der C-terminalen Hälfte von HisF stammt, ist besonders der Vergleich zu wildtypischem HisF und zu HisF-C interessant.

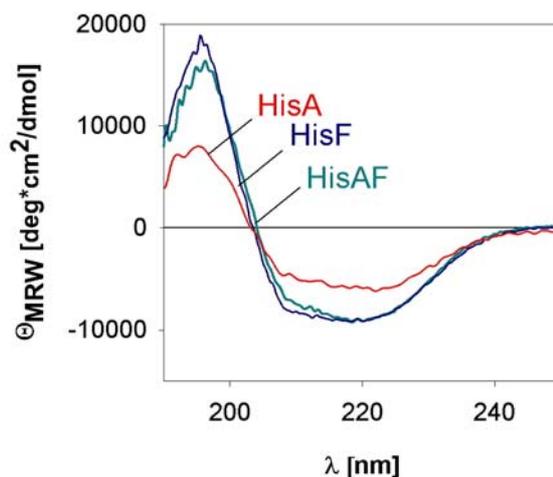


Abbildung 4.23: Das Fern-UV CD-Spektrum von HisAF gleicht sowohl dem von HisA wie dem von HisF

Die Spektren wurden in 50mM KP, pH 7,5 bei 23°C aufgenommen. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 0,16^{mg/ml} für HisAF, 0,3^{mg/ml} für HisA und 0,17^{mg/ml} für HisF. Die gezeigten Spektren sind das Mittel aus 10 Einzelspektren. Die Schichtdicke der Küvette betrug 0,1cm. Das HisA-Spektrum wurde aus Schmidt (1999) übernommen.

In Abbildung 4.24 ist exemplarisch das Nah-UV CD-Spektrum (250-320nm) von HisAlinkF gezeigt. Es ist gut strukturiert, das Protein besitzt somit eine ausgeprägte Tertiärstruktur. Das Spektrum ist bis auf den Bereich um 295nm praktisch identisch mit dem des Wildtypproteins HisF. In diesem bestimmten Bereich ähnelt es eher dem von HisF-C (Abbildung 4.24).

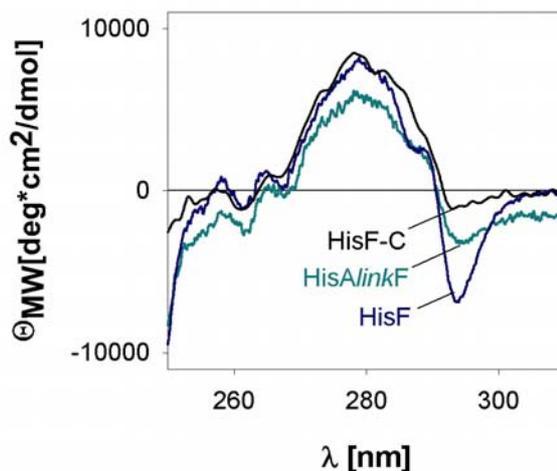


Abbildung 4.24: Das Nah-UV CD-Spektrum von HisAlinkF gleicht denen von HisF und HisF-C

Die Spektren wurden in 50mM KP, pH 7,5 bei 23°C aufgenommen. Die eingesetzten Konzentrationen betragen $0,9\text{mg/ml}$ für HisAlinkF, $0,17\text{mg/ml}$ für HisF und $0,16\text{mg/ml}$ für HisF-C. Die gezeigten Spektren sind das Mittel aus 10 Einzelspektren. Die Schichtdicke der Küvette betrug 1cm (HisAlinkF) bzw. 5cm (HisF und HisF-C).

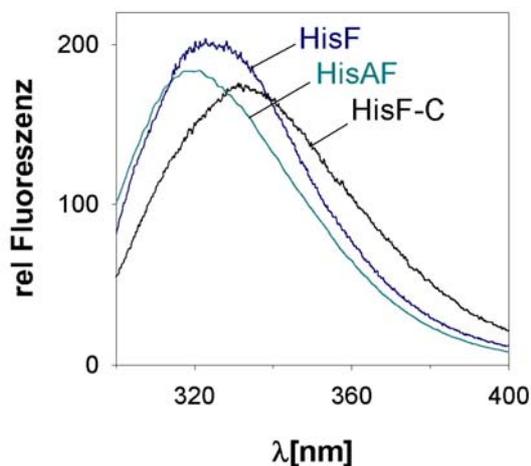


Abbildung 4.25: Das einzige Tryptophan ist in HisAF und in HisF gleich gut vom Lösungsmittel abgeschirmt

Die Fluoreszenzemissionsspektren von HisAF, HisF und HisF-C wurden nach Anregung bei 295nm in 50mM KP, pH 7,5 bei 23°C aufgenommen. Die eingesetzten Konzentrationen betragen $0,16\text{mg/ml}$ für HisAF, $0,17\text{mg/ml}$ für HisF und $0,16\text{mg/ml}$ für HisF-C. Die Maxima der Fluoreszenzemission liegen für HisAF bei 320nm, für HisF bei 323nm, für HisF-C bei 333nm.

Bei den Fluoreszenzmessungen von HisAF wurde durch Excitation bei 295nm ausschließlich die Fluoreszenz von Tryptophan 156 angeregt. Das Emissionsmaximum von HisAF liegt mit 320nm nahe dem von HisF bei 323nm, während es bei HisF-C bei 333nm zu finden ist (Abbildung 4.25). Dies belegt, daß der einzige Tryptophanrest in

HisAF ebenso wie im HisF-Wildtypenzym nahezu vollständig vom Lösungsmittel abgeschirmt ist. In der separaten HisF-C Hälfte ist das gleiche Tryptophan dagegen deutlich stärker dem Lösungsmittel ausgesetzt.

4.3.3.4 Messung der konformationellen Stabilität durch Denaturierung in Harnstoff

Um die Stabilität von HisAF zu quantifizieren, wurde das Protein in Harnstoff denaturiert und die Auffaltung nach 12-stündiger Inkubation mehrmals zur Überprüfung der Gleichgewichtseinstellung mittels Fluoreszenzemissions-Spektroskopie bei 320nm (Anregung bei 320nm) und Fern-UV CD-Spektroskopie bei 222nm analysiert. Die mit Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie verfolgten Auffaltungskurven erwiesen sich dabei als deckungsgleich (Abbildung 4.26a). Dies bedeutet, daß Tertiär- und Sekundärstruktur gemeinsam auffalten. Es findet sich somit kein Hinweis auf ein Auffaltungsintermediat, d.h. die Daten sind kompatibel mit dem

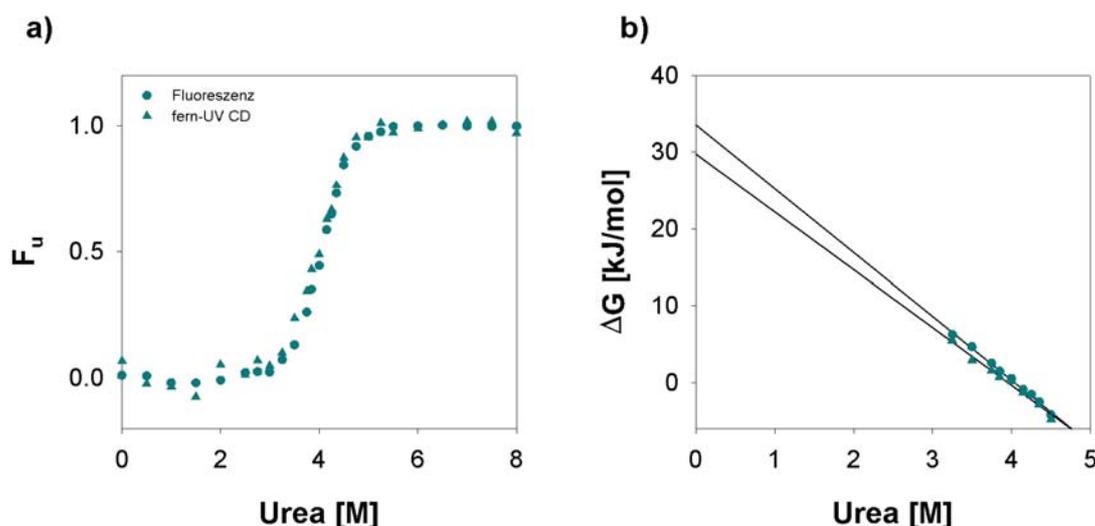


Abbildung 4.26: Auffaltung von HisAF mit Harnstoff (a) und daraus abgeleitete thermodynamische Stabilität ΔG als Funktion der Harnstoffkonzentration (b)

Die Messungen wurden in 50mM KP, pH 7,5 bei 23°C durchgeführt. Die Proben enthielten 0,075^{mg}/_{ml} HisAF. Das fluorimetrische Signal wurde über eine Minute aufgenommen und gemittelt. Die Werte der CD-Spektroskopie sind ein Mittel aus 10 Messungen; die Schichtdicke der CD-Küvette betrug 0,1cm. Die mit Fluoreszenzspektroskopie (Excitation bei 280nm, Emission bei 320nm) und Fern-UV CD-Spektroskopie bei 222nm verfolgten Auffaltungskurven sind nahezu deckungsgleich (a). Die unter der Annahme des Zweizustandsmodells ermittelten $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Werte betragen 34,8^{kJ}/_{mol} (fluorimetrisch verfolgte Auffaltung) bzw. 29,7^{kJ}/_{mol} (mit CD verfolgte Auffaltung) (b). Die entsprechenden m-Werte liegen bei 8,6^{kJ}/_{molM} bzw. 7,5^{kJ}/_{molM}.

Zweizustandsmodell der Denaturierung. Der ermittelte Wert von $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ beträgt circa $32,5^{\text{kJ}}/\text{mol}$ (fluorimetrisch verfolgte Kurve: $34,8^{\text{kJ}}/\text{mol}$; mit CD verfolgte Kurve: $29,7^{\text{kJ}}/\text{mol}$) (3.5.8; Abbildung 4.26b).

Der Übergangsbereich der Kurven ist relativ steil, d.h. der Prozeß der Denaturierung verläuft mit hoher Kooperativität (Abbildung 4.26a). Der aus der Steigung in Abbildung 4.26b ermittelte m-Wert (3.5.8) beträgt circa $8,1^{\text{kJ}}/\text{molM}$ (fluorimetrisch verfolgte Kurve: $8,6^{\text{kJ}}/\text{molM}$, mit CD verfolgte Kurve: $7,5^{\text{kJ}}/\text{molM}$). Sowohl $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ als auch m von HisAF liegen damit im Bereich natürlich vorkommender Proteine (Privalov, 1979; Pfeil, 1998).

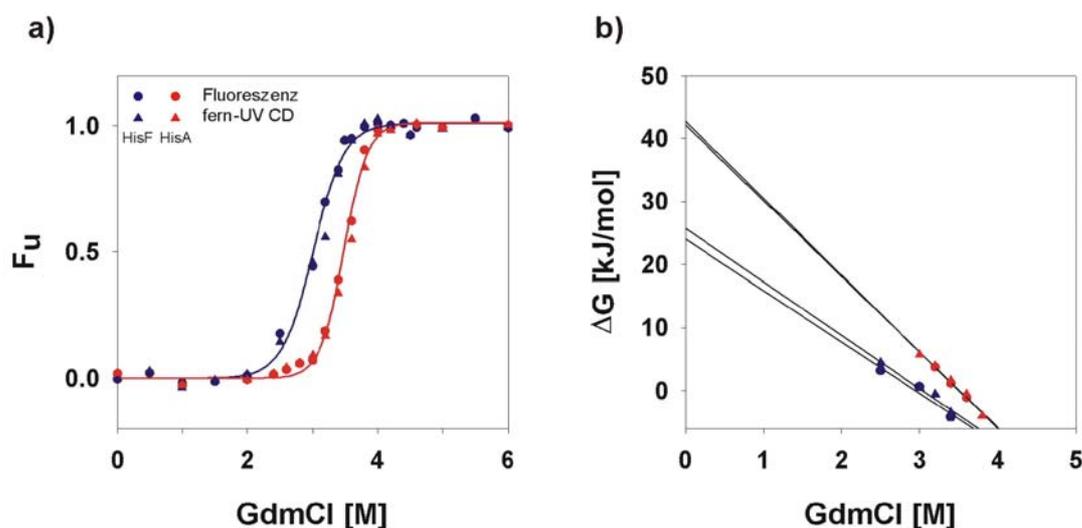


Abbildung 4.27: Auffaltung von HisA und HisF mit Guanidiniumchlorid (a) und daraus abgeleitete thermodynamische Stabilitäten ΔG als Funktion der GdmCl-Konzentrationen (b)

Die Messungen wurden in 50mM KP, pH 7,5 bei 23°C durchgeführt. Die Proben enthielten $0,146^{\text{mg}}/\text{ml}$ HisA und $0,075^{\text{mg}}/\text{ml}$ HisF. Das fluorimetrische Signal wurde über eine Minute aufgenommen und gemittelt. Die Werte der CD-Spektroskopie sind ein Mittel aus 10 Messungen; die Schichtdicke der CD-Küvette betrug 0,1cm. Die mit Fluoreszenzspektroskopie (Excitation bei 280nm, Emission bei 340nm bei HisA und 320nm bei HisF) und Fern-UV CD-Spektroskopie bei 222nm verfolgten Auffaltungskurven von HisA bzw. HisF sind nahezu deckungsgleich (a). Die unter der Annahme des Zweizustandsmodells ermittelten $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Werte betragen für HisA $42,7^{\text{kJ}}/\text{mol}$ (fluorimetrisch verfolgte Auffaltung) bzw. $42,1^{\text{kJ}}/\text{mol}$ (mit CD verfolgte Auffaltung) und für HisF $24,0^{\text{kJ}}/\text{mol}$ (fluorimetrisch verfolgte Auffaltung) bzw. $28,5^{\text{kJ}}/\text{mol}$ (mit CD verfolgte Auffaltung) (b). Die entsprechenden m-Werte liegen für HisA bei $12,2^{\text{kJ}}/\text{molM}$ bzw. $12,0^{\text{kJ}}/\text{molM}$ und für HisF bei $8,1^{\text{kJ}}/\text{molM}$ bzw. $8,5^{\text{kJ}}/\text{molM}$.

Zur Entfaltung der Wildtypenzyme HisA und HisF wurde Guanidiniumchlorid (GdmCl) verwendet, dessen denaturierende Wirkung die von Harnstoff übersteigt. Trotzdem dauerte es ca. zwei Tage bis sich bei der Auffaltung ein Gleichgewicht einstellte. Die Analyse mittels Fluoreszenzspektroskopie nach Anregung bei 280nm (Messung der Emission: HisF 320nm, HisA 340nm) und Fern-UV CD-Spektroskopie

(222nm) ergaben, daß HisA mit $[D]_{1/2} = 3,5\text{M GdmCl}$ stabiler ist als HisF mit $[D]_{1/2} = 3,0\text{M GdmCl}$ und bei beiden Proteinen Tertiär- und Sekundärstruktur simultan entfalten (Abbildung 4.27). Dies bedeutet, daß ähnlich wie bei HisAF, auch bei HisA und HisF die Auffaltungskurven keinen Hinweis auf die signifikante Anhäufung eines Intermediates liefern.

Die thermodynamische Stabilität von HisA und HisF wurde analog zu HisAF bestimmt. Der $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Wert beträgt ca. $42,4\text{kJ/mol}$ für HisA und ca. $26,3\text{kJ/mol}$ für HisF. Der $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Wert von HisAF liegt mit $32,5\text{kJ/mol}$ genau zwischen dem von HisA und HisF. Die m-Werte liegen bei ca. $12,1\text{kJ/molM}$ für HisA und ca. $8,3\text{kJ/molM}$ für HisF, was in etwa dem m-Wert von HisAF entspricht.

Für ein nicht-natürliches Protein besitzt HisAF somit eine beträchtliche Stabilität und zeigt eine sehr kooperative Auffaltung, die vergleichbar mit den Wildtypproteinen HisA und HisF ist.

4.3.3.5 Messung der Stabilität mittels Hitzedenaturierung (DSC-Messungen)

Um Aufschluß über die Hitzestabilität von HisAF zu erhalten, wurde Differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC) genutzt. Es wurden vergleichende Messungen von HisAF und HisF durchgeführt. Dabei wurden die Proteine in 50mM KP, pH 7,5 aufgeheizt und ihre Wärmekapazität C_p als Funktion der Temperatur mit Puffer als

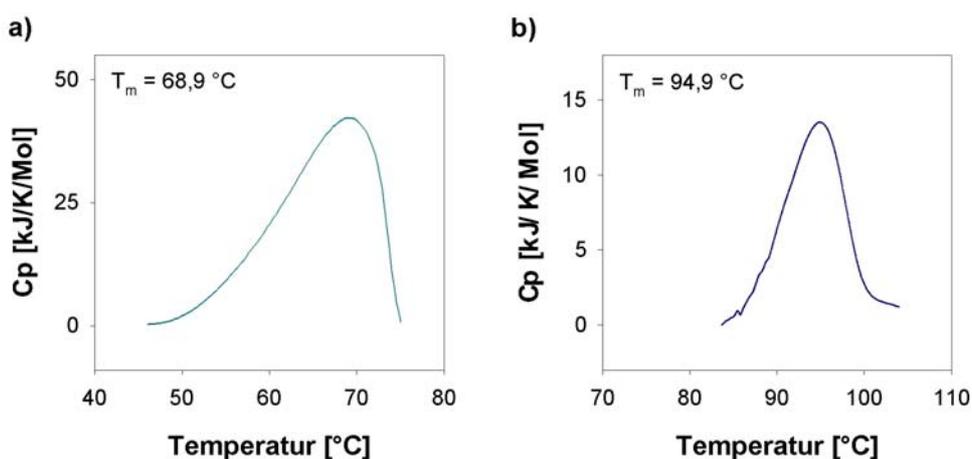


Abbildung 4.28: DSC-Messungen mit HisAF (a) und HisF (b)

Es wurden $40\mu\text{M}$ HisAF bzw. $44\mu\text{M}$ HisF in 50mM KP, pH 7,5 mit einer Scanrate von 60K/h aufgeheizt und gegen Puffer vermessen. Die Funktion wurde mit dem Programm Origin bearbeitet, wobei der Baseline-Scan (Puffer gegen Puffer) vom Meßscan (Protein gegen Puffer) abgezogen wurde.

Referenz gemessen (Abbildung 4.28). HisAF denaturiert deutlich früher als HisF, bei gleicher Scanrate von $60^{\text{K}}/\text{h}$ ergibt sich für HisAF ein T_m von $68,9^{\circ}\text{C}$ und für HisF ein T_m von $94,9^{\circ}\text{C}$. Dies zeigt, daß HisAF eine beachtliche Thermostabilität aufweist.

Da die thermische Denaturierungen von HisAF und HisF irreversibel verliefen, war eine weitergehende thermodynamische Analyse nicht möglich.

4.3.3.6 Stabilität gegenüber Trypsin

Um weitere Aussagen über die Stabilität bzw. Flexibilität von HisAF zu erhalten, wurde das Protein mit Trypsin inkubiert. Das Ergebnis des proteolytischen Verdaus wurde auf einem Tris-Tricin-Gel analysiert (Abbildung 4.29; Schagger & von Jagow, 1987). Bei der Chimäre HisAF und den Wildtypproteinen HisA und HisF tritt das gleiche Muster auf, wonach die Proteine mit der Zeit um ca. 4kDa verkürzt werden (Abbildung 4.29). Dieser Abbau ist in HisA und HisF bereits nach 5-minütiger Inkubation zu beobachten und ist nach 6 Stunden praktisch abgeschlossen. HisAF wird dagegen erst nach einer Stunde abgebaut, zudem sind nach 6 Stunden noch 50% des Proteins intakt. Gegenüber proteolytischer Degradation durch Trypsin ist HisAF demnach sogar stabiler als die Elternproteine. Dies ist ein starker Hinweis auf eine kompakte HisAF-Struktur.

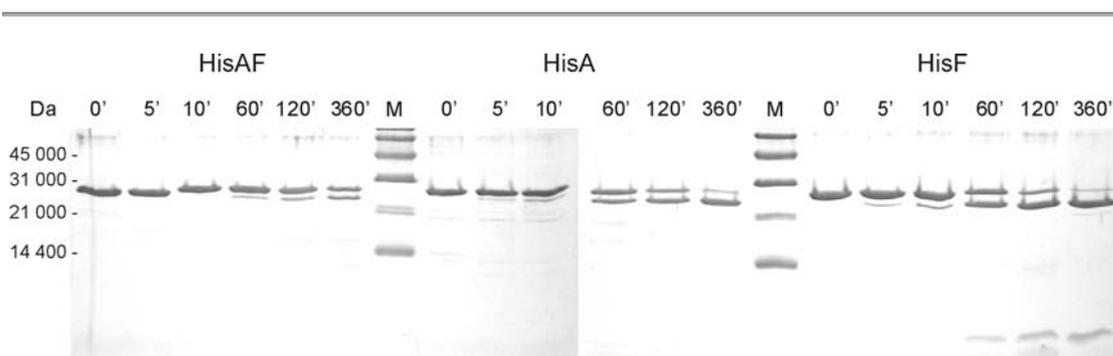


Abbildung 4.29: HisAF ist stabiler gegenüber Trypsinolyse als HisA und HisF

$10\mu\text{M}$ HisAF, HisA bzw. HisF wurden mit $0,064\mu\text{M}$ Trypsin in 50mM KP, pH 7,5 bei 23°C für 5, 10, 60, 120 und 360 Minuten inkubiert. Die Trypsinspaltung der Proteine wurde durch Elektrophorese auf Tris-Tricin-Gelen (20% Acrylamid) analysiert. Alle Proteine werden über die Zeit um ca. 4kDa verkürzt. Bei HisF taucht ab 60' Inkubation eine entsprechende Bande auf. M = Markerproteine.

Frühere Untersuchungen zeigten, daß das 4kDa Fragment im Falle von HisA durch tryptische Spaltung nach Arginin 21 und im Falle von HisF durch Spaltung nach Arginin 27 entsteht (Schwander, 1997; Beismann-Driemeyer, 2000). Diese Argininreste liegen jeweils in der Schleife zwischen $\beta 1'$ und $\beta 1''$. Da HisAF um ein

Fragment gleicher Länge verkürzt wird, ist es wahrscheinlich, daß der Schnitt an derselben Stelle wie in HisA erfolgt, nämlich nach Arginin 21.

4.3.4 Aktivitätsmessungen *in vitro*

HisAF wurde auf HisA- und ammoniumabhängige HisF-Aktivität getestet, wobei jeweils das andere Protein in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ als Hilfsenzym eingesetzt wurde (3.5.11). Ansonsten enthielten die Ansätze jeweils $10\mu\text{M}$ 5'ProFAR und 100mM NH_4 -Acetat gelöst in 50mM Tris/HCl pH 8,0. Selbst $20\mu\text{M}$ HisAF führten jedoch weder zu meßbarer HisA- noch HisF-Aktivität.

4.3.5 Untersuchung der Komplexbildung mit HisH durch analytische Gelfiltration

Das native HisF-Protein assembliert mit HisF zu einem stöchiometrischen Komplex, der Imidazolglycerinphosphat Synthase (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Die analytische Gelfiltration einer Mischung von HisAF mit einem zweifachen Überschuß

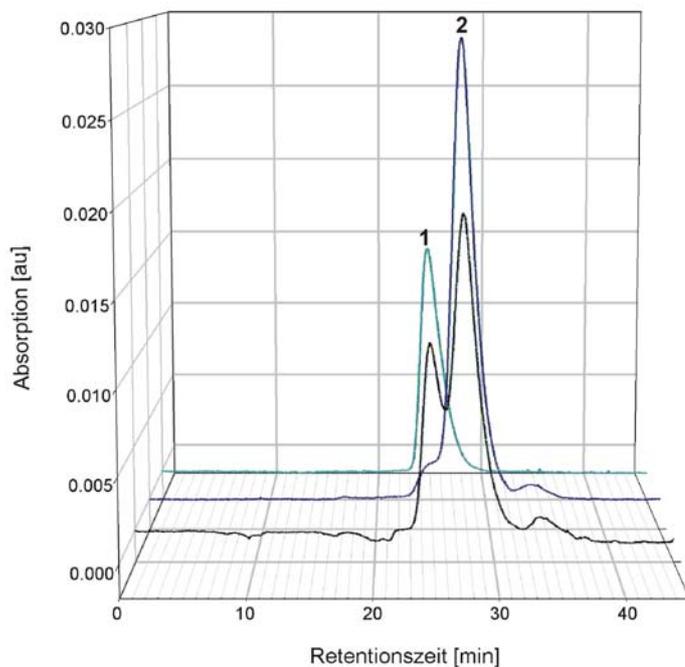


Abbildung 4.30: HisAF bildet mit HisH keinen Komplex

Elutionsprofile von HisAF (1, türkis), HisH (2, blau) und einer 1:2 molaren Mischung von HisAF und HisH (schwarz) bei analytischer Gelfiltration auf einer Superdex-75-Säule. Die Elution der Proteine wurde bei 280nm verfolgt, die Flußrate betrug $0,5\text{ml}/\text{min}$ in 50mM KP, pH 7,5, 300mM KCl, RT.

an HisH ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine Komplexbildung der beiden Proteine (Abbildung 4.30). Der C-terminale HisF-Anteil von HisAF ist demnach nicht ausreichend für eine Bindung an HisH.

4.3.6 Ligandenbindung

4.3.6.1 Bindung von 5'ProFAR

Um die Bindung von 5'ProFAR, dem Substrat von HisA, an die Chimäre HisAF zu testen, wurden Tryptophanvarianten nach dem Vorbild von HisF (Haeger, 2001) hergestellt. Dabei war der einzige Tryptophanrest von HisF von der α -Helix 5 in eine flexible Schleife in der Nähe des aktiven Zentrums versetzt worden. Die Bindung von 5'ProFAR an das HisF_F23W_W156F Protein konnte über die Fluoreszenzänderung von W23 detektiert werden. In analoger Weise wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Variante HisAF_F27W_W156F hergestellt, um die Bindung von 5'ProFAR über die Fluoreszenzänderung von W27 zu detektieren.

Dazu wurde zunächst die C-terminale Hälfte aus *hisF*-W156F (Haeger, 2001) analog zur Klonierung von *hisAF* (4.3.1) amplifiziert und in den Vektor pET24a(+) kloniert. Die N-terminale *hisA* Hälfte wurde mittels Megaprimer-Methode erstellt und vor *hisF*-C_W156F kloniert. Dazu wurde mit den Primern T7-Prom und 3'*hisA*-N_F27W ein Megaprimer auf dem Templat pET24a(+)-*hisAlinkF* erstellt und anschließend das Volllängen-Fragment *hisA*-N_F27W mit dem Megaprimer und 3'*hisA*-N(*Bam*HI) von dem Templat pET24a(+)-*hisAlinkF* amplifiziert. Zusätzlich wurde das Konstrukt *hisAF*_F27W_W156F ohne Linker, analog zu *hisAF* ohne Linker, in den Vektor pET24a(+) kloniert (4.3.1): auf dem Templat pET24a(+)-*hisAlinkF*_F27W_W156F wurde mit den Primern T7-Prom und 3'*hisAF* ein Megaprimer erstellt, der in einer zweiten PCR als 5'Primer diente und zusammen mit dem Primer 3'*hisF*-C(*Bam*HI) auf demselben Templat das Volllängenprodukt generierte.

Die Proteinvarianten wurden nach heterologer Genexpression wie für *HisAlinkF* und *HisAF* beschrieben (4.3.2) über Rückfaltung aus dem Pellet und anschließende präparative Gelfiltration gereinigt, obwohl nach Expression auch ein kleiner Anteil Protein im löslichen Teil des Zellextraktes zu finden war.

Um die Bindung von 5'ProFAR an die Varianten zu testen wurden 10 μ M HisAF_F27W_W156F in 50mM KP-Puffer, pH 7,5, in 2,5 μ M-Schritten bis zu einer

Konzentration von 20 μ M 5'ProFAR titriert und nach Anregung bei 295nm jeweils ein Fluoreszenzemissionsspektrum von 300-400nm aufgenommen (3.5.12.1). Es ergab sich jedoch keine Verschiebung der Fluoreszenzintensität oder des Fluoreszenzmaximums, welches bei dieser Variante bei 346nm liegt. Auch die Zugabe von 0,1mM 5'ProFAR hatte keinen Effekt auf das Fluoreszenzsignal.

Entweder wird 5'ProFAR nicht von HisAF gebunden oder aber die Schleife nach β 1 bewegt sich bei der Bindung nicht in solcher Weise, daß über Fluoreszenzänderung des eingebauten Tryptophan eine Bewegung zu detektieren wäre.

Eine andere Möglichkeit zu testen, ob 5'ProFAR eine Bindung mit HisAF eingeht, wäre der Vergleich von Auffaltungskurven mit und ohne Liganden. Falls Bindung stattfindet, sollte es zur Stabilisierung von HisAF und damit zur Verschiebung der Auffaltungskurve hin zu höheren Harnstoffkonzentrationen kommen.

4.3.6.2 Bindung von rCdRP an HisAF

HisA bindet reduziertes CdRP (rCdRP), ein Produktanalogon der Phosphoribosyl-anthranilat Isomerase (TrpF), mit einem K_d von 115 μ M (Leopoldseder, 2002). Um die Bindung von rCdRP an die Chimäre HisAF zu testen, wurden 5 μ M HisAF schrittweise mit rCdRP titriert und nach Anregung bei 280nm jeweils ein Fluoreszenzemissionsspektrum von 300-450nm aufgenommen (3.5.12.2). Mit zunehmender rCdRP-Konzentration nahm die intrinsische Tryptophanfluoreszenz um 320nm ab und gleichzeitig die Fluoreszenz des aromatischen Ringsystems von rCdRP um 415nm zu (Abbildung 4.31).

Die Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten zeigt, daß ein Energietransfer zwischen den beiden Fluorophoren stattfindet. Dieser Energietransfer findet in gleicher Weise bei der Bindung von rCdRP an tHisA (Leopoldseder, 2002), sowie an TrpF aus *E.coli* und *T.maritima* statt (Hommel *et al.*, 1995; Sterner *et al.*, 1996). Ein isoemissiver Punkt ist bei 371nm zu beobachten, welcher belegt, daß nur eine Art von Bindestelle von HisAF für rCdRP existiert.

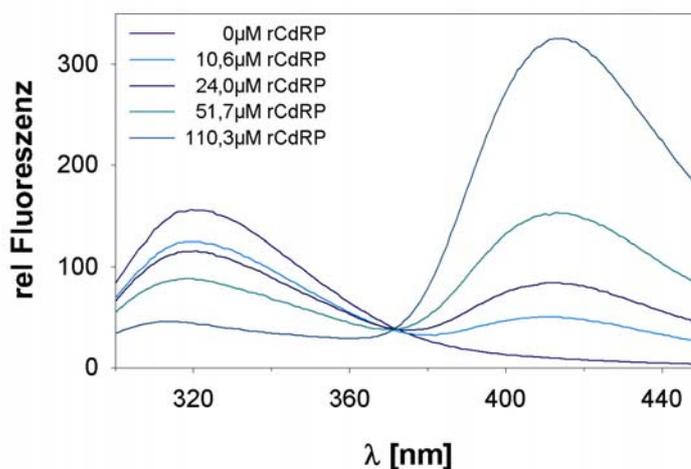


Abbildung 4.31: Titration von HisAF mit rCdRP

Die Fluoreszenzemissionsspektren wurden nach Anregung bei 280nm in 50mM Tris/HCl, pH 7,5 bei 23°C aufgenommen. Es wurden 5 μ M HisAF eingesetzt und schrittweise die angegebenen Konzentrationen an rCdRP zutitriert.

Zur Quantifizierung der Bindungsstärke wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei 320nm über eine Minute gemittelt und nach Abzug des Nullwerts (Enzym in Puffer) gegen die rCdRP-Konzentration aufgetragen (Abbildung 4.32). Durch einen Fit der resultierenden hyperbolischen Bindungskurve (Programm Sigma Plot) wurde die thermodynamische Dissoziationskonstante $K_d^{\text{rCdRP}} = 80\mu\text{M}$ bestimmt.

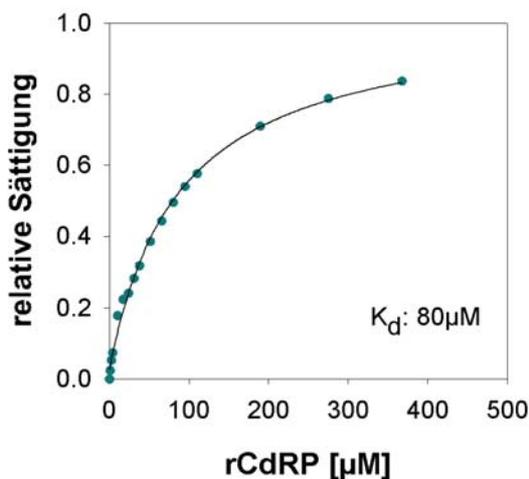


Abbildung 4.32: Bindung von rCdRP an HisAF

Die Fluoreszenzemission von 5 μ M HisAF bei 320nm wurde nach Anregung bei 280nm in 50mM Tris/HCl, pH 7,5 bei 23°C über 1min gemittelt. Die Abnahme der Fluoreszenz wurde gegen die eingesetzte rCdRP-Konzentration aufgetragen. Die Meßpunkte wurden normiert und durch Fit mit einer hyperbolischen Funktion (Programm Sigma Plot) die thermodynamische Dissoziationskonstante K_d zu 80 μ M bestimmt.

Dieser Messung zufolge besitzt HisAF die Fähigkeit rCdRP zu binden und zwar in vergleichbarer Weise wie HisA ($K_d^{\text{rCdRP}} = 115\mu\text{M}$; Leopoldseeder, 2002). Daraus läßt sich schließen, daß das aktive Zentrum von HisAF dem des wildtypischen HisA ähnelt.

4.3.7 Zufallsmutagenese durch DNA-Shuffling und Selektion auf HisAF-Varianten mit katalytischer Aktivität

hisAlinkF und *hisAF* wurden in den Vektor pTNA kloniert, um ihre Komplementationsfähigkeit von $\Delta hisA$ - bzw. $\Delta hisF$ -Defizienzen auxotropher *E.coli* Zellen zu überprüfen (3.2.3). Dazu wurden die Gene mittels PCR von dem Templat pET24a(+)-*hisAF* unter Verwendung der Primer 5'*hisA*(*SphI*) und 3'*hisF*(*HindIII*) amplifiziert und über die eingebauten Schnittstellen *SphI* und *HindIII* in pTNA ligiert. Die korrekte Basenabfolge positiver Klone wurden über DNA-Sequenzierung verifiziert. Transformation der beiden Deletionsstämme mit pTNA-*hisAlinkF* bzw. pTNA-*hisAF*, gefolgt von Selektion auf Minimalmedium ohne Histidin zeigte, daß die Varianten *HisAlinkF* und *HisAF* weder die *hisA*- noch die *hisF*-Defizienz der Mangelstämme *in vivo* komplementieren können. Dies deckt sich mit der fehlenden *HisA*- oder *HisF*-Aktivität von *HisAF in vitro* (4.3.4).

Zur Etablierung katalytischer Aktivität auf dem *HisAF*-Gerüst wurde daraufhin eine Kombination aus Zufallsmutagenese und Selektion *in vivo* durchgeführt. Dazu wurde *hisAlinkF* geshuffelt (Stemmer, 1994; 3.3.7.3), die einzelnen Schritte sind in Abbildung 4.33 dokumentiert. In einem ersten Schritt wurde das Gen von dem Konstrukt pET24a(+)-*hisAlinkF* mit den Primern T7-Prom und T7-Term amplifiziert (30 Zyklen: 1' 95°C, 1' 55°C, 1'20'' 72°C; Spur A in Abbildung 4.33). Es wurde wie in allen folgenden PCR-Schritten die *Taq*-Polymerase verwendet. Daraufhin wurde das entstandene Fragment bei 20°C für 7min mit DNaseI inkubiert, welche anschließend durch Hitze inaktiviert wurde (15' 98°C). Die Verwendung von 1u DNaseI ergab gewünschte Fragmente der Länge 50-200bp (Spur D). 16µl dieses Ansatzes wurden in der darauffolgenden *Primerless* PCR verwendet (50 Zyklen: 30'' 95°C, 40'' 40°C, 55'' 72°C). Dabei ergab sich ein Schmier mit einer diffusen Bande von knapp 1000bp (Spur PL). Eine Kontroll-PCR mit den T7-Primern über 30 Zyklen ergab kein PCR-Produkt dieser Größe (Spur K), was darauf hindeutet, daß keine signifikante Menge unverdautes Fragment nach Behandlung mit DNaseI mehr vorhanden war. In der abschließenden *Primed* PCR wurde das Volllängenfragment unter Verwendung von

„inneren Primern“ (5'hisA(*Sph*I) und 3'hisF(*Hind*III)) noch einmal amplifiziert, was zu großen Mengen eines Fragments mit der erwarteten Länge von knapp 800bp führte (Spur P).

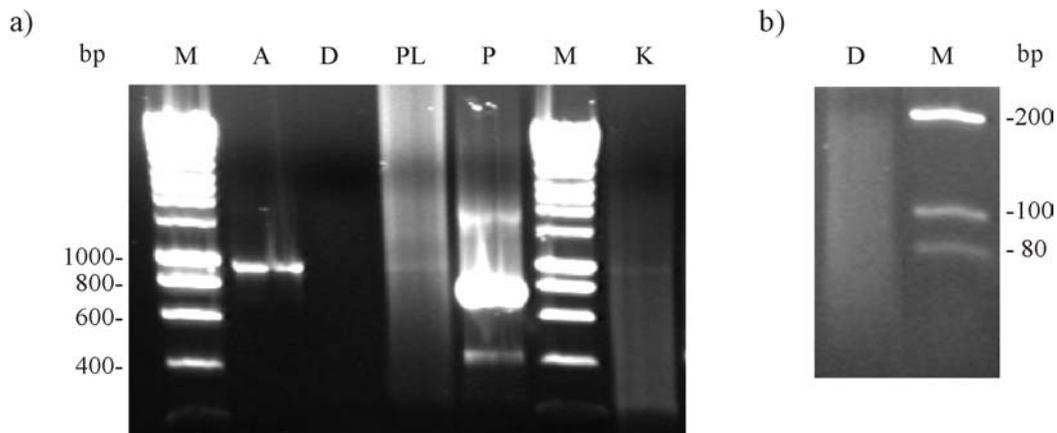


Abbildung 4.33: Analyse des DNA-Shuffling von *hisAlinkF*

Alle Zwischenprodukte wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen (a), das Produkt des DNaseI-Verdau ist zusätzlich auf einem 2%igen Agarosegel gezeigt (b). M: Smart- (a) bzw. 100bp-Ladder (b), A: PCR-Produkt als Templat für den DNaseI-Verdau, D: Fragmente nach DNaseI-Verdau, PL: Produkte der *Primerless* PCR, P: Produkte der *Primed* PCR mit inneren Primern, K: Kontrollreaktion mit DNaseI-Fragmenten.

Das geshuffelte Fragment wurde über die Schnittstellen *Sph*I und *Hind*III in pTNA ligiert, wobei ein etwa 4-facher Überschuß an Fragment zu Vektor eingesetzt wurde. Insgesamt vier Ligationsansätze wurden zur Transformation von acht Chargen frischer elektrokompenter DH5 α -Zellen verwendet. Nach einer Stunde Kur im Schüttler bei 37°C wurden die gesamten Ansätze auf einer großen Ampicillin-haltigen LB-Agarplatte ausgestrichen (12,3dm²). Nach Inkubation über Nacht wurden alle Kolonien abgeschabt und aus diesen Zellen Plasmide mit *hisAlinkF*-Varianten präpariert (3.3.8.2), welche die Primärbank darstellen. Anhand der Zahl der gewachsenen Kolonien auf zusätzlichen Platten, auf denen Verdünnungen ausplattiert wurden, wurde die Größe der Bank auf $9,5 \cdot 10^6$ geschätzt. Die Sequenzierung der Plasmid-DNA aus fünf Einzelkolonien ergab, daß durch das DNA-Shuffling in das *hisAlinkF*-Gen zwischen einer und drei Mutationen eingeführt worden waren. Die durchschnittliche Mutationsfrequenz betrug zwei Basenaustausche pro Gen, entsprechend 1,5 Aminosäureaustauschen.

Insgesamt 5 μ g der Primärbank wurden jeweils mittels fünf Transformationen in frisch hergestellte elektrokompente Δ *hisA*- bzw. Δ *hisF*-Zellen eingebracht. Die so

behandelten Zellen wurden auf Selektivmedium, d.h. VB bzw. M9+Ammoniumsulfat, ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Innerhalb der Beobachtungsdauer von neun Tagen zeigte sich jedoch kein Koloniewachstum.

Analog wurde eine pTNA-*hisAF*-Bank mit einer Größe von $1,44 \cdot 10^6$ und einer abgeschätzten Mutationsfrequenz von zwei Nukleotidaustauschen pro Gen hergestellt, entsprechend 1,8 Aminosäureaustauschen. Bei analogen Experimenten wie oben für *hisAlinkF* beschrieben fand sich jedoch auch in dieser Bank keine Variante mit signifikanter HisA- oder HisF-Aktivität.

4.3.8 Zusammenfassung

Es wurden Chimären bestehend aus Hälften von HisA und HisF hergestellt und charakterisiert. HisAF stellt ein lösliches, gefaltetes, monomeres und stabiles Protein dar, HisFA dagegen ist sehr instabil und tendiert stark zu Aggregation. Die Module HisA-N und HisF-C besitzen demnach für die Packung optimale Kontaktflächen, während die ihnen in den Wildtypproteinen gegenüberliegenden Hälften, HisF-N und HisA-C, nicht ausreichend gut zusammenpassen, um ein stabiles Protein zu bilden.

Die Eigenschaften von HisAF sind ein weiterer Hinweis auf die evolutionäre Verwandtschaft von HisA und HisF und ihrer Entstehung aus einem gemeinsamen Vorläufer halber Länge.

Um über die genaue Anpassung der Hälften aneinander einen tieferen Einblick zu erhalten, wird derzeit die Auflösung der Röntgenstruktur von HisAF in Zusammenarbeit mit der AG Wilmanns (EMBL Hamburg) versucht. Eine derartige Struktur könnte auch wichtige Anhaltspunkte für die Etablierung katalytischer Aktivität auf dem HisAF-Grundgerüst mittels rationalen Proteindesigns liefern.

4.4 Diskussion

Als ein wesentlicher Mechanismus der molekularen Evolution wird die Kombination von Strukturmodulen diskutiert (Lupas *et al.*, 2001). In diesem Kontext werden häufig Domänen als eigenständige Substrukturen bezüglich Faltung, Funktion oder anderer Eigenschaften genannt (Jaenicke, 1999), welche in verschiedenen Zusammensetzungen vorkommen können. Die Herstellung und Charakterisierung isolierter Domänen ist eine häufig angewandte Methode. Die Identifizierung kleinerer unabhängiger

Einheiten, aus denen sich die Domänen existierender Proteine zusammensetzen, ist mittels Sequenz- und Strukturanalyse möglich. Die Herstellung dieser Subdomänen oder Module kann Aufschluß darüber geben, wie Domänenstrukturen sich im Laufe der Evolution entwickelt haben. So wurde auf der Basis von Sequenz- und Strukturanalysen für die $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme HisA und HisF postuliert, daß diese typische „Eindomänen-Faltung“ tatsächlich aus zwei Modulen besteht, die den beiden N- und C-terminalen Hälften entsprechen (Thoma *et al.*, 1999; Lang *et al.*, 2000).

Diese These wird durch die im ersten Teil dieser Arbeit ermittelte Ähnlichkeit der Halb-Barrel Struktur, $(\beta\alpha)_4$, mit der Flavodoxin-ähnlichen Faltung, $(\beta\alpha)_5$, untermauert (4.1; Höcker *et al.*, 2002). Lediglich die Abschirmung der hydrophoben Flächen unterscheidet sich in den beiden Strukturen: bei der Flavodoxin-ähnlichen Faltung wird die „hydrophobe Wunde“ des dem Halb-Barrel entsprechenden Anteils durch ein zusätzliches $\beta\alpha$ -Modul abgeschirmt, während in den HisF-Hälften die Dimerisierung den gleichen Effekt ausübt. Den biochemischen Nachweis der Existenz zweier Domänen innerhalb des $(\beta\alpha)_8$ -Barrel lieferte der Befund, daß sich die isolierten Hälften des $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyms HisF, HisF-N und HisF-C, zu stabilen Proteinen falten (Höcker *et al.*, 2001). Zudem unterstützte diese Arbeit das Modell der Evolution von HisA und HisF, sowie anderer $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Enzyme, aus einem gemeinsamen Vorläufer halber Länge (Abbildung 1.4).

Die entscheidenden Mechanismen dieses Modells stellen Genduplikation, Genfusion und anschließende Diversifizierung dar. Diese Schritte wurden im zweiten Teil dieser Arbeit experimentell rekonstruiert. Wie zurzeit bei der Entschlüsselung ganzer Genome beobachtet werden kann, sind Genduplikationen allgemein ein häufig zu beobachtendes Phänomen. Die anschließende Fusion der beiden Tochtergene bietet den Vorteil, daß durch die kovalente Verknüpfung der Proteine die Translations- und Rotationsentropie des ungefalteten Zustandes erniedrigt und damit die freie Energie der Stabilisierung ΔG erhöht wird (Erickson, 1989; Nagi & Regan, 1997). Eben dieser Effekt konnte durch Genduplikation von *hisF-C* und anschließende Fusion der Tochtergene in der resultierenden Variante HisF-CC beobachtet werden (4.2.4). Aus den duplizierten und fusionierten Hälften hat sich im Laufe der Evolution durch Anpassung der Interaktionsflächen mittels Akkumulation von Mutationen eine kompakte Struktur entwickelt. Dieser Fall wird allgemein im Rosetta-Stone Modell beschrieben (Marcotte *et al.*, 1999; Abbildung 1.1). Sein Ausgangspunkt ist die Fusion

von Genen, die für zwei nicht-interagierende Proteine A und B kodieren. Dies führt zu der Expression eines Fusionproteins, dessen Domänen zunächst unspezifisch wechselwirken. Es bildet sich eine einfache Kontaktfläche aus, die durch sukzessive Mutationen optimiert wird. In dem hier beschriebenen Experiment sind die beiden Proteine, nämlich HisF-C, identisch ($A = B$). Anhand der mittels rationalen Designs erzeugten Variante HisF-CmutC konnte gezeigt werden, daß bereits wenige Aminosäureaustausche zu einer deutlichen Verbesserung der Kontaktfläche führen können. Die angestrebte Ausbildung eines Salzbrückennetzwerks durch zwei Aminosäureaustausche im vierten *Layer* führte in Kombination mit je zwei Austausch in *Layer* 2 und 3, welche allein keinen meßbaren Effekt hatten, zu einem stabileren und kompakteren Protein: HisF-CmutC lag im Gegensatz zu HisF-CC fast ausschließlich in monomerer Form vor und faltete mit höherer Kooperativität auf (4.2.6).

Trotz dieser Erfolge gibt es jedoch offensichtliche konzeptionelle Grenzen der Nachvollziehbarkeit von Evolutionsereignissen mittels des in dieser Arbeit verfolgten Ansatzes. Während bei der natürlichen Evolution die Selektion auf Funktion des Proteins eine entscheidende Rolle spielt, besitzen die im Rahmen dieser Arbeit erstellten HisF-CC Varianten keine bekannte katalytische Aktivität. Jedoch ist die Stabilität eine unabdingbare Voraussetzung für die Etablierung einer Funktion. Für die weitere Stabilisierung der HisF-CC Varianten und die Etablierung einer katalytischen Aktivität bieten sich Methoden an, welche die natürliche Evolution nachahmen (Cohen *et al.*, 2001; Chen, 2001; Arnold *et al.*, 2001): Zufallsmutagenese gefolgt von der Selektion einer bestimmten Eigenschaft. Wird diese Eigenschaft an das Überleben des Organismus gekoppelt, ist eine einfache Selektion ohne aufwendiges *Screening* möglich. Entsprechende Systeme bezüglich der Erhöhung der Löslichkeit und Funktionalisierung der HisF-CmutC Variante wurden in dieser Arbeit vorbereitet und getestet (4.2.7 bis 4.2.9).

Daneben zeigt die Beobachtung, daß einige Aminosäureaustausche zu keiner meßbaren Veränderung von HisF-CC führte, die Grenzen rational begründeten Proteindesigns auf und unterstreicht zudem, daß Veränderungen in der Sequenz nicht gleich bedeutend mit Veränderungen in der Struktur eines Proteins sind. Eine Diversifizierung kann somit zu großen Abweichungen der Primärstruktur unter Beibehaltung der Tertiärstruktur führen. Die relativ geringe Sequenzidentität zwischen den Hälften (diese liegt mit 25% in der *Twilight Zone* detektierbarer Homologien; Rost 1999)

und zwischen offensichtlich verwandten $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen wie TrpF und HisA (10% Sequenzidentität; Jürgens *et al.*, 2000; Henn-Sax *et al.*, 2002) zeigt an, daß die Auseinanderentwicklung der Sequenzen bereits vor geraumer Zeit begonnen hat, es jedoch über diese lange Phase der Evolution zu keiner signifikanten Diversifizierung der Strukturen gekommen ist.

Dies wird insbesondere daran deutlich, daß die N-terminale Hälfte von HisA (HisA-N) und die C-terminale Hälfte von HisF (HisF-C) eine HisAF Chimäre ausbilden, deren Stabilität und Kompaktheit vergleichbar den Elternproteinen HisA und HisF sind, wie im dritten Teil dieser Arbeit gezeigt werden konnte (4.3.8). Dies unterstützt die enge Verwandtschaft der beiden Enzyme, sowie ihre divergente Evolution aus einem gemeinsamen Halb-Barrel. Zum anderen legt es nahe, daß $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Proteine modular aufgebaut sind. Die Vielseitigkeit der molekularen Evolution wird enorm ausgeweitet, wenn nicht nur identische, sondern auch unterschiedliche Domänen kombiniert werden, um neue funktionelle Eigenschaften zu etablieren (Gerlt & Babbitt, 2001a). In der Natur findet sich dafür ein Beispiel in der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Domäne der Phosphoinositid-spezifischen Phospholipasen C (PI-PLC). Während sich die Strukturen der jeweiligen C-terminalen Hälften prokaryotischer und eukaryotischer PI-PLCs stark unterscheiden, sind die jeweiligen N-terminalen Hälften, welche alle katalytisch essentiellen Aminosäuren beinhalten, mit einem RMSD von 1,85Å für 104 äquivalente C_α -Atome gut superpositionierbar (Heinz *et al.*, 1998).

Experimentell wurden erste Ansätze bezüglich des modularen Aufbaus von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel bereits in den neunziger Jahren verfolgt. Bei einem Versuch aus acht repetitiven $\beta\alpha$ -Einheiten Proteine mit $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Faltung zu konstruieren, entstanden die Varianten Babarellin und Octarellin (Richardson *et al.*, 1987, Goraj *et al.*, 1990). Für Octarellin konnte durch CD-Spektroskopie die Bildung stabiler α -Helices und β -Stränge nachgewiesen werden, die Packung des Barrel war jedoch nicht optimal (Beauregard *et al.*, 1991). Die Herstellung weiterer Octarellin-Varianten zeigte, daß für das *de novo*-Design von $(\beta\alpha)_8$ -Barreln vier $\alpha\beta\alpha\beta'$ -Einheiten besser geeignet sind (Sander, 1991; Houbrechts *et al.*, 1995). Weitere Barrel-Konstruktions-Experimente wurden von Tanaka *et al.* (1994a, b) durchgeführt. Unter anderem wurde eine duplizierte $(\beta\alpha)_4$ -Variante erstellt, die Charakteristika einer natürlichen $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Struktur aufwies, jedoch eine mangelhafte Packung des Barrel-Inneren besaß (Tanaka

et al., 1994b). Im Gegensatz dazu ist die HisAF-Chimäre ein stabiles $(\beta\alpha)_8$ -Barrel mit intaktem Faß und nativer Tertiärstruktur.

Zusammengenommen unterstützen und erweitern die in dieser Arbeit entstandenen Daten das Modell der molekularen Evolution der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme HisA und HisF aus einem identischen Halb-Barrel. Sie zeigen die experimentelle Nachvollziehbarkeit von Evolutionsmechanismen wie Genrekrutierung durch Duplikation und Fusion, sowie die Konstruierbarkeit stabiler $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Proteinen durch die Kombination verschiedener $(\beta\alpha)_4$ -Module aus unterschiedlichen Ausgangsproteinen.

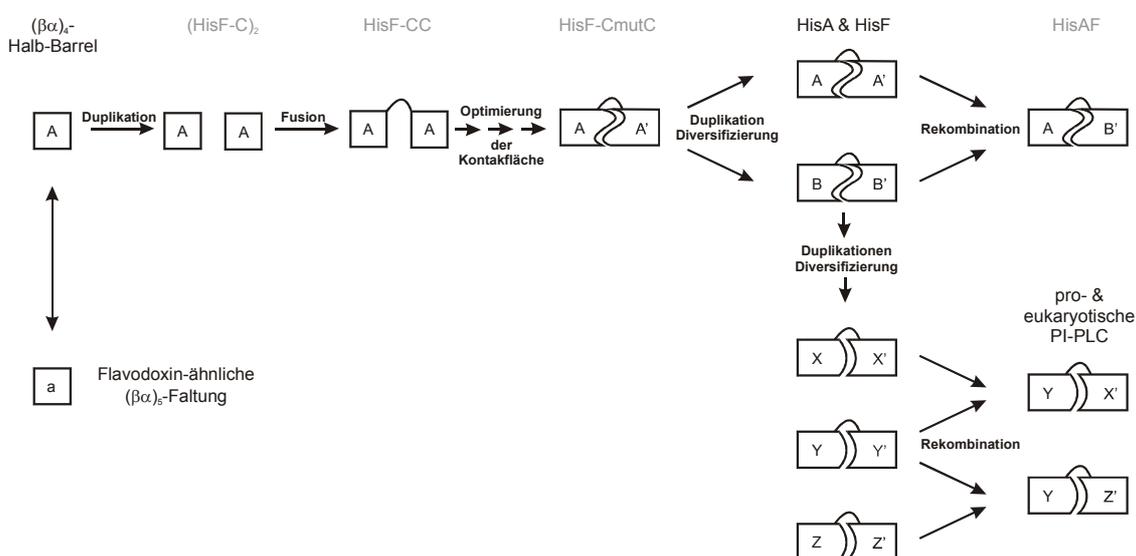


Abbildung 4.34: Evolutionsmodell des modularen Aufbaus der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel

Aus einem $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barrel, welches in Verwandtschaft zu Proteinen mit der Flavodoxin-ähnlichen Faltung steht, hat sich durch Duplikation, Fusion der Tochtermoleküle und Optimierung der Kontaktfläche ein ursprüngliches $(\beta\alpha)_8$ -Barrel gebildet. Aus diesem haben sich durch Duplikation und Diversifizierung weitere $(\beta\alpha)_8$ -Barrel gebildet, denen die heute bekannten Enzyme HisA und HisF nach Maßgabe ihrer noch vorhandenen zweifältigen Symmetrie am ähnlichsten sind. Durch weitere Duplikations- und Diversifizierungsschritte entstand ein Repertoire an weniger symmetrischen $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzymen, welches durch Rekombination erweitert wurde. Ein Beispiel hierfür könnten die pro- und eukaryotischen PI-Phospholipasen C darstellen (s. Text). Analog hierzu ist die Rekombination von HisA und HisF *in vitro* zur Chimäre HisAF. Die den Zwischenstufen äquivalenten, in dieser Arbeit untersuchten Varianten sind in grau dargestellt.

Wie könnte nun ein solch modularer Aufbau der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Proteine zu einem früheren Zeitpunkt der Evolution ausgesehen haben? Das bisher beschriebene Modell beinhaltet die Entstehung aus einem Vorläufer halber Länge durch Duplikation und anschließende Fusion der Tochtermoleküle, welche sich durch sukzessive Mutationen aneinander angepaßt haben und sich danach durch erneute Duplikationen und

Diversifikationen zu den vielen uns heute bekannten stabilen $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Proteinen entwickelten. Es ist jedoch auch ein alternativer Weg denkbar, der eine zusätzliche Dimension der Diversifikation erlaubt. Frühe $(\beta\alpha)_8$ -Barrel konnten aufgrund der ähnlichen Kontaktflächen bis zu einem bestimmten Grad der Diversifizierung Module untereinander austauschen, was u.a. zu der Entstehung unterschiedlicher PI-PLC in Pro- und Eukaryoten geführt haben kann. Diese Möglichkeit konnte durch die Herstellung der HisAF Chimäre gezeigt werden (Abbildung 4.34).

4.5 Ausblick

- A. Basierend auf der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Hypothese des gemeinsamen evolutionären Ursprungs der Halb-Barrel und der Flavodoxin-ähnlichen Faltung, wäre es interessant, eine experimentelle Umwandlung ausgehend von der einen Faltung in die andere zu versuchen. Das Gelingen derartiger Umwandlungen würde die Hypothese der Verwandtschaft der beiden Faltungstypen stark unterstützen.
- B. Die Kontaktflächen-optimierte Variante HisF-CmutC bildet einen guten Ausgangspunkt für die weitere Verbesserung der Löslichkeit und/oder Aktivierung durch Zufallsmutagenese und Selektion. Eine Genbank wurde bereits hergestellt und die entsprechenden Selektionssysteme wurden getestet.
- C. Entsprechend stehen bei der Chimäre HisAF als nächster Schritt weitere Versuche der Etablierung einer katalytischen Aktivität mittels gerichteter Evolution im Vordergrund. Für ein weiteres rationales Proteindesign in diese Richtung würde die Auflösung der Röntgenstruktur, die momentan in Zusammenarbeit mit der AG Wilmanns (EMBL Hamburg) versucht wird, wichtige Hinweise liefern.
- D. Der modulare Aufbau der $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Faltung könnte zudem anhand der PI-PLC weiter untersucht werden. Die Herstellung von Chimären aus eukaryotischen und prokaryotischen Hälften bietet sich hier an.
- E. Darüberhinaus sind ähnliche Untersuchungen anhand anderer Proteinfaltungen wie z.B. der Superfamilie der γ -Crystallin-ähnlichen Proteine (SCOP 2.12.1) denkbar. Diese Proteine bestehen aus zwei identischen Domänen, wobei sich jede Domäne wiederum aus zwei superpositionierbaren Greek-Key Modulen zusammensetzt. Die Aminosäuresequenzidentität der Domänen beträgt um die 40%, die der Module immerhin 20-30% (Wistow *et al.*, 1983; Branden & Tooze, 1991). Diese

Vergleiche weisen auf eine evolutionäre Verwandtschaft der vier Greek-key Module in γ -Crystallin-ähnlichen Proteinen hin. Danach wäre ein ursprüngliches Modul dupliziert, worauf die Tochtermodule fusionierten und ein der heutigen Domäne entsprechende Struktur ausbildeten. Durch einen weiteren Duplikations- und Fusionschritt und anschließende Diversifikation wären die heute bekannten γ -Crystalline entstanden (Abbildung 4.35). In der Natur wurden bisher keine monomeren Einzel-Domänen γ -Crystalline gefunden. Um jedoch ihre Eigenschaften untersuchen zu können wurden einzelne N- und C-terminale Domänen der Rinder γ B-, Rinder und humanen γ S-Cristalline, sowie Domänen des Protein S aus *Myxococcus xanthus* durch limitierte Proteolyse oder rekombinante DNA-Technologie hergestellt (Jaenicke & Slingsby, 2001; und darin enthaltene Referenzen). Die Untersuchungen ergaben, daß die Trennung der Domänen voneinander das Strukturgerüst der Polypeptidkette nicht signifikant verändert. Der erste Duplikations- und Fusionschritt von einem ursprünglichen γ -Crystallin Modul zu einer γ -Crystallin Domäne könnte analog zu dieser Arbeit durch die Herstellung isolierter Greek-Key Module und ihrer neuartigen Zusammensetzung untersucht werden.

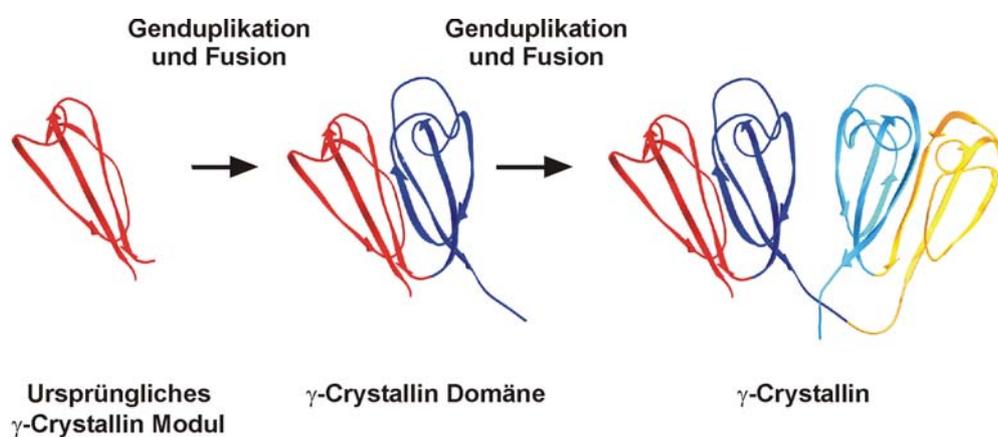


Abbildung 4.35: Modell für die Evolution der γ -Crystalline

Ausgehend von einem Gen, das für ein „ursprüngliches γ -Crystallin Modul“ mit unbekannter Funktion kodierte, führte eine Reihe von Duplikationsereignissen mit anschließender Diversifikation zu den Genen, die für die heutigen γ -Crystalline kodieren.

5 Literatur

- Alifano P, Fani R, Lio P, Lazcano A, Bazzicalupo M, Carlomagno MS, Bruni CB (1996) Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiol Rev* 60: 44-69
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- Altschul S, Madden T, Schäffer A, Zhang Z, Miller W, Lipman D (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402
- Arnold FH, Wintrode PL, Miyazaki K, Gershenson A (2001) How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem Sci* 26: 100-106
- Azem A, Shaked I, Rosenbusch JP, Daniel E (1995) Cross-linking of porin with glutaraldehyde: a test for the adequacy of premises of cross-linking theory. *Biochim Biophys Acta* 1243: 151-156
- Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Phillips DC, Pogson CI, Wilson IA, Corran PH, Furth AJ, Milman JD, Offord RE, Priddle JD, Waley SG (1975) Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature* 255: 609-14
- Beauregard M, Goraj K, Goffin V, Heremans K, Goormaghtigh E, Ruyschaert JM, Martial JA (1991) Spectroscopic investigation of structure in octarellin (a de novo protein designed to adopt the α/β -barrel packing). *Protein Eng* 4: 745-749
- Becerra A, Lazcano A (1996) The role of gene duplication in the evolution of purine nucleotide salvage pathways. *Origins Life Evol Biosph* 28: 539-553
- Beismann-Driemeyer S, Sterner R (2001) Imidazole glycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima*. Quaternary structure, steady-state kinetics, and reaction mechanism of the holoenzyme complex. *JBC* 276: 20387-20396
- Bennett MJ, Schlunegger MP, Eisenberg D (1995) 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci* 4: 2455-2468
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235-242
- Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJ, Meyer EF Jr, Brice MD, Rodgers JR, Kennard O, Shimanouchi T, Tasumi M (1977) The Protein Data Bank. A computer-based archival file for macromolecular structures. *Eur J Biochem* 80: 319-324
- Bisswanger H, Kirschner K, Cohn W, Hager V, Hansson E (1979) N-(5-phosphoribosyl)anthranilate isomerase-indolglycerol-phosphate-synthase. A substrate analogue binds two different binding sites on the bifunctional enzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 18: 5946-5953
- Bork P, Gellerich J, Groth H, Hooft R, Martin F (1995) Divergent evolution of a β/α -barrel subclass: detection of numerous phosphate-binding sites by motif search. *Protein Sci* 4: 268-274
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Branden C, Tooze J (1991) Anti-parallel β structures. In *Introduction to Protein Structure*. Chapter 5, pp59-78, Garland Publishing, Inc, New York and London

- Cadwell RC, Joyce GF (1994) Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl* 3: S136-S140
- Chen R (2001) Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution. *Trends Biotechnol* 19: 13-14
- Chester N, Marshak DR (1993) Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 209: 284-290
- Chothia C, Finkelstein AV (1990) The classification and origins of protein folding patterns. *Ann Rev Biochem* 59: 1007-1039
- Cohen N, Abramov S, Dror Y, Freeman A (2001) In vitro enzyme evolution: the screening challenge of isolating the one in a million. *Trends Biotechnol* 19: 507-510
- Copley R, Bork P (2000) Homology among $(\beta\alpha)_8$ barrels: implications for the evolution of metabolic pathways. *J Mol Biol* 303: 627-641
- Cordes MH, Walsh NP, McKnight CJ, Sauer RT (1999) Evolution of a protein fold in vitro. *Science* 284: 325-328
- Davisson VJ, Deras IL, Hamilton SE, Moore LL (1994) A plasmid-based approach for the synthesis of a histidine biosynthetic intermediate. *J Org Chem* 59: 137-143
- Dietmann S, Holm L (2001) Identification of homology in protein structure classification. *Nat Struct Biol* 8:953-957
- Douangamath A, Walker M, Beimann-Driemeyer S, Vega-Fernandez MC, Sterner R, Wilmanns M (2002) Structural evidence for ammonia tunneling across the $(\beta\alpha)_8$ -barrel of the imidazole glycerol phosphate synthase bienzyme complex. *Structure* 10: 185-193
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acid Res* 16: 6127- 6145
- Eads JC, Ozturk D, Wexler TB, Grubmeyer C, Sacchettini JC (1997) A new function for a common fold: the crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase. *Structure* 5: 47-58
- Eberhard M (1990) A set of programs for analysis of kinetic and equilibrium data. *Comput Appl Biosci* 6: 213-221
- Eddy SR (1998) Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 14: 755-763
- Erickson HP (1989) Co-operativity in protein-protein association. The structure and stability of the actin filament. *J Mol Biol* 206: 465-474
- Fani R, Lio P, Chiarelli I, Bazzicalupo M (1994) The evolution of the histidine biosynthetic genes in prokaryotes: a common ancestor for the *hisA* and *hisF* genes. *J Mol Evol* 38: 489-495
- Fani R, Lio P, Lazcano A (1995) Molecular evolution of the histidine biosynthetic pathway. *J Mol Evol* 41: 760-74
- Fani R, Mori E, Tamburini E, Lazcano A (1998) Evolution of the structure and chromosomal distribution of histidine biosynthetic genes. *Orig Life Evol Biosp* 28: 555-570
- Farber GK, Petsko GA (1990) The evolution of α/β -barrel enzymes. *Trends Biochem Sci* 15: 228-234
- Gerlt JA (2000) New wine from old barrels. *Nat Struct Biol* 7: 171-173
- Gerlt JA, Babbitt PC (2001a) Divergent evolution of enzymatic function: mechanistically diverse superfamilies and functionally distinct suprafamilies. *Annu Rev Biochem* 70: 209-246
- Gerlt JA, Babbitt PC (2001b) Barrels in pieces? *Nat Struct 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: 562-76
- Grishin NV (2001) Fold change in evolution of protein structures. *J Struct Biol* 134: 167-185.
- Goldschmidt EP, Cater MS, Matney TS, Butler MA, Greene A (1970) Genetic analysis of the histidine operon in *Escherichia coli* K12. *Genetics* 66: 219-229
- Goraj K, Renard A, Martial JA (1990) Synthesis, purification and initial structural characterization of octarellin, a de novo polypeptide modelled on the alpha/beta-barrel proteins. *Protein Eng* 3: 259-266
- Hadley C, Jones DT (1999) A systematic comparison of protein structure classifications: SCOP, CATH and FSSP. *Structure Fold Des* 7: 1099-1112
- Haeger M (2001) Ammoniak-Channeling und allosterische Kommunikation im, Bienenzym-komplex Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus *Thermotoga maritima*. *Diplomarbeit*, Universität Mainz
- Hanahan D (1984) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- Hegy H, Gerstein M (1999) The relationship between protein structure and function: a comprehensive survey with application to the yeast genome. *J Mol Biol* 288: 147-164
- Heinz DW, Essen LO, Williams RL (1998) Structural and mechanistic comparison of prokaryotic and eukaryotic phosphoinositide-specific phospholipases C. *J Mol Biol* 275: 635-650.
- Henn-Sax M, Höcker B, Wilmanns M, Sterner R (2001) Divergent evolution of $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzymes. *Biol Chem* 382: 1315-1320
- Henn-Sax M, Thoma R, Schmidt S, Hennig M, Kirschner K, Sterner R (2002) Two $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzymes of histidine and tryptophan biosynthesis have similar reaction mechanisms and common strategies for protecting their labile substrates. *Biochemistry* 41: 12032-12042
- Höcker B (1999) Untersuchungen zur Evolution des $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyms HisF aus *Thermotoga maritima*. *Diplomarbeit*, Universität Göttingen
- Höcker B, Jürgens C, Wilmanns M, Sterner R (2001a) Stability, catalytic versatility and evolution of the $(\beta\alpha)_8$ -barrel fold. *Curr Opin Biotech* 12: 376-381
- Höcker B, Beismann-Driemeyer S, Hettwer S, Lustig A, Sterner R (2001b) Dissection of a $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzyme into two folded halves. *Nat Struc Biol* 8: 32-36
- Höcker B, Schmidt S, Sterner R (2002) A common evolutionary origin of two elementary enzyme folds. *FEBS Lett* 510: 133-135
- Holm L, Sander C (1993) Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J Mol Biol* 233: 123-138
- Holm L, Sander C (1996) Alignment of three-dimensional protein structures: network server for database searching. *Methods Enzymol* 266: 653-662
- Hommel U, Eberhard M, Kirschner K (1995) Phosphoribosyl anthranilate isomerase catalyses a reversible amidori reaction. *Biochemistry* 34: 5429-5439
- Horowitz NH (1945) On the evolution of biochemical syntheses. *Proc Natl Acad Sci USA* 31: 153-157
- Horowitz NH (1965) The evolution of biochemical syntheses-retrospect and prospect. In Bryson V & Vogel HJ, editors, *Evolving genes and proteins*. pp 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 JM, Martial JA (1995) Second-generation octarellins: two new de novo (β/α)₈-polypeptides designed for investigating the influence of β -residue packing on the α/β -barrel structure stability. *Protein Eng* 8: 249-259
- Huang X, Holden HM, Raushel FM (2001) Channeling of substrates in enzyme-catalysed reactions. *Annu Rev Biochem* 70: 149-180
- Hubbard SJ (1998) The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim Biophys Acta* 1382: 191-206
- Huynen M, Bork P (1998) Measuring genome evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5849-5856
- Hwang KY, Song HK, Chang C, Lee J, Lee SY, Kim KK, Choe S, Sweet RM (1997) Crystal structure of thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* refined at 1.7 Å resolution. *Mol Cells* 7: 251-258
- International Human Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28
- Jaenicke R (1999) Stability and folding of domain proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 71: 155-241
- Jaenicke R, Slingsby C (2001) Lens Crystallins and their microbial homologs: structure, stability, and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36: 435-499
- Jain R, Rivera MC, Moore JE, Lake JA (2002) Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. *Theor Popul Biol* 61: 489-495
- Jensen RA (1976) Enzyme recruitment in evolution of new function. *Ann Rev Microbiol* 30: 419-425
- Johnson WC Jr (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* 7: 205-214
- Jürgens C, Strom A, Wegener D, Hettwer S, Wilmanns M, Sterner R (2000) Directed evolution of a ($\beta\alpha$)₈-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9925-9930
- Klem TJ, Davisson VJ (1993) Imidazole glycerol phosphate synthase: the glutaminamidotransferase in histidine biosynthesis. *Biochemistry* 32: 5177-5186
- Klem TJ, Chen Y, Davisson VJ (2001) Subunit interactions and glutamine utilization by *Escherichia coli* imidazole glycerol phosphate synthase. *J Bacteriol* 183: 989-996
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- 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: 1546-1550
- Lazcano A, Miller S (1996) The origin and early evolution of life: prebiotic chemistry, the pre-RNA world, and time. *Cell* 85: 793-798
- Lazcano A, Miller S (1999) On the origin of metabolic pathways. *J Mol Evol* 49: 424-431
- Lebioda L, Stec B, Brewer JM (1989) The structure of yeast enolase at 2.25-Å resolution. An 8-fold $\beta + \alpha$ -barrel with a novel $\beta\beta\alpha\alpha$ ($\beta\alpha$)₆ topology. *J Biol Chem* 264: 3685-3693
- Le Gouill C, Parent J-L, Rola-Plezczyński M, Stankova J (1994) Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal Biochem* 219: 164

- Leopoldseder S (2002) Molekulare Analyse einer Substratspezifitätsänderung von 5'ProFAR Isomerase aus *Thermotoga maritima*. Diplomarbeit, Universität zu Köln
- Lesk AM, Branden CI, Chothia C (1989) Structural principles of α/β barrel proteins: the packing of the interior of the sheet. *Proteins* 5: 139-148
- Levitt M, Chothia C (1976) Structural patterns in globular proteins. *Nature* 261: 552-558
- Liang H, Sandberg WS, Terwilliger TC (1993) Genetic fusion of subunits of a dimeric protein substantially enhances its stability and rate of folding. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7010-7014
- Lichtarge O (2001) Getting past appearances: the many-fold consequences of remote homology. *Nat Struct Biol* 8: 918-920
- Linz U, Degenhardt H (1990) Die Polymerase Kettenreaktion. Ein Überblick. *Naturwissenschaften* 77: 515-530
- Luger K, Hommel U, Herold M, Hofsteenge J, Kirschner K (1989) Correct folding of circularly permuted variants of a $\beta\alpha$ barrel enzyme in vivo. *Science* 243: 206-210
- Lukat GS, Stock AM, Stock JB (1990) Divalent metal ion binding to the CheY protein and its significance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry* 29: 5436-5442
- Lupas AN, Ponting CP, Russell RB (2001) On the evolution of protein folds: are similar motifs in different protein folds the result of convergence, insertion, or relics of an ancient peptide world. *J Struc Biol* 134: 191-203
- Lutz S, Benkovic SJ (2002) Engineering Protein Evolution. In Brahmman S & Johnsson K, editors, Directed Molecular Evolution of Proteins. chapter 9, pp 177-213, Wiley VCH Weinheim
- Lutz R, Bujard H (1997) Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 25: 1203-1210
- Lynch M, Conery JS (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290: 1151-1155
- Marcotte EM, Pellegrini M, Ng H-L, Rice DW, Yeates TO, and Eisenberg D (1999) Detecting protein function and protein-protein interactions from genome sequences. *Science* 285: 751-753
- Margolies MN, Goldberger RF (1966) Isolation of the fourth (isomerase) of histidine biosynthesis from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 241: 3262-3269
- Martin ACR, Orengo AO, Hutchinson EG, Jones S, Karmirantzou M, Laskowski RA, Mitchell JBO, Taroni C, Thornton JM (1998) Protein folds and functions. *Structure* 6: 875-884
- Massière F, Badet-Denissot M-A (1998) The mechanism of glutamine dependent amidotransferases. *Cell Mol Life Sci* 54: 205-222
- Matney TS, Goldschmidt EP, Erwin NS, Scroggs RA (1964) A preliminary map of genomic sites for F-attachment in *Escherichia coli* K12. *Biochem Biophys Res Commun* 17: 278-281
- Matsumura M, Becktel WJ, Levitt M, Matthews BW (1989) Stabilization of phage T4 lysozyme by engineered disulfide bonds. *Proc Natl Acad Sci* 86: 6562-6566
- Maxwell KL, Mittermaier AK, Forman-Kay JD, Davidson AR (1999) A simple in vivo assay for increased protein solubility. *Protein Sci* 8: 1908-1911
- Merz A, Yee MC, Szadkowski H, Pappenberger G, Crameri A, Stemmer WP, Yanofsky C, Kirschner K (2000) Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures. *Biochemistry* 39: 880-889

- Miles EW, Rhee S, Davies DR (1999) The molecular basis of substrate channeling. *J Biol Chem* 274: 12193-12196
- Mullis KB, Fallona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350
- Murzin A, Brenner S, Hubbard T, Chothia C (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* 247: 536-540
- Nagi AD, Regan L (1997) An inverse correlation between loop length and stability in a four-helix-bundle protein. *Folding Design* 2: 67-75
- Ochmann H, Lawrence JG, Groisman EA (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299-304
- Ostermeier M, Shim JH, Benkovic SJ (1999) A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nat Biotechnol* 17: 1205-1209
- Pace CN, Scholtz JM (1997) Measuring the conformational stability of a protein. In *Proofs for Protein Structure: A practical approach*. chapter 12, pp 299-321. Creighton TE, IRL Press, Oxford, 2ed
- Palmer DR, Garrett JB, Sharma V, Meganathan R, Babbitt PC, Gerlt JA (1999) Unexpected divergence of enzyme function and sequence: 'N-acylamino acid racemase' is o-succinylbenzoate synthase. *Biochemistry* 38: 4252-4258
- Pfeil W (1998) *Protein Stability and Folding. A collection of thermodynamic data*. Springer-Verlag, New York
- Privalov PC (1979) Stability of proteins. *Adv Prot Chem* 33: 167-241
- Pujadas G, Palau J (1999) TIM barrel fold: structural, functional and evolutionary characteristics in natural and designed molecules. *Biologia, Bratislava* 54: 231-253
- Reardon D, Farber GK (1995) The structure and evolution of α/β barrel proteins. *FASEB J* 9: 497-503
- Richardson JS, Kneller D, Osguthorpe D, Sharf M (1987) Heidelberg: European Molecular Biological Laboratories (Sander C ed), 21-39
- Rossmann MG, Argos P (1976) Exploring structural homology of proteins. *J Mol Biol* 105: 75-95
- Russell RB, Barton GJ (1992) Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. *Proteins* 14: 309-323
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Prime-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sambrook J, Fritsch EE, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour, New York
- Sander C (1991) *De novo* design of proteins. *Curr Opin Struct Biol* 1: 630-637
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain determining inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Sarkar G, Sommer SS (1990) The megaprimer method of site-directed mutagenesis. *BioTechniques* 8: 404-407
- Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368-379

- Schmid FX (1997) Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Proofs for Protein Structure: A practical approach*. chapter 11, pp 259-295. Creighton TE, IRL Press, Oxford, 2ed
- Schmidt S (1999) Die Identifizierung von katalytisch essentiellen Aminosäuren der 5'ProFAR-Isomerase aus *Thermotoga maritima*. *Diploma thesis*, Universität Göttingen
- Schwander M (1997) Cloning of the *hisA* gene from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*. *Diploma thesis*, Universität Basel
- Sharp PA, Sugden B, Sambrook J (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus influenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055-3063
- Stark GR (1965) Reactions of cyanate with functional groups of proteins. 3. Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry* 4: 1030-1036
- Stemmer WP (1994a) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 25: 10747-10751
- Stemmer WP (1994b) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370: 389-391
- Sterner R, Kleemann GR, Szadkowski H, Lustig A, Hennig M, Kirschner K (1996) Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer. *Protein Sci* 5: 2000-2008
- Stetter KO (1996) Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 18: 149-158
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69: 183-215
- Stüber D, Matile H, Garotta G (1990) System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. *Immunol Methods* 4: 121-152
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 60-89
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185: 60-89
- Tanaka T, Hayashi M, Kimura H, Oobatake M, Nakamura H (1994a) De novo design and creation of a stable artificial protein. *Biophys Chem* 50: 47-61
- Tanaka T, Kuroda Y, Kimura H, Kidokoro S, Nakamura H (1994b) Cooperative deformation of a *de novo* designed protein. *Protein Eng* 7: 969-976
- Terwilliger TC (1995) Engineering the stability and function of gene V protein. *Adv Protein Chem*, 46: 177-215
- Thoma R, Schwander M, Liebl W, Kirschner K, Sterner R (1998) A histidine gene cluster of the hyperthermophile *Thermotoga maritima*: sequence analysis and evolutionary significance. *Extremophiles* 2: 379-89
- Thoma R, Hennig M, Sterner R, Kirschner K (2000) Structure and function of mutationally generated monomers of dimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from *Thermotoga maritima*. *Structure* 8: 265-276
- Traut TW, Temple BR (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
- Tsai C-J, Nussinov R (1997a) Hydrophobic folding units derived from dissimilar monomer structures and their interactions. *Protein Sci* 6: 24-42

- Tsai C-J, Nussinov R (1997b) Hydrophobic folding units at protein-protein interfaces: implications to protein folding and to protein-protein association. *Protein Sci* 6: 1426-1437
- Tsai C-J, Xu D, Nussinov R (1997) Structural motifs at protein-protein interfaces: protein cores versus two-state and three-state model complexes. *Protein Sci* 6: 1793-1805
- Urfer R, Kirschner K (1992) The importance of surface loops for stabilizing an eightfold $\beta\alpha$ barrel protein. *Protein Sci* 1: 31-45
- Volkov AA, Arnold FH (2000) Methods for in vitro DNA recombination and random chimeragenesis. *Methods Enzymol* 328: 447-456
- Wilmanns M, Hyde CC, Davies DR, Kirschner K, Jansonius JN (1991) Structural conservation in parallel $\beta\alpha$ -barrel enzymes that catalyze three sequential reactions in the pathway of tryptophan biosynthesis. *Biochemistry* 30: 9161-9169
- Wilson GG, Murray NE (1991) Restriction and modification systems. *Ann Rev Genetics* 25: 585-627
- Wirenga RK (2001) The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett* 492: 193-198
- Wistow G, Turnell B, Summers L, Slingsby C, Moss D, Miller L, Lindley P, Blundell, T (1983) X-ray analysis of the eye-lens protein gamma-II crystallin at 1.9Å. *J Mol Biol* 170: 175-202
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4576-4579
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strain: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119
- Ycas M (1974) On earlier states of the biochemical system. *J Theor Biol* 44: 145-160
- Zalkin H, Smith JL (1998) Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Advanc Enzymol relat areas Mol Biol* 72: 87-144
- Zhao H, Giver L, Shao Z, Affholter JA, Arnold FH (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat Biotechnol* 16: 258-261

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

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

A	Absorption, ausgefallenes Protein nach Rückfaltung, Adenosin
Å	Ångström
AICAR	5'-phosphoribosyl-4-carboxamid-5-aminoimidazol
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxosulfat
A_x	Absorption bei der Wellenlänge x nm
$0.1\% A_x$	spezifischer Extinktionskoeffizient
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Cytosin
CD	Circular Dichroismus
CdRP	1-(o-carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5-phosphat
cm	Zentimeter
C_p	partielle spezifische Wärmekapazität
Crx	<i>Crude Extract</i> , lösliche Fraktion des Zellextrakt
d	Schichtdicke
$[D]_{1/2}$	Konzentration an Denaturierungsmittel, bei dem $F_N = F_U$
Da	Dalton
DALI	<i>Distance Matrix Alignment</i>
d.h.	das heißt
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	Differentielle Scanning Kalorimetrie
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dYT	<i>double Yeast Tryptone</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
f	Verdünnungsfaktor
F_N	gefaltetes Protein
F_U	ungefaltetes Protein
g	Gramm
G	Guanosin
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GPC	<i>Gel Permeation chromatography</i> , Gelfiltration
<i>his</i>	Gene, die für Enzyme des Histidinbiosyntheseweges kodieren,

	z.B. kodiert <i>hisF</i> für das Enzym HisF
His ₆	6 Histidine
HisA	5'-ProFAR Isomerase
HisAF	Chimäre bestehend aus N-terminaler Hälfte von HisA und C-terminaler Hälfte von HisF
HisF	Synthase Untereinheit der ImGPS
HisFA	Chimäre bestehend aus N-terminaler Hälfte von HisF und C-terminaler Hälfte von HisA
HisF-N	N-terminale Hälfte von HisF
HisF-C	C-terminale Hälfte von HisF
HisH	Glutaminase Untereinheit der ImGPS
HMMer	<i>profile hidden Markov models</i>
IGPS	Indolglycerinphosphat Synthetase
ImGP	Imidazolglycerinphosphat
ImGPS	Imidazolglycerinphosphat Synthase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KP	Kaliumphosphat Puffer
l	Liter
L	lösliches Protein nach Rückfaltung
LB	Luria-Bertani (-Medium)
log	decadischer Logarithmus
M	mol/l, molar, Längenstandard
m	Steigung
mA	Milliampère
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRW	mittleres Molekulargewicht der Aminosäuren
MW	Molekulargewicht des Proteins
mwco	<i>molecular weight cut off</i>
n	Anzahl der Nukleotide eines Primers
N _A	Anzahl der Aminosäuren
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
P	Pellet, unlösliche Fraktion des Zellextraktes
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDB	Protein Datenbank
PI-PLC	Phosphoinositid spezifische Phospholipase C
pmol	picomol
PRAI	Phosphoribosylanthranilat Isomerase
5'-PRFAR	N'-[(5'-phosphoribulosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid

5'-ProFAR	N'-[(5'-phosphoribosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid
PSI-BLAST	<i>Position Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SeqID	Sequenzidentität
ssDNA	Einzelstrang-DNA
SOE	<i>Splicing by Overlap Extension</i>
STAMP	<i>Structural Alignment of Multiple Proteins</i>
SV	Säulenvolumen
T	Temperatur, Thymidin
T _A	<i>Annealing</i> -Temperatur
TBE	Tris-Bor-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIM	Triosephosphat Isomerase
<i>T.maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TrpC	Indolglycerinphosphat Synthetase
TrpF	Phosphoribosylanthranilat Isomerase
u	Einheit
ün	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VB	Vogel-Bonner (-Medium)
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wilytp
Ω	Ohm
Δ	Differenz
ΔG	freie Enthalpie der Auffaltung
ε _x	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge x
λ	Wellenlänge
Θ _{MRW}	durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure
Θ _{obs}	gemessene Elliptizität
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

6.2 Aminosäuresequenzen der Konstrukte

Der die Hälften verbindende Linker wurde in blau dargestellt. Aminosäureaustausche wurden in der Sequenz der entsprechenden Variante rot markiert und die Position in der Originalsequenz unterstrichen.

HisF-CC Varianten

123 210

HisF-CC MQAVVVAID AKRVDGEFMV FTYSGKKNTG ILLRDWVVEV EKRGAGEILL TSIDRDGTKS GYDTEMIRFV RPLTTLPIIA SGGAGKMEHF

_E167R

_E167K

HisF-C*C I V T

HisF-CmutC R I V T

211 253 123' 165'

HisF-CC LEAFLAGADA ALAASVFHFR EIDVRELKEY LKKHGVNVRL EGLGSG QAVVVAID AKRVDGEFMV FTYSGKKNTG ILLRDWVVEV EKRG

_E167R

_E167K

HisF-C*C S

HisF-CmutC K S

166' 253'

HisF-CC GEILL TSIDRDGTKS GYDTEMIRFV RPLTTLPIIA SGGAGKMEHF LEAFLAGADA ALAASVFHFR EIDVRELKEY LKKHGVNVRL EGL

_E167R R

_E167K K

HisF-C*C

HisF-CmutC

HisF-NN Varianten

1 90
HisF-NN MLAKRIIACL DVKDGRVVKG TNFENLRDSG DPVELGKFYS EIGIDELVFL DITASVEKRR TMLELVEKVA EQIDIPFTVG GGIHDFETAS
HisF-NwNw W

91 122 1' 50'
HisF-NN ELILRGADKV SINTAAVENP SLITQIAQTF GSG MLAKRIIACL DVKDGRVVKG TNFENLRDSG DPVELGKFYS EIGIDELVFL
HisF-NwNw

51' 122'
HisF-NN DITASVEKRR TMLELVEKVA EQIDIPFTVG GGIHDFETAS ELILRGADKV SINTAAVENP SLITQIAQTF GS
HisF-NwNw W

7 Kurzzusammenfassung

Das $(\beta\alpha)_8$ -Barrel ist eine häufige und vielseitige Enzymfaltung. Frühere Analysen der Sequenzen und Strukturen von HisA und HisF, sowie biochemische Untersuchungen der isolierten N- und C-terminalen Hälften HisF-N und HisF-C, legten den Schluß nahe, daß diese $(\beta\alpha)_8$ -Barrel von einem ursprünglichen $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barrel abstammen. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Modell weiter verfeinert und experimentell rekonstruiert.

Zunächst wurden mittels umfassender Datenbankanalysen auffallende strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barreln HisF-N und HisF-C und Enzymen mit der Flavodoxin-ähnlichen $(\beta\alpha)_5$ -Faltung aufgespürt. Dieses Ergebnis führte zu der Hypothese, daß ein großer Anteil der heute bekannten Enzyme einen gemeinsamen evolutionären Ursprung besitzen.

Anschließend wurde die postulierte Evolution von HisF durch Genduplikation, Tandemfusion und Diversifikation nachvollzogen, wobei HisF-C als Modell für das ursprüngliche $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barrel diente. Im Vergleich zu HisF-C erwies sich HisF-CC, das Produkt der Duplikation und Fusion, als stabiler. Jedoch führte erst die Optimierung der Kontaktfläche zwischen seinen beiden Hälften mittels rationalem Proteindesign zu dem gut löslichen, kompakt gefalteten und monomeren Proteingerüst von HisF-CmutC, auf dem in zukünftigen Experimenten HisF-Aktivität etabliert werden soll.

Im letzten Teil der Arbeit wurde ein chimäres Protein HisAF, bestehend aus HisA-N und HisF-C hergestellt und charakterisiert. HisAF ist ein monomeres Protein mit nativer Sekundär- und Tertiärstruktur, dessen thermodynamische Stabilität und Kompaktheit den Elternproteinen HisA und HisF entspricht. Dieses Ergebnis bestätigt die evolutionäre Verwandtschaft von HisA und HisF und legt nahe, daß diese und andere $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme modular aus $(\beta\alpha)_4$ -Halb-Barreln aufgebaut sind.

8 Abstract

The $(\beta\alpha)_8$ -barrel is a frequent and versatile enzyme fold. An earlier analysis of the sequences and structures of HisA and HisF, as well as biochemical studies on the isolated N- and C-terminal halves HisF-N and HisF-C, suggested that these $(\beta\alpha)_8$ -barrels evolved from an ancestral $(\beta\alpha)_4$ -half barrel. Here, this model was further refined and reconstructed experimentally.

Comprehensive database searches identified striking structural similarities between the $(\beta\alpha)_4$ -half barrels HisF-N and HisF-C, and enzymes adopting the flavodoxin-like $(\beta\alpha)_5$ -barrel fold. These findings provoke the hypothesis that a large fraction of modern-day enzymes evolved from a common structural building block.

The postulated evolution of HisF by a series of gene duplication, tandem fusion and diversification events was reconstructed experimentally, using HisF-C as a model for the ancestral $(\beta\alpha)_4$ -half barrel. HisF-CC, the product of the duplication and fusion, was more stable than HisF-C. However, only the optimisation of the interface between the two halves by rational protein design yielded the soluble, stable and monomeric HisF-CmutC protein, on which catalytic HisF activity shall be established in future experiments.

Finally, a chimeric protein consisting of HisA-N and HisF-C was generated and characterised. HisAF is a monomeric protein with native secondary and tertiary structure, whose thermodynamic stability and compactness corresponds to that of the parent proteins HisA and HisF. This result supports the evolutionary relatedness of HisA and HisF and suggests that these and other $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzymes are built from $(\beta\alpha)_4$ -half barrel modules.

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

Allen voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Sterner herzlich bedanken für ein vielseitiges und spannendes Thema. Die wissenschaftlichen Diskussionen haben mir viel Spaß gemacht. Für die fachliche Unterstützung und die Möglichkeit der Teilnahme an interessanten Tagungen möchte ich mich besonders bedanken.

Herrn Prof. Dr. H.W. Klein danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die vielen Informationen wissenschaftlicher sowie allgemeiner Art.

Ich möchte mich bei all meinen Kooperationspartnern bedanken. Durch Dr. Matthias Wilmanns wertvolle Strukturdaten wurden unsere Modelle erst richtig anschaulich. Steffen Schmidts Einführung in die Bioinformatik ermöglichte neue Half-Barrel Hypothesen. (Keine) halben Sachen machten wir nicht zuletzt aufgrund der vielen wertvollen Hinweise aus Prof. Dr. Kaspar Kirschners reichen Erfahrungsschatz.

Für die Benutzung der CD-, DSC- und DLS- Geräte und die Beantwortung von Fragen bezüglich der Nutzung danke ich Herrn Prof. Dr. D. Schomburg und seinen Mitarbeitern.

Der Arbeitsgruppe Klein und allen anderen Mitarbeitern der „kleinen Biochemie“ danke ich für die herzliche Aufnahme unserer Arbeitsgruppe in Köln und das angenehme Arbeitsklima.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle Kollegen der „AG Sterner“, Stefan Hettwer (für das immer offene Ohr, viele Tips und Tricks und die Zusammenarbeit im Westfalenlabor), Martina Henn-Sax (für ihre Begeisterung bei wissenschaftlichen Diskussionen und viele interessante Gespräche während der Stippvisiten in Köln), Catharina Jürgens (dafür, daß sie immer da ist, wenn man sie braucht), Simona Cerrone (für lauter wichtige Kleinigkeiten), Michaela Häger und Nina Mohrlüder (für HisF-Fachsimpeleien), Sonja Leopoldseder, Miriam Deuss, Andreas Ivens, Silke Beismann-Driemeyer, Vera Boege, Silke Allekotte, den Gastforschern Gavin Murphy und Satoshi Akanuma, sowie den „neuen“ Diplomanden Manal Bosnali und Jörg Claren (schön, daß ihr bei „mir“ eingezogen seid) und Nathalie Heuer für eine Atmosphäre, in der es sich hervorragend arbeiten läßt.

Meinen Eltern und Freunden danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit, welches mir oft völlig neue Blickwinkel eröffnete.

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 in 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 dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Sterner betreut worden.

Teilpublikationen

- Höcker B, Schmidt S, Sterner R (2002) A common evolutionary origin of two elementary enzyme folds. *FEBS Lett* 510: 133-135
- Höcker B, Beismann-Driemeyer S, Hettwer S, Lustig A, Sterner R (2001) Dissection of a $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzyme into two folded halves. *Nat Struct Biol* 8: 32-36
- Höcker B, Jürgens C, Wilmanns M, Sterner R (2001) Stability, catalytic versatility and evolution of the $(\beta\alpha)_8$ -barrel fold. *Curr Opin Biotech* 12: 376-381 (Review)
- Henn-Sax M, Höcker B, Wilmanns M, Sterner R (2001) Divergent evolution of $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzymes. *Biol Chem* 382: 1315-1320 (Review)
- Höcker B, Henn-Sax M, Lang D, Wilmanns M, Sterner R. (2001). Structural and functional evidence for the evolution of the $(\beta\alpha)_8$ -barrel scaffold from an ancestral half-barrel. *Nova Acta Leopoldina Supp.* **16**, 27

9 Lebenslauf

Birte Höcker, geboren am 29.08.1974 in Bielefeld

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand ledig

Schulausbildung

1981-1985 Grundschule Schröttinghausen, Bielefeld

1985-1994 Ratsgymnasium Bielefeld

06/1994 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1994-1999 Diplomstudiengang Biologie an der Georg-August
Universität Göttingen

1996-1997 Studium der Biologie an der Carleton University,
Ottawa, Kanada

10/1998 Diplomprüfungen in Genetik (Hauptfach), Entwicklungs-
biologie und Physik

10/1998 -09/1999 Diplomarbeit bei Privatdozent Dr. R. Sterner am Institut
für Mikrobiologie und Genetik der Universität
Göttingen, Abteilung Molekulare Genetik und
Präparative Molekularbiologie. Thema der Arbeit:
„Untersuchungen zur Evolution des ($\beta\alpha$)₈-Barrel
Enzyms HisF aus *Thermotoga maritima*“

10/1999 Diplom in Biologie

01/2000-12/2001 Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
bei Prof. Dr. R. Sterner am Institut für Biochemie der
Albertus-Magnus Universität zu Köln