

**Neuartige Tryptophan Synthasen aus Hyperthermophilen:
Charakterisierung der Enzyme aus
*Sulfolobus solfataricus***

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

vorgelegt von
Sonja Leopoldseder aus Bielefeld

November 2005

Promotionsgesuch eingereicht am 16.11.2005

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

Prüfungsausschuß:	Vorsitzender	Prof. Dr. G. Hauska
	1. Prüfer	Prof. Dr. R. Sterner
	2. Prüfer	Prof. Dr. M. Thomm
	3. Prüfer	Prof. Dr. H. Tschochner

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2002 bis Mai 2004 am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln und von Mai 2004 bis November 2005 am Lehrstuhl Biochemie II des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg unter Leitung von Prof. Dr. Reinhard Sterner durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	4
2.1 Bedeutung von Protein-Protein Wechselwirkungen	4
2.2 Die Biosynthese von Tryptophan	5
2.3 Die Tryptophan Synthasen aus <i>Salmonella typhimurium</i> und <i>E. coli</i>	7
2.3.1 Struktur und Funktion	7
2.3.2 Katalysemechanismus und Kommunikation der Untereinheiten	9
2.4 Mechanismen der Proteinevolution	12
2.4.1 Genduplikation	12
2.4.2 Horizontaler Gentransfer	13
2.5 Eine neue Klasse von β -Untereinheiten der Tryptophan Synthase	14
2.5.1 TrpB2 aus <i>Thermotoga maritima</i>	16
2.5.2 TrpB2a und TrpB2b aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	17
2.6 Ziel der Arbeit	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 <i>Escherichia coli</i> Stämme	19
3.2 Vektoren	19
3.2.1 pET Vektoren	19
3.2.2 Oligodesoxyribonukleotide	21
3.2.3 Längenstandards	23
3.2.4 Enzyme	24
3.2.5 Chemikalien	24
3.2.6 Kits	25
3.2.7 Geräte und Materialien	25
3.2.8 Nährmedien	27
3.2.9 Lösungen und Puffer	28
3.2.10 Software	30
3.3 Methoden	31
3.3.1 Mikrobiologische Methoden	31
3.3.2 Molekularbiologische Arbeiten	33

3.3.3	Proteinchemische Methoden	38
3.3.4	Analytische Methoden.....	44
4	Ergebnisse	57
4.1	Proteinproduktion.....	57
4.1.1	Klonierung von <i>strpA</i> , <i>strpB2a</i> und <i>strpB2b</i>	57
4.1.2	Heterologe Expression von <i>strpA</i> und Reinigung von sTrpA	58
4.1.3	Heterologe Expression von <i>strpB2a</i> und Reinigung von sTrpB2a	59
4.1.4	Heterologe Expression von <i>strpB2b</i> und Reinigung von sTrpB2b.....	60
4.1.5	Herstellung und Reinigung der GAPDH aus <i>T. maritima</i>	61
4.2	Proteinchemische Charakterisierung von sTrpA, sTrpB2a und sTrpB2b.....	62
4.2.1	Fluoreszenzspektroskopie	62
4.2.2	Limitierte Proteolyse	63
4.2.3	Irreversible thermische Inaktivierung	66
4.2.4	Bestimmung der apparenten Molekulargewichte und der Assoziationszustände	67
4.3	Enzymkinetische Charakterisierung.....	71
4.3.1	A-Reaktion bei 60°C	71
4.3.2	Temperaturabhängigkeit der Aktivierung von sTrpA durch sTrpB2a und tmTrpA durch tmTrpB1	74
4.3.3	Quantifizierung der Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2a, sowie zwischen tmTrpA und tmTrpB1	75
4.3.4	B-Reaktion	77
4.4	Analyse der sTrpA*sTrpB2a Kontaktfläche	80
4.4.1	Sequenzvergleiche von TrpB2a (im Operon kodiert) und TrpB2b (außerhalb des Operons kodiert) Proteinen.....	80
4.4.2	Auswahl der zwischen sTrpB2a und sTrpB2b auszutauschenden Aminosäuren 84	
4.5	Klonierung der Mutanten <i>strpB2a_1-4</i> und <i>strpB2b_1-4</i>	87
4.6	Heterologe Expression der klonierten Varianten und Reinigung der Proteinprodukte	90
4.7	Spektroskopische Charakterisierung der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten	93
4.8	Steady-state enzymkinetische Charakterisierung.....	94
4.8.1	B-Reaktion der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten.....	94
4.8.2	A-Reaktion von sTrpA in Anwesenheit der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten	95

4.9	Nachweis von tmTrpB2 in T. maritima Zellextrakten	98
5 Diskussion.....		100
5.1	Die Tryptophan Synthase als Modell für Protein-Protein Interaktionen in Multienzymkomplexen.....	100
5.2	Neuartige Tryptophan Synthase -Untereinheiten aus Hyperthermophilen: Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen T. maritima und S. solfataricus.....	101
5.3	Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2a im Vergleich zu Tryptophan Synthasen aus TrpA und TrpB1 Untereinheiten	102
5.4	Strukturelle Unterschiede zwischen sTrpB2a und sTrpB2b mit Relevanz für die Interaktion mit sTrpA.....	105
5.5	Die Evolution der Tryptophan Synthase	108
5.6	Mögliche alternative Funktionen der TrpB2 Proteine.....	110
6 Literatur		111
7 Abkürzungsverzeichnis		123
8 Anhang		127
8.1	Organismennamen.....	127
8.2	Kalibrierung der analytischen Gelfiltrationssäule Superdex 200.....	129
9 Danksagung.....		130

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reaktionen und Enzyme der Tryptophan Biosynthese	6
Abbildung 2: Die $\alpha\beta\alpha$ Struktur der Tryptophan Synthase aus <i>S. typhimurium</i>	8
Abbildung 3: Mechanismus der TrpA-Reaktion. (Nach Kulik et al., 2005.)	9
Abbildung 4: Mechanismus der TrpB Reaktion. (Nach Drewe und Dunn, 1985.).....	10
Abbildung 5: Reaktionszyklus der Tryptophan Synthase. (Modifiziert nach Pan und Dunn, 1996.)	11
Abbildung 6: Phylogenetischer Baum der TrpB Proteinfamilie. (Modifiziert nach (Xie <i>et al.</i> 2002)	15
Abbildung 7: Schematische Darstellung des pET-Expressionssystems.....	20
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Vektors pET28a(+)......	21
Abbildung 9: Zeitabhängige Änderung des Konzentrationsgradienten im Sedimentationsgleichgewichts-Experiment.....	51
Abbildung 10: Analyse der Reinigung von rekombinantem sTrpA (N-terminaler His-Tag) mittels SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid).....	58
Abbildung 11: Analyse der Reinigung von rekombinantem sTrpB2a (C-terminaler His-Tag) mittels SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid).....	59
Abbildung 12: Analyse der Reinigung von sTrpB2b (N-terminaler His-Tag) mittels SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid).....	61
Abbildung 13: Limitierte Trypsinolyse von (A) sTrpA und tmTrpA, (B) ecTrpA und (C) sTrpA in Anwesenheit des Substratanalogons Indolpropanolphosphat (IPP).....	63
Abbildung 14: Ausschnitt aus einem Aminosäuresequenzalignment von ecTrpA, tmTrpA und sTrpA im Bereich von $\beta\alpha$ -Loop 6 (blau markierte Reste). Die experimentell nachgewiesenen (ecTrpA und tmTrpA) und die mutmaßlichen (sTrpA) Schnittstellen von Trypsin sind rot markiert.....	64
Abbildung 15: Limitierte Trypsinolyse von (A) ecTrpB, tmTrpB1, (B) tmTrpB2, sTrpB2a und (C) sTrpB2b.....	65
Abbildung 16: Irreversible thermische Inaktivierung bei 85 °C von sTrpA, sTrpB2a und sTrpB2b	66
Abbildung 17: Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration (Superdex 200) von sTrpA, sTrpB2a und sTrpB2b.	67
Abbildung 18: Die Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration (Superdex 200) liefern keinen Hinweis auf Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2a oder sTrpB2b.....	70

Abbildung 19: Sättigungskurve von sTrpA bei 60°C.....	72
Abbildung 20: Arrhenius Diagramme der k_{cat} -Werte von (A) isoliertem sTrpA (pink) und sTrpA in Anwesenheit von sTrpB2a und L-Serin (blau), sowie (B) isoliertem tmTrpA (rot) und tmTrpA in Anwesenheit von tmTrpB1 und L-Serin (blau).....	75
Abbildung 21: Titration von (A) sTrpB2a mit sTrpA und (B) tmTrpB1 mit tmTrpA bei 60 °C.	76
Abbildung 22: Sättigungskurven für Serin von sTrpB2a (A) und sTrpB2b (B) bei 60°C.....	77
Abbildung 23: Taxonomiebaum der TrpB2 Proteine aus <i>P. aerophilum</i> , <i>A. pernix</i> , <i>P. torridus</i> , <i>S. tokodaii</i> und <i>S. sulfolobus</i>	81
Abbildung 24: Sequenzalignment der TrpB2a und TrpB2b Proteine aus <i>P. torridus</i> , <i>S. tokodaii</i> und <i>S. sulfolobus</i>	84
Abbildung 25: Modell der Interaktionsfläche zwischen sTrpB2a (grau) und sTrpA (pink).	84
Abbildung 26: Modell des Kernbereichs von sTrpB2a (grau) und der Interaktionsfläche mit sTrpA (pink)	85
Abbildung 27: Erster Schritt der SOE-PCR für die Erstellung der Varianten (A) <i>strpB2a_1</i> und (B) <i>strpB2b_1</i>	87
Abbildung 28: Schema der Klonierung von <i>strpB2a_2</i> mittels SOE-PCR	89
Abbildung 29: Reinheitsgrad der angereicherten Varianten sTrpB2a_1, _3, _4 und sTrpB2b_1, _2, _3, _4, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).	92
Abbildung 30: Titration von (A) sTrpB2a_1 und (B) sTrpB2a_3 mit sTrpA.....	97
Abbildung 31: Western-Blot von <i>T. maritima</i> Zellextrakten mit anti_TrpB2 (links) und anti_TrpB1 (rechts) Antikörpern.....	98
Abbildung 32: Modell zur Evolution der Tryptophan Synthase β -Untereinheit.....	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Der Smart Ladder DNA-Standard.....	23
Tabelle 2: Der Low Molecular Weight Marker.....	24
Tabelle 3: Protokoll für die Reinigung mittels Affinitätschromatographie.....	41
Tabelle 4: Protokoll für die Reinigung mittels Hydroxyapatit-Chromatographie (SV: 32,7 ml).....	42
Tabelle 5: Protokoll für die Reinigung mittels Anionenaustauscher-Chromatographie (SV: 1 ml).....	43
Tabelle 6: Zusammensetzung eines SDS - Polyacrylamidgels	46
Tabelle 7: Maxima der Fluoreszenzemissionsspektren von sTrpA, sTrpB2a und sTrpB2b.....	62
Tabelle 8: Retentionszeiten in der analytischen Gelfiltration, berechnete (M_R^{calc}) und apparente (M_R^{app}) Molekulargewichte, sowie abgeleitete Assoziationszustände von sTrpA, sTrpB2a, sTrpB2b.	68
Tabelle 9: Berechnete (M_R^{calc}) und aus Gleichgewichtsläufen in der analytischen Ultrazentrifuge ermittelte apparente (M_R^{app}) Molekulargewichte, sowie daraus abgeleitete Assoziationszustände von sTrpB2a und sTrpB2b.....	69
Tabelle 10: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpA-Proteine aus <i>S. solfataricus</i> (sTrpA) und <i>T. maritima</i> (tmTrpA) bei 60°C, in An- und Abwesenheit der kognaten TrpB-Proteine.	73
Tabelle 11: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpB-Proteine aus <i>S. solfataricus</i> (sTrpB2a, sTrpB2b) und <i>T. maritima</i> (tmTrpB1, tmTrpB2) bei 80 °C.....	78
Tabelle 12: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpB-Proteine aus <i>S. solfataricus</i> (sTrpB2a, sTrpB2b) bei 60 °C, in An- und Abwesenheit von sTrpA.	79
Tabelle 13: Übersicht über die Ausbeuten und Konzentrationen der gereinigten sTrpB2a und sTrpB2b Varianten.	91
Tabelle 14: Maxima der Fluoreszenzemissionsspektren der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten im Vergleich zu den wildtypischen Proteinen.	93
Tabelle 15: Steady-state enzymkinetische Parameter (B-Reaktion) der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten im Vergleich mit den wildtypischen Proteinen.....	94
Tabelle 16: Wechselzahlen von sTrpA in Gegenwart der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten bei 60 °C.....	96

Formelverzeichnis

Formel 1: Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen.....	34
Formel 2: Berechnung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids.....	36
Formel 3: Bestimmung der Annealing-Temperatur in einer PCR-Reaktion.....	36
Formel 4: Berechnung des Sedimentationskoeffizienten s	49
Formel 5: Berechnung des apparenten Sedimentationskoeffizienten s_{app}	50
Formel 6: Berechnung von $s_{20,w}$	50
Formel 7: Berechnung von M aus Sedimentationsgleichgewichtsläufen.....	51

1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Tryptophan Synthase aus dem hyperthermophilen Archaeon *Sulfolobus solfataricus* charakterisiert. Der klassische Tryptophan Synthase Komplex mesophiler Mikroorganismen besteht aus zwei α - (TrpA) und zwei β - (TrpB1) Untereinheiten, die an benachbarten Positionen im *trp*-Operon kodiert sind. TrpA und TrpB1 binden mit hoher Affinität an einander und aktivieren sich im $\alpha\beta\beta\alpha$ Komplex wechselseitig. Als Folge davon katalysiert TrpA die Spaltung von Indol-3-glycerinphosphat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Indol, welches durch einen hydrophoben Kanal zum aktiven Zentrum von TrpB diffundiert, wo es mit L-Serin zu L-Tryptophan kondensiert.

Die vollständige Sequenzierung der Genome einer Reihe von hyperthermophilen Archaea und Bacteria führte zur Identifizierung einer neuen Klasse von TrpB2 Proteinen, die im Vergleich zu den TrpB1 Proteinen eine lange N-terminale Extension und zwei Insertionen aufweisen. In Organismen ohne *trpB1* Gen ist *trpB2* innerhalb, in Organismen mit *trpB1* Gen dagegen außerhalb des *trp*-Operons kodiert. In früheren Untersuchungen sind die Proteine tmTrpA, tmTrpB1 und tmTrpB2 aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt, gereinigt und *in vitro* charakterisiert worden. In isolierter Form bildeten tmTrpB1 und tmTrpB2 jeweils $\beta\beta$ - Homodimere und waren vergleichbar katalytisch aktiv. Während tmTrpB1 sich jedoch mit tmTrpA zur konventionellen $\alpha\beta\beta\alpha$ Tryptophan Synthase zusammenlagerte, bildete tmTrpB2b keinen Komplex mit tmTrpA aus. Dies ist darauf zurückgeführt worden, dass die in tmTrpB2 und den anderen TrpB2 Proteinen vorhandenen zusätzlichen Sequenzabschnitte die Komplexbildung sterisch verhindern.

Das Genom des hyperthermophilen Archaeons *Sulfolobus solfataricus* enthält kein *trpB1* Gen. Stattdessen sind zwei *trpB2* Gene vorhanden, von denen *strpB2a* im Operon neben *strpA* und *strpB2b* außerhalb des Operons lokalisiert ist. Zunächst sollte geklärt werden, ob eines der beiden sTrpB2 Proteine einen Komplex mit sTrpA bildet oder ob *S. solfataricus* ohne klassische $\alpha\beta\beta\alpha$ Tryptophan Synthase auskommt. Zu diesem Zweck wurden sTrpA, sTrpB2a und sTrpB2b durch heterologe Genexpression in *E. coli* hergestellt, gereinigt und

charakterisiert. Es zeigte sich, dass in isolierter Form sTrpA als α - Monomer vorliegt, und sTrpB2a und sTrpB2b jeweils als $\beta\beta$ - Homodimere. Mittels analytischer Gelfiltration bei 25°C ließ sich weder ein Komplex aus sTrpA mit sTrpB2a noch mit sTrpB2b nachweisen. Steady-state enzymkinetische Untersuchungen bei 60°C zeigten, dass weder sTrpB2a noch sTrpB2b durch sTrpA aktiviert werden. Umgekehrt änderten sich auch die katalytischen Eigenschaften von sTrpA durch die Anwesenheit von sTrpB2b nicht, während die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M^{IGP}) von sTrpA durch die Anwesenheit von sTrpB2a um den Faktor 60 erhöht wurde. Dies geht hauptsächlich auf eine Erhöhung der Wechselzahl (k_{cat}) und in geringerem Maße auf eine Erniedrigung der Michaelis-Konstante (K_M^{IGP}) zurück. Bei gleichzeitiger Anwesenheit des sTrpB2a Substrates L-Serin in sättigender Konzentration, ist die Aktivität von sTrpA sogar annähernd 300-fach heraufgesetzt. Um zu ermitteln, ob die Stärke der Aktivierung mit steigender Temperatur zunimmt, wurden die Wechselzahlen von sTrpA in Ab - und Anwesenheit von sTrpB2a und Serin jeweils bei 45, 50, 55 und 60°C gemessen. Die resultierenden Arrheniusdiagramme verliefen parallel, was die Unabhängigkeit der Aktivierung von der Temperatur belegt. Zur Bestimmung der Affinität der beiden Untereinheiten für einander wurden Aktivitätstitrationen bei 60°C durchgeführt. Dabei wurde die Komplexbildung über die Erhöhung der Aktivität von sTrpA durch sTrpB2a in Anwesenheit sättigender Konzentrationen von Serin verfolgt. Die ermittelte thermodynamische Dissoziationskonstante (K_d) hatte einen Wert von 280 nM, die unter identischen Bedingungen ermittelte Dissoziationskonstante für die Bildung des Komplexes aus tmTrpA und tmTrpB1 betrug 4 nM und entspricht damit in etwa dem Literaturwert für die Komplexbildung der TrpA und TrpB1 Proteine aus *E. coli*. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Tendenz von TrpB Proteinen zur Komplexbildung mit TrpA in der Reihenfolge TrpB2b < TrpB2a < TrpB1 zunimmt. Auf der Basis dieser Beobachtungen wurde ein Modell für die Evolution der Tryptophan Synthase entwickelt. Es geht davon aus, dass zunächst unabhängige kodierte TrpA und TrpB2b - ähnliche Untereinheiten existierten, die nach Vereinigung der Gene im *trp*-Operon schrittweise stärkere und besser koordinierte TrpA-TrpB2a und TrpA-TrpB2b Komplexe ausbildeten.

Durch eine Kombination aus multiplen Sequenzalignments und Strukturmodellierungen wurden Bereiche in sTrpB2a und sTrpB2b identifiziert, die für die unterschiedliche Tendenz zur Komplexbildung mit sTrpA verantwortlich sein könnten. Um die Bedeutung dieser Sequenzabschnitte experimentell zu testen, wurden sie zwischen den beiden Proteinen durch gerichtete Mutagenese wechselseitig ausgetauscht. Die dadurch erzeugten Varianten

sTrpB2a_{1,2,3,4} und sTrpB2b_{1,2,3,4} zeigten identische Fluoreszenzeigenschaften wie die wildtypischen Proteine und waren katalytisch aktiv. Während für keine der sTrpB2b Varianten eine Wechselwirkung mit sTrpA nachgewiesen werden konnte, war die Aktivierbarkeit von sTrpA durch sTrpB2a₁ und sTrpB2a₃ etwa um die Hälfte reduziert. Die Stärke der Bindung von sTrpB2a₃ an sTrpA scheint dagegen nicht beeinträchtigt zu sein, während die Dissoziationskonstante für die Bindung von sTrpB2a₁ an sTrpA unter identischen Bedingungen um den Faktor 36-fach höher liegt als für die Bindung von sTrpB2a an sTrpA. Dies zeigt, dass drei konservierte Aminosäuren von sTrpB2a in der unmittelbaren Kontaktregion zu sTrpA, die in sTrpB2a₁ ebenso wie in sTrpB2b deletiert sind, einen wichtigen Beitrag für die Bindung an sTrpA leisten. Damit ist ein erster Schritt zur Identifizierung der strukturellen Grundlagen des unterschiedlichen Assoziationsverhaltens von sTrpB2a und sTrpB2b an sTrpA gelungen.

Obwohl postuliert wurde, dass TrpB2 Proteine in Hyperthermophilen die Rolle eines Indolrettungsproteins oder einer Serin-Desaminase übernehmen, ist ihre tatsächliche physiologische Funktion noch ungeklärt. Mit Hilfe spezifischer Antikörper konnte im Rahmen dieser Arbeit das tmTrpB2 Protein im Extrakt von *T. maritima* Zellen nachgewiesen werden. Dies spricht für eine Funktion des Proteins im Metabolismus und macht es unwahrscheinlich, dass tmtrpB2 und seine Homologen lediglich Pseudogene darstellen.

2 Einleitung

2.1 Bedeutung von Protein-Protein Wechselwirkungen

Das Leben aller Organismen beruht auf einem Pool an Bausteinen wie Nukleotiden und Aminosäuren, die in ihrer Kombination zu einer enormen Vielfalt an Makromolekülen wie DNA, RNA und Proteinen mit unterschiedlicher Struktur und Funktion führen. Die Produktion dieser Bausteine durch spezifische Enzyme erfolgt in vielen einzelnen Reaktionen entlang spezifischer Biosynthesewege, die zusammen ein gigantisches Netz, den Stoffwechsel, bilden. Die Koordination dieses Netzwerkes erfordert vielfache Regulation und Kontrolle. Manche Wege werden erst bei Bedarf angeschaltet, um eine Verschwendung von Energie und Ressourcen zu vermeiden. Andere laufen permanent ab, um lebenserhaltende Grundfunktionen zu garantieren. Ein essentielles Problem stellt die Logistik in der Zelle dar. Viele Intermediate zerfallen leicht oder müssen vor dem Verlust durch Abbau oder Diffusion geschützt werden. Andere Intermediate können in mehreren Reaktionswegen weiterverwendet werden, die deshalb räumlich von einander getrennt werden müssen. Eine verbreitete Strategie ist die Separierung enzymatischer Aktivitäten durch ihre Lokalisierung in bestimmten Organellen, wie beispielsweise den Zellkern, das Cytosol oder die Mitochondrien. Ähnlich effektiv ist die nachbarschaftliche Immobilisierung von Enzymen an Membranen, wodurch kurze Wege für die Intermediate garantiert werden. Häufig sind die Gene eines Stoffwechselweges in einem Operon organisiert. Die gemeinsame Transkription garantiert zeitliche und räumliche Nähe der Genprodukte.

Eine besonders effiziente Möglichkeit zur Koordination enzymatischer Reaktionen innerhalb eines Stoffwechselweges ist die Bildung von Multienzymkomplexen. Dies kann durch Fusion auf Genebene geschehen oder durch Zusammenlagerung von getrennt exprimierten Proteinen. In Multienzymkomplexen können die katalytischen Aktivitäten der beteiligten Enzyme optimal koordiniert und Intermediate direkt zwischen den assoziierten aktiven Zentren transferiert werden. Oft ist die Bildung von nicht-kovalenten Komplexen zwischen Enzymen von dauerhafter Natur (Jones & Thornton 1996, Tsai et al. 1998), während in anderen Fällen Interaktionen innerhalb eines Multienzymkomplexes transient erfolgen (Nooren & Thornton 2003).

Welches sind die strukturellen Grundlagen stabiler und transienter Interaktionen in Multienzymkomplexen und anderen, katalytisch inaktiven Proteinassoziaten? Zur Beantwortung dieser Frage wurden bis vor wenigen Jahren hauptsächlich klassische Beispiele wie Antigen-Antikörper und Protease-Inhibitor Komplexe analysiert, deren Strukturen einen wesentlichen Beitrag zur Erstellung genereller Prinzipien leisten konnten (Wodak & Janin 2002). Auf der Basis der in den letzten Jahren enorm angestiegenen Anzahl von hochaufgelösten Röntgenstrukturen verschiedenster Proteinkomplexe gewinnt jedoch die computergestützte Analyse und, darauf aufbauend, die Vorhersage von Protein-Protein Kontaktflächen zunehmend an Bedeutung (Chakrabarti & Janin 2002, Kortemme & Baker 2004, Lo Conte et al. 1999). Dadurch konnten charakteristische Merkmale von Kontaktflächen identifiziert werden (Deremble & Lavery 2005), wozu beispielsweise die erhöhte Konservierung und eine spezifische Zusammensetzung von Aminosäuren bzw. Sequenzabschnitten gehören (Yao et al. 2003) (Valdar & Thornton 2001).

2.2 Die Biosynthese von Tryptophan

Zur detaillierten Analyse der Struktur und Funktion von Protein-Protein Interaktionen in Multienzymkomplexen eignen sich Vertreter aus prokaryotischen Stoffwechselwegen besonders gut. Sie sind in der Regel nicht zu kompliziert aufgebaut, stabil und sowohl genetisch als auch biochemisch gut charakterisiert. Auch lassen sie sich häufig in großen Mengen durch heterologe Genexpression in *Escherichia coli* herstellen. In vielen Fällen sind ihre Röntgenstrukturen in hoher Auflösung bekannt, was den gezielten Austausch potentiell wichtiger Aminosäuren durch gerichtete Mutagenese erleichtert. Ein Paradebeispiel für einen gut untersuchten prokaryontischen Stoffwechselweg ist die Biosynthese der Aminosäure Tryptophan (Xie et al. 2003, Yanofsky 2003, Yanofsky et al. 1999) (Abbildung 1).

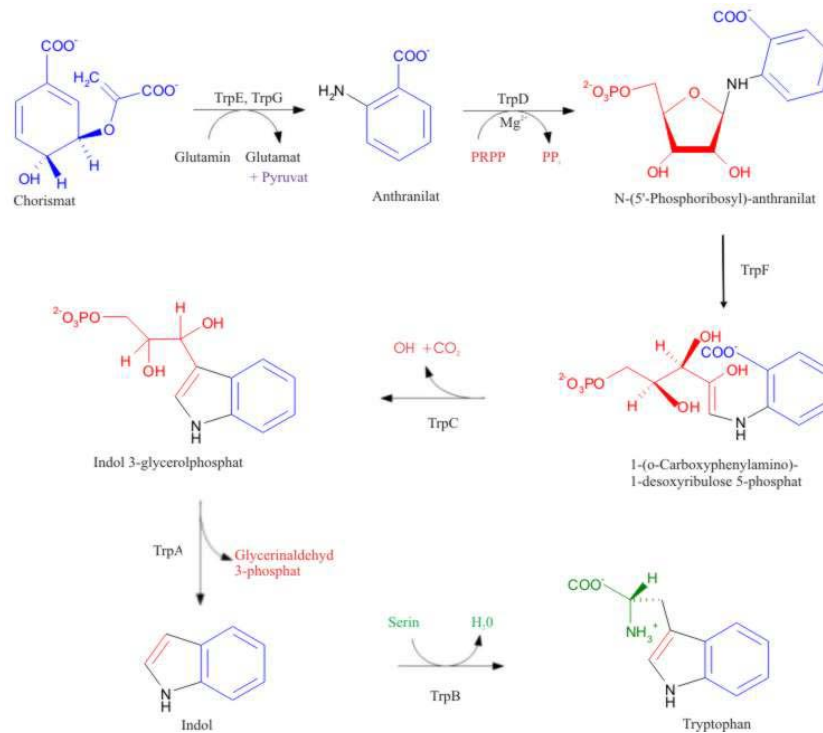


Abbildung 1: Reaktionen und Enzyme der Tryptophan Biosynthese.

TrpE, TrpG: große und kleine Untereinheit der Anthranilat Synthase; TrpD: Anthranilatphosphoribosyl Transferase; TrpF: N-(5'-Phosphoribosyl)-Anthranilat Isomerase; TrpC: Indol-3-glycerinphosphat Synthase; TrpA: α -Untereinheit der Tryptophan Synthase; TrpB: β -Untereinheit der Tryptophan Synthase

In *E. coli* bilden die Gene der sieben Enzyme eine transkriptionelle Einheit, das *trp*-Operon. Auf der Ebene der Genexpression wird die Biosynthese des Tryptophan über den Trp-Repressor und Attenuation mittels eines Trp-reichen *leader*-Peptids streng reguliert. Dazu kommt auf Proteinebene die *feedback*-Inhibition der ersten beiden Enzyme (TrpE und TrpD) durch Tryptophan (Xiu *et al.* 2002). In manchen Organismen ist das Operon deutlich anders organisiert. So sind manche Operone in kleiner Einheiten fragmentiert, einzelne oder mehrerer Gene in andere Teile des Genoms ausgelagert bzw. fremde Gene in das Operon integriert (Xie *et al.* 2003). In den allen untersuchten Fällen stehen jedoch die Gene für *trpA* und *trpB* unter gemeinsamer Transkriptionskontrolle. Der von diesen Genen kodierte Tryptophan Synthase Komplex steht im Mittelpunkt dieser Arbeit.

2.3 Die Tryptophan Synthasen aus *Salmonella typhimurium* und *E. coli*

2.3.1 Struktur und Funktion

Die Tryptophan Synthase (E.C.4.2.1.20) ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung (Miles 1991). Bereits früh wurde am Beispiel des Enzyms aus *E. coli* gezeigt, dass es sich um ein Heterotetramer aus zwei α - (TrpA) und zwei β - (TrpB) Untereinheiten handelt (Crawford & Yanofsky 1958), das folgende Reaktionen katalysiert:

TrpA-Reaktion: Indolglyzerinphosphat \leftrightarrow Indol + Glyzerinaldehyd 3-Phosphat

(1)

TrpB-Reaktion: Indol + L-Serin \rightarrow L-Tryptophan (2)

Gesamtreaktion:

Indolglyzerinphosphat + L-Serin \rightarrow L-Tryptophan + Glyzerinaldehyd 3-Phosphat (3)

Eine Besonderheit der Tryptophan Synthase besteht darin, dass beide Untereinheiten getrennt stabil sind. Frühe Studien mittels Dichtegradientenzentrifugation mit den isolierten und assoziierten Untereinheiten zeigten, dass es sich bei TrpA um ein monomeres Protein handelt, während TrpB als Homodimer vorliegt (Creighton & Yanofsky 1966). Obwohl die isolierten TrpA und TrpB Proteine die Reaktionen 1 bzw. 2 mit messbarer Rate katalysieren können, laufen beide Einzelreaktionen und die physiologische Gesamtreaktion 3 im Komplex wesentlich effizienter ab (Miles 1979).

Die erste bekannte Kristallstruktur einer Tryptophan Synthase war die des Enzyms aus *Salmonella typhimurium* (Hyde *et al.* 1988). Der gesamte Komplex hat eine Länge von 150 Å, wobei die aktiven Zentren der assoziierten α - und β - Untereinheiten jeweils 25 Å von einander entfernt liegen (Abbildung 2)

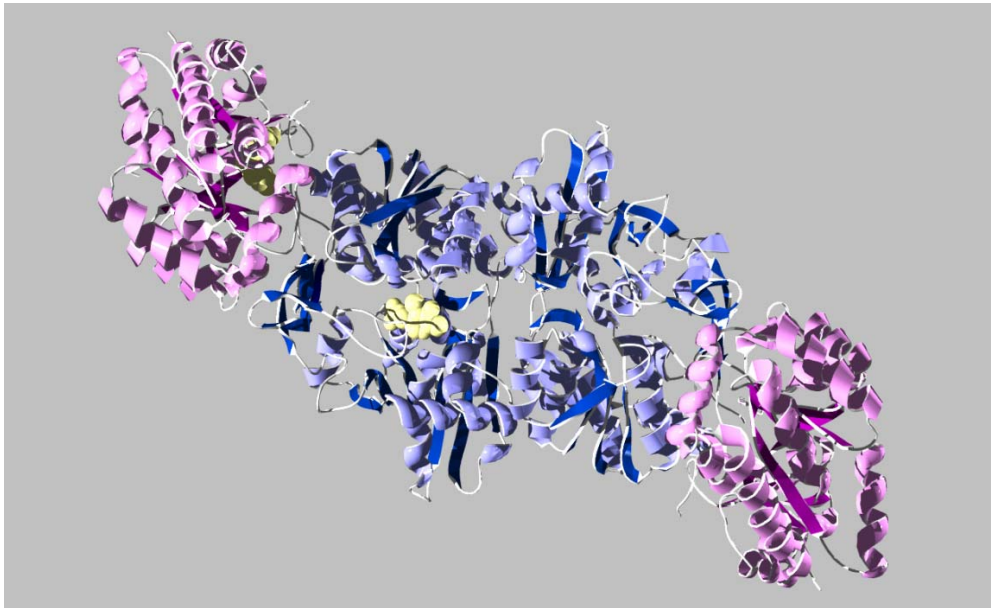


Abbildung 2: Die $\alpha\beta\alpha$ Struktur der Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium*.

Rosa: TrpA, blau: TrpB, gelb: 5-Fluoroindolpropanolphosphat (an TrpA gebunden) und Pyridoxal 5'-phosphat (an TrpB gebunden). Die gezeigte Struktur hat die pdb Kennung 1A50 (Schneider *et al.* 1998).

TrpA Proteine weisen ein Molekulargewicht von ungefähr 27 kDa auf und bestehen aus etwa 240 Aminosäuren. Sie gehören zur Familie der $(\beta\alpha)_8$ -barrel Enzyme, die etwa 10 % aller Proteine mit bekannter Raumstruktur umfasst (Sternier & Hocker 2005, Wierenga 2001). Dieser Faltungstyp, der erstmals bei der Triosephosphat Isomerase gefunden wurde (Banner *et al.* 1976), ist aus einem sich achtmal wiederholenden Motiv aufgebaut. Jedes Motiv besteht aus einem β -Strang und einer α -Helix, die durch $\beta\alpha$ -Schleifen mit einander verbunden sind. Die einzelnen Motive sind über $\alpha\beta$ -Schleifen verknüpft. Die acht β -Stränge lagern sich zu einem zentralen parallelen Faltblatt („Fass“ oder „barrel“) zusammen, welches von den acht Helices umgeben ist. Wie in allen bekannten $(\beta\alpha)_8$ -barrel Enzymen, liegt auch das aktive Zentrum von TrpA an den Enden der β -Stränge und in den $\beta\alpha$ -Schleifen. TrpA besitzt drei zusätzliche helicale Segmente, Helix 0, Helix 2' und Helix 8', welche vor dem β -Strang 1 und zwischen β -Strang 2 und Helix 2 bzw. β -Strang 8 und Helix 8 liegen (Hyde *et al.* 1988); (Vadrevu *et al.* 2003). TrpB Proteine weisen in ihrer dimeren Form ein Molekulargewicht von ungefähr 94 kDa auf und bestehen aus etwa 860 Aminosäuren. Ein TrpB Monomer besteht aus zwei nahezu gleich großen Domänen, zwischen denen sich das aktive Zentrum befindet. Die N-terminale Domäne (Aminosäuren 1 – 204 in *S. typhimurium* TrpB) wird durch ein dreistufiges Helix-Faltblatt-Helix Sandwich dominiert, welches von zwei Helices umgeben

ist. Die C-terminale Domäne (Aminosäuren 205 – 397 in *S. typhimurium* TrpB) besteht aus einem zentralen β -Faltblatt, das zwischen zwei Schichten von α -Helices liegt.

Eine an der Tryptophan Synthase zum ersten Mal entdeckte Besonderheit stellt der hydrophobe Kanal dar, der die aktiven Zentren von TrpA und TrpB verbindet. Durch diesen gelangt Indol direkt vom Ort seiner Synthese zum Ort seines Verbrauchs (Dunn *et al.* 1990). Inzwischen sind weitere Enzymkomplexe mit molekularen Tunneln bekannt, zum Beispiel die Carbamoylphosphat Synthetase, die Asparagin Synthase, sowie die Imidazolglycerinphosphat Synthase (Beismann-Driemeyer & Sterner 2001, Huang *et al.* 2001, Miles *et al.* 1999, Raushel *et al.* 2003).

2.3.2 Katalysemechanismus und Kommunikation der Untereinheiten

Gezielte Mutagenese ergab, dass die Aminosäuren Glutamat 49 und Aspartat 60 (Nummerierung nach TrpA aus *S. typhimurium*) für die TrpA-Reaktion essentiell sind (Miles *et al.* 1988, Nagata *et al.* 1989, Yutani *et al.* 1987). Während Glu49 im β -Strang 2 lokalisiert ist, befindet sich Asp60 im darauf folgenden $\beta\alpha$ -Loop 2. Der in Abbildung 3 dargestellte Reaktionsmechanismus zeigt, dass beide Reste die Spaltung von Indolglycerinphosphat (IGP) zu Indol und Glycerinaldehyd 3-Phosphat (GA3P) sowohl als allgemeine Säure als auch als allgemeine Base katalysieren.

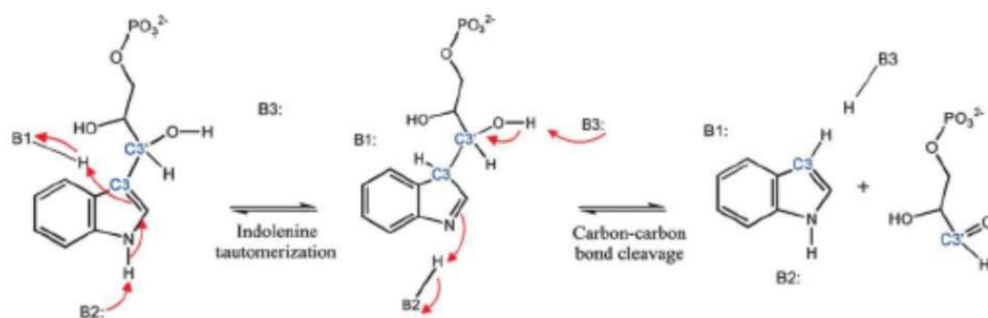


Abbildung 3: Mechanismus der TrpA-Reaktion. (Nach (Kulik *et al.* 2005).)

Asp60 übernimmt die Funktion von B2, während Glu49 sowohl als B1H als auch als B3 fungiert. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt auf der Seite von IGP (Weischet & Kirschner 1976) und wird erst durch den von TrpB katalysierten Umsatz von Indol mit L-Serin in die physiologische Richtung verschoben.

Die B-Reaktion verläuft in mehreren Schritten (Drewe & Dunn 1985) (Abbildung 4). Im Ruhezustand liegt am aktiven Zentrum ein internes Aldimin ($E_{(Ain)}$) vor, wobei der Cofaktor PLP über einen konservierten Lysinrest kovalent an das Enzym gebundenen ist. Im ersten Schritt verdrängt L-Serin den Lysinrest, wodurch ein externes Aldimin ($E_{(Aex1)}$) entsteht, das im Gleichgewicht mit dem Aminoacrylat-Intermediat vorliegt ($E_{(A-A)}$). Im zweiten Schritt reagiert das vom TrpA kommende Indol mit $E_{(A-A)}$ zum Quinoid ($E_{(Q)}$) und weiter zum zweiten externen Aldimin ($E_{(Aex2)}$). Abschließend wird unter Freisetzung von L-Tryptophan das interne Aldimin regeneriert ($E_{(Ain)}$).

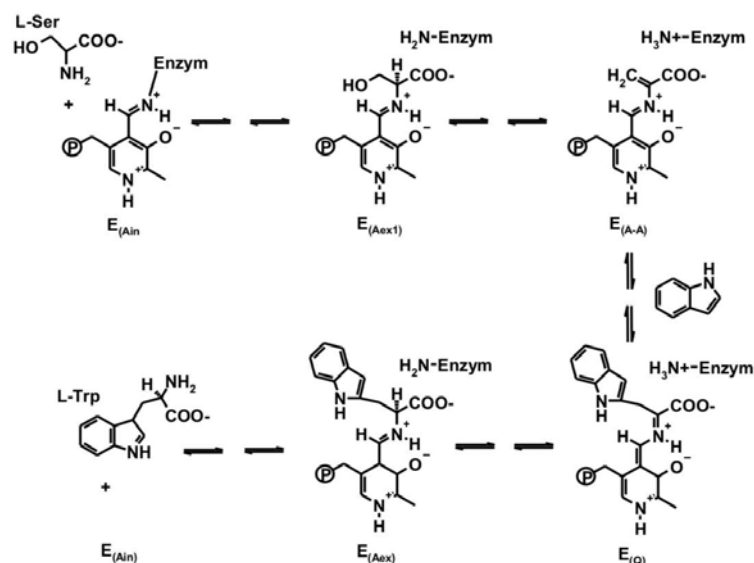


Abbildung 4: Mechanismus der TrpB Reaktion. (Nach Drewe und Dunn, 1985.)

Die Bildung von L-Tryptophan aus Indol und L-Serin verläuft über eine Reihe von Intermediaten, von denen die wichtigsten dargestellt sind. $E_{(Ain)}$: internes Aldimin, $E_{(Aex1)}$: erstes externes Aldimin, $E_{(A-A)}$: Aminoacrylat-Intermediat, $E_{(Aex2)}$: zweites externes Aldimin.

Eine ausgeprägte Kommunikation zwischen den TrpA- und TrpB Untereinheiten der Tryptophan Synthase ermöglicht die Koordination der katalytischen Aktivitäten und verhindert die Verschwendung von Indol. Dabei spielt der Übergang von einer offenen Konformation, welche die Bindung der Substrate ermöglicht, zu einer geschlossenen, katalytisch aktiven Konformation eine zentrale Rolle (Osborne et al. 2003, Pan & Dunn 1996) (Abbildung 5).

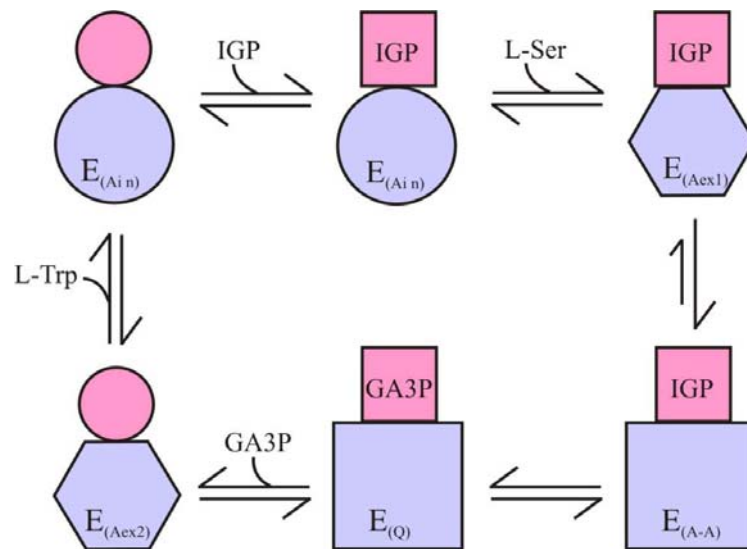


Abbildung 5: Reaktionszyklus der Tryptophan Synthase. (Modifiziert nach Pan und Dunn, 1996.)

Pink: TrpA, blau: TrpB. Kreise geben eine offene Konformation wieder, Quadrate eine geschlossene, und Sextaeder eine halb geschlossene.

Die Bindung von IGP an das aktive Zentrum von TrpA führt zur einer Bewegung der $\beta\alpha$ -Loops 2 und 6, wodurch TrpA von der offenen in die geschlossene Konformation übergeht (Brzovic et al. 1993, Raboni et al. 2005, Rhee et al. 1998). Diese Bewegung wird über eine Wasserstoffbrücke zwischen α Gly181 und β Ser178 (Nummerierung nach der Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium*) auf die β -Untereinheit übertragen (Marabotti et al. 2001, Schneider et al. 1998, Weyand et al. 2002). Gleichzeitig wird durch den Kontakt das Gleichgewicht vom externen Aldimin zum Aminoacrylat verschoben, dessen Anreicherung zum Übergang von TrpB von der halb geschlossenen in die geschlossene Konformation führt. Dabei rotieren die beiden Domänen der β -Untereinheit relativ zueinander (Bahar & Jernigan 1999, Weber-Ban et al. 2001). Diese Bewegung wird nun wiederum auf TrpA übertragen und führt dort zur Spaltung des gebundenen IGP, dem Channeling des dabei gebildeten Indol und zur Bildung des Quinoid-Intermediats an TrpB. Nach der Freisetzung der Produkte GA3P und L-Tryptophan kommt es zur schrittweisen Regeneration der offenen Zustände beider Untereinheiten. Dieser Reaktionszyklus stellt sicher, dass so lange kein Indol am aktiven Zentrum von TrpA gebildet wird und durch den Tunnel gelangen kann, bis ein reaktives Intermediat an TrpB vorliegt.

2.4 Mechanismen der Proteinevolution

2.4.1 Genduplikation

Grundlage für die Evolution von Proteinfunktionen ist die Evolution der kodierenden Gene. Neben Mutationen wie Nukleinsäuresubstitutionen, Deletionen und Insertionen, stellt die Duplikation von DNA-Abschnitten einen entscheidenden Faktor beim Erwerb neuer Funktionen dar (Hancock 2005). Haldane und Muller beschrieben als Erste die Möglichkeit, dass redundante Kopien eines Gens Mutationen ansammeln und sich zu einem Gen mit neuer Funktion entwickeln könnten (Haldane 1932, Muller 1935). Eine zeitlang wurde sogar die Meinung vertreten, die Genduplikation sei die einzige Möglichkeit für einen Organismus, sein Repertoire an Proteinfunktionen zu erweitern (Ohno 1970). Nach einem Duplikationsereignis gibt es für die („paralogen“) Tochtergene verschiedene Evolutionsszenarien. Im häufigsten Fall verliert eine Kopie jegliche Funktion und wird zum Pseudogen, da sie keinem selektiven Druck ausgesetzt ist und Mutationen anhäuft. Beide Kopien können aber auch die gleiche Funktion behalten und so einen erhöhten Bedarf an dem Genprodukt decken. Dies ist zum Beispiel der Fall für die multiplen Kopien des Lysozym-Gens in Tieren aus der Gruppe der Ruminantia mit ihrem speziellen Verdauungssystem aus drei Vormägen und einem Hauptmagen (Irwin & Wilson 1989). Einen besonderen Gewinn für den Organismus stellt eine Genduplikation dann dar, wenn eine der beiden Kopien eine bisher nicht vorhandene Funktion übernimmt und dadurch einen Überlebensvorteil sichert. Auf diese Weise können ganze Cluster von homologen Genen entstehen, wie es für die Globine (Hardison 1998) und Immunoglobuline (Eason *et al.* 2004) der Fall ist. In jüngster Zeit entwickelte sich die Idee der Subfunktionalisierung (Lynch & Force 2000). Anstatt dass eine Kopie die Originalfunktion behält und die zweite Kopie eine gänzlich neue Funktion übernimmt oder verloren geht, evolvieren demnach beide Kopien zu Abwandlungen des Originals. So können sich beispielsweise aus einem Enzym mit breiter Substratspezifität zwei Tochterenzyme mit enger Substratspezifität unter Beibehaltung des Reaktionsmechanismus entwickeln. Auf diese Weise sind vermutlich die ProFAR Isomerase (HisA) und die PRA Isomerase (TrpF) aus der unspezifischen Isomerase PriA entstanden (Sterner & Hocker 2005). HisA und TrpF sind $(\beta\alpha)_8$ -barrel Enzyme, die in der Biosynthese von Histidin bzw. Tryptophan mit dem identischen Reaktionsmechanismus die Isomerisierung einer Aminoaldose (ProFAR bzw. PRA) in die entsprechende Aminoketose (PRFAR bzw. CdRP) katalysieren (Henn-Sax *et al.*

2002, Jurgens et al. 2000, Leopoldseder et al. 2004). PriA zeigt dagegen eine duale Substratspezifität für ProFAR und PRA, und katalysiert sowohl die HisA- als auch die TrpF-Reaktion mit hoher Effizienz (Barona-Gomez & Hodgson 2003, Kuper et al. 2005). Die wiederholte Abfolge von Genduplikationen und Diversifikation kann zur Evolution ganzer Proteinklassen führen, die auf einem gemeinsamen Vorläufer zurückgehen und unterschiedlichste Reaktionen katalysieren. Die SCOP (*structural classification of proteins*)-Datenbank listet eine ganze Reihe solcher „Protein-Superfamilien“ auf (Murzin et al. 1995).

2.4.2 Horizontaler Gentransfer

Neben der linearen Vererbung von Genen von einer Generation zur nächsten, ist als weiterer Mechanismus der Proteinevolution der horizontale Gentransfer in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses gerückt (Kurland *et al.* 2003). Charles Darwin beschrieb die Evolution der Lebewesen als „Baum des Lebens“ (Darwin 1859). Die Darstellung von Verwandtschaftsverhältnissen in Form von Stammbäumen hat bis in die heutige Zeit Bestand und die Einführung der ribosomalen RNA als taxonomischer Marker ermöglichte die Einbeziehung von Prokaryoten in Form der Bacteria und der Archaea (Woese 1987, Woese & Fox 1977). Die voranschreitende Sequenzierung kompletter prokaryotischer Genome brachte jedoch Phänomene zum Vorschein, die durch eine rein lineare Vererbung nicht zu erklären sind. So ergab die Sequenzierung der Genome von drei Subspezies von *E. coli*, dass nur 40 % der Gene in allen drei Vertretern vorhanden sind (Welch *et al.* 2002). Weitere Befunde legten nahe, dass heute lebende Mikroorganismen genetisches Material von bereits ausgestorbenen Vertretern beinhalten, auch wenn sie nicht in direkter Linie von diesen abstammen (Gogarten & Townsend 2005, Hartman & Fedorov 2002, Zhaxybayeva & Gogarten 2004). Diese und andere Befunde führten zu der Erkenntnis, dass viele prokaryotische Genome zu einem erheblichen Teil aus horizontal transferierten Genen bestehen (Nakamura *et al.* 2004), weshalb man statt von einem Baum besser von einem Netzwerk des Lebens sprechen sollte. Beim horizontalen Gentransfer werden DNA-Sequenzen zwischen Organismen transferiert, die nicht zwingend zur gleichen Spezies gehören. Den ersten Hinweis darauf, dass dies möglich ist, lieferte die Beobachtung, dass genetisches Material zwischen verschiedenen Pneumococccen-Spezies übertragen werden kann (Griffith 1928). Analog zum Resultat eines Genduplikationsereignisses, kann die Aufnahme eines Gens für den Empfänger keinen nachweisbaren Effekt haben oder sich negativ

auswirken, wenn z.B. durch die Integration in das Genom wichtige Genfunktionen zerstört werden. Horizontaler Gentransfer kann aber auch einen selektiven Vorteil bieten, wie z.B. bei der Aufnahme von Antibiotikaresistenzgenen. Das aufgenommene Gen wird dann dauerhaft ins Genom integriert und linear weiter vererbt werden. Drei wesentliche Mechanismen des horizontalen Gentransfers sind bekannt: Konjugation, Transduktion und Transformation (Thomas & Nielsen 2005). Bei der *Konjugation*, die auf Prokaryoten beschränkt ist, wird ein direkter Kontakt zwischen zwei Zellen hergestellt, über den Plasmide übertragen werden können (Clark & Adelberg 1962). Die *Transduktion* erfordert einen Überträger, bei dem es sich in der Regel um Viren und Bakteriophagen handelt. Bei der Reifung der Phagen kann es zum Einbau von Wirts-DNA kommen, die im Falle einer weiteren Infektion in das Genom des neuen Empfängers integriert werden kann. Durch *Transformation* wird freie DNA über die Zellmembran aufgenommen und in das Wirtsgenom integriert (Dubnau 1999, Lorenz & Wackernagel 1994).

2.5 Eine neue Klasse von β -Untereinheiten der Tryptophan Synthase

Kapitel 2.3.1 und 2.3.2 machen deutlich, dass es sich bei der α - und β -Untereinheit der Tryptophan Synthase sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene um ein eng gekoppeltes System handelt. Vor diesem Hintergrund erscheint es zunächst überraschend, dass bei Genomsequenzierungen einer Reihe von Mikroorganismen zwei *trpB* Gene identifiziert wurden, *trpB1* und *trpB2* (Hettwer & Sterner 2002). Die von den *trpB2*-Genen kodierten TrpB2-Proteine werden in der COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins) Datenbank (Tatusov *et al.* 2003) als „alternative“ Tryptophan Synthase β -Untereinheit (COG 1350, TrpB2), neben der „klassischen“ Tryptophan Synthase β -Untereinheit (COG 0133, TrpB1), geführt. Abbildung 6 zeigt, dass die TrpB1 und die TrpB2 Proteine zwei phylogenetisch getrennte Gruppen bilden.

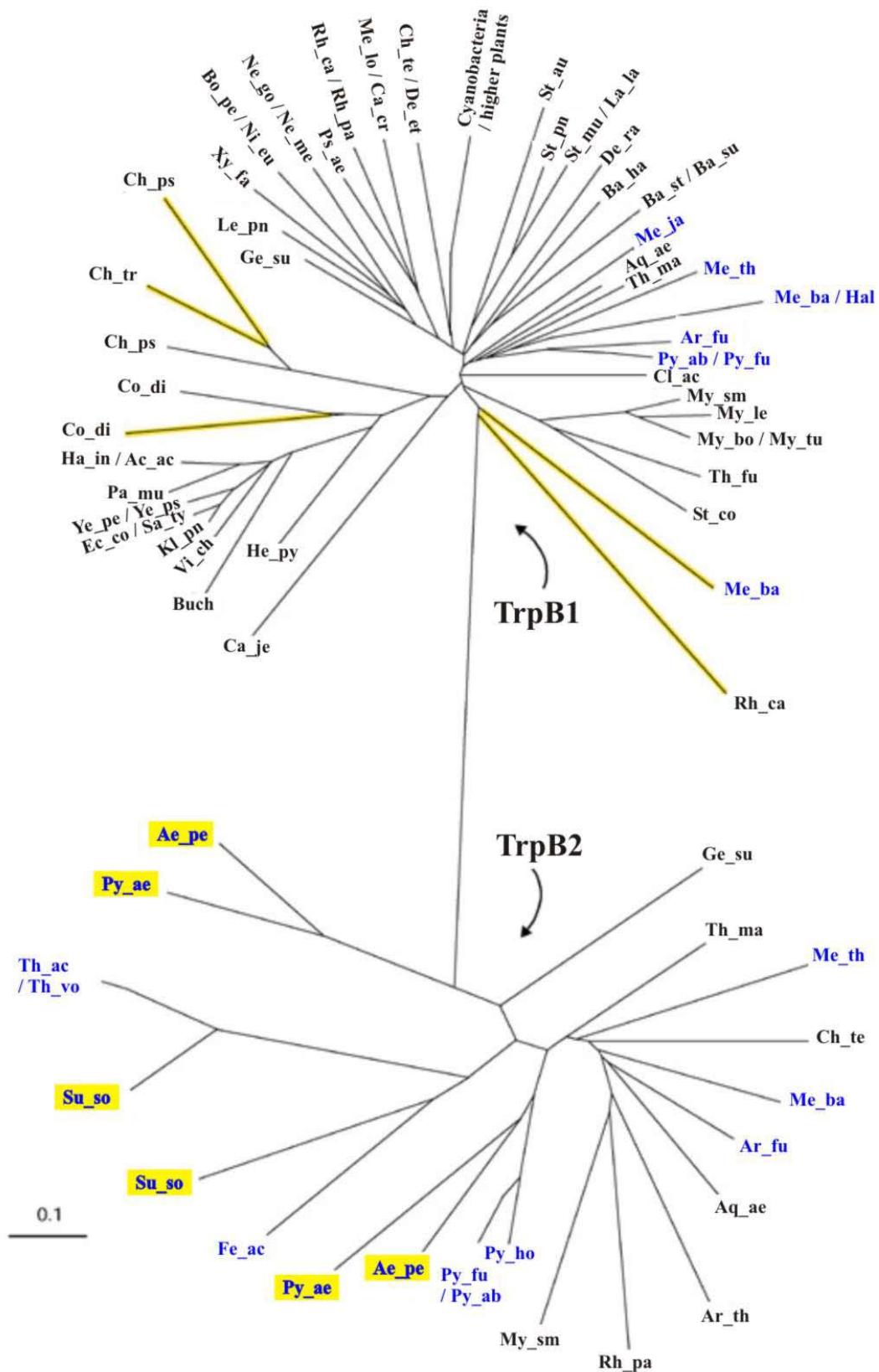


Abbildung 6: Phylogenetischer Baum der TrpB Proteinfamilie. (Modifiziert nach (Xie *et al.* 2002)

Vertreter der Archaea sind in blau dargestellt, Organismen mit zwei TrpB2 Proteinen sind gelb hinterlegt. Gelbe Striche markieren mögliche Pseudogene. Eine Erklärung der Abkürzung der Organismennamen findet sich im Anhang 8.1.

Auffallend ist, dass *trpB2* bisher fast ausschließlich in der Domäne der Archaeen gefunden wurde und dort außer in fünf Spezies der Methanococci, Methanopyri und Halobacteria aus der Gruppe der Euryarchaeota überall vorkommt. Acht archaelle Genome enthalten sowohl ein *trpB1* als auch ein *trpB2* Gen. Diese Situation liegt auch in einigen wenigen Bakterien, wie z.B. *T. maritima*, vor. Eine bisher auf Crenarchaeoten beschränkte Besonderheit stellen die zehn Genome dar, die kein *trpB1*, dafür aber ein oder zwei *trpB2* Gene besitzen. Grundsätzlich ist immer ein *trpB* Gen mit *trpA* im *trp*-Operon gekoppelt. Falls vorhanden, handelt es sich dabei um *trpB1*, während *trpB2* dann außerhalb des Operons liegt. In Organismen, die kein *trpB1* Gen besitzen, tritt ein *trpB2* Gen an diese Stelle.

2.5.1 TrpB2 aus *Thermotoga maritima*

Thermotoga maritima ist ein strikt anaerobes, gram-negatives Bakterium, das aus der Umgebung von unterseeischen hydrothermalen Quellen in Italien und im Gebiet der Azoren isoliert wurde (Huber *et al.* 1986). Das Temperaturoptimum liegt bei 80 °C, Wachstum ist jedoch zwischen 55 °C und 90 °C möglich. Bei der vollständigen Sequenzierung des Genoms (Nelson *et al.* 1999) wurde neben dem operon-ständigen *tmtrpB1* Gen ein *tmtrpB2* Gen außerhalb des Operons identifiziert. Die Proteine tmTrpA, tmTrpB1 und tmTrpB2 wurden durch heterologe Genexpression in *E. coli* hergestellt, gereinigt und charakterisiert (Hettwer & Sterner 2002). Dabei zeigte sich, dass isoliertes TrpB2 ebenso wie TrpB1 ein Homodimer bildet und die beiden Enzyme eine vergleichbare katalytische Effizienz aufweisen. Der wichtigste Unterschied zwischen den beiden Proteinen besteht darin, dass TrpB1 - ebenso wie die TrpB Proteine aus *E. coli* und *S. typhimurium* - einen stabilen $\alpha\beta\beta\alpha$ Komplex mit TrpA ausbildet, in dem sich die beiden Untereinheiten wechselseitig aktivieren. Dagegen konnte weder eine physikalische Assoziation von tmTrpB2 mit tmTrpA noch eine wechselseitige Aktivierung der beiden Proteine in steady-state enzymkinetischen Messungen nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese abgeleitet, dass es sich bei TrpB2 um ein Indol-Rettungsprotein handeln könnte. Demnach wird angenommen, dass bei den hohen Wachstumstemperaturen von Hyperthermophilen das hydrophobe Indol aus dem Kanal im Inneren des $\alpha\beta\beta\alpha$ Komplexes teilweise entweicht, durch die Cytoplasmamembran diffundiert und somit der Zelle verloren geht. Im Cytoplasma vorhandenes TrpB2 könnte aus dem Kanal freigesetztes Indol binden und zu Tryptophan umsetzen. Für diese Funktion

spricht der extrem niedrige K_M^{Indol} (und damit die extrem hohe Indol-Affinität) von tmTrpB2 und die Tatsache, dass *trpB2* Gene hauptsächlich bei Hyperthermophilen nachgewiesen wurden.

Warum bildet tmTrpB2 im Gegensatz zu tmTrpB1 keinen Komplex mit tmTrpA aus, obwohl die beiden TrpB Proteine eine Sequenzidentität von 33 % aufweisen? Ein Sequenzalignment von tmTrpB2 mit tmTrpB1 führte zu der Vermutung, dass eine N-terminale Extension von 20 Aminosäuren und zwei Insertionen von 5 bzw. 10 Aminosäuren in tmTrpB2 eine Assoziation mit tmTrpA aus sterischen Gründen verhindern. Diese Hypothese wird gestützt durch die Beobachtung, dass die zusätzlichen Sequenzabschnitte nach Projektion auf die Röntgenstruktur des $\alpha\beta\alpha$ Komplexes aus *S. typhimurium* im Bereich der potentiellen Kontaktfläche zu TrpA liegen. Tatsächlich ist das Vorhandensein von rund 30 zusätzlichen Aminosäuren mit teilweise konservierter Sequenz ein gemeinsames Merkmal aller bekannten TrpB2 Proteine, welches sie eindeutig von den TrpB1 Proteinen abhebt und maßgeblich zur Einteilung der bekannten TrpB Proteine in diese beiden Kategorien beiträgt.

2.5.2 TrpB2a und TrpB2b aus *Sulfolobus solfataricus*

Sulfolobus solfataricus ist ein hyperthermophiles Archaeon, dessen optimale Wachstumsbedingungen bei Temperaturen von 75 – 80 °C und pH-Werten von 2 – 3 liegen. Der Organismus wird hauptsächlich in heißen Quellen in Gebieten mit vulkanischer Aktivität gefunden, z.B. im Yellowstone National Park, in Island und Italien. Das komplette Genom wurde 2001 sequenziert (She *et al.* 2001). Dabei stellte sich heraus, dass *S. solfataricus* kein *trpB1* Gen, dafür aber zwei *trpB2* Gene besitzt. Zusammen mit *strpA* liegt *strpB2a* im *trp*-Operon, während *strpB2b* außerhalb des Operons lokalisiert ist. Diese Situation findet sich in noch vier weiteren Archaeen (*Sulfolobus tokodaii*, *Aeropyrum pernix*, *Pyrobaculum aerophilum* und *Picrophilus torridus*).

Folgt man nun der Hypothese, dass die zusätzlichen Sequenzabschnitte der TrpB2 Proteine eine Komplexbildung mit TrpA verhindern, dann dürften diese fünf Organismen - ebenso wie fünf weitere, deren einziges *trpB* Gen zum *trpB2* Typ gehört - keinen $\alpha\beta\alpha$ Tryptophan Synthase Komplex ausbilden. Da es sich bei der Ausbildung von Multienzymkomplexen um eine sehr effiziente Möglichkeit zur Koordination gekoppelter enzymatischer Reaktionen handelt, stellt sich die Frage, ob diese Archaeen aufgrund physiologischer Besonderheiten auf diesen Vorteil im Falle der Tryptophan Synthase verzichten können. Eine andere Möglichkeit

wäre, dass sich – anders als im Falle von tmTrpB2 - doch ein Komplex zwischen sTrpA und einem oder beiden sTrpB2 Proteinen bildet. Ein solcher Komplex, der sich in der Art und Stärke der Interaktion der Untereinheiten von den bisher bekannten Komplexen unterscheiden müsste, könnte eventuell eine evolutionäre Vorstufe des „modernen“ Tryptophan Synthase Komplexes darstellen. Dafür spricht, dass TrpB2 Proteine hauptsächlich in Archaeen und hyperthermophilen Bakterien gefunden werden, die letzten gemeinsamen Vorläufer aller bekannten Organismen näher stehen als mesophile Bakterien. Das Fehlen von TrpB1 Proteinen ist sogar ganz auf Archaeen beschränkt.

2.6 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten am Beispiel der Tryptophan Synthase aus *S. solfataricus* Einblicke in die strukturellen Grundlagen und die funktionellen Konsequenzen von Protein-Protein Interaktionen gewonnen, sowie Einsichten in die Evolution von Multienzymkomplexen erhalten werden. Dazu sollte zunächst geklärt werden, ob und mit welcher Affinität sich Komplexe aus sTrpA und sTrpB2a bzw. sTrpB2b bilden, und wie sich eine eventuelle Komplexbildung auf die katalytischen Aktivitäten und die Stabilitäten der Bindungspartner auswirkt. Dazu sollten die *strpA*, *strpB2a* und *strpB2b* Gene heterolog in *E. coli* exprimiert, die Proteinprodukte gereinigt und sowohl einzeln als auch im Gemisch mit hydrodynamischen, spektroskopischen und enzymkinetischen Methoden charakterisiert werden. Die aus der Analyse dieser Messungen gewonnenen Erkenntnisse sollten dann im zweiten Teil der Arbeit durch gezielte Aminosäureaustausche an den tatsächlichen oder potentiellen Kontaktflächen der Untereinheiten überprüft und vertieft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 *Escherichia coli* Stämme

BL21 (DE3) (Studier & Moffatt 1986)

hsdS, *gal*, [*λ**CI*, *ts857*, *cmd 1*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *relA1*]

BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL

BF⁻ *ompT* *hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ(DE3) *endA* Hte [*argU proL Cam*^r] [*argU ileY leuW* Strep/Spec^r]

Bei BL21 CodonPlus (DE3) RIPL Zellen werden Gene von einem zusätzlichen Plasmid coexprimiert, welche für in *E. coli* seltene tRNAs kodieren (*argU* (AGA, AGG); *proL* (CCC); *ileY* (AUA); *leuW* (CUA)). Das Plasmid enthält zusätzlich das Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase, die Resistenz gegen Chloramphenicol vermittelt.

DH5α (Hanahan 1983)

[F⁻, *endA1*, *hsdR17* (r_k⁻ m_k⁻), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA* (Nal^r), *relA1*, Δ(*lacZYA-argF*)U169, Φ80*lacZ*ΔM15]

3.2 Vektoren

3.2.1 pET Vektoren

Die Transkription von Genen innerhalb der multiplen Klonierungsstelle (MCS) in pET-Vektoren (NOVAGEN, plasmid for expression by T7 RNA Polymerase) erfolgt durch die

RNA Polymerase des Phagen T7 (Studier *et al.* 1990). pET-Vektoren können daher nur in Stämmen verwendet werden, die die entsprechende T7 RNA Polymerase exprimieren. Die Expression des Polymerasegens und des in das Plasmid klonierten Gens erfolgt unter Kontrolle eines lacUV5-Promotor-Operators und wird durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert (Abbildung 7). Der entsprechende lac-Repressor (*LacI*) ist auf dem Plasmid kodiert und wird konstitutiv exprimiert.

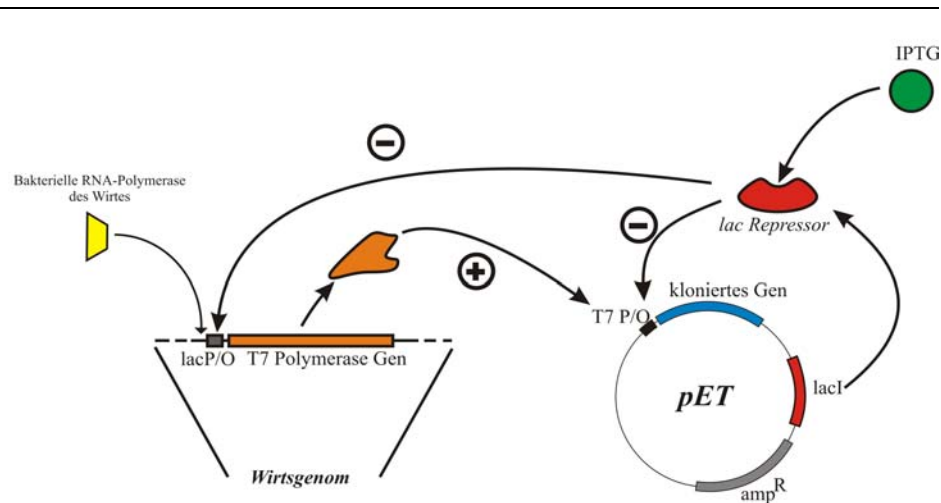


Abbildung 7: Schematische Darstellung des pET-Expressionssystems

3.2.1.1 pET28a(+)

Im Vektor pET28a(+) befindet sich *upstream* von der MCS ein Hexahistidin-tag (His-tag), gefolgt von einer Thrombinschnittstelle. Um diesen His-tag nutzen zu können wurde das jeweilige Gen 5'-seitig über eine *NdeI* Schnittstelle in den entsprechenden Leserahmen kloniert. 3'-seitig wurden zur Klonierung z.B die *HindIII* Schnittstelle verwendet und dabei das interne Stopcodon erhalten, wodurch der *downstream* der MCS liegende His-tag nicht translatiert wurde (Abbildung 8). Das Plasmid beinhaltet als Selektionsmarker das Kanamycinresistenzgen.

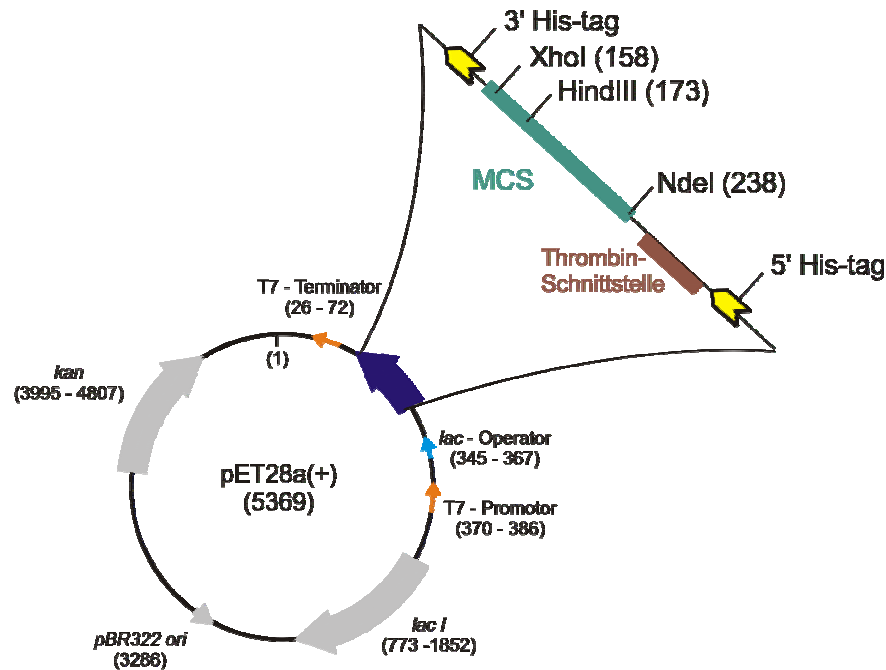


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Vektors pET28a(+).

In der multiplen Klonierungsstelle (MCS) sind nur die Schnittstellen einiger der verwendeten Restriktionsenzyme dargestellt.

3.2.1.2 pET21a(+)

Der Vektor pET21a(+) unterscheidet sich von pET28a(+) lediglich durch das Vorhandensein eines Ampicillinresistenzgens und das Fehlen des *upstream* der MCS gelegenen His-tags. Für die Klonierung von *strpB2a* wurden die Restriktionsendonuclease-Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* verwendet, wobei das natürliche Stopp Codon von *strpB2a* deletiert wurde. Dadurch wurde ein C-terminaler His-tag angehängt.

3.2.2 Oligodesoxyribonukleotide

3.2.2.1 Primer für die Klonierung von *strpA*, *strpB2a* und *strpB2b*

5' <i>strpA</i> <i>NdeI</i>	5'-GGACCATATGGAAATGGGTAAGATGCTTGTAGTCT- ATATGACG-3'
3' <i>strpA</i> <i>BamHI</i>	5'-GAGTTTTTTTAGGATCCTCATTATATTCATCTAA-3'

5' <i>strpB2a_NdeI</i>	5'-GTGCTGCTGATGTACATATGGTAAAAGACGAG-3'
3' <i>strpB2a_EcoRI</i>	5'-TAGACTACAGAATTCTTACCCATTTCCATTCAACC-3'
3' <i>strpB2a_XhoI</i>	5'-CCGCTCGAGCCCATTTCCATT-3'
5' <i>strpB2a_XhoI_mitte</i>	5'-GGTGCCTATTTCTCCAGAATCGAT-3'
3' <i>strpB2a_XhoI_mitte</i>	5'-ATCGATTCTGGAGAAATAGGCACC-3'
5' <i>strpB2b_NdeI</i>	5'-CCGTCGCCATATGGCTATGAGA-3'
3' <i>strpB2b_HindIII</i>	5'-CGGAAGCTTCTACTCCTTAAATAACACTGA-3'

3.2.2.2 Primer für die Klonierung von *tmgapdh*

5' <i>tmgapdh_NdeI</i>	5'-AAGCCTGCATATGAAAATAGG-3'
3' <i>tmgapdh_HindIII</i>	5'-CATCCGAAGCTTAACCGCTGGTGTCTGG-3'

3.2.2.3 Primer für die Klonierung der *sTrpB2a* und *sTrpB2b* Varianten

5' <i>strpB2a_1</i>	5'-ACT GGC AAA TCC TTA GAT TTA TTA AGA AGT-3'
3' <i>strpB2a_1</i>	5'-TAA GGA TTT GCC AGT TGG ATC CCT TGG TGG-3'
5' <i>strpB2a_2</i>	5'-TTG AAG GAA GTT TTA CCC AAG GAG GTA TTA-3'
3' <i>strpB2a_2</i>	5'-TAA TAC CTC CTT GGG TAA AAC TTC CTT CAA-3'
5' <i>strpB2a_3</i>	5'-AGG AGT GGA AAG GTT AGG AGG AAG TAT ATT GCA GTA AGT-3'
3' <i>strpB2a_3</i>	5'-AAC CTT TCC ACT CCT CAG CTC ATC TCC GAT AAA GGG GTA-3'
5'- <i>strpB2a_4</i>	5'-TTG GCC AAA GAC TCC AAT CAT CCA GGA TCA TTA-3'
3' <i>strpB2a_4</i>	5'-GTC TTT GGC CAA TAA TTG CCT ACC GTA TTC AGT-3'
5'- <i>strpB2b_1</i>	5'-GGT GCC TAT TTC TCC AGA ATC GAA CTA TTG AAG GAA-3'
3'- <i>strpB2b_1</i>	5'-TCT GGA GAA ATA GGC ACC TTG GGG ATC TTG TGG CGG-3'
5' <i>strpB2b_2</i>	5'-TTA AGA AGT ATA CTA CCG AGC AAG GTG CTG-3'

3' <i>strp</i> B2b_2	5'-CAG CAC CTT GCT CGG TAG TAT ACT TCT TAA-3'
5' <i>strp</i> B2b_3	5'-AAG AAA GGC AAG CGT TAT ATT GCC TCT GGA-3'
3' <i>strp</i> B2b_3	5'-CTT GCC TTT CTT ATT TCC TAA GAA TGG ATA-3'
5' <i>strp</i> B2b_4	5'-TTA GAG ACA AAC CCA CAG CAT CCT GGA TCT TTA-3'
3' <i>strp</i> B2b_4	5'-GTT TGT CTC TAA TAT CTT TCT ACC GAA TTC TGT-3'

3.2.3 Längenstandards

3.2.3.1 DNA-Längenstandard

Smart Ladder: Eurogentec (Seraing, Belgien)

Die Smart Ladder diente sowohl als Längenstandard zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten, als auch zur Abschätzung von DNA-Mengen im Agarosegel (3.3.2.9).

Tabelle 1: Der Smart Ladder DNA-Standard

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

bp: Basenpaare; *Bei Auftrag von 5 µl Standard

3.2.3.2 Protein –Längenstandard

Low Molecular Weight Marker: Amersham Biosciences (Mannheim)

Der *Low Molecular Weight Marker* diente sowohl als Längenstandard zur Größenbestimmung von Proteinen, als auch zur Abschätzung von Proteinmengen im SDS-Polyacrylamidgel (3.3.4.2)

Tabelle 2: Der Low Molecular Weight Marker

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

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

3.2.4 Enzyme

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase: New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main; www.neb-online.de)

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

Restriktionsendonukleasen: Fermentas GmbH (St. Leon-Rot; www.fermentas.de) oder New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main; www.neb-online.de)

T4 Ligase: Fermentas GmbH (St. Leon-Rot; www.fermentas.de)

Thrombin from bovine plasma: Sigma-Aldrich (Steinheim; www.sigmaaldrich.de)

Taq-Polymerase (Ready-Mix REDTaq PCR Reaction Mix): Sigma-Aldrich (Steinheim; www.sigmaaldrich.de)

3.2.5 Chemikalien

Alle für molekularbiologische Arbeiten benötigten Chemikalien besaßen den größtmöglichen Reinheitsgrad. Wenn nicht anders angegeben wurden die Chemikalien von Becton Dickinson

GmbH (Heidelberg; www.bd.com), Bio-Rad Laboratories (München; www.biorad.com), Biozym Scientific GmbH (Hess; www.biozym.com), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe; www.carl-roth.de), GE Healthcare (Freiburg, www.amershambiosciences.com), Gerbu Biochemicals GmbH (Gaiberg; www.gerbu.de), KMF Laborchemie Handels GmbH (Lohmar; www.kmf-laborchemie.de), Merck KGaA (Darmstadt; www.merck.de), MP Biomedicals (Eschwege; www.mpbio.com), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim; www.roche.de), Serva (Heidelberg, www.serva.de) oder Sigma Aldrich (Steinheim; www.sigmaaldrich.de) bezogen.

Anti_tmTrpB1 und anti_tmTrpB2 Antikörper aus Kaninchen: Biogenes (Berlin, www.biogenes.de)

1-Indol(3yl)glycerinphosphat (IGP): freundliche Gabe von Prof. K. Kirschner, Biozentrum der Universität Basel.

3.2.6 Kits

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

NucleoBond AX DNA-Extraction Kit: Macherey Nagel (Düren, www.macherey-nagel.com)

NucleoSpin Extract II: Macherey Nagel (Düren, www.macherey-nagel.com)

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

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

3.2.7 Geräte und Materialien

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

Äkta basic 10 better: GE-Healthcare (Freiburg, www.amershambiosciences.com)

Mit folgenden Säulen:

Affinitätssäule POROS MC/20: Applied Biosystems (Foster City, CA, USA, www.appliedbiosystems.com)

Affinitätssäule HisTrap: GE Healthcare (Freiburg, www.amershambiosciences.com)

Anionenaustauscher MonoQ: GE Healthcare (Freiburg, www.amershambiosciences.com)

- Gelfiltrationssäule S200:** GE Healthcare (Freiburg, www.amershambiosciences.com)
- Blot-Kammer:** Hoefer SemiPhor semi-dry transfer unit (Modell TE70; Hoefer Pharmacia Biotech Inc.)
- Brutschrank:** Heraeus B6060, Kendro (Osterode; www.kendro.com)
- Dampfsterilisator:** Varioklav Dampfsterilisator Typ 500, H&P Labortechnik (Oberschleißheim; www.hp-lab.de)
- Dialyseschläuche:** Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe; www.carl-roth.de) oder Spectrum Laboratories Inc. (Gardena, CA, USA; www.spectrumlabs.com)
- Elektrophorese:** Hoefer Mighty Small II und Multi Gel Caster Gelgießstand, Amersham Biosciences (Mannheim; www.amershambiosciences.com)
- Filtrationsanlage:** Filtereinheit Millex FG13, Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage, Millipore (Schwalbach, www.millipore.com)
- Fluoreszenzspektrophotometer:** Fluoreszenz-Spektrometer Cary Eclipse, Varian Inc. (Palo Alto, CA, USA)
- Geldokumentation:** Imager Gel Doc 1000 mit Gel Doc 1000 White Light Source und Single Wavelength Mini-Transilluminator, BioRAD (München, www.biorad.com)
- Heizblock:** Thermoblock V2.0, O. Waase (Göttingen)
- Konzentratoren:** Amicon 30 und Amicon 10 Ultra Centrifugal Filter Devices, Millipore (Schwalbach, www.millipore.de)
- Kunststoffküvetten:** ½ Mikroküvette, Ratiolab (Dreieich-Buchsschlag, www.ratiolab.com)
- Magnetrührer:** Ika RCT basic
- Magnetrührer (beheizbar):** Ika RCT basic, Ika Labortechnik (Staufen; www.ika.de)
- Membranfilter:** ME24, 0,2 µm Porengröße, Ø 47 mm, Schleicher & Schuell (Dassel, www.schleicher-schuell.de)
- NAP-Säulen:** NAP-5, 10 und 25, Amersham Biosciences (Mannheim, www.amershambiosciences.com)
- pH-Messgerät:** pH-Meter, InolabWTW (Weilheim, www.inolab.wtw.de)
- Pipetten:** Pipetman P20, P200, P1000, Gilson (Den Haag, NL, www.gilson.com) und Research 0,5 – 10 µl, Eppendorf (Hamburg, www.eppendorf.com)
- Power-Supply:** EPS 301, Amersham Biosciences (Mannheim; www.amershambiosciences.com)
- Quartzküvetten:** 10 mm Schichtdicke, Hellma (Mülheim, www.hellma-worldwide.de) oder Starna (Pfungstadt, www.starna.de)

Rollschüttler: RM5 Assistent 348, Karl Hecht GmbH & Co. KG (Sondheim, www.hecht-assistent.de)

Schüttelinkubatoren: Innova 4000, 4400, 4430 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co. Inc. (Nürtingen, www.nbsc.com)

Spritzenfilter: 0,22 µm Porengröße, Fisherbrand (Schwerte; www.fisher.at)

Schütteltisch: Rocking Platform, Biometra (Göttingen, www.biometra.de)

Ultraschallgerät: Branson Sonifier D-250, bzw. W-250 D mit ½“ Resonator und 1/8“ Mikrospitze, Heinemann (Schwäbisch Gmünd, <http://home.t-online.de/home/HEINEMANNUltraschalltechnik/kontakt.htm>)

Vakuumpumpe: ME 2C, Vacuubrand (Wertheim, www.vacuubrand.de)

Vortexer: Reax Top, Heidolph Instruments GmbH (Kelheim, www.heidolph.neptun.diewerber.de)

Waagen: Scaltec SBA 52-Laborwaage und SBA 33-Feinwaage, Denver Instrument (Göttingen, www.denverinstrument.de)

Wasserbad: Wasserbad 1012, GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, www.gfl.de)

Zentrifugen: Centrifuge 5810 R, Eppendorf (Hamburg, www.eppendorf.com) und Heraeus Biofuge *pico*, bzw. *fresco*, Schütt Labortechnik (Göttingen, www.schuett-labortechnik.de), sowie Sorvall RC-5C mit den Rotortypen SS34 und GSA, Sorvall (Langenselbold, www.sorvall.com)

3.2.8 Nährmedien

LB (Luria-Bertani-Medium (Sambrook *et al.* 1989))

1 % (w/v) Trypton

1% (w/v) NaCl

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

SOB

2 % (w/v) Trypton

0,05 % NaCl

0,5 % Hefeextrakt

Nach dem Autoklavieren wurden 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂ und 2,5 mM KCl hinzugefügt.

Agarplatten

Dem Medium wurde 1,5 % Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurden Antibiotika in 1:1000 Verdünnung in das handwarme Medium gegeben.

3.2.9 Lösungen und Puffer

Die Fertigung von Lösungen und Puffern, die nicht von Firmen bezogen wurden, ist im Folgenden beschrieben. Soweit nicht anders vermerkt, wurden wässrige Lösungen hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert. Es wurde MILLIPORE-Wasser oder bidestilliertes Wasser verwendet.

1 % Agarose

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

Ampicillin-Stammlösung

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

Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Stammlösung

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

Blockpuffer

PBST plus 5 % Magermilchpulver

Chloramphenicol-Stammlösung

100 mg/ml Chloramphenicol in 96 % (v/v) Ethanol gelöst und bei 4 °C gelagert

Coomassie-Färbelösung

50 % (v/v) Ethanol (96 %ig); 10 % (v/v) Essigsäure (100 %ig); 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliantblau G250 in Wasser gelöst und durch einen Papierfilter filtriert.

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid

IPTG-Stammlösung

1 M IPTG in Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert

Kaliumphosphat-Puffer (KP)

1 M K_2HPO_4 und 1 M KH_2PO_4 in Wasser gelöst und durch Mischen auf den gewünschten pH-Wert gebracht

Kanamycin-Stammlösung

75 mg/ml Kanamycin-Sulfat in Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert

PBS

10 mM KP pH 7,5, 140 mM NaCl

PBST

PBS plus 0,1 % Tween

SDS-PAGE-Laufpuffer (1x)

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

SDS-Page-Probenpuffer (2x)

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

SDS-PAGE-Sammelgelpuffer

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

SDS-PAGE-Trenngelpuffer

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

Sucrose-Farbmarker

60 % (w/v) Saccharose; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau ; 0,05 % (w/v) Xylencyanol FF in 0,5x TBE Puffer

TBE-Puffer (5x)

90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA

TFB I Lösung

100 mM KCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM KOAc; 10 mM CaCl₂; 15 % (v/v) Glyzerin; pH 5,8 – 6,2 mit Essigsäure eingestellt

TFB II Lösung

10 mM Tris/HCl; 10 mM KCl; 75 mM CaCl₂; 15 % (v/v) Glyzerin ; pH 7,0 mit Kaliumhydroxid eingestellt

Thrombin-Lagerungspuffer

50 mM NaCitrat; 200 mM NaCl, 0,1 % (v/v) PEG-8000; 50 % (v/v) Glyzerin; pH 6,5

Thrombin-Reaktionspuffer (10x)

200 mM Tris/HCl; 1,5 M NaCl, 25 mM CaCl₂; pH 8,4

Transferpuffer

20 mM Tris, 200 mM Glycin, 20 % Methanol

3.2.10 Software

Chromas: Version 1.45, McCarthy 1996-1998 (www.technelysium.com.au)

Corel Draw: Version 9.0, Corel Corporation (www.corel.de)

COSY: Version 5.5 public version (Eberhard 1990)

GCG Package: Version 10, Accelrys (www.accelrys.com)

Office 2000: Word, Excel, Power Point, Microsoft (www.microsoft.de)

Sigma Plot: Version 5.0, Systat Software Inc. (www.sigmaplot.com)

Swiss PDB Viewer: Version 3.70b (<http://au.expasy.org/spdbv/>)

TCoffee Web Server (http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi)

WinGene Version 231 (<http://www.ipw.agrl.ethz.ch/~lhennig/wingene.html>)

WinPep Version 301 (<http://www.ipw.agrl.ethz.ch/~lhennig/winpep.html>)

3.3 Methoden

3.3.1 Mikrobiologische Methoden

3.3.1.1 Abtötung von Mikroorganismen

Zur Sterilisation von Lösungen und Medien und zur Abtötung von *E. coli* Kulturen wurde für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Ebenso wurden zu sterilisierende Glas- und Metallwaren behandelt, die vor Gebrauch im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet wurden.

3.3.1.2 Sterilfiltration von Lösungen

Lösungen, die nicht durch Autoklavieren sterilisiert werden konnten, wurden durch einen Minisart NML Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert, wodurch die Mikroorganismen aus der Lösung entfernt wurden. Lösungen für den Gebrauch an chromatographischen Anlagen wurden zusätzlich entgast.

3.3.1.3 Anzucht und Lagerung von *E. coli* Stämmen

E. coli Stämme wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C angezogen. Bei plasmidtragenden Stämmen wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Anzucht erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in LB-Medium. Kulturvolumina bis zu 5 ml wurden in einem 15 ml Kulturröhrchen geschüttelt, für Volumina bis zu 50 ml wurden 100 ml Erlenmeyerkolben verwendet. Die Röhrchen und Kolben wurden bei 250 Upm geschüttelt. Bei einem Volumen von 1000 ml wurden 3000 ml Erlenmeyerkolben mit oder ohne Schikane verwendet und bei 115 Upm geschüttelt.

3.3.1.4 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (Inoue *et al.* 1990)

Zur Präparation von chemisch kompetenten Zellen wurden 500 ml SOB-Medium in einem 1 L Erlenmeyerkolben mit Zellen des entsprechenden Stammes angeimpft und bei 37 °C und 250 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,7 angezogen. Die Kultur wurde für 15 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 4000 Upm, 10 Minuten, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 50 ml eiskalter TFB-I Lösung aufgenommen und anschließend erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml eiskalter TFB-II Lösung aufgenommen, Aliquots von 100 µl in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA oder 7 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 45 Sekunden einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, für fünf Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend nach Zugabe von 900 µl LB-Medium für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in einer passenden Verdünnung auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.1.5 Präparation elektrisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Präparation von elektrisch kompetenten Zellen wurden 500 ml LB-Medium in einem 1 L Erlenmeyerkolben mit Zellen des entsprechenden Stammes angeimpft und bei 37 °C und 250 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,7 angezogen. Die Kultur wurde für 15 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 4000 Upm, 10 Minuten, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 500 ml eiskaltem, sterilen Wasser aufgenommen und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 250 ml eiskaltem, sterilen Wasser resuspendiert, zentrifugiert und abschließend in 10 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Aliquots von 100 µl wurden in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und bei -80 °C gelagert.

3.3.1.6 Vorbereitung von DNA für die Elektroporation

Bei einer Elektroporation ist es unerlässlich, die zur Transformation eingesetzte DNA-Lösung zu entionisieren, um einen Kurzschluss zu vermeiden. Ligationsansätze wurden deshalb vor der Transformation auf Nitrozellulosefiltern für 1 – 2 Stunden gegen 10 % (v/v) Glycerin dialysiert.

3.3.1.7 Elektroporation (Dower *et al.* 1988)

Für die Transformation wurden 100 µl elektrokompetenter Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm) überführt und mit 100 ng Plasmid-DNA oder 7 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Nach dem elektrischen Puls (2500 V, 25 µF, 200 Ω) im Elektroporator wurden die Zellen sofort mit 900 µl LB-Medium versetzt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einer passenden Verdünnung auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.2 Molekularbiologische Arbeiten

3.3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen

Die Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen erfolgte mit dem Nucleobond AX DNA-Extraktionskit (Machery-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers. Es wurde die AX-100 Säule verwendet. Die von der Säule eluierte DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und zentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico* oder Eppendorf Centrifuge 5415 R, 13000 Upm, 1 Stunde, 4 °C). Das Pellet wurde anschließend mit 100 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 50 µl Wasser aufgenommen.

3.3.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in einer wässrigen Lösung lässt sich aus der Absorption bei 260 nm (A_{260}) nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmen. Gemessen wurde gegen Wasser in einer Quartzküvette (Schichtdicke 1 cm). Eine A_{260} von 1 entspricht in etwa einer Konzentration von 50 μg doppelsträngiger DNA pro ml Lösung.

Entsprechend berechnet sich die DNA-Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz wie folgt:

$$c_{dsDNA} (\mu\text{g} / \text{ml}) = A_{260} \cdot 50 \cdot f$$

c: Konzentration

f: Verdünnungsfaktor

A_{260} : Absorption bei 260 nm

Formel 1: Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen

In der Regel wurde eine 100fache Verdünnung der DNA-Lösung hergestellt. Für die Messung wurde ein Spektrum von 240 bis 320 nm mit dem Cary Bio 100 Spektralphotometer (Varian) aufgenommen. Das Verhältnis von A_{260}/A_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Lösung und ist bei proteinfreien Proben größer als 1,8.

Eine grobe Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel durch Vergleich der Bandenintensität mit den Banden der Smart Ladder (Eurogentec).

3.3.2.3 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen von Genen erfolgte durch das Service Labor des Zentrums für Molekulare Medizin Köln, bzw. die Firmen Genterprise (Mainz, www.genterprise.de) und Geneart (Regensburg, www.geneart.com). Es wurde das Kettenabbruch-Verfahren von Sanger (Sanger *et al.* 1977) verwendet, wobei verschiedene fluoreszenzmarkierte 2',3'-Dideoxynukleotide zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden in der *Thermal Cycle Sequencing* Reaktion (Sears *et al.* 1992, Slatko 1994) eingesetzt werden. Dadurch entstehen 3'-terminal fluoreszenzmarkierten Einzelstrang-Abbruchfragmente, die

gelektrophoretisch aufgetrennt werden. Als Matrize wurden 600 – 1000 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die Primermenge betrug 10 pmol. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem GCG Wisconsin Package oder dem Programm WinGene.

3.3.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (Mullis & Faloona 1987, Saiki et al. 1988). Sie ermöglicht die selektive Vervielfachung des DNA-Templates auch aus einem komplexen DNA-Gemisch heraus. Die Reaktion basiert auf der Anlagerung (*Annealing*) und Verlängerung (*Extension*) zweier Oligonukleotid-Primer, die auf gegenüberliegenden Strängen in entgegengesetzter Richtung die Zielregion einer doppelsträngigen DNA flankieren. Die Reaktion besteht aus aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen, die jeweils durch drei Phasen unterschiedlicher Temperatur charakterisiert sind. In der ersten Phase, der Denaturierungsphase, wird die Doppelstrang-DNA durch Erhitzen aufgeschmolzen und somit in Einzelstrang-DNA überführt. Durch das anschließende Absenken der Temperatur in der *Annealing*-Phase kommt es zur Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die komplementären Zielregionen der einzelsträngigen Matrizen-DNA. In der Extensions-Phase werden bei höherer Temperatur die Primer durch eine thermostabile Polymerase komplementär zur Matrize verlängert. In den aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen kommt es zu einer exponentiellen Akkumulation der durch die beiden Primer flankierten DNA-Sequenz.

Die PCR-Bedingungen wurden je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz und dem G/C-Gehalt der jeweiligen spezifischen Primer festgelegt. Die Reaktionen wurden in 50 µl Gesamtvolumen durchgeführt und enthielten folgende Komponenten: 100 ng Matrizen DNA, 100 pmol eines jeden Primers und Ready RED*Taq* PCR Reaction Mix mit MgCl₂ (Sigma-Adrich) nach Herstellerangaben. Für die Gewährleistung einer Proof-reading Aktivität wurden 1 µl Pwo-Polymerase hinzugefügt. Für die Klonierung der *strpB2a* und *strpB2b* Mutanten wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase nach Herstellerangaben eingesetzt.

Nach einer anfänglichen Denaturierung für 3 Minuten bei 95 °C wurde der eigentliche Reaktionszyklus gestartet. Die Denaturierung erfolgte in der Regel für 45 s bei 95 °C, das Primer-Annealing für 45 s bei der für das jeweilige Primerpaar charakteristischen Temperatur (siehe unten) und die Extension für 1 min/kb bei 72 °C. Dieser Zyklus wurde 30-mal

durchlaufen und nach einer abschließenden Extension für 10 Minuten bei 72 °C wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt.

Die Schmelztemperatur T_M eines Primers wurde nach einer empirischen Formel, die sowohl den relativen molaren G/C-Gehalt (% GC) als auch die Länge der Oligonukleotide (n) berücksichtigt, berechnet:

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

Formel 2: Berechnung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids

T_M lag i.d.R. zwischen 50 und 65 °C.

Aus den Schmelztemperaturen der beiden Primer (T_{M1} und T_{M2}) wurde die Annealing-Temperatur T_A wie folgt ermittelt:

$$T_A = \left[\frac{T_{M1} + T_{M2}}{2} \right] - 3^\circ C$$

Formel 3: Bestimmung der Annealing-Temperatur in einer PCR-Reaktion

3.3.2.5 Insert-screening

Zur schnellen Überprüfung des Erfolges einer Klonierung wurden die nach einer Transformation erhaltenen Klone wie folgt behandelt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde der Kolonie etwas Zellmaterial entnommen und in einem vorbereiteten PCR-Ansatz suspendiert. Mit dem Rest der haftenden Zellen wurden 5 ml LB-Medium inokuliert, um gegebenenfalls Plasmid isolieren zu können. Der PCR-Ansatz enthielt i.d.R. Primer, die *upstream* und *downstream* der MCS des Plasmids lagen. Während der PCR-Reaktion werden die Zellen lysiert und geben die Plasmide frei. Nach erfolgter PCR wurde die Größe der gewonnenen PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese (3.3.2.9) abgeschätzt.

3.3.2.6 Overlap Extension-PCR (SOE-PCR)

Die Overlap Extension PCR ist eine *in vitro* Mutagenesetechnik, die in zwei Schritten zu einem gezielten Austausch eines oder mehrerer Nukleotide führt (Ho *et al.* 1989). Es wurden zwei zueinander komplementäre Mutationsprimer von etwa 20 bp Länge definiert, die im zentralen Bereich den gewünschten Nukleotidaustausch trugen. Im ersten Schritt wurden in zwei getrennten PCR-Ansätzen (3.3.2.4) zwei Fragmente mit Hilfe des klonierten, wildtypischen Gens als Matrize, sowie je eines Mutationsprimers und des entsprechenden *upstream* bzw. *downstream* flankierenden Primers amplifiziert. Die beiden Fragmente teilten eine kurze überlappende Region, die den eingeführten Austausch enthält.

Diese Fragmente dienten im zweiten Schritt als Matrize, um mit Hilfe des *upstream* und des *downstream* Primers das komplette Gen zu amplifizieren. Die PCR-Produkte des ersten Schrittes wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert (3.3.2.10). Je 4 µl dienten im zweiten Schritt als Matrize, in welchem die *Annealing*-Temperatur grundsätzlich 40 °C betrug.

3.3.2.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen gespalten. Für analytische Zwecke wurden i.d.R. 200 ng DNA mit etwa 2 U Enzym gespalten, in präparativen Ansätzen 1 bis 10 µg DNA durch mindestens 20 U Enzym. Dabei wurde Sorge getragen, dass das Enzymvolumen maximal 10% des Gesamtvolumens betrug. Sollten DNA-Fragmente mit zwei Enzymen gespalten werden, wurde ein nach Herstellerangaben geeigneter Puffer gewählt. War dies nicht möglich, wurde nacheinander verdaut, wobei nach der ersten Spaltung eine Reinigung durch Gelextraktion (3.3.2.10) erfolgte. Der Erfolg einer Spaltung wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (3.3.2.9).

3.3.2.8 Ligation von DNA-Enden

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Produkt wurde das Insertfragment in einem 5-8fachen molaren Überschuss zum Vektorfragment zugesetzt. Beide

Fragmente wurden zuvor zur Reinigung auf ein Agarosegel aufgetragen und extrahiert (3.3.2.10). Die Ligation erfolgte in T4-Ligase-Puffer mit 2 U T4-Ligase für 16 Stunden bei 16 °C in einem Gesamtvolumen von 20 µl.

3.3.2.9 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung doppelsträngiger DNA erfolgte in Gelen von 1% (w/v) Agarose in 0,5 x TBE-Puffer. Die Agarose wurde in einem handelsüblichen Mikrowellengerät gekocht und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Proben wurden mit mindestens 1/5 Volumen Sucrose-Farbmarker versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Als Längenstandard diente die Smart Ladder (Eurogentec). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 190 V durchgeführt, die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm sichtbar gemacht und ggf. extrahiert (3.3.2.9).

3.3.2.10 Extraktion von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen

Für eine Aufreinigung wurden die DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und entweder mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen) oder dem Nucleo Spin Extract Kit (Nucleobond) nach Herstellerangaben gereinigt.

3.3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.3.1 Expression von Genen und Anreicherung von Proteinen in analytischen Mengen

Alle zu exprimierenden Gene lagen in Vektoren der pET-Serie (Novagen) vor und standen somit unter Kontrolle des T7 Promotor- und *lac* Operator- Systems (3.2.1).

Um zu untersuchen, ob sich die klonierten Gene überexprimieren lassen, wurden Expressionen im analytischen Maßstab (Probeexpressionen) durchgeführt. Dazu wurden mit einer frisch transformierten *E. coli* Kolonie 5 ml LB Medium mit entsprechenden Antibiotika inokuliert und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Mit dieser Kultur wurden weitere 50 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer

Zelldichte von $OD_{600} = 0,6$ inokuliert. Daraufhin wurde der Ansatz auf zwei Kolben aufgeteilt. In einem Kolben wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert, im anderen kein IPTG zugegeben. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810R, 4000 Upm, 10 min, 4 °C) pelletiert, in 1 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und mit einem Ultraschall Desintegrator (Branson Digital Sonifier, Model 250 D, bzw. W-250 D; Amplitude 25 %, 50 Sekunden) aufgeschlossen.

Die Proben wurden in der Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge *pico*, bzw. Eppendorf 5415 D, 13000 Upm, 5 min, RT) zentrifugiert und der Überstand vollständig in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das erhaltene Pellet mit den unlöslichen Zellbestandteilen (P) wurde in 1 ml Aufschlusspuffer resuspendiert, 100 µl davon in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit gleichem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt. Zur Untersuchung des löslichen Zellextrakts (*crude extract* oder Rohextrakt, C) wurden 100 µl des Überstands in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit gleichem Volumen 2 x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt.

Da mit thermostabilen Proteinen gearbeitet wurde, konnte der Rest des löslichen Zellextrakts einem Hitzeschritt unterzogen werden. Hierzu wurde die Probe für 20 min in einem Heizblock auf 65 - 75 °C erhitzt und anschließend für 10 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert (Heraeus Bifuge *pico* oder Eppendorf 5415 D, 13000 Upm, 10 min, RT). 100 µl des Überstands (Hitzeschritt, H) wurden abgenommen und mit einem Volumen 2 x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt.

Die drei mit SDS-Probenpuffer versetzten Aliquots (P, C, H) wurden per SDS-PAGE (3.3.4.2) analysiert.

3.3.3.2 Expression von Genen und Anreicherung von Proteinen in präparativem Maßstab

Um Proteinmengen im Milligramm-Maßstab zu reinigen, wurden Großexpressionen im präparativen Maßstab durchgeführt. Dazu wurden mit einer frisch transformierten *E. coli* Kolonie 50 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum inokuliert und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Mit dieser Kultur wurden 1000 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,6$ inokuliert. In Einzelfällen wurde die Expressionstemperatur herabgesetzt, insbesondere dann, wenn die Probeexpression gezeigt hatte, dass sich der Großteil des überexprimierten Proteins

in der Pelletfraktion befand (sTrpB2a). Bei der Expression von *strpA* wurde dem Medium 20 mM Kaliumphosphat Puffer (KP) zugesetzt, um durch die Bindung der Phosphationen an das aktive Zentrum die Stabilität und Löslichkeit des erzeugten Proteins zu erhöhen. Zeigte die Probeexpression an, dass eine Induktion mit IPTG notwendig war, wurde beim Erreichen einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,6$ 1 mM IPTG zugegeben. Nach Wachstum über Nacht wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (Sorvall RC-5B, GS3 Rotor, 4000 Upm, 15 min, 4 °C) und in 25 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Für sTrpB2a und sTrpB2b wurde 10 mM KP pH 7,5, 40 µM PLP verwendet, für sTrpA und für tmGAPDH 10 mM KP pH 7,5. Der Zellaufschluss erfolgte durch Sonifizieren mit dem Branson Digital Sonifier (Model 250 D oder W-250 D; Amplitude 50 %, 2 x 2 min mit jeweils 1 min Pause). Die Probe wurde während der gesamten Prozedur auf Eis gehalten, um eine übermäßige Erwärmung der Lösung zu vermeiden. Anschließend wurde ein Aliquot von 100 µl (P/C) entnommen. Die restliche Probe wurde scharf zentrifugiert (Sorvall RC-5C oder RC-2B, Rotor HFA 22500, 13000 Upm, 15 min) und der Überstand in 50 ml Falcons überführt. Eine erste Aufreinigung erfolgte mittels Hitzeschritt. Dazu wurden die Falcons für 20 Minuten in ein auf 65 °C (sTrpB2a) oder 75 °C (sTrpA, sTrpB2a, tmGAPDH) geheiztes Wasserbad gestellt und gelegentlich geschwenkt. Anschließend wurde wieder scharf zentrifugiert (Sorvall RC-5C oder RC-2B, Rotor HFA 22500, 13000 Upm, 30 min), der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und ein 100 µl Aliquot abgenommen (H). Die Probe P/C wurde zentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, bzw. Eppendorf 5415 D, 13000 Upm, 10 min, RT), der Überstand in ein neues Eppendorfgesäß überführt (C) und das resultierende Pellet in 100 µl Wasser aufgenommen (P). Alle Proben (P,C,H) wurden mit 2 x SDS Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE (3.3.4.2) analysiert.

3.3.3.3 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie basiert auf der spezifischen, reversiblen Wechselwirkung eines Proteins mit einem an der Säulenmatrix gebundenen Liganden, wodurch seine Anreicherung aus einem Proteingemisch erreicht wird. Die Elution erfolgt durch die kompetitive Verdrängung des Proteins vom immobilisierten Liganden.

Die Chromatographie erfolgte an einer Biocad Sprint Perfusions-Chromatographie-Anlage (Perkin Elmer) oder einem Äkta Basic 10 better System (GE Healthcare). Bei der verwendeten Poros MC/20 Säule (Applied Biosystems, SV 7,9 ml) stellen an die

Säulenmatrix gebundene Nickel-Ionen Koordinationsstellen für einen N- oder C-terminal angefügten His-tags eines Proteins zur Verfügung. Als zweiter Reinigungsschritt wurde eine HisTrap Säule (GE Healthcare, SV 1ml) verwendet.

Vor jeder Reinigung wurden die Säulen nach Herstellerangaben mit Nickel-Ionen beladen. Als Laufpuffer diente in jedem Fall 10 mM KP pH 7,5, 300 mM KCl. Die Elution erfolgt durch einen linearen Imidazolgradienten, wobei das Imidazol um die vom His-tag des Proteins besetzten Ni²⁺-Koordinationsstellen konkurriert. Die Elution wurde über die Absorptionmessung bei 260 nm und 280 nm verfolgt und die Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Die Reinigung erfolgte nach den Protokollen in Tabelle 3.

Tabelle 3: Protokoll für die Reinigung mittels Affinitätschromatographie

	Poros MC/20 (SV: 7.9 ml)	HisTrap (SV: 1 ml)
Flussrate	10 ml/min	1 ml/min
Äquilibrieren	2 SV Laufpuffer	2 SV Laufpuffer
Beladen	Variables Probenvolumen	Variables Probenvolumen
Waschen	15 SV Laufpuffer	10 SV Laufpuffer
Eluieren	15 - 20 SV Gradient von 0 – 60 mM Imidazol in Laufpuffer	15 - 20 SV Gradient von 0 – 60 mM Imidazol in Laufpuffer
Hochsalz	5 SV 1 Imidazol in Laufpuffer	5 SV 1 Imidazol in Laufpuffer
Regenerieren	3 SV Laufpuffer	3 SV Laufpuffer

SV: Säulenvolumen

3.3.3.4 Hydroxyapatit-Chromatographie

Die Hydroxyapatit-Chromatographie wurde eingesetzt, um den durch proteolytischen Verdau (3.3.3.6) abgespaltenen His-tag und das für den Verdau eingesetzte Thrombin zu entfernen.

Hydroxyapatit ist eine kristalline Form von Calciumphosphat, an dessen Oberfläche Proteine über ihre Amino- und Carboxygruppen binden. Die positiv geladenen Aminogruppen treten in eine unspezifische elektrostatische Wechselwirkung mit den überwiegend negativ geladenen Phosphatgruppen, während die negativ geladenen Carboxygruppen einerseits elektrostatisch abgestoßen werden, andererseits von den Calciumatomen komplexiert werden (Lottspeich & Zorbas 1998).

Die Chromatographie erfolgte an einer Biocad Sprint Perfusions-Chromatographie-Anlage (Perkin Elmer) oder einem Äkta Basic 10 better System (GE Healthcare). Es wurde eine mit Hydroxyapatit gepackte XK-26 Säule (GE Healthcare, SV 32,7 ml) verwendet. Als

Laufpuffer diente 10 mM KP pH 7,5 und die Elution erfolgte durch einen linearen KP Gradienten. Tabelle 4 gibt das Reinigungsprotokoll wieder.

Tabelle 4: Protokoll für die Reinigung mittels Hydroxyapatit-Chromatographie (SV: 32,7 ml)

Flussrate	3,5 ml/min
Äquilibrieren	1 SV Laufpuffer
Beladen	Variables Probenvolumen bei 0,5 ml/min
Waschen	5 SV Laufpuffer
Elution	0 – 300 mM KP
Hochsalz	1 SV 500 mM KP
Regeneration	1 SV Laufpuffer

3.3.3.5 Anionenaustauscher-Chromatographie

Die Ionenaustauscher-Chromatographie beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung von Proteinen mit einer geladenen Säulenmatrix. Die Matrix eines Kationenaustauschers trägt negativ geladene Seitenketten und eignet sich deshalb für die Reinigung positiv geladener Proteine, während ein Anionenaustauscher aufgrund seiner positiv geladenen Matrix für die Reinigung negativ geladener Proteine gewählt wird. Die Stärke der Bindung hängt dabei von der Stärke der Ladung des Proteins ab. Diese wiederum basiert auf dem spezifischen pI-Wert, welcher den pH-Wert wiedergibt, bei dem ein Protein ungeladen ist. Deshalb müssen die Pufferbedingungen für die Chromatographie so gewählt werden, dass das gewünschte Protein möglichst stark geladen ist. Die Elution erfolgt durch Verdrängung der gebundenen Proteine durch eine steigende Konzentration an im Laufpuffer gelösten Salzionen.

Die Chromatographie erfolgte an einer Biocad Sprint Perfusions-Chromatographie-Anlage (Perkin Elmer) oder einem Äkta Basic 10 better System (GE Healthcare) unter Verwendung einer MonoQ Säule (GE Healthcare, SV 1ml). Als Laufpuffer wurde 10 mM KP pH 7,5 verwendet, die Elution erfolgte durch einen linearen NaCl Gradienten. Die Reinigung erfolgte nach dem Protokoll in Tabelle 5.

Tabelle 5: Protokoll für die Reinigung mittels Anionenaustauscher-Chromatographie (SV: 1 ml)

Flussrate	2 ml/min
Äquilibrieren	5 SV Laufpuffer
Beladen	Variables Probenvolumen
Waschen	10 SV Laufpuffer
Elution	0 – 500 mM NaCl in Laufpuffer
Hochsalz	5 SV 1 M NaCl in Laufpuffer
Regeneration	5 SV Laufpuffer

3.3.3.6 Enzymatische Abspaltung des Hexahistidin-Tags

Wurde dem Protein durch Genexpression im pET28a(+) Vektor (3.2.1.1) ein N-terminaler His-tag angehängt, so wurde dieser nach erfolgter Reinigung mittels Affinitätschromatographie (3.3.3.3) entfernt. Dazu wurde die Proteinlösung mit 1/10 Volumen 10fach Thrombin-Reaktionspuffer und 20 U Thrombin pro mg Protein versetzt. Das lyophilisierte Thrombin (Sigma-Aldrich) wurde zuvor mit einer Konzentration von 1 U/ μ l in Thrombin-Lagerungspuffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Der Ansatz wurde über Nacht bei 20 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE wurde die Vollständigkeit der Spaltung überprüft. Um den abgespaltenen His-Tag und das Thrombin zu entfernen, schloss sich ein weiterer Reinigungsschritt mittels Hydroxyapatitchromatographie (3.3.3.4) oder Anionenaustauscher-Chromatographie (3.3.3.5) an.

3.3.3.7 Dialyse von Proteinlösungen

Um einen Pufferwechsel zwischen zwei Reinigungsschritten zu vollziehen, wurden die Proteinlösungen gegen ein mindestens 100 faches Volumen an gewünschtem Puffer für 4 – 6 Stunden bei 4 °C dialysiert. Dialyseschläuche (Spektrapor 2, Ausschlussgrösse 14000) wurden zuvor in Wasser eingeweicht.

3.3.4 Analytische Methoden

3.3.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.3.4.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)

Der Bradford-Test dient der quantitativen Bestimmung des Proteingehalts von wässrigen Lösungen. Der in der Färbelösung enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 bindet an Proteine, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt (Bradford 1976). Die Bindung erfolgt vorwiegend an kationische, nichtpolare und hydrophobe Reste. In einem Bereich von 0,2 - 1,4 mg Protein pro ml Lösung ist die Absorption bei 595 nm annähernd linear. Für den Test wurden 800 µl verdünnte Proteinelösung mit 200 µl Biorad-Reagenz versetzt. Nach 5 min Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm gemessen, wobei als Referenz die gleiche Menge Reagenz mit Puffer diente.

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

$$c = \frac{(A_{595} - b)}{m}$$

c : Proteinkonzentration [mg/ml];

A_{595} : Absorption bei 595 nm

b : y-Achsenabschnitt der Kalibrierungsgeraden

m : Steigung der Kalibrierungsgeraden

3.3.4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Absorptions-spektroskopie

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie Cystine (Disulfid-brücken) absorbieren UV-Licht im Bereich von 250 – 300 nm. Nach Pace *et al.* (1995) kann aus der Aminosäuresequenz der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ϵ_{280}) und daraus, bei bekanntem Molekulargewicht, der spezifische Extinktionskoeffizient ($^{0,1\%}A_{280}$) berechnet werden:

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

$${}_{0,1\%}A_{280} = \frac{\epsilon_{280}}{M_r}$$

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

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

$$c = \frac{A_{280}}{{}_{0,1\%}A_{280} \times d}$$

c : Konzentration [mg/ml]
 A_{280} : Absorption bei 280 nm
 d : Schichtdicke der Küvette [cm]
 ${}_{0,1\%}A_{280}$: spezifischer Extinktionskoeffizient [cm^2mg^{-1}]

Es wurden Spektren von 230 – 350 nm aufgenommen, wobei sich das Absorptionsmaximum des Proteins bei 278 nm befinden sollte. Der Quotient A_{280} / A_{250} sollte mindestens 1,8 betragen und es sollte keine Absorption oberhalb von 300 nm auftreten, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch auf Aggregatbildung zurückgehende Lichtstreuung ausschließen zu können. Bei deutlicher Absorption oberhalb von 300 nm wurde als erste Näherung eine lineare Zunahme der Lichtstreuung mit abnehmender Wellenlänge angenommen und die ermittelte Proteinkonzentration entsprechend korrigiert.

3.3.4.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinproben wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese herangezogen (Laemmli 1970). In Anwesenheit des Detergens Natriumdodecylsulfat werden Proteine durch den Siebeffekt des Gels entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, welches durch Vergleich mit einem Proteinlängenstandard abgeschätzt werden kann.

Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 45 mA in 0,075 cm dicken Gelen durchgeführt. Die verwendete Polyacrylamidkonzentration betrug 12,5 %. Bei der Herstellung der Gele wurde eine Gießapparatur (Multi-Gel-Caster) verwendet, mit der 13 Gele gleichzeitig gegossen werden können. Für die Fertigung wurde nach dem Rezept in Tabelle 6 vorgegangen. Zur Lagerung wurden die fertigen Gele in feuchte Papiertücher gewickelt bei und 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 6: Zusammensetzung eines SDS - Polyacrylamidgels

	Sammelgel (6%)	Trenngel (12,5%)
H ₂ O	1,2 ml	2,4 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	0,45 ml	2,0 ml
Sammelgel/Trenngelpuffer	0,6 ml	1,56 ml
10 % (w/v) APS	0,007 ml	0,015 ml
TEMED	0,002 ml	0,007 ml

Die fertigen Gele wurden in eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresekammer (Hoefler) gesetzt und mit den zu untersuchenden Proben (bis zu 20 µl pro Tasche) beladen. Die Proben wurden zuvor mit 2 x SDS-Probenpuffer vermischt, 5 – 10 Minuten bei 97 °C erhitzt und anschließend zentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico* oder Eppendorf Centrifuge 5415 D, 13000 Upm, 1 Minute). Als Längenstandard diente der Low Molecular Weight Marker (3.2.3.2). Nach der Elektrophorese erfolgte die Färbung durch 10 minütiges Schwenken in einer Coomassiefärbelösung. Durch zweimaliges Aufkochen in Wasser in der Mikrowelle wurden die Gele entfärbt und die Proteine sichtbar gemacht.

3.3.4.3 Western-Blot

Der Western-Blot dient der spezifischen Identifikation und Quantifizierung von Proteinen in komplexen Proteingemischen. Dabei können einzelne Proteine aus Gesamt-Zell-Protein oder Gewebe-Lysaten nachgewiesen werden. Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE (3.3.4.2) werden sie auf eine Membran transferiert, dadurch immobilisiert und mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Der gebundene erste Antikörper und damit das gebundene Protein wird durch einen zweiten Antikörper, der entweder radioaktiv markiert oder an ein Enzym (Peroxidase, Phosphatase etc.) gekoppelt ist, detektiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine tmTrpB1 und tmTrpB2 mittels Western-Blot in *Thermotoga maritima* Zelllysat nachgewiesen. Als jeweils erster Antikörper wurden

spezifische Peptidantikörper verwendet. Die Herstellung erfolgte von der Firma Biogenes (Berlin, www.biogenes.de), wobei die Peptide GEEDTIRQKPNVERMK aus tmTrpB1 und LDPPLDPETKQPISPEK aus tmTrpB2 zur Immunisierung von Kaninchen verwendet wurden. Als zweiter Antikörper diente Anti-Kaninchen IgG gekoppelt an Merrettichperoxidase (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, Illinois, USA, www.piercenet.com).

Nach Auftrennung des Proteingemisches mittels SDS-PAGE (3.3.4.2) erfolgte der Blot auf eine PVDF Membran bei 2,5 mA/cm² für 60 Minuten in Transfer-Puffer im semi-dry Verfahren. Die Membran wurde zuvor für wenige Sekunden in 100 % Methanol aktiviert, das SDS-Gel nach erfolgter Elektrophorese ca. 15 min in PBS geschwenkt. Folgender Aufbau wurde für einen Blot verwendet: Anode, 3 Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes und in PBS getränktes Whatman-Papier, PVDF Membran, SDS-Gel, 3 Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes und in PBS getränktes Whatman-Papier, Kathode.

Nach Beendigung des Blots wurde die Membran reversibel mit Ponceau S Lösung angefärbt, um den Transfer der Proteine zu überprüfen und die Banden des Proteinstandards markieren zu können. Nach Entfärbung durch mehrmaliges Schwenken in Wasser, erfolgte das Blockieren freier Bindestellen auf der Membran durch Inkubation in 20 ml Blockpuffer für 1 Stunde. Nach anschließender Inkubation in 20 ml Blockpuffer mit dem ersten Antikörper in einer 1:7000 Verdünnung wurde die Membran 3 mal für 10 min in je 20 ml PBST gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte in 20 ml PBST in einer 1:4000 Verdünnung für 1 Stunde. Abschließend wurde die Membran erneut 3 mal für 10 min in je 20 ml PBST gewaschen. Die Anfärbung erfolgte durch kurzes Schwenken in ca. 5 ml TMB Membrane Peroxidase Substrat (KPL Inc., Gaithersburg, Maryland, USA, www.kpl.com). Durch Schwenken in ca. 1 L Wasser wurde die Reaktion gestoppt, sobald Banden sichtbar wurden. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

3.3.4.4 Fluoreszenzspektroskopie

Absorbiert ein Molekül Licht bestimmter Wellenlänge, so wird es von einem energetischen Grundzustand in einen angeregten Zustand transferiert. Die Rückkehr in den Grundzustand kann u.a. durch die Emission eines Photons geschehen. Dieser Vorgang ist als Fluoreszenz messbar. Die Energie eines emittierten Photons ist geringer als die eines absorbierten, was zu einer Verschiebung zu größerer Wellenlänge, also einer Rotverschiebung entspricht.

Die Fluoreszenz von Proteinen beruht im Wesentlichen auf der aromatischen Aminosäure Tryptophan. Eine geringe Rolle spielt das Tyrosin. Aromatische Seitenketten absorbieren bei einer Wellenlänge von etwa 280nm maximal. Nach Anregung bei 295 nm ist die Fluoreszenz ausschließlich auf Tryptophane zurückzuführen.

Die Fluoreszenz von Tryptophan zeigt eine Abhängigkeit von der Polarität der Umgebung. Eine stark polare Umgebung bewirkt eine Rotverschiebung zu einem Maximum bei ca. 350 nm gegenüber einem Maximum bei 320 – 330 nm in unpolarer Umgebung. Über die Messung von Fluoreszenzspektren kann also eine Aussage über die Lage eines Tryptophans in einem Protein gemacht und daraus wiederum auf seinen Faltungszustand geschlossen werden. Die Messungen wurden am Fluoreszenz Spektrophotometer Cary Eclipse (Varian) durchgeführt. In einer Quartzküvette wurde die Proteinlösung auf eine Konzentration von 5 μ M in 10 mM KP pH 7,5 verdünnt. Nach Anregung bei 280 nm bzw. 295 nm wurde ein Emissionsspektrum von 300 nm bis 450 nm aufgenommen. Dabei wurden je zehn Messungen aufgenommen und der Mittelwert gebildet. Als Nullwert diente jeweils ein Pufferspektrum.

3.3.4.5 Analytische Gelfiltration

Mit Hilfe der analytischen Gelfiltration kann das apparente Molekulargewicht von Proteinen und damit, bei bekanntem Molekulargewicht des Monomers, der Oligomerisierungszustand bestimmt werden. Bei globulären Proteinen besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und dem Elutionsvolumen. Das apparente Molekulargewicht eines Proteins kann daher durch Vergleich des Elutionsvolumens mit den Elutionsvolumina von Standard-Proteinen bestimmt werden. Weicht die Gestalt des Proteins von der globulären Form ab, so können sich jedoch erhebliche Differenzen zum tatsächlichen Molekulargewicht ergeben.

Zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden wurde eine analytische Superdex 200 HR 10/30 Säule (GE Healthcare, SV 24 ml) mit 1 SV Gelfiltrationspuffer (50 mM KP, 300 mM KCl pH 7,5) äquilibriert. Anschließend wurden die Proteine des LMW-Gelfiltrationskalibrierungskits (3.2.6) nacheinander nach Anweisung des Herstellers auf die Säule gegeben. Die Kalibrierungsgerade wurde durch Auftragen des Logarithmus des theoretischen Molekulargewichts gegen die Elutionszeit erstellt (Anhang 8.2). Nach der Kalibrierung wurde die Proteinprobe über den Probenloop mit einem Volumen von nicht mehr als 200 μ l auf die Säule aufgebracht und bei gleicher Flussrate wie die Standardproteine (0,5 ml/min, max.

Rückdruck 1,7 MPa) eluiert. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Das apparente Molekulargewicht wurde durch Vergleich mit der Kalibrierungsgeraden ermittelt.

3.3.4.6 Analytische Ultrazentrifugation

3.3.4.6.1 Sedimentationsläufe

Mittels analytischer Ultrazentrifugation kann der Sedimentationskoeffizient bestimmt werden, welcher für jedes Protein, abhängig von seinem Molekulargewicht und seiner Form, charakteristisch ist. Dazu wird die Ultrazentrifuge mit verhältnismäßig hohen Umdrehungszahlen betrieben, wodurch Proteine in den radial ausgerichteten Sektorzellen vom Rotormittelpunkt bis zum Zellenboden wandern. Im Verlauf der Zentrifugation kommt es zur Ausbildung einer Trennlinie zwischen reinem Lösungsmittel ohne Makromoleküle und demjenigen Lösungsmittelanteil, in dem noch sedimentierende Proteine enthalten sind. Diese Grenzlinie wandert mit der Zeit, wobei ihre Wanderungsgeschwindigkeit die Sedimentationsgeschwindigkeit der Makromoleküle widerspiegelt. Die Sedimentation wird in regelmäßigen Zeitabständen über die Messung des Absorptionsverlaufes in der Sektorzelle verfolgt.

Der Sedimentationskoeffizient s entspricht dem Quotienten aus der Sedimentationsgeschwindigkeit und der Zentrifugalbeschleunigung:

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

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

r = Abstand des Meßpunktes zum Rotationszentrum [cm]

t = Zeit [s]

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

Formel 4: Berechnung des Sedimentationskoeffizienten s

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

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

Formel 5: Berechnung des apparenten Sedimentationskoeffizienten s_{app}

Der Wert für den Quotienten $2,303/\omega^2$ lässt sich für die jeweilige Drehzahl aus Tabellen entnehmen, z.B. (Chervenka 1973).

Die Umrechnung von s_{app} auf Standardbedingungen ($T = 293,15$ K, Lösungsmittel = Wasser) erfolgt nach Formel 6:

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

T = Temperatur [K]

η = relative Viskosität

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

ρ = Dichte des Lösungsmittels [g/cm^3]

Formel 6: Berechnung von $s_{20,w}$

Die Werte für die Temperaturabhängigkeiten der Viskosität lassen sich aus Tabellen entnehmen, z.B. (Chervenka 1973). $\frac{\eta_{T,LM}}{\eta_{T,w}}$ wurde als 1,015 und $\frac{1 - \bar{v}_{20,w} \cdot \rho_{20,w}}{1 - \bar{v}_{T,LM} \cdot \rho_{T,LM}}$ als 1

angenommen, ausgehend von den Werten, die für die Läufe mit den *T.maritima* Proteinen (Ariel Lustig, Biozentrum der Universität Basel, (Hettwer & Sterner 2002)).

Die Durchführung erfolgte an einer Beckman Spinco Model E in einem An-G Rotor unter Verwendung von 12 mm Doppelsektorzellen mit Saphir-Fenster. Die Zentrifugation erfolgte bei Raumtemperatur. Für die Bestimmung von T wurde die Temperatur im Gerät vor und nach dem Lauf bestimmt und gemittelt. Für Läufe mit TrpA-Proteinen wurde eine Umdrehungsgeschwindigkeit von 60000 Upm gewählt, alle anderen Läufe wurden bei 52000 Upm durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 278 nm. Alle Proben wurden zuvor in den gleichen Puffer (10 mM KP pH 7,5) gebracht, der auch als Referenz diente und zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico oder Eppendorf 5415 D, 13000 Upm, 20 Minuten, 4 °C). Die Proteinkonzentration lag zwischen 0,2 und 0,4 mg/ml.

3.3.4.6.2 Gleichgewichtsläufe

Die Zentrifugation bei niedrigen Umdrehungszahlen eröffnet die Möglichkeit, über das Sedimentationsgleichgewicht das Molekulargewicht zu bestimmen. In diesem Fall wurde die Methode des „*High-Speed Sedimentation Equilibrium (HSSE)*“ verwendet. Dabei kommt es nach genügend langer Laufzeit zu einem Gleichgewicht zwischen zwei entgegengesetzten Prozessen, der Sedimentation im Zentrifugalfeld und der Rückdiffusion der Teilchen. Analog zum Sedimentationslauf (3.3.4.6.1) wird der Absorptionsverlauf in der Sektorzelle in regelmäßigen Zeitabständen verfolgt. Abbildung 8 zeigt schematisch die Einstellung des Gleichgewichts.

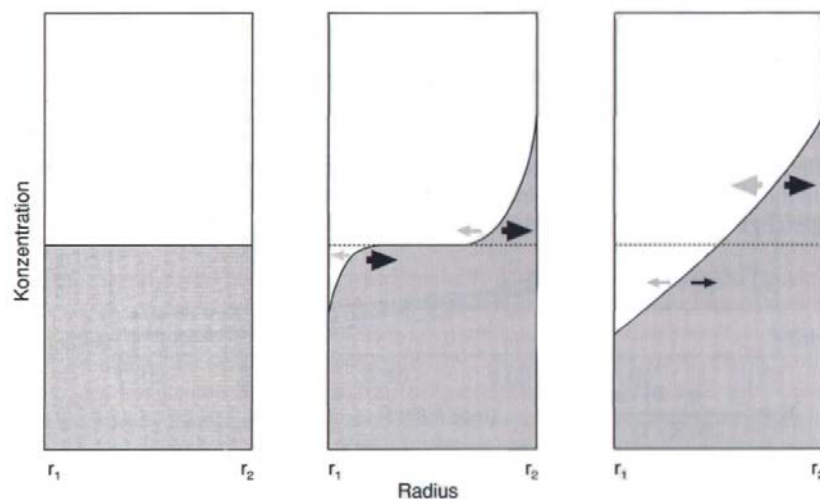


Abbildung 9: Zeitabhängige Änderung des Konzentrationsgradienten im Sedimentationsgleichgewichtsexperiment.

Links: Beginn des Experiments; Mitte: In der ersten Phase sedimentiert gelöstes Material verstärkt zu Boden. Die Sedimentation überwiegt gegenüber der Diffusion (ungleich große Pfeile); Rechts: Das Sedimentationsgleichgewicht ist (annähernd) erreicht (gleich große Pfeile). Abbildung aus (Holtzhauer 1996)

Im Gleichgewichtszustand gilt:

$$M = \frac{2 \cdot RT}{(1 - \bar{v}_2 \rho_1) \cdot \omega^2} \cdot \frac{d \ln c_2}{dr^2}$$

Formel 7: Berechnung von M aus Sedimentationsgleichgewichtsläufen

M = molare Masse [g/mol]
 R = allgemeine Gaskonstante = $8,31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
 T = absolute Temperatur [K]
 c_2 = Konzentration des gelösten Proteins [mg/ml]
 ρ_1 = Massendichte des Lösungsmittels [g/ml]
 \bar{V}_2 = partielles spezifisches Volumen des Proteins [ml/g]
 r = Abstand des Meßpunktes zum Rotationszentrum [cm]
 ω = Winkelgeschwindigkeit ($2 \cdot \pi \cdot \text{rpm}/60$) [s^{-1}]

Die Durchführung erfolgte an einer Beckman Spinco Model E in einem An-G Rotor unter Verwendung von 12 mm Doppelsektorzellen mit Saphir-Fenster. Die Zentrifugation erfolgte bei Raumtemperatur. Für die Bestimmung von T im Gerät wurde die Temperatur vor und nach dem Lauf bestimmt und gemittelt. Die Läufe wurden bei 12000 Upm durchgeführt, die Detektion erfolgte bei 278 nm. Alle Proben wurden zuvor in den gleichen Puffer (10 mM KP pH 7,5) gebracht, der auch als Referenz diente, und zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico oder Eppendorf 5415 D, 13000 Upm, 20 Minuten, 4 °C). Die Proteinkonzentration lag bei 0,4 mg/ml.

Die Auswertung erfolgte nach der Meniscus-Depletion-Sedimentation-Equilibrium-Methode (Wales et al. 1951, Yphantis 1964) mit Hilfe eines selbstgeschriebenen Makros für das Programm Sigma-Plot (freundliche Gabe von Klaus-Jürgen Tiefenbach, (Tiefenbach 1997)). Damit wird die Basislinie in einem begrenzten Bereich um den Nullpunkt so lange variiert, bis die Punkte der logarithmischen Auftragung gegen r^2 aus den Messpunkten weitgehend auf einer idealen Linie liegen. Das partielle spezifische Volumen wurde nach Cohn und Edsall aus der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins berechnet (Cohn & Edsall 1943, Durchschlag 1986).

3.3.4.7 Limitierte Proteolyse mit Trypsin

Trypsin ist eine Serinprotease, die Peptidbindungen nach den Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet. Die Geschwindigkeit des Abbaus lässt Rückschlüsse über die Stabilität des Proteins und die Zugänglichkeit der Spaltstellen zu. Somit können Veränderungen dieser Zugänglichkeit, verursacht z.B. durch Bindung von Liganden oder anderen Proteinen mittels limitierter Proteolyse nachgewiesen werden.

Der Proteinprobe wurde eine 1/100 oder 1/20 molare Menge an Trypsin zugesetzt und der Ansatz bei Raumtemperatur in 100 mM Tris/HCl pH 7,8 (für TrpA Proteine) und in 10 mM

KP pH 7,5 (für TrpB Proteine) inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und der Abbau durch Zugabe von 2 x SDS Probenpuffer und Aufkochen gestoppt. Alle Proben wurden abschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

3.3.4.8 Steady state Enzymkinetik

3.3.4.8.1 Messung der TrpA Aktivität

Die durch die α -Untereinheit der Tryptophansynthase katalysierte A-Reaktion ist die reversible aldolytische Spaltung von Indol-3-glycerinphosphat (IGP) zu Indol und Glycerinaldehyd 3-phosphat (GA3-P). Da sich hierbei keine Absorptionsänderung ergibt und somit eine photometrische Messung des Umsatzes nicht möglich ist, wird GA3-P durch die Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) weiter zu 1-Arseno 3-phosphoglycerat umgesetzt, wobei NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ reduziert wird (Creighton 1970). In Anwesenheit von Arsenat ist die Reaktion vollständig irreversibel, da das entstehende 1-Arseno 3-phosphoglycerat in wässrigem Milieu sofort zu 3-Phosphoglycerat und Arsenat hydrolysiert und somit der Reaktion entzogen wird. Durch diese gekoppelte Hilfsreaktion wird nicht nur ein detektierbares Signal, nämlich die Änderung der Absorption bei 340 nm erzeugt ($\Delta\epsilon(\text{NADH}-\text{NAD}^+) = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, (Horecker & Kornberg 1948)), sondern auch das auf der Seite der Ausgangsprodukte liegende Gleichgewicht der Reaktion (Weischet & Kirschner 1976) auf die rechte Seite verlagert.

Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

100 mM EPPS/KOH, pH 7,5 bei 60°C

180 mM KCl

40 μM Pyridoxal 5' phosphat

6 mM NAD^+

20 mM Arsenat

5,5 μM tmGAPDH

10 μM – 10 mM IGP

Variable Konzentrationen an sTrpA oder tmTrpA (über NAP Säule in 100 mM EPPS/KOH pH 7,5)

Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 500 μl durchgeführt und durch Zugabe von IGP gestartet. Zuvor wurde der vorbereitete Reaktionsansatz für etwa 5 Minuten bei 60°C im beheizten Probenschlitten des Spektrophotometers (Cary 100 Bio, Varian) inkubiert. Es wurden Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der IGP-Konzentration gemessen. Aus den resultierenden Sättigungskurven wurden K_M^{IGP} und V_{max} ermittelt, und daraus wiederum die Wechselzahl $k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} [E_0]$ (Konzentration an aktiven Zentren) bestimmt.

3.3.4.8.2 Messung der TrpB Aktivität

Die durch die β -Untereinheit der Tryptophan Synthase katalysierte B-Reaktion ist die unter Wasserabspaltung erfolgende Kondensation von L-Serin und Indol zu L-Tryptophan. Diese Reaktion ist irreversibel und kann photometrisch über die Zunahme der Absorption bei 290 direkt verfolgt werden ($\Delta\varepsilon(\text{Trp-Indol}) = 1.89 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

100 mM Kaliumphosphat Puffer, pH 7,5 bei 60°C, bzw. 80 °C

180 mM KCl

40 μM Pyridoxal 5' phosphat

200 μM Indol

10 – 1500 mM Serin

0,75 μM sTrpB2a bzw. 4 μM sTrpB2b (aktive Zentren).

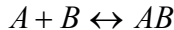
Die Reaktion wurde in 500 μl Volumen durchgeführt und durch Zugabe von Indol gestartet. Zuvor wurde der vorbereitete Reaktionsansatz für etwa 5 Minuten bei 60°C im beheizten Probenschlitten des Spektrophotometers (Cary 100 Bio, Varian) inkubiert. Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante für L-Serin wurde Indol in sättigender Konzentration (200 μM) vorgelegt und Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Konzentration an L-Serin gemessen. Aus den resultierenden Sättigungskurven wurden K_M^{Serin} und V_{max} ermittelt, und daraus wiederum die Wechselzahl $k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} [E_0]$ (Konzentration an aktiven Zentren von sTrpB2a bzw. sTrpB2b) bestimmt. Der K_M^{Indol} wurde durch die Analyse von vollständigen Sättigungskurven mit der integrierten Form der Michaelis-Menten Gleichung mit dem

Programm COSY (Eberhard, 1990) bestimmt. Die Kurven wurden in Anwesenheit von 200 μM Indol und 1000 mM Serin bis zum vollständigen Verbrauch des Indol aufgenommen. Die B-Reaktion wurde sowohl mit isoliertem sTrpB2a bzw. sTrpBb gemessen, als auch in Anwesenheit eines etwa 2-fachen molaren Überschusses an sTrpA.

3.3.4.9 Bestimmung der Bindung von tmTrpB1 an tmTrpA

Die Bildung der Komplexe aus sTrpA und sTrpB2a bzw. tmTrpA und tmTrpB1 wurde über Titrationsstudien quantifiziert. Dazu wurde jeweils eine konstante Konzentration an TrpB Protein (0,5 μM (aktive Zentren) sTrpB2a bzw. 0,05 μM (aktive Zentren) tmTrpB1) vorgelegt und mit zunehmenden Konzentrationen an TrpA Protein (0 - 20 μM sTrpA bzw. 0 - 0,2 μM tmTrpA) versetzt. Die Bindung wurde über die Messung der A-Reaktion verfolgt, wobei um die (sehr niedrige) Aktivität von freiem TrpA Protein korrigiert wurde.

Für die Bindung der beiden Untereinheiten wurde folgendes Modell angenommen:



wobei A und B die freien Untereinheiten darstellen und AB den Komplex.

Die thermodynamische Dissoziationskonstante K_d für die Komplexbildung ergibt sich zu:

$$K_d = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]},$$

wobei [A], [B] und [AB] die Konzentration an freiem TrpA, TrpB und TrpA-TrpB Komplex repräsentieren.

Im Falle von sTrpB2a mit sTrpA konnte die Titrationskurve mit einer einfachen hyperbolischen Funktion gefittet (Programm Sigma Plot) und so der K_d -Wert ermittelt werden.

Im Falle von tmTrpB1 und tmTrpA war dies nicht möglich, da die Titrationskurve über einen weiten Bereich linear verlief und somit die freie Konzentration an sTrpA deutlich unterhalb der zugegebenen Gesamtkonzentration lag.

Deshalb wurde diese Titrationskurve mittels einer nicht-linearen Methode der kleinsten Quadrate (Eberhard 1990) nach folgender Formel analysiert:

$$\frac{[AB]_{eq}}{[A]_0} = \frac{1}{2} \left(d - \sqrt{d^2 - 4c} \right)$$

$$d = \frac{1 + ([A]_0 + K_d)}{[B]_0}$$

$$c = \frac{[A]_0}{[B]_0}$$

$[AB]_{eq}$ stellt dabei die Gleichgewichtskonzentration von AB dar, $[A]_0$ ist die Gesamtkonzentration an tmTrpA und $[B]_0$ die Gesamtkonzentration von tmTrpB1. Der Fit erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Programms Sigma Plot.

4 Ergebnisse

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Gene *strpA*, *strpB2a* und *strpB2b* in Vektoren kloniert und heterolog in *E. coli* exprimiert. Anschließend wurden die rekombinanten Proteine aus dem löslichen Teil des Zellextraktes gereinigt und charakterisiert.

4.1 Proteinproduktion

4.1.1 Klonierung von *strpA*, *strpB2a* und *strpB2b*

Die Klonierung der Gene *strpA*, *strpB2a* und *strpB2b* erfolgte mittels PCR, ausgehend von genomischer *S. solfataricus* DNA. Für *strpA* wurden die Oligonukleotide 5′*strpA_NdeI* und 3′*strpA_BamHI* verwendet, für *strpB2a* 5′*strpB2a_NdeI* und 3′*strpB2a_EcoRI*, und für *strpB2b* 5′*strpB2b_NdeI* und 3′*strpB2b_HindIII*. Das Gen für *strpA* wurde anschließend über die eingeführten Restriktionsschnittstellen in den Vektor pET21a(+) kloniert, die Gene für *strpB2a* und *strpB2b* jeweils in den pET21a(+) und pET24a(+) Vektor (Stefan Hettwer, unpublizierte Arbeiten). Um an die rekombinanten Proteine einen N-terminalen Hexahistidin-Tag anzufügen und damit ihre Reinigung über Metallchelate-Affinitätschromatographie zu ermöglichen, wurden die Gene im Rahmen dieser Arbeit in den pET28a(+) Vektor (3.2.1.1) umkloniert. Dazu wurde 5′-seitig jeweils die Schnittstelle für *NdeI* genutzt und 3′-seitig die Schnittstellen für *BamHI* (*strpA*), *EcoRI* (*strpB2a*) und *HindIII* (*strpB2b*). Das Gen *strpB2a* wurde, ausgehend von pET28a(+), zusätzlich in den pET21a(+) Vektor (3.2.1.2) umkloniert, um bei der Expression einen His-tag unmittelbar an den C-Terminus des Proteins anzuhängen. Mittels SOE-PCR (3.3.2.6) wurde dafür eine interne *XhoI* Schnittstelle entfernt, sowie eine C-terminale *XhoI* Schnittstelle angefügt und das Stop-Codon deletiert. Zur Amplifikation der überlappenden Fragmente im ersten Schritt wurden die Oligonukleotide 5′*strpB2a_NdeI* und 3′*strpB2a_XhoI_mitte* bzw. 5′*strpB2a_XhoI_mitte* und 3′*strpB2a_XhoI* verwendet. Die erzeugten Fragmente dienten im zweiten Schritt als Matrize zur Erzeugung des gesamten Gens, das dann in der abschließenden PCR durch den Einsatz von 5′*strpB2a_NdeI* und 3′*strpB2a_XhoI* amplifiziert und unter Verwendung der entsprechenden Schnittstellen

kloniert wurde. Alle Gene wurden zur Kontrolle der Nukleotidabfolge komplett sequenziert (3.3.2.3).

4.1.2 Heterologe Expression von *strpA* und Reinigung von sTrpA

Zur Herstellung von sTrpA wurden *E. coli* BL21(DE3) Codon plus Zellen mit dem Konstrukt pET28a_*strpA* transformiert, in LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol bei 37°C angezogen und die Genexpression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Abbildung 10 gibt einen Überblick über die verschiedenen Schritte der Aufreinigung, die mittels SDS-Page dokumentiert wurden.

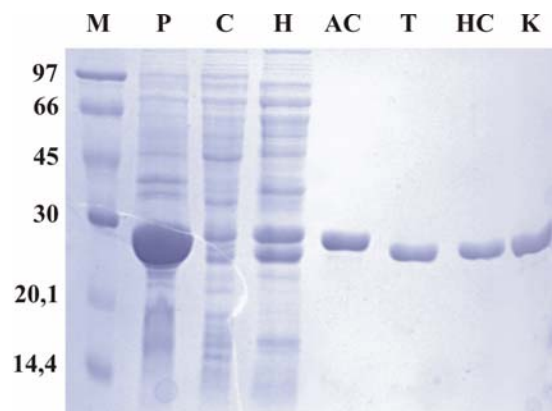


Abbildung 10: Analyse der Reinigung von rekombinantem sTrpA (N-terminaler His-Tag) mittels SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid)

M: Low Molecular Weight Marker; P: unlösliche Fraktion des Zellextraktes (10 µl); C: lösliche Fraktion des Zellextraktes Rohextrakt (10 µl); H: Überstand des Hitzeschrittes (20 µl); AC: vereinigte Fraktionen nach Affinitätschromatographie (20 µl); T: Protein nach enzymatischer Abspaltung des Hexahistidin-Tags (20 µl); HC: vereinigte Fraktionen nach Hydroxyapatit-Chromatographie (20 µl); K: konzentriertes Protein (5 µl).

Über 90 % des rekombinanten Proteins fanden sich in der unlöslichen Fraktion des Zellextraktes (P). Um ein eventuell mühsame Rückfaltung nach Auflösung der *inclusion bodies* in Guanidiniumchlorid zu vermeiden, wurde *strpA* jedoch aus dem löslichen Teil des Zellextraktes (C) gewonnen. Eine erste Anreicherung erfolgte durch einen Hitzeschritt von 20 Minuten bei 75 °C, wodurch ein erheblicher Teil der Wirtsproteine entfernt werden konnte (H). Anschließend wurde eine Metallchelate-Affinitätschromatographie (3.3.3.3) durchgeführt (AC) und der Hexahistidin-Tag durch Thrombin abgespalten (T) (3.3.3.6). Nach einer weiteren Aufreinigung mittels Hydroxyapatit-Chromatographie (HC) (3.3.3.4) wurde das nun

zu mehr als 95 % saubere Protein mittels Dialyse (3.3.3.7) in 10 mM KP pH 7,5 umgepuffert, auf 1,2 mg/ml einkonzentriert (K), in flüssigen Stickstoff eingetropfert und bei -80 °C gelagert. Die Ausbeute betrug 25 mg sTrpA aus 5 l Bakterienkultur.

4.1.3 Heterologe Expression von *strpB2a* und Reinigung von sTrpB2a

Zur Herstellung von sTrpB2a wurden *E. coli* BL21(DE3) Codon plus Zellen mit den Konstrukten pET28a_*strpB2a* bzw. pET21a_*strpB2a* transformiert, in LB-Medium mit Kanamycin, bzw. Ampicillin und Chloramphenicol angezogen und die Genexpression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Da insgesamt nur sehr wenig sTrpB2a produziert wurde und sich bei 37 °C nahezu das gesamte rekombinante Protein in der unlöslichen Fraktion fand, wurde die Inkubationstemperatur der Zellen auf 25°C abgesenkt (Kopetzki *et al.* 1989). Dadurch gelang es, einen kleinen Anteil (weniger als 5 %) von sTrpB2a in die lösliche Fraktion zu überführen und daraus zu reinigen. Abbildung 11 gibt einen Überblick über die Reinigungsschritte nach Expression von pET21a_*strpB2a* aus, die mittels SDS-PAGE dokumentiert wurden.

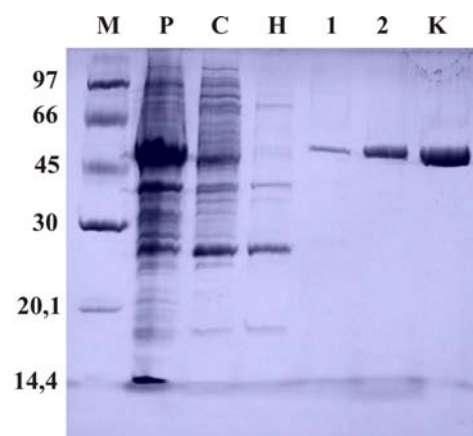


Abbildung 11: Analyse der Reinigung von rekombinantem sTrpB2a (C-terminaler His-Tag) mittels SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid)

M: Low Molecular Weight Marker; P: unlösliche Fraktion des Zellextraktes (10 µl); C: lösliche Fraktion des Zellextraktes (10 µl) H: Überstand des Hitzeschrittes (10 µl); 1: vereinigte Fraktionen nach der ersten Affinitätschromatographie (20 µl); 2: vereinigte Fraktionen nach der zweiten Affinitätschromatographie (20 µl); K: konzentriertes Protein (20 µl).

Eine erste Anreicherung erfolgte auch hier durch einen Hitzeschritt von 20 Minuten bei 75 °C (H), gefolgt von einer Metallchelate-Affinitätschromatographie (3.3.3.3). Dabei wurde der lösliche Überstand des Hitzeschrittes zunächst auf eine POROS MC/20 Säule aufgetragen, wodurch jedoch nicht alle Fremdproteine von sTrpB2a abgetrennt werden konnten. Das Protein wurde deshalb anschliessend über eine His-trap Säule weiter angereichert, wodurch eine Reinheit von etwa 95 % erzielt werden konnte. Bei späteren Reinigungen wurde der Schritt mit der His-Trap Säule durch eine Anionenaustauscher-Chromatographie (3.3.3.5) ersetzt, wodurch ein mindestens gleich guter Reinigungserfolg erreicht wurde (siehe Reinigung der sTrpB2a Varianten, 4.6).

Erfolgte die Expression von pET28a_ *strpB2a* aus, dann wurde der dabei angehängte N-terminale Hexahistidin-Tag nach der Affinitätschromatographie über die POROS MC/20 Säule durch Thrombin entfernt (3.3.3.6). Daran schloss sich ein weiterer Reinigungsschritt mittels Hydroxyapatit-Chromatographie (3.3.3.4) oder Anionenaustauscher-Chromatographie (3.3.3.5) an.

Das saubere sTrpB2a Protein wurde in einer Konzentration zwischen 0,15 bis 0,5 mg/ml in 10 mM KP pH 7,5 in flüssigen Stickstoff eingetropt und bei -80 °C gelagert. Die Ausbeuten bei den verschiedenen Reinigungen lagen zwischen 0,3 und 1,6 mg sTrpB2a aus 10 L Bakterienkultur und damit um zwei Größenordnungen unterhalb der erzielten Ausbeuten an sTrpA (4.1.2) und sTrpB2b (4.1.4).

4.1.4 Heterologe Expression von *strpB2b* und Reinigung von sTrpB2b

Zur Herstellung von sTrpB2b wurden *E. coli* BL21(DE3) Codon plus Zellen mit dem Konstrukt pET28a_ *strpB2b* transformiert, in LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol bei 37°C angezogen und die Genexpression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Abbildung 12 gibt einen Überblick über die Reinigung, die mittels SDS-PAGE verfolgt wurde.

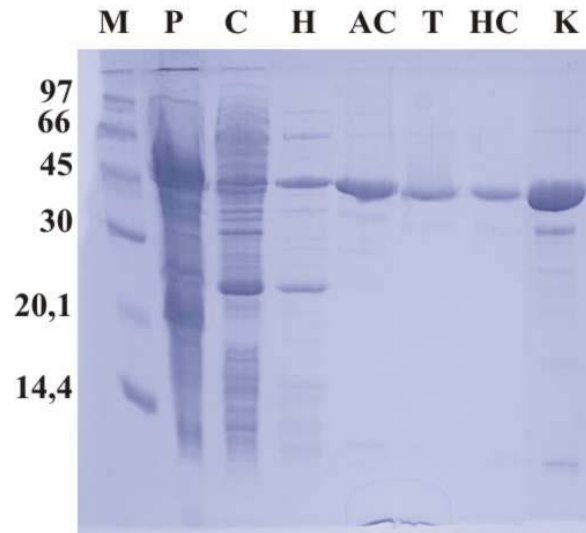


Abbildung 12: Analyse der Reinigung von sTrpB2b (N-terminaler His-Tag) mittels SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid)

M: Low Molecular Weight Marker; P: unlösliche Fraktion des Zellextraktes (10 μ l); C: lösliche Fraktion des Zellextraktes (10 μ l); H: Überstand des Hitzeschrittes (10 μ l); AC: vereinigte Fraktionen nach Affinitätschromatographie (10 μ l); T: Protein nach enzymatischer Abspaltung des Hexahistidin-Tags (10 μ l); HA: vereinigte Fraktionen nach Hydroxyapatit-Chromatographie (10 μ l); K: konzentriertes Protein (5 μ l).

Etwa 30 % des Proteins befanden sich in der löslichen Fraktion und wurden über einen Hitzeschritt bei 75 °C für 20 Minuten, Metallchelate-Affinitätschromatographie (3.3.3.3), enzymatische Abspaltung und Entfernung des Hexahistidin-Tags (3.3.3.6) und Hydroxyapatit-Chromatographie (3.3.3.4) zu einer Reinheit von 95 % gebracht. sTrpB2b wurde in 10 mM KP pH 7,5 umgepuffert, auf 3-4 mg/ml einkonzentriert, in flüssigen Stickstoff eingetropfelt und bei – 80 °C gelagert. Die Ausbeute betrug zwischen 20 und 30 mg sTrpB2b aus 3 L Bakterienkultur.

4.1.5 Herstellung und Reinigung der GAPDH aus *T. maritima*

Die GAPDH aus *T. maritima* (tmGAPDH) wurde als Hilfsenzym für die TrpA-Reaktion benötigt (3.3.4.8.1). Das Gen lag in dem Vektor pKM1 (Hettwer & Sterner 2002, Pappenberger et al. 1997) kloniert vor und wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels PCR mit den Oligonukleotiden 5'tmgapdh_NdeI und 3'tmgapdh_HindIII daraus amplifiziert und anschließend über die entsprechenden Schnittstellen in den pET28a(+) Vektor kloniert. Zur Herstellung von tmGAPDH wurden *E. coli* BL21(DE3) Codon plus Zellen mit dem Konstrukt

pET28a_tmGAPDH transformiert, in LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol bei 37°C angezogen und die Genexpression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Das Protein befand sich vollständig in der löslichen Fraktion des Zellextraktes und wurde nach einem Hitzeschritt von 20 Minuten bei 75 °C und anschließender Metallchelate-Affinitätschromatographie (3.3.3.3) zu einer Reinheit von > 95 % gebracht. Die GAPDH wurde ohne vorherige Abspaltung des N-terminalen His-tags in 10 mM KP pH 7,5 umgepuffert, auf 3,6 mg/ml einkonzentriert, in flüssigen Stickstoff eingetropfelt und bei – 80 °C gelagert. Die Ausbeute betrug zwischen 43 und 106 mg tmGAPDH aus 3 L Bakterienkultur.

4.2 Proteinchemische Charakterisierung von *sTrpA*, *sTrpB2a* und *sTrpB2b*

4.2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Zur Überprüfung der Tertiärstruktur der gereinigten Proteine wurden Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen. Es wurde jeweils bei 280 nm und 295 nm angeregt und die Emission von 300 nm bis 450 nm verfolgt. Die Fluoreszenzemission geht nach Anregung bei 295 nm ausschließlich und nach Anregung bei 280 nm hauptsächlich auf die Tryptophane im Protein zurück (3.3.4.4). Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7: Maxima der Fluoreszenzemissionsspektren von *sTrpA*, *sTrpB2a* und *sTrpB2b*

	Maxima der Fluoreszenzemissionsspektren [nm] nach Anregung bei	
	280 nm	295 nm
<i>sTrpA</i>	342	343
<i>sTrpB2a</i>	328	331
<i>sTrpB2b</i>	327	327

Messbedingungen: 5 µM (aktive Zentren) Protein in 10 mM KP Puffer pH 7,5 bei 25 °C. Die angegebenen Werte sind das Mittel der Maxima aus 10 Spektren.

Die Lage der Maxima lässt darauf schließen, dass die beiden Tryptophane von sTrpA dem Lösungsmittel wesentlich zugänglicher sind als die jeweils 3 Tryptophane der beiden TrpB Proteine. Eine Betrachtung des Strukturmodells von sTrpA zeigt, dass W65 und W88 in Helices an der Oberfläche des Proteins lokalisiert sind. Für sTrpB2a gibt das Modell (4.4.2) nur Auskunft über die Lage von W136 und W349, da W12 im N-terminalen Bereich des Proteins liegt, welcher nicht modelliert werden konnte. Während das in TrpB2 Proteinen konservierte W136 (Abbildung 24) tief im Protein lokalisiert ist, kommt das nicht konservierte W349 eher an der Oberfläche zu liegen.

4.2.2 Limitierte Proteolyse

Limitierte Proteolyse ist eine geeignete Methode, um die Stabilität und Flexibilität von Proteinen zu untersuchen (Hubbard 1998). Der Abbau von ecTrpA und ecTrpB durch Trypsin, sowie der Effekt der Substratbindung auf diese Degradation wurde bereits früher untersucht (Miles & Higgins 1978). Dabei zeigte sich, dass isoliertes ecTrpB in die beiden Fragmente β -F1 und β -F2 gespalten wird. Dagegen wird ecTrpA zunächst in ein enzymatisch noch aktives Fragment α 1 zerlegt, dass bei längerer Inkubation zu kleineren Fragmenten abgebaut wird. Bei analogen Versuchen erwiesen sich tmTrpA und tmTrpB1 als sehr viel stabiler gegenüber Trypsin als ecTrpA und ecTrpB (Hentzelt 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Experimente teilweise wiederholt und auf sTrpA, sTrpB2a und sTrpB2b ausgedehnt. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse für die TrpA Proteine.

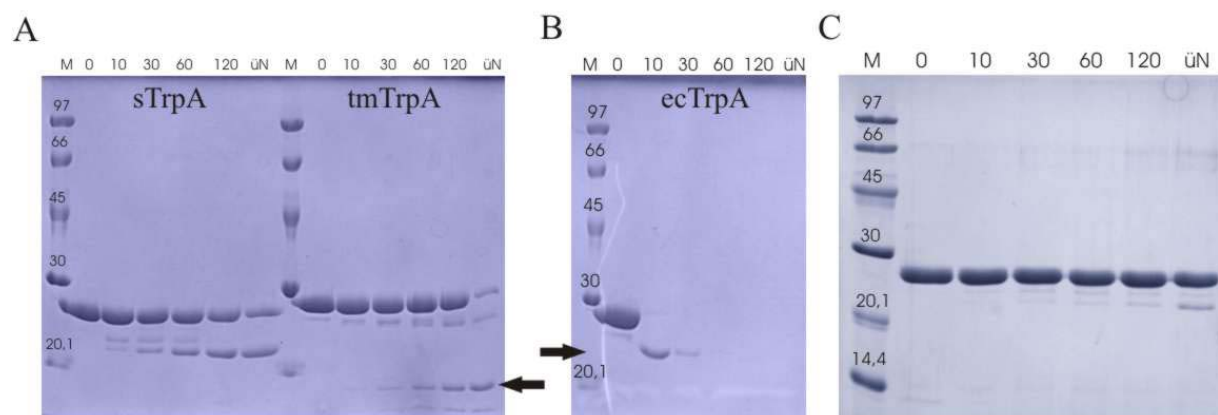


Abbildung 13: Limitierte Trypsinolyse von (A) sTrpA und tmTrpA, (B) ecTrpA und (C) sTrpA in Anwesenheit des Substratanalogons Indolpropanolphosphat (IPP).

Die Proteine wurden in Abwesenheit von IPP mit einem 100-fachen molaren Unterschuss an Trypsin (A, B) bzw. in Anwesenheit von 1 mM IPP mit einem 20-fachen molaren Unterschuss an Trypsin (C) in 100 mM Tris/HCl pH 7,8 bei RT inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) analysiert. 0-120: Zeitpunkt der Probenentnahme in Minuten, üN: über Nacht, M: Low Molecular Weight Marker. Die Pfeile markieren die Fragmente von ecTrpA und tmTrpA, die durch Verdau im α -Loop 6 entstehen (vgl. Abbildung 14).

Beim Verdau von tmTrpA (Abbildung 13A) und ecTrpA (Abbildung 13B) konnten die früher erzielten Ergebnisse reproduziert werden (Hentzelt 1999, Miles & Higgins 1978). Während ecTrpA schon nach 10 min fast vollständig zu $\alpha 1$ abgebaut war, lag tmTrpA nach 120 min zu einem überwiegenden Anteil und nach Inkubation über Nacht noch zu etwa 10 % als intaktes Protein vor. Im Falle von sTrpA reicherte sich ein Fragment im Bereich von etwa 21-22 kDa an, welches nach Inkubation über Nacht etwa 50% des sichtbaren Proteins ausmachte. Bei den restlichen 50% des sichtbaren Proteins handelte es sich um unverdautes sTrpA, das somit noch stabiler als tmTrpA gegenüber Abbau durch Trypsin zu sein scheint.

Das stabile Fragment $\alpha 1$ von ecTrpA entsteht durch Spaltung C-terminal von Arg188, welches im beweglichen $\beta\alpha$ -Loop 6 liegt (Miles 1991). Im Zuge der Substratbindung legt sich dieser Loop auf das aktive Zentrum und überführt TrpA von der offenen in die geschlossene Konformation (2.3.2). Dadurch wird Arg188 in Anwesenheit des Substratanalogons IPP für den proteolytischen Abbau unzugänglich. In tmTrpA liegt an entsprechender Position im α -Loop 6 das Arg165 (Abbildung 14), welches in analoger Weise durch Bindung von IPP vor dem Abbau durch Trypsin geschützt wird (Hentzelt 1999). Entsprechend wird auch sTrpA in Anwesenheit von IPP sehr viel langsamer durch Trypsin abgebaut als ohne den Liganden (Abbildung 13C).

ecTrpA	YLLS RAGVTGAENRAAL PLNH 195
tmTrpA	YYIS RYGVTGER --EDL PFAD 172
sTrpA	YYGV RP --TTG VP --IPVSVKQ 176

Abbildung 14: Ausschnitt aus einem Aminosäuresequenzalignment von ecTrpA, tmTrpA und sTrpA im Bereich von $\beta\alpha$ -Loop 6 (blau markierte Reste). Die experimentell nachgewiesenen (ecTrpA und tmTrpA) und die mutmaßlichen (sTrpA) Schnittstellen von Trypsin sind rot markiert.

Da der Loop 6 von sTrpA jedoch keinen Argininrest enthält, der ecTrpA-Arg188 und tmTrpA-Arg185 entspricht (Abbildung 14), ist der Ort der Trypsinolyse und damit auch der

Mechanismus des IPP-induzierten Schutzes vor der Spaltung bisher nicht klar. Obwohl Arg162 oder Lys175 gute Kandidaten sind (Abbildung 14), kann erst die N-terminale Sequenzierung des Fragmentes endgültigen Ausschluß bringen. Die Größe des entstehenden Fragmentes von etwa 22 kDa lässt eher auf eine Lage der Schnittstelle C-terminal von Loop 6 schließen.

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Trypsinspaltung von ecTrpB, tmTrpB1, tmTrpB2, sTrpB2a und sTrpB2b zusammengestellt.

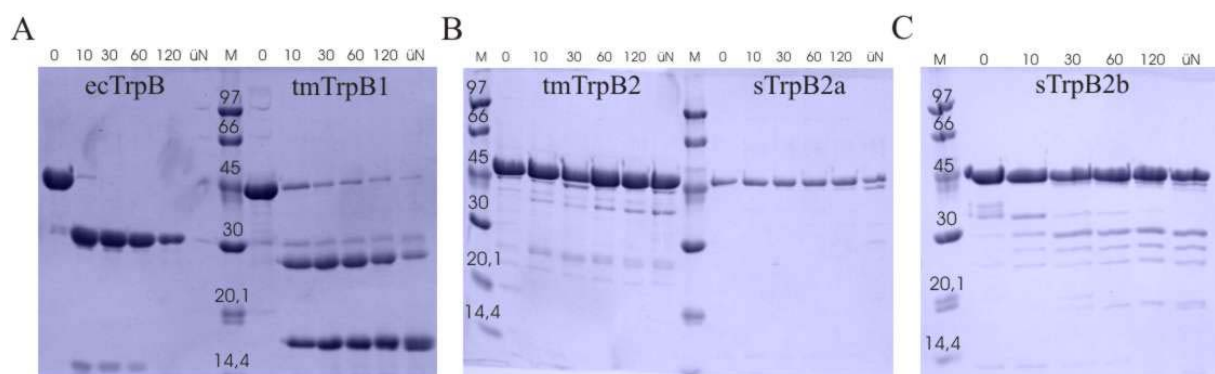


Abbildung 15: Limitierte Trypsinolyse von (A) ecTrpB, tmTrpB1, (B) tmTrpB2, sTrpB2a und (C) sTrpB2b.

Die Proteine wurden mit einem 100-fachen molaren Überschuss an Trypsin in 10 mM KP pH 7,5 inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) analysiert. 0-120: Zeitpunkt der Probenentnahme in Minuten, üN: über Nacht, M: Low Molecular Weight Marker.

Wie Abbildung 15A zeigt, wird ecTrpB schon nach 10 Minuten zu zwei Fragmenten abgebaut, die als β -F1 und β -F2 beschrieben wurden (Miles & Higgins 1978) und nach Inkubation über Nacht praktisch vollständig verschwinden. Die Spaltung von tmTrpB1 führt, ebenfalls wie beschrieben (Hentzelt 1999), rasch zu zwei definierten Fragmenten. Dagegen ist tmTrpB2 extrem stabil gegenüber Trypsin, da trotz des Auftretens einer Reihe von Banden niedriger Intensität die Menge an intaktem Protein auch nach Inkubation über Nacht kaum abzunehmen scheint (Abbildung 15B). Die beiden TrpB2 Proteine aus *S. solfataricus* sind ähnlich resistent gegenüber Trypsin und zeigten auch nach Inkubation über Nacht kaum Anzeichen eines Abbaus (Abbildung 15B, C). Die Anwesenheit schwacher Banden im Falle von tmTrpB2 und sTrpB2b zum Zeitpunkt „0“ deutet auf Verunreinigungen durch Wirtsproteine hin, die nach Inkubation mit Trypsin offensichtlich rasch degradiert wurden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass – mit Ausnahme von tmTrpB1 – alle TrpA und TrpB Proteine aus *T. maritima* und *S. solfataricus* durch Trypsin unter den gegebenen Bedingungen nur sehr langsam abgebaut werden. Diese hohe Proteaseresistenz wurde auch für andere Proteine aus hyperthermophilen Organismen beobachtet, beispielsweise TrpD aus *S. solfataricus* (Ivens 1998) und TrpF aus *T. maritima* (Sterner et al. 1996) und geht einher mit einer hohen Resistenz gegenüber irreversibler Hitzedenaturierung, die im nächsten Kapitel beschrieben wird.

4.2.3 Irreversible thermische Inaktivierung

Um die Hitzestabilität der Proteine sTrpA, sTrpB2a und sTrpB2b zu untersuchen, wurden die Halbwertszeiten der thermischen Inaktivierung bestimmt. Dazu wurden die Proteine bei 85°C inkubiert, nach verschiedenen Zeiten Aliquots entnommen, bei 4°C kurz zentrifugiert und direkt im Anschluss die Restaktivität des Überstandes unter Substratsättigung bei 60 °C gemessen. In allen Fällen wurde ein zeitabhängiger monoexponentieller Abfall der Enzymaktivität beobachtet. Damit ergab sich in der semi-logarithmischen Darstellung jeweils eine lineare Abnahme, aus der die Halbwertszeiten der Inaktivierung bestimmt wurden (Abbildung 16).

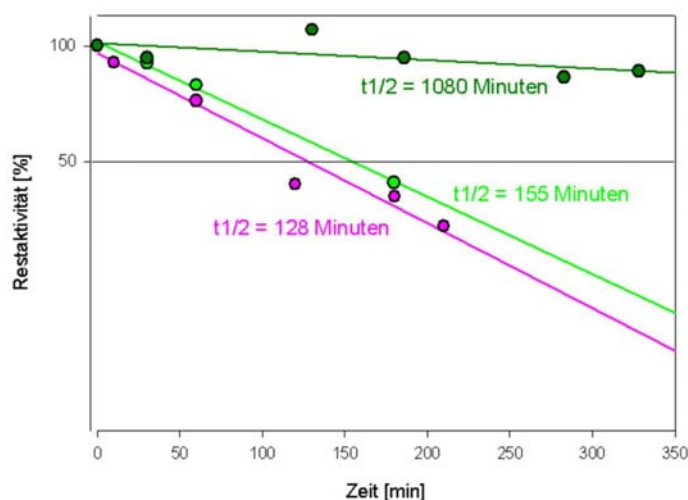


Abbildung 16: Irreversible thermische Inaktivierung bei 85 °C von sTrpA, sTrpB2a und sTrpB2b

Pink: sTrpA, hellgrün: sTrpB2a und dunkelgrün: sTrpB2b. Die Substrate wurden jeweils in sättigenden Konzentrationen eingesetzt. Die angegebenen Halbwertszeiten $t_{1/2}$ wurden durch Extrapolation der erhaltenen Geraden auf die X-Achse bei 50 % Restaktivität bestimmt.

Die Halbwertszeit von sTrpA entspricht mit 128 min bei 85°C praktisch genau der von tmTrpA (Hettwer & Sterner 2002). Bei der gleichen Temperatur ist sTrpB2a mit einer Halbwertszeit von 155 min etwas labiler als tmTrpB1 und tmTrpB2 (je $t_{1/2} = 320$) und wesentlich labiler als sTrpB2b, dessen Halbwertszeit bei 1080 min liegt. Trotz dieser Unterschiede sind alle untersuchten TrpA und TrpB Proteine aus *S. solfataricus* (und *T. maritima*) bei der physiologischen Temperatur deutlich stabiler als andere untersuchte Enzyme der Tryptophanbiosynthese. So beträgt die Halbwertszeit für sTrpD bei 80 °C nur 85 min und die für sTrpC bei 85 °C lediglich 3,8 min (Miriam Deuss und Susanne Dietrich, mündliche Mitteilung).

4.2.4 Bestimmung der apparenten Molekulargewichte und der Assoziationszustände

4.2.4.1 Isolierte Proteine

Die apparenten Molekulargewichte und die Assoziationszustände aller Proteine wurden zunächst mittels analytischer Gelfiltration auf einer kalibrierten Superdex 200 Säule (Kalibrierungsgerade im Anhang 8.2 bestimmt (Abbildung 17)).

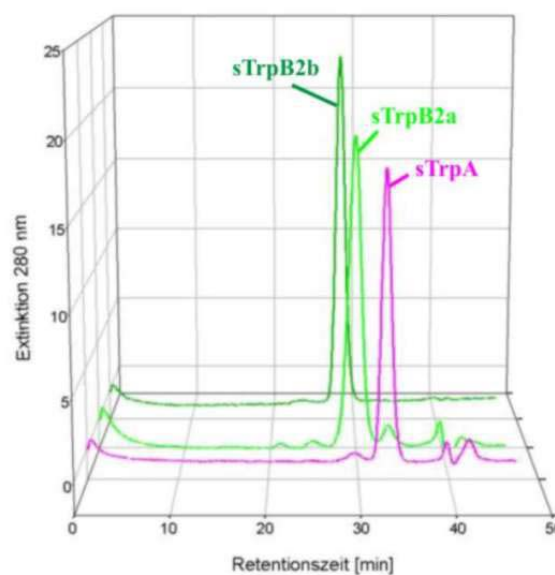


Abbildung 17: Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration (Superdex 200) von sTrpA, sTrpB2a und sTrpB2b.

Es wurden 12 μM sTrpA (pink), 6,3 μM (aktive Zentren) sTrpB2a (hellgrün) und 6 μM (aktive Zentren) sTrpB2b (dunkelgrün) aufgetragen. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 300 mM KCl, und wurde über die Absorption bei 280 nm verfolgt.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 8: Retentionszeiten in der analytischen Gelfiltration, berechnete (M_R^{calc}) und apparente (M_R^{app}) Molekulargewichte, sowie abgeleitete Assoziationszustände von sTrpA, sTrpB2a, sTrpB2b.

Protein	Retentionszeit [min]	M_R^{app} [Da]	M_R^{calc} [Da]	Abgeleiteter Assoziationszustand
sTrpA	16.49	25477	27387 (α)	Monomer
sTrpB2a	14.95	55719	95404 (β_2)	?
sTrpB2b	14.14	83508	95556 (β_2)	?

Aus der Retentionszeit von sTrpA ergibt sich ein apparentes Molekulargewicht von 25477 Da, welches sehr gut mit dem errechneten Molekulargewicht für das Monomer von 27387 Da übereinstimmt. Der symmetrische Elutionspeak gibt keinen Hinweis auf weitere Assoziationszustände, ebenso konnte keine Tendenz zur Aggregation festgestellt werden. Daraus ergibt sich, dass rekombinantes sTrpA ein sauberes und monomeres Protein darstellt, ebenso wie alle bisher charakterisierten TrpA Proteine (Hyde et al. 1988, Jeong et al. 2004, Yamagata et al. 2001). Weniger eindeutig waren die Ergebnisse für sTrpB2a und sTrpB2b. Sie eluierten zwar ebenfalls als symmetrischer Peak und sind demnach homogen und sauber, ihre apparente Molekulargewichte lagen jedoch zwischen den für die Monomere und die Dimere berechneten Werten. Ähnliches war bei der analytischen Gelfiltration von TrpB1 und TrpB2 von *T. maritima* beobachtet worden, deren dimerer Assoziationszustand erst mittels analytischer Ultrazentrifugation eindeutig nachgewiesen werden konnte (Hettwer und Sterner, 2002). Um eine genaue Aussage über das Molekulargewicht machen zu können, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. H. Durchschlag (Lehrstuhl Biochemie II der Universität Regensburg) auch mit sTrpB2a und sTrpB2b Gleichgewichtsläufe in einer analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Berechnete (M_R^{calc}) und aus Gleichgewichtsläufen in der analytischen Ultrazentrifuge ermittelte apparente (M_R^{app}) Molekulargewichte, sowie daraus abgeleitete Assoziationszustände von sTrpB2a und sTrpB2b.

Protein	M_R^{calc} [Da]	M_R^{app} [Da]	Abgeleiteter Assoziationszustand
sTrpB2a	95404 (β_2)	91998	Dimer
sTrpB2b	95556 (β_2)	103953	Dimer

Die apparenten Molekulargewichte von 91998 Da bzw. 103953 Da für sTrpB2a bzw. sTrpB2b belegen, dass beide Proteine ein Homodimer bilden, ebenso wie alle bisher untersuchten TrpB Proteine (Creighton & Yanofsky 1966, Hioki et al. 2004, Hyde et al. 1988). Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen analytischer Gelfiltration und analytischer Ultrazentrifugation liefert die zylinderartige Form des TrpB Proteins (Abbildung 2), welche stark von der globulären Form der für die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule verwendeten Proteine abweicht. Dies hat vermutlich zur Folge, dass sTrpB2a und sTrpB2b ein aberrantes Laufverhalten in der Gelfiltration zeigen, wie es auch für die beiden TrpB Proteine aus *T. maritima* beobachtet wurde (Hettwer & Sterner 2002).

4.2.4.2 Gemische aus sTrpA mit sTrpB2a und sTrpB2b

Um zu untersuchen, ob sTrpA mit sTrpB2a bzw. sTrpB2b einen Komplex bildet, wurden wiederum analytische Gelfiltrationsläufe auf einer kalibrierten Superdex 200 Säule (Kalibrierungsgerade im Anhang 8.2) durchgeführt. Dazu wurden die isolierten Proteine einzeln und nach Mischung von sTrpA mit sTrpB2a bzw. sTrpB2b in einem molaren Verhältnis von 2:1 auf die Säule aufgetragen (Abbildung 18).

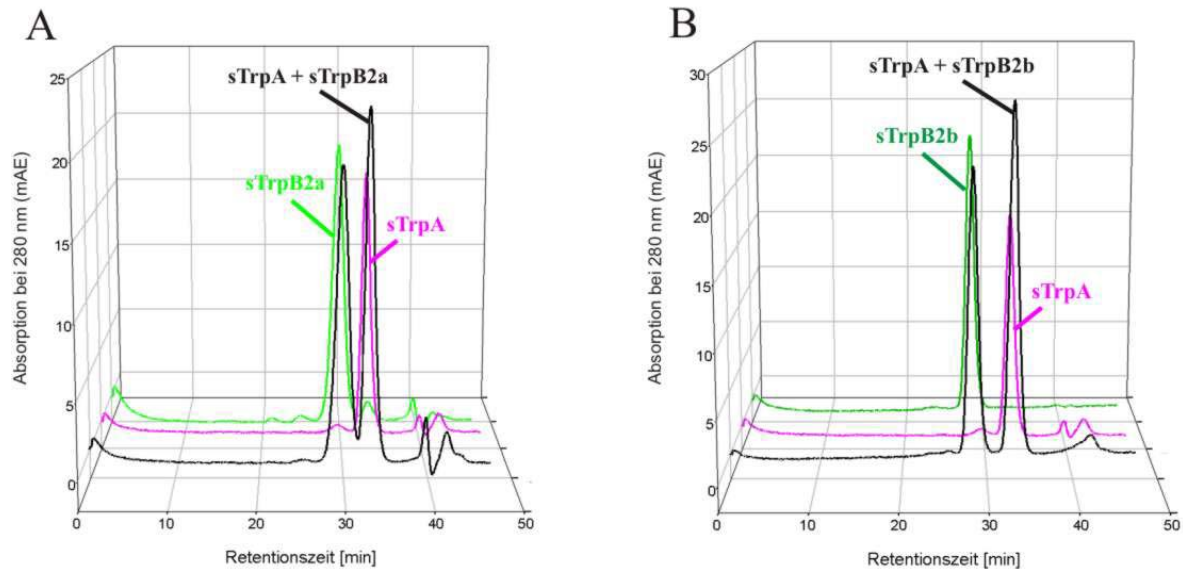


Abbildung 18: Die Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration (Superdex 200) liefern keinen Hinweis auf Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2a oder sTrpB2b.

(A) Es wurden Lösungen mit 12 μM sTrpA (pink), 6,3 μM (aktive Zentren) sTrpB2a (hellgrün) und eine 1:1 Mischung beider Lösungen (schwarz) aufgetragen. (B) Es wurden 12 μM sTrpA (pink), 6 μM (aktive Zentren) sTrpB2b (hellgrün) und eine 1:1 Mischung beider Lösungen (schwarz) aufgetragen. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 300 mM KCl, und wurde über die Absorption bei 280 nm verfolgt.

Die Elutionsprofile der Gemische entsprechen der Summe der Profile der einzeln aufgetragenen Proteine. Die analytische Gelfiltration liefert somit keinen Hinweis für die Bildung eines Komplexes aus sTrpA und sTrpB2a oder sTrpB2b.

Enzymkinetische Messungen erbrachten dagegen Hinweise auf eine Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2a (4.3). Deshalb wurde getestet, ob die Assoziation von sTrpA mit sTrpB2a durch die Anwesenheit ihrer Substrate induziert wird. Zu diesem Zweck wurde die Superdex 200 Säule mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 300 mM KCl äquilibriert, der zusätzlich (a) 40 μM PLP, (b) 40 μM PLP plus 1 M Serin, (c) 40 μM PLP plus 1 M Serin plus 0,1 mM IGP enthielt. Anschließend wurde auf die Säule jeweils ein Gemisch aus 5 μM sTrpB2a (aktive Zentren) und 10 μM sTrpA aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min bei Raumtemperatur eluiert. In Anwesenheit von 40 μM PLP war das Elutionsprofil (nicht gezeigt) identisch mit den Elutionsprofilen, die in Abwesenheit der Substrate erhalten wurden (Abbildung 18). In Anwesenheit von 1 M Serin (b,c) konnte kein Elutionspeak für sTrpB2a mehr detektiert werden, die Elutionszeit und die Stärke der Absorption bei 280 nm für sTrpA waren dagegen identisch mit denen für das isolierte Protein. Dies bedeutet, dass die

analytische Gelfiltration unter den gegebenen Bedingungen keinen Hinweis auf eine Substrat-induzierte Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2a lieferte.

Um die mittels analytischer Gelfiltration erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurden Sedimentationsläufe in einer analytischen Ultrazentrifuge bei 24,8 °C durchgeführt. Zunächst wurden die isolierten Proteine untersucht, wobei 15 µM sTrpA, 4 µM (aktive Zentren) sTrpB2a und 8 µM (aktive Zentren) sTrpB2b eingesetzt wurden., Anschließend wurden Läufe mit Proteingemischen durchgeführt, wobei 7 µM sTrpA mit 3,3 µM (aktive Zentren) sTrpB2a, bzw. 10,5 µM sTrpA mit 6 µM (aktive Zentren) sTrpB2b versetzt wurden. Über den Vergleich der S-Werte der isolierten Proteine und der Proteine im Gemisch sollten eventuell gebildete Komplexe nachgewiesen werden. Die isolierten Proteine sedimentierten jeweils als einheitliche Bande mit $S_{20,w}$ -Werten von 2,1 (sTrpA), 5,5 (sTrpB2a) und 5,5 (sTrpB2b). Nach Mischung von sTrpA und sTrpB2b wurden die selben $S_{20,w}$ -Werte ermittelt wie für die isolierten Proteine. Dies bedeutet, dass sich zwischen diesen Proteinen auch in der analytischen Ultrazentrifuge kein Komplex nachweisen ließ, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der analytischen Gelfiltration (Abbildung 18). Dagegen ergab der Lauf mit einem Gemisch aus sTrpA und sTrpB2a kein klares Ergebnis, da die geringe Konzentration von sTrpB2a zu einem schlechten Rausch-Signal Verhältnis führte. Über die Bildung eines Komplexes aus diesen beiden Proteinen lässt sich auf der Basis der Sedimentationsläufe deswegen keine eindeutige Aussage treffen.

4.3 Enzymkinetische Charakterisierung

4.3.1 A-Reaktion bei 60°C

Bei der durch die α -Untereinheit der Tryptophan Synthase katalysierte A-Reaktion handelt es sich um die reversible aldolytische Spaltung von Indol 3-glycerinphosphat (IGP) zu Indol und Glycerinaldehyd 3-phosphat, wobei das Gleichgewicht auf der Seite des IGP liegt (2.3.2, Abbildung 3). Beim hier verwendeten gekoppelten Test wird die Reaktion unter Verwendung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) auf die Seite der Produkte

verschoben und gleichzeitig durch die Reduktion von NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ ein spektroskopisch detektierbares Signal erzeugt (3.3.4.8.1).

Abbildung 19 zeigt eine Sättigungskurve, die durch Messung der Anfangsgeschwindigkeiten in Anwesenheit verschiedener IGP-Konzentration bei 60 °C erhalten wurde.

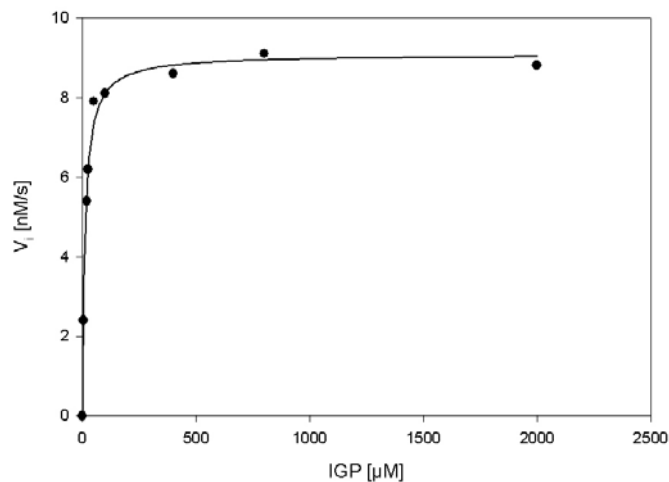


Abbildung 19: Sättigungskurve von sTrpA bei 60°C.

Reaktionsbedingungen: 100 mM EPPS/KOH pH 7,5 mit 180 mM KCl und 40 µM Pyridoxal 5'-phosphat, 6 mM NAD^+ , 20 mM Arsenat, 5,5 µM tmGAPDH und 14 µM sTrpA.

Um eine Aktivierung durch die sTrpB Proteine zu überprüfen (und daraus auf Komplexbildung zu schließen), wurde die sTrpA-Reaktion in Anwesenheit von sTrpB2a (mit und ohne Serin) und sTrpB2b verfolgt. Die Werte bei 60°C für die abgeleiteten steady-state enzymkinetischen Parameter (Wechselzahl k_{cat} , Michaelis-Konstante K_M^{IGP} und katalytische Effizienz $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{IGP}}$) sind in Tabelle 10 aufgelistet und denen von tmTrpA bei der gleichen Temperatur (Hettwer 2001) gegenübergestellt.

Tabelle 10: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpA-Proteine aus *S. solfataricus* (sTrpA) und *T. maritima* (tmTrpA) bei 60°C, in An- und Abwesenheit der kognaten TrpB-Proteine.

Protein	k_{cat} [s^{-1}]	$K_{\text{M}}^{\text{IGP}}$ [mM]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{IGP}}$ [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$]
sTrpA ^a	0,0007	0,012	0,058
sTrpA + [sTrpB2a] ₂ ^b	0,012	0,0035	3,4
Ratio^c	17,1	0,29	58,6
sTrpA + [sTrpB2a] ₂ + Serin ^d	0,1	0,0062	16,1
Ratio^c	142,9	0,52	277,6
sTrpA + [sTrpB2b] ₂ ^b	0,0007	0,012	0,058
Ratio^c	1	1	1
tmTrpA ^a	0,052	0,65	0,08
[tmTrpA*tmTrpB1] ₂ ^b	0,515	0,11	59
Ratio^c	9,9	0,17	59
[tmTrpA*tmTrpB1] ₂ + Serin ^e	1,1	0,013	90
Ratio^c	21,2	0,02	1125

Reaktionsbedingungen: 100 mM EPPS/KOH pH 7,5 mit 180 mM KCl und 40 μM Pyridoxal 5'-phosphat, 6 mM NAD^+ , 5,5 μM tmGAPDH.

^a 14 μM sTrpA / 7,66 μM tmTrpA;

^b 3 μM sTrpA plus 0,5 μM (aktive Zentren) sTrpB2a / 14 μM sTrpA plus 28 μM (aktive Zentren) sTrpB2b / 1,04 μM tmTrpA plus 1,04 μM (aktive Zentren) tmTrpB1;

^c Verhältnis der steady-state enzymkinetischen Parameter von TrpA in An- und Abwesenheit von TrpB;

^d 3 μM sTrpA plus 0,5 μM (aktive Zentren) sTrpB2a plus 1 M Serin;

^e 1,04 μM tmTrpA plus 1,04 μM (aktive Zentren) tmTrpB1 plus 0,5 M Serin

In isolierter Form weisen sTrpA und tmTrpA vergleichbare katalytische Effizienzen auf, die durch die Anwesenheit eines zweifachen molaren Überschusses (an aktiven Zentren) von sTrpB2a bzw. einer äquimolaren Konzentration von tmTrpB1 jeweils etwa 60-fach erhöht wird. Dies geht jeweils auf eine deutliche Erhöhung der Wechselzahl und eine moderate Erniedrigung der Michaeliskonstante für IGP zurück. Durch die zusätzliche Anwesenheit des TrpB-Substrates Serin werden die katalytische Effizienzen von sTrpA und tmTrpA noch weiter erhöht, was eine mehr als 270- bzw. 1000-fache Aktivierung im Vergleich zu den

isolierten Proteinen zur Folge hat. Im Gegensatz dazu hat die Anwesenheit von sTrpB2b und tmTrpB2 keinen Einfluss auf die Aktivitäten von sTrpA (Tabelle 10) und tmTrpA (Hettwer & Sterner 2002). Die Ergebnisse belegen eindeutig, dass sTrpA mit dem im *trp*-Operon kodierten sTrpB2a Protein einen Komplex ausbildet und es innerhalb dieses Komplexes zu einer Aktivierung von sTrpA durch sTrpB2a kommt. Dagegen liefern die steady-state enzymkinetischen Messungen keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen sTrpA und dem ausserhalb des *trp*-Operons kodierten sTrpB2b. In analoger Weise bildet tmTrpA einen Komplex mit dem im *trp*-Operon kodierten tmTrpB1 Protein und wird durch dieses aktiviert, während es zu keiner messbaren Interaktion zwischen tmTrpA und dem außerhalb des *trp*-Operons kodierten tmTrpB2 kommt (Hettwer & Sterner 2002).

4.3.2 Temperaturabhängigkeit der Aktivierung von sTrpA durch sTrpB2a und tmTrpA durch tmTrpB1

In den beiden vorherigen Kapiteln wurde gezeigt, dass bei Raumtemperatur durchgeführte analytische Gelfiltration zu keiner nachweisbaren Komplexbildung von sTrpA mit sTrpB2a führt, während die bei 60°C beobachtete Aktivierung von sTrpA durch sTrpB2a die Assoziation der beiden Proteine eindeutig belegt (Tabelle 10). Dagegen konnte Komplexbildung zwischen tmTrpA und tmTrpB1 sowohl bei Raumtemperatur in der analytischen Gelfiltration (Hettwer & Sterner 2002) als auch bei 60°C in enzymkinetischen Messungen (Tabelle 10) nachgewiesen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Stärke der Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2a mit zunehmender Temperatur zunimmt, während die Komplexbildung zwischen tmTrpA und tmTrpB1 weniger stark von der Temperatur abhängt. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Stimulation der katalytischen Aktivitäten von sTrpA durch sTrpB2a bzw. von tmTrpA durch tmTrpB1 bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen. In Abbildung 20 ist das Ergebnis in Form von Arrhenius Diagrammen dargestellt.

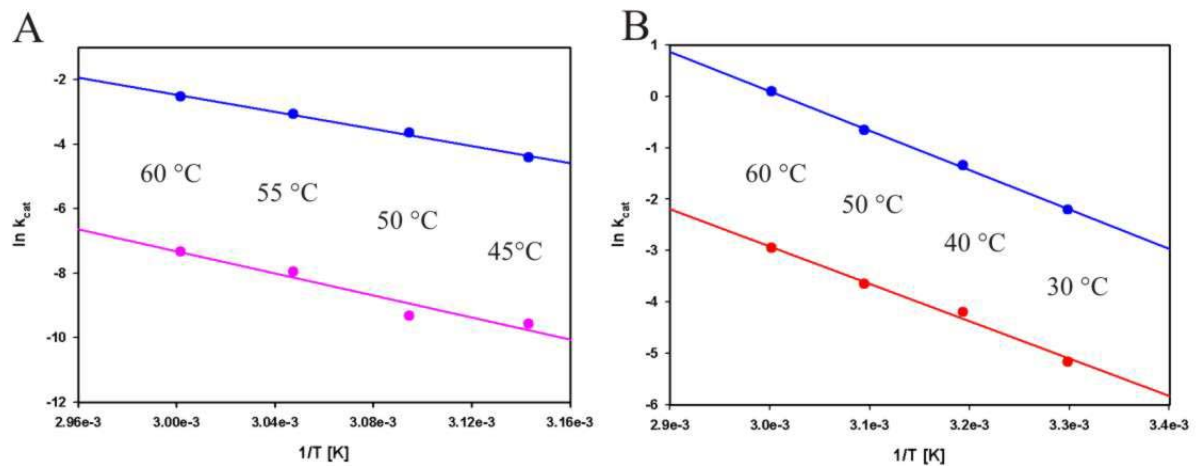


Abbildung 20: Arrhenius Diagramme der k_{cat} -Werte von (A) isoliertem sTrpA (pink) und sTrpA in Anwesenheit von sTrpB2a und L-Serin (blau), sowie (B) isoliertem tmTrpA (rot) und tmTrpA in Anwesenheit von tmTrpB1 und L-Serin (blau).

Reaktionsbedingungen: 100 mM EPPS/KOH pH 7,5 mit 180 mM KCl und 40 μM Pyridoxal 5'-phosphat, 6 mM NAD^+ , 5,5 μM tmGAPDH.

(A) Für die Messungen mit isoliertem sTrpA wurden 10 μM (55 °C), 15 μM (50 °C, 60 °C) und 27 μM (45 °C) Enzym eingesetzt; die Messungen im Komplex wurden mit 3 μM sTrpA plus 0,5 μM (aktive Zentren) sTrpB2a plus 1 M Serin durchgeführt; (B) Für die Messungen mit isoliertem tmTrpA wurden 7,7 μM Enzym eingesetzt, die Messungen im Komplex wurden mit je 1,04 μM tmTrpA und tmTrpB1 (aktive Zentren) durchgeführt. Die Daten von (B) stammen aus Hettwer (2001).

Aus den Steigungen der Geraden in Abbildung 20 wurden die Aktivierungsenergien für isoliertes und durch sTrpB2a aktiviertes sTrpA zu 141,5 kJ/mol und 110,4 kJ/mol berechnet, während die Werte für isoliertes und durch tmTrpB1 aktiviertes tmTrpA bei 60,4 kJ/mol und 63,8 kJ/mol liegen. Dies bedeutet, dass die Arrheniusdiagramme sowohl in Abbildung 20A als auch in Abbildung 20B annähernd parallel verlaufen und somit sowohl die Aktivierung von sTrpA durch sTrpB2a als auch die von tmTrpA durch tmTrpB1 weitgehend unabhängig von der Temperatur ist.

4.3.3 Quantifizierung der Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2a, sowie zwischen tmTrpA und tmTrpB1

Die in den Kapitel 4.2.4.2 und 4.3.2 dokumentierten Ergebnisse machen es unwahrscheinlich, dass die Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2a entscheidend davon abhängt, dass die Substrate der beiden Untereinheiten vorhanden sind oder die Messungen bei hohen

Temperaturen durchgeführt werden. Als einzige plausible Erklärung für den fehlenden Nachweis der Komplexbildung in der analytischen Gelfiltration bleibt somit die Möglichkeit, dass die Bindung zwischen den Untereinheiten relativ schwach ist. Dies könnte dazu führen, dass sie nach Auftrag auf die Gelfiltrationssäule so stark verdünnt werden, dass ihre Konzentrationen unterhalb der thermodynamische Dissoziationskonstante (K_d) zu liegen kommen. Nimmt man gleichzeitig ein schnelles Gleichgewicht zwischen Bildung und Dissoziation des Komplexes an, dann würde dies die beobachtete Elution von sTrpA und sTrpB2a als zwei getrennte Peaks erklären (Abbildung 18).

Um den K_d -Wert der Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2a abschätzen zu können, wurden Titrationsversuche durchgeführt. Dabei wurden, in Anwesenheit sättigender Konzentrationen an IGP und Serin, zu einer konstanten Menge an sTrpB2a zunehmend höhere Konzentrationen an sTrpA zugegeben. Als Maß für die Menge an gebildetem Komplex bei jedem Titrationschritt diente die gemessene A-Aktivität, wobei die erhaltenen Werte um die (sehr niedrige) Aktivität von überschüssigem sTrpA korrigiert wurden. Ein analoges Experiment wurde mit tmTrpA und tmTrpB1 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

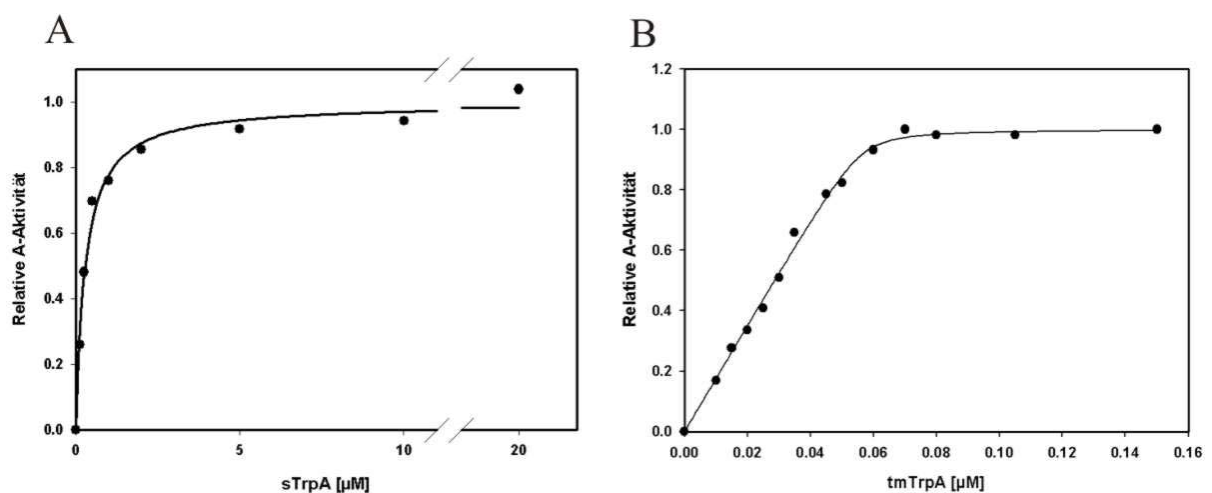


Abbildung 21: Titration von (A) sTrpB2a mit sTrpA und (B) tmTrpB1 mit tmTrpA bei 60 °C.

(A) 0,5 µM (aktive Zentren) sTrpB2a wurden mit den angegebenen Konzentrationen an sTrpA,

(B) 0,05 µM (aktive Zentren) tmTrpB1 mit den angegebenen Konzentrationen an tmTrpA titriert.

Reaktionsbedingungen: 100 mM EPPS/KOH pH 7,5 mit 180 mM KCl und 40 µM Pyridoxal 5'-phosphat, 6 mM NAD⁺, 5,5 µM tmGAPDH, 1 mM IGP, 1 M Serin.

Die Bindung von sTrpA an sTrpB2a (Abbildung 21A) konnte mit einer hyperbolischen Funktion gefittet werden, wodurch ein K_d -Wert von 280 nM ermittelt wurde. Die

Bindungskurve von tmTrpA an tmTrpB1 (Abbildung 21B) ist weitgehend linear und der extrapolierte Äquivalenzpunkt von 0.6 μM tmTrpA bei einer vorgelegten Konzentration von 0.5 μM (aktive Zentren) an tmTrpB1 bestätigt die 1:1 Stöchiometrie der Untereinheiten im $[\text{tmTrpA} \cdot \text{tmTrpB1}]_2$ Komplex (Hettwer & Sterner 2002). Da bei dieser Titration die freie Konzentration an tmTrpA offensichtlich deutlich unterhalb der zutitrierten Konzentration lag, wurde die Kurve mit Hilfe einer quadratischen Gleichung (3.3.4.9) gefittet (Eberhard 1990). Der dadurch ermittelte K_d -Wert von 4 nM ist ähnlich dem für die Komplexbildung von ecTrpA mit ecTrpB gemessenen Wert von 2 nM, der auf ähnliche Weise bestimmt wurde (Creighton & Yanofsky 1966). Offensichtlich erfolgt die Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2a also unter vergleichbaren Bedingungen mit einer um etwa zwei Größenordnungen niedrigeren Affinität als die Komplexbildung zwischen den TrpA und TrpB1 Proteinen der bisher untersuchten Tryptophan Synthasen.

4.3.4 B-Reaktion

In der durch die β -Untereinheit der Tryptophansynthase katalysierten B-Reaktion kondensiert L-Serin mit Indol in einer irreversiblen Reaktion zu L-Tryptophan und Wasser (2.3.2, Abbildung 4). Die Reaktion wird photometrisch über die Zunahme der Absorption bei 290 nm beim Übergang von Indol zu Tryptophan bei 290 nm verfolgt (3.3.4.8.2).

Die Reaktion wurde bei 60°C und bei 80°C gemessen. Bei der Aufnahme von Sättigungskurven für Indol wurde Serin in sättigender Konzentration zugegeben, und umgekehrt. Abbildung 22 zeigt exemplarisch die Sättigungskurven für Serin von sTrpB2a und sTrpB2b bei 60°C.

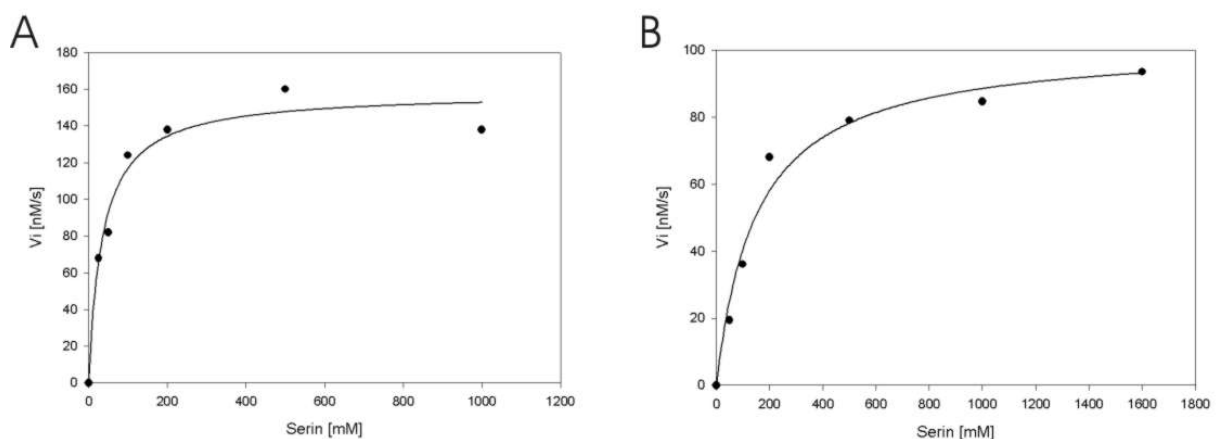


Abbildung 22: Sättigungskurven für Serin von sTrpB2a (A) und sTrpB2b (B) bei 60°C.

Reaktionsbedingungen: 100 mM KP pH 7,5 mit 180 mM KCl und 40 μ M Pyridoxal 5'-phosphat, 0,2 mM Indol, (A) 0,76 μ M (aktive Zentren) sTrpB2a und (B) 4 μ M (aktive Zentren) sTrpB2b.

Die Werte bei 80°C für die abgeleiteten steady-state enzymkinetischen Parameter (Wechselzahl k_{cat} , Michaelis-Konstanten $K_{\text{M}}^{\text{Indol}}$ und $K_{\text{M}}^{\text{Serin}}$, katalytische Effizienzen $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{Indol}}$ und $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{Serin}}$) sind in Tabelle 11 aufgelistet und denen von tmTrpB1 und tmTrpB2a bei der gleichen Temperatur (Hettwer und Sterner, 2002) gegenübergestellt.

Tabelle 11: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpB-Proteine aus *S. solfataricus* (sTrpB2a, sTrpB2b) und *T. maritima* (tmTrpB1, tmTrpB2) bei 80 °C.

Protein	k_{cat} [s ⁻¹]	$K_{\text{M}}^{\text{Indol}}$ [μ M]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{Indol}}$ [mM ⁻¹ s ⁻¹]	k_{cat} [s ⁻¹]	$K_{\text{M}}^{\text{Serin}}$ [mM]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{Serin}}$ [mM ⁻¹ s ⁻¹]
[sTrpB2a] ₂ ^a	1,1	13,3	83	1,4	54	0,026
[sTrpB2b] ₂ ^a	0,27	5,5	49	0,22	40	0,006
[tmTrpB1] ₂ ^b	4,2	40	100	3,8	110	0,034
[tmTrpB2] ₂ ^c	0,46	<0,77	>600	0,44	50,2	0,0087

Reaktionsbedingungen: 100 mM KP Puffer pH 7,5 mit 180 mM KCl und 40 μ M Pyridoxal 5'-phosphat. 0 – 1600 mM L-Serin, 200 μ M Indol.

^a 1 μ M (aktive Zentren) sTrpB2a / 1,1 μ M (aktive Zentren) sTrpB2b;

^b 0,5 μ M (aktive Zentren) tmTrpB1;

^c 0,3 μ M (aktive Zentren) tmTrpB2 für die Serin-abhängige Reaktion bzw. 0,78 μ M für die Indol-abhängige Reaktion. Die Daten für die Proteine aus *T. maritima* stammen aus Hettwer und Sterner (2002).

Es wird deutlich, dass sTrpB2a vergleichbare Werte für $K_{\text{M}}^{\text{Serin}}$ wie sTrpB2b aufweist, jedoch eine etwa 5-fach höhere Wechselzahl und damit auch etwa 5-fach höhere katalytische Effizienz im Umsatz von Serin. Diese entspricht im Falle von sTrpB2a ziemlich genau der von tmTrpB1 und im Falle von sTrpB2b der von tmTrpB2. Die Werte für $K_{\text{M}}^{\text{Indol}}$ liegen für sTrpB2a und sTrpB2b im vergleichbaren Bereich und damit zwischen den entsprechenden Michaeliskonstanten von tmTrpB1 und tmTrpB2.

Die Messungen der Aktivitäten von sTrpB2a und sTrpB2b in Anwesenheit von sTrpA wurden bei 60 °C durchführt. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 12: Steady-state enzymkinetische Parameter der TrpB-Proteine aus *S. solfataricus* (sTrpB2a, sTrpB2b) bei 60 °C, in An- und Abwesenheit von sTrpA.

Protein	k_{cat} [s ⁻¹]	K_M^{Indol} [μM]	k_{cat}/K_M^{Indol} [mM ⁻¹ s ⁻¹]	k_{cat} [s ⁻¹]	K_M^{Serin} [mM]	k_{cat}/K_M^{Serin} [mM ⁻¹ s ⁻¹]
[sTrpB2a] ₂ ^a	0,2	3	66,7	0,2	35	0,006
[sTrpB2a] ₂ +sTrpA	0,19	6	31,7	0,16	45,8	0,004
[sTrpB2b] ₂ ^b	0,038	6	6,3	0,026	151	0,00017
[sTrpB2b] ₂ +sTrpA	0,043	8	5,4	0,023	70	0,00033

Reaktionsbedingungen: 100 mM KP Puffer pH 7,5 mit 180 mM KCl und 40 μM Pyridoxal 5'-phosphat. 0 – 1600 mM L-Serin, 200 μM Indol.

^a 0,76 μM (aktive Zentren) sTrpB2a ± 1,5 μM sTrpA;

^b 4 μM (aktive Zentren) sTrpB2b ± 8 μM sTrpA.

Die katalytischen Effizienzen von sTrpB2a für den Umsatz von Indol und Serin liegen jeweils um etwa eine Größenordnung über der von sTrpB2b, was hauptsächlich auf einen erhöhten k_{cat} -Wert zurückgeht. Jedoch werden weder sTrpB2a noch sTrpB2b durch die Anwesenheit eines zweifachen molaren Überschusses an sTrpA aktiviert. Die Mischung aus sTrpB2a und sTrpA in Anwesenheit sättigender Konzentrationen an Serin und dem TrpA Substratanalogon IPP führte ebenfalls zu keiner Stimulierung der TrpB-Reaktion (Daten nicht gezeigt). Ebenso wird tmTrpB2 durch tmTrpA nicht stimuliert, während sich die Werte für k_{cat}/K_M^{Indol} und k_{cat}/K_M^{Serin} von tmTrpB1 im [tmTrpA*tmTrpB1]₂ Komplex bei 80°C um den Faktor 4 bzw. 65 erhöhen (Hettwer und Sterner, 2002).

Die fehlende Aktivierung von sTrpB2a durch sTrpA ist insofern überraschend, als sich bei allen bisher untersuchten Tryptophansynthase Komplexen die α- und β-Untereinheiten wechselseitig aktivieren (Hettwer & Sterner 2002, Miles 1979, Miles 1995). Damit ist die hier beobachtete monodirektionale Aktivierung von sTrpA durch sTrpB2a ein neuartiges Phänomen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Wechselzahl von sTrpA in isolierter Form mit 0,0007 s⁻¹ (Tabelle 10) wesentlich niedriger liegt als die von sTrpB2a mit 0.2 s⁻¹ (Tabelle 12) bei gleicher Temperatur von 60°C. Selbst die maximale Aktivierung von sTrpA durch sTrpB2a und Serin führt zu einem k_{cat} -Wert von nur 0,11 s⁻¹ (Tabelle 10), weshalb die A-Teilreaktion limitierend für die Umsatzrate des Tryptophansynthase Komplexes aus sTrpA und sTrpB2a bleibt und deshalb keine Notwendigkeit für eine Beschleunigung der B-Teilreaktion besteht.

4.4 Analyse der sTrpA*sTrpB2a Kontaktfläche

In fast allen bisher untersuchten Tryptophansynthasen lagern sich TrpA und TrpB zu einem $\alpha\beta\alpha$ Komplex zusammen (Hyde et al. 1988, Lee et al. 2005, Miles 1995). In *T. maritima* bildet tmTrpA mit tmTrpB1 ebenfalls einen $\alpha\beta\alpha$ Komplex, während die zusätzliche β -Untereinheit tmTrpB2 nicht mit tmTrpA interagiert (Hettwer & Sterner 2002). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von tmTrpB1 und tmTrpB2 führte zu der Hypothese, dass eine N-terminale Extension und zwei Insertionen in tmTrpB2 im Bereich der potentiellen Kontaktfläche zu tmTrpA die Komplexbildung sterisch verhindern. Diese zusätzlichen Sequenzabschnitte sind ein charakteristisches Merkmal aller TrpB2 Proteine und enthalten teilweise konservierte Bereiche. Wie im Falle von *T. maritima* enthält auch das Genom von *S. solfataricus* zwei TrpB Proteine, die aber beide zum Typ TrpB2 (COG1350) gehören. Die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Experimente zeigen, dass es entgegen der oben beschriebenen Hypothese zu einer Komplexbildung und funktionalen Wechselwirkung zwischen sTrpA und dem im *trp*-Operon kodierten sTrpB2a kommt. Analog zu der Situation in *T. maritima* ließ sich aber keine Wechselwirkung zwischen sTrpA und dem außerhalb des Operons kodierten sTrpB2b nachweisen. Es stellt sich damit erneut die Frage nach den strukturellen Determinanten, die über eine Interaktion zwischen TrpA und TrpB Proteinen entscheiden. Die nachfolgenden Abschnitte befassen sich mit der computergestützten Analyse der potentiellen Kontaktfläche und der praktischen Überprüfung der daraus abgeleiteten Hypothesen in Form gezielter Aminosäuresubstitutionen in sTrpB2a und sTrpB2b.

4.4.1 Sequenzvergleiche von TrpB2a (im Operon kodiert) und TrpB2b (außerhalb des Operons kodiert) Proteinen

Ein Aminosäuresequenzvergleich von sTrpB2a und sTrpB2b mit dem Programm Tcoffee, (Poirot et al. 2003) ergibt eine Identität von 52 %. Zur Identifizierung der Unterschiede zwischen sTrpB2a und sTrpB2b, die über eine Komplexbildung mit sTrpA entscheiden könnten, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. R. Merkl (Lehrstuhl Biochemie II der Universität Regensburg) die TrpB2 Proteine der Organismen mit zwei *trpB2* Genen in einem multiplen Sequenzalignment (Tcoffee, (Poirot et al. 2003)) verglichen. In Abbildung 23 ist

der daraus resultierende Taxonomiebaum dargestellt. Er zeigt, dass die TrpB2 Proteine aus *Picrophilus torridus*, *Sulfolobus tokodaii* und *Sulfolobus solfataricus* eine zentrale Gruppe bilden, die sich weiter in TrpB2a und TrpB2b Proteine unterteilt. Um die Unterschiede zwischen den sTrpB2a und sTrpB2b Sequenzen möglichst klein zu halten und so die Auswahl an Aminosäureresten für eine Mutationsanalyse zu erleichtern, wurden die außerhalb der zentralen Gruppe stehenden TrpB2 Sequenzen von *Aeropyrum pernix* und *Pyrobaculus aerophilum* in die weitere Analyse nicht mit einbezogen.

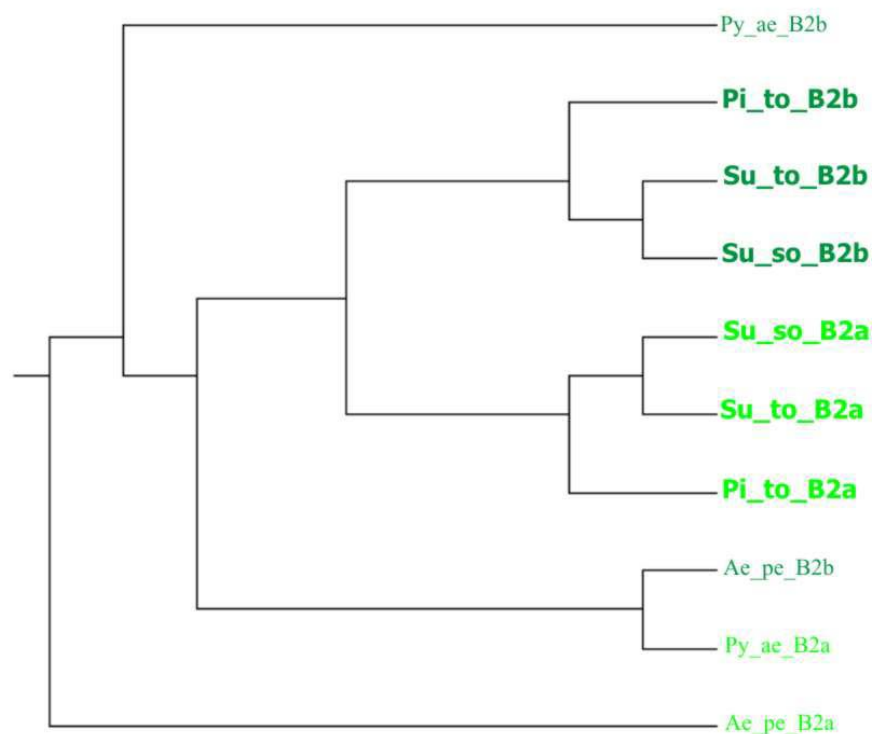


Abbildung 23: Taxonomiebaum der TrpB2 Proteine aus *P. aerophilum*, *A. pernix*, *P. torridus*, *S. tokodaii* und *S. solfataricus*.

Hellgrün: TrpB2a Proteine, dunkelgrün: TrpB2b Proteine. Der Baum wurde auf der Basis eines multiplen Sequenzalignments (Tcoffee, (Poirot et al. 2003)) mittels PHYLIP Protpars (Felsenstein 1995) berechnet. Die graphische Ausgabe erfolgte durch den Phylodendron tree printer.

Im nächsten Schritt wurden die TrpB2 Sequenzen von *P. torridus*, *S. tokodaii* und *S. solfataricus* erneut aligniert (Abbildung 24). Aus zahlreichen Röntgenkristallstrukturen und Mutationsanalysen ist bekannt, welche Aminosäuren aus *S. typhimurium* TrpB1 sich an der Kontaktfläche zu TrpA befinden bzw. an der Kommunikation der aktiven Zentren beteiligt

sind (Hyde et al. 1988, Lee et al. 2005, Marabotti et al. 2001, Nishio et al. 2005, Raboni et al. 2005) Durch Vorhersage der Strukturen von sTrpA und sTrpB2a (mittels 3D-PSSM: www.sbg.bio.ic.ac.uk) auf der Basis der Röntgenstruktur der Tryptophansynthase aus *S. typhimurium*) und der darauf aufbauenden Modellierung des sTrpA-sTrpB2a Komplexes (mittels Deep View Swiss-Pdb Viewer: <http://www.expasy.org/spdbv/>) wurden Sequenzabschnitte in sTrpB2a identifiziert, die vermutlich an der Kontaktfläche zu sTrpA liegen (hellgraue Felder in Abbildung 24).

```

-----MSBEPKSLSSDIIPENWVWTPDLPPELPPPRDTKS-DPSSINILINKILPKSVLKQEFTRKRYKIPDEIIDKIYIIGRPT 81
-----MVKND-LIPKWNMIIPDLPKPLPPPRDPPDAEFSRIELLKILPKVLRQOFTIERFIKIPPEVRDRYAIIGRPT 75
-----MVKEDILPKWYMIIPDLPKPLPPPRDPPQAYFSRIDLLRSILPKVLRQOFTIERYIKIPPEVRDRYLSIGRPT 76
-----MAMRIRIDLFODEIPAOWNMLPDLPEELPPPODPTGKS--LELLKVLPSKVLELEFAKERYVKIPDEVLELYLQVGRPT 79
MYKRISKTI IKGNNIKYHMLKVRFDLPQDEIPTWYMIIPDLPELPEPODPTGKS--FEILKQVLPKSVLELEFSKERYIKIPPEVLRQYLQVGRPT 97
-----MIRYDLKQSEMPKRWYMIIPDLPEEVPMPDENGEA--MELLKRAVPSKILEHEFSHERYIDIPPEVYBYKYMVMVGRPT 76

* * * * *
PIIRAKNLEKYLDYGGKIFFKFBGATATGSHKINTALAQAYAMNENANGVTTETGAGQWGSATALAAASLYNLKSQIFMVRVSYBQKPLRKVVMSLYNS 181
PLMRAKRLEBYLDTPAKIYFKFBGATPTGSHKINTAVPQAYPAEBGISHVVTETGAGQWGTAVALAASMYDLSSITIFMVRVSYBQKPMRKTIMELYGK 175
PLFRAKRLEBYLKTARIYFKYBEGATPTGSHKINTALPOAYPAKEBEGIEHVVTETGAGQWGTAVALAASMYNKMSTIFMVKVSYBQKPMRRSIMQLYGAN 176
PIIRAKRLEBYLGNNIKIYLMKESYTYTTSBKINSALAHVYPAKLDNAKFVTTETGAGQWGSVALASALFRMKAHIFMVRTSYAKPYRKYMMQWYGA 179
PIIRAKRLEBYLGGYIKIYMKMESHTYTGSHKINSALAHVYPAKLDNAKFVTTETGAGQWGSVALASALFNIOAHIFMVRTSYAKPYRKYMMQWYNAQ 197
PIIRAKRFBEYLGNNIKIYMKMESYTYTTSBKINSALAHVYPAKLDNAKFVSSSETGAGQWGAASVALAALNNIKAHIFMVRTSYAKPYRKYMMQWYGA 176

* * * * *
VVPSPNLTEFRKILSENPHPGTLGIGISEAVYALDHNRYWVASVMNAALTRQSVIGQESI KQWELLGEBFPDVLFGCVGGGSGNFGGFAPFLP IND 281
VYASPTDLTEFRKILKENPNHPGSLGIAMSEAI BPAALNHNFRYLVGSVLDVLLHQSVIGMEAI AQDELGEBEPDILIGCVGGGSGNFGGTYFFIGAKK 275
VYASPTNLTEYGRKILETNPQHPGSLGIAMSEAI BPAALNHNFRYLVGSVLDVLLHQSVIGQETITQLDILGEBDADILIGCVGGGSGNFGGTYFFIGAKK 276
VHPSPSDLTEFRQALLAKDNSHPGSLGIAISDAVEYAHQNGKVVVGSVWNSDIMPKTIAGMEAKKQWELIGEDPDYIIGVWGGGSSNYAALAYPFLGDEL 279
VHPSPSDFTRYGREVLAKDNPNTGSLGIAISEAVYALENGKVVVGSVWNSDILPKTIAGMEAKKQWEMIGEDPDYIIGVWGGGSSNYAALAYPFLGDEL 297
VHPSPSDFTAYGKELLKXDPENPGLGIAISDAMKYALENNCKYIAGSVINADILYKTIAGQEQALLQMKWTGDDPDYIIGVWGGGSSNYAALAYPFLGDEL 276

* * * * *
D-----IBIYATTAQBPVFKSQGEYKYDLMDTAGVLPVAVEMYSLGADFPVPPKIYAGGLRYHGAAPSLSLINHGRIKSDVETBBOVKNAIKTFAANTQGP 376
G-----KKYI AVGA AEIPKFTSGKYEYDYPDTAGLLPLVKMITLGDYVPPPIYAGGLRYHGVAPTL SLLIKKIVWREYKBEIYEA AKIPMKTQGI V 370
G-----KRYI AVSSAEIPKFSKGEYKDFPDSAGLLPLVKMITLGDYVPPPIYAGGLRYHGVAPTL SLLIKKIVWREYKBEIYEA AKIF IENQGI V 371
RSKVRKRYI ASGSSEVPKMTGVKYDYPDTAKLLPMLKMYTIGSDFPVPPVYAGGLRYHGVAPTL SLLIKKIVQARDYSQBEESFKWAKLFSLEGIY 379
RKGKVRKYI ASGAIEVPKMTGVKYDYPDTAKILPMLKMYTIGSDFIPAPVYAGGLRYHGVAPTL SLLIKKIVQARDYSQBEESFAFSWAKLFSQIBG 397
RENNIRKYI AAGSLEVPKMTGVKYDYPDTAGVLPMLKMYTIGADFPVPPVYAGGLRYHGVAPTL SLLIKKIVQARDYSQBEESFKYALQVLFKIEGIY 376

* * * * *
IAPESGHAVATAIKYAREHK--DEKKTLLNVSGHGLLDLSIFSD----- 419
PAPESAHAIKAVIDBALKAKTBKERRVIVFNLSGHGLLDLGNYESIRRRVEK-- 422
PAPESAHAIRAVVDEAIEARKONNERKVI VFNLSGHGLLDLGNYESMMKRLNG 425
PAPETSHALPI LAEIAEBAKSGERKTIVSFGHGLLDLGNYASVLPKE---- 429
PAPETSHALPILKEI VBEAKSGEKKTIVLISFGHGLLDLANYADVLGNKB-- 449
PAPETSHALPILKEIADEAERTHEKKTIVLVSFGHGLLDLANYADALGLK---- 426

```

Abbildung 24: Sequenzalignment der TrpB2a und TrpB2b Proteine aus *P. torridus*, *S. tokodaii* und *S. sulfolobus*.

*: Konservierte Reste; hellgrau: Potentielle Kontaktfläche zu TrpA; dunkelgrau: Insertionen in TrpB2a bzw. TrpB2b; blau: zwischen sTrpB2a und sTrpB2b ausgetauschte Sequenzabschnitte: Glu30-Ile37 / Thr37-Leu40; Lys190-Gln197 / Gln193-Asn200; Asn274-Arg279 / Asp277-Lys287. Das Alignment wurde mit Tcoffee (Poirot et al. 2003) erstellt und in Word nachbearbeitet.

4.4.2 Auswahl der zwischen sTrpB2a und sTrpB2b auszutauschenden Aminosäuren

Innerhalb des potentiellen Kontaktbereiches von sTrpB2a zu sTrpA fallen zwei kurze Sequenzabschnitte auf, in denen sich TrpB2a und TrpB2b Proteine unterscheiden (Abbildung 24). Ein kurzer und weitgehend konservierter Abschnitt im N-terminalen Bereich der TrpB2a Proteine (Phe34-Ser35-Arg36 in sTrpB2a) fehlt in den TrpB2b Proteinen.

In Abbildung 25A ist die Lage dieser drei Aminosäuren an der Interaktionsfläche von sTrpB2a mit sTrpA dargestellt.

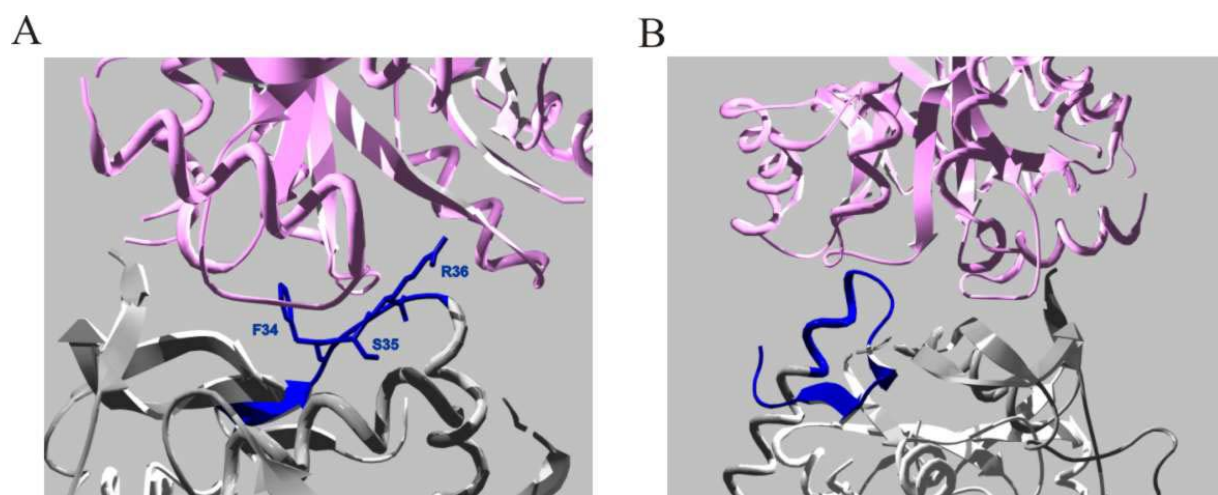


Abbildung 25: Modell der Interaktionsfläche zwischen sTrpB2a (grau) und sTrpA (pink).

Blau markiert sind (A) Rückgrat und Seitenketten des Sequenzabschnittes um Phe34-Ser35-Arg36 aus sTrpB2a und (B) der N-terminale Sequenzbereich aus sTrpB2a (Met1-Leu44), welche gegen die entsprechenden Abschnitte bzw. Bereiche aus sTrpB2b ausgetauscht wurden. (Details finden sich im Text.) Die umgekehrten Austausche wurden ebenfalls durchgeführt. Die Struktur des Komplexes wurde mittels 3D-PSSM und Deep View Swiss-Pdb Viewer auf der Basis der Röntgenstruktur der Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium* modelliert.

Insbesondere die Seitenketten von Phenylalanin 34 und Arginin 36 ragen weit in die Struktur von sTrpA hinein und sollten deshalb für die Komplexbildung von Bedeutung sein. Somit könnte ihre Deletion aus sTrpB2a zu einer Abschwächung bzw. ihre Insertion in sTrpB2b zu einer Förderung der Interaktion mit sTrpA führen. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden die Sequenzabschnitte um die Insertion zwischen sTrpB2a und sTrpB2b durch gezielte Mutagenese wechselseitig ausgetauscht. Um die strukturelle Integrität der Proteine zu erhalten, wurde der substituierte Bereich N- und C-terminal so weit ausgedehnt, dass zwischen sTrpB2a und sTrpB2b ähnliche oder identische Reste mit einbezogen werden konnten. In den resultierenden Varianten sTrpB2a_1 und sTrpB2b_1 sind die Bereiche Glutamin 30 bis Isoleucin 37 aus sTrpB2a bzw. Threonin 37 bis Leucin 40 aus sTrpB2b gegeneinander ausgetauscht (blaue Bereiche in Abbildung 24 und 25). Zusätzlich wurden zwei weitere Varianten sTrpB2a_2 und sTrpB2b_2 erstellt, in denen die gesamten N-terminalen Bereiche von Methionin 1 bis Leucin 44 aus sTrpB2a bzw. Methionin 1 bis Leucin 47 aus sTrpB2b durch einander ersetzt sind (Abbildung 25B).

In den TrpB2b Proteinen findet sich ein teilweise konservierter Sequenzabschnitt (Ser281-Gly282-Lys283-Val284-Arg285 in sTrpB2b), der nun seinerseits den sTrpB2a Proteinen fehlt (Abbildung 24). Allerdings befindet sich die entsprechende Region von sTrpB2a (Asn274 bis Arg279; Abbildung 24) nicht in Nachbarschaft zu sTrpA, sondern im Kernbereich des Proteins innerhalb eines kurzen Loops (Abbildung 26). Dies macht eine direkte Beteiligung an der Wechselwirkung der Untereinheiten eher unwahrscheinlich.

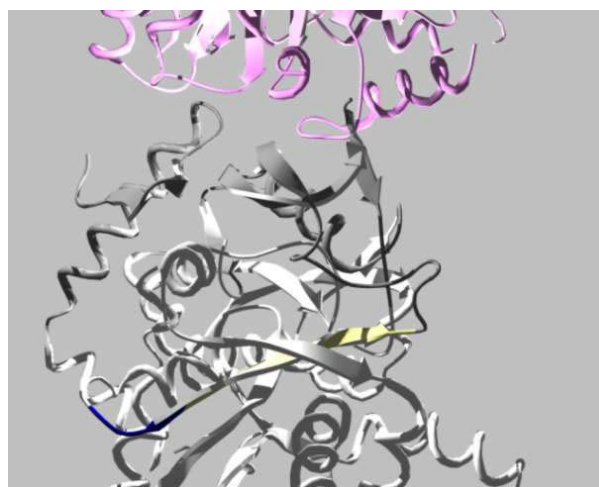


Abbildung 26: Modell des Kernbereichs von sTrpB2a (grau) und der Interaktionsfläche mit sTrpA (pink)

Der blau markierte Bereich in sTrpB2a entspricht dem Sequenzabschnitt Asn274 bis Arg279, in dem sich in sTrpB2b eine Insertion befindet (vgl. Abbildung 24). Das auf diesen Sequenzabschnitt folgende β -Strang ist gelb markiert.

Allerdings folgt auf diese Region ein β -Strang, an den sich ein langer Loop anschließt, der seinerseits wieder Teil der Kontaktfläche zu sTrpA ist (Abbildung 26). Es ist deshalb vorstellbar, dass die Insertion von 5 Aminosäuren in sTrpB2b zu einer weitreichenden Verschiebung des nachfolgenden β -Faltblattes und damit auch zu Veränderungen an der Kontaktfläche führt und damit die Bindung an sTrpA beeinflusst. Um dies zu überprüfen, wurden die Varianten sTrpB2a_3 und sTrpB2b_3 konstruiert, in denen die Aminosäuren Asparagin 274 bis Arginin 279 aus sTrpB2a bzw. Aspartat 277 bis Lysin 287 aus sTrpB2b gegen einander ausgetauscht sind.

Neben der N-terminalen Region wurden zwei weitere Bereiche in TrpB2a als potentielle Kontaktfläche zu sTrpA identifiziert (hellgraue Bereiche in Abb. 24). Innerhalb dieser Bereiche gibt es keine auffälligen strukturellen Unterschiede wie Insertionen oder Deletionen zwischen den TrpB2a und den TrpB2b Proteinen. Deshalb wurde hier die Aminosäurezusammensetzung analysiert im Hinblick auf Reste, die sich in ihren chemischen Eigenschaften unterscheiden.

Im Abschnitt von Threonin 182 bis Glycin 223 in sTrpB2a bzw. Serin 185 bis Glycin 226 in sTrpB2b fallen in diesem Zusammenhang besonders zwei Positionen auf. An Position 194 findet sich in sTrpB2a ein polarer Threoninrest, bei den anderen beiden TrpB2a Proteinen ein negativ geladener Glutamatrest. Im Gegensatz dazu besitzen alle drei TrpB2b Proteine hier einen positiv geladenen Lysinrest. In der benachbarten Position 195 steht bei den TrpB2a Proteine ein konservierter polarer Asparaginrest, während die TrpB2b Proteine hier ein konserviertes Aspartat besitzen (Abbildung 24). Es ist also denkbar, dass in diesem Bereich durch elektrostatische Effekte Wechselwirkungen mit sTrpA begünstigt bzw. erschwert werden. Wie bei den Varianten sTrpB2a_1-3 und sTrpB2b_1-3, wurde auch hier der Bereich um die zu untersuchenden Aminosäuren so erweitert, dass konservierte Sequenzabschnitte erreicht wurden. In sTrpB2a_4 und sTrpB2b_4 wurden demnach die Reste Lysin 190 bis Glutamin 197 aus sTrpB2a bzw. Glutamin 193 bis Asparagin 200 aus sTrpB2b gegeneinander ausgetauscht. Da der gesamte Bereich zwischen Aminosäure 184 und 200 im Modell von sTrpB2a nicht definiert ist, kann die Lage der ausgewählten Reste nicht in einer Strukturabbildung illustriert werden.

Im Abschnitt zwischen Isoleucin 288 und Prolin 323 in sTrpB2a bzw. Valin 296 und Prolin 331 in sTrpB2b konnten keine Positionen identifiziert werden, an denen sich die TrpB2a und TrpB2b Proteine auffällig unterscheiden (Abbildung 24). Aus diesem Grund wurden in dieser Region keine Austausche vorgenommen.

4.5 Klonierung der Mutanten *strpB2a_1-4* und *strpB2b_1-4*

Die Klonierung der Mutanten *strpB2a_1,3,4* und *strpB2b_1,3,4*, bei denen Bereiche innerhalb der Gene ausgetauscht wurden, erfolgte über SOE-PCR (3.3.2.6). Dabei dienten die in pET28a klonierten wildtypischen *strpB2a* und *strpB2b* Gene (4.1.1) als Templat. In Abbildung 27 ist das Prinzip am Beispiel von *strpB2a_1* und *strpB2b_1* dargestellt.

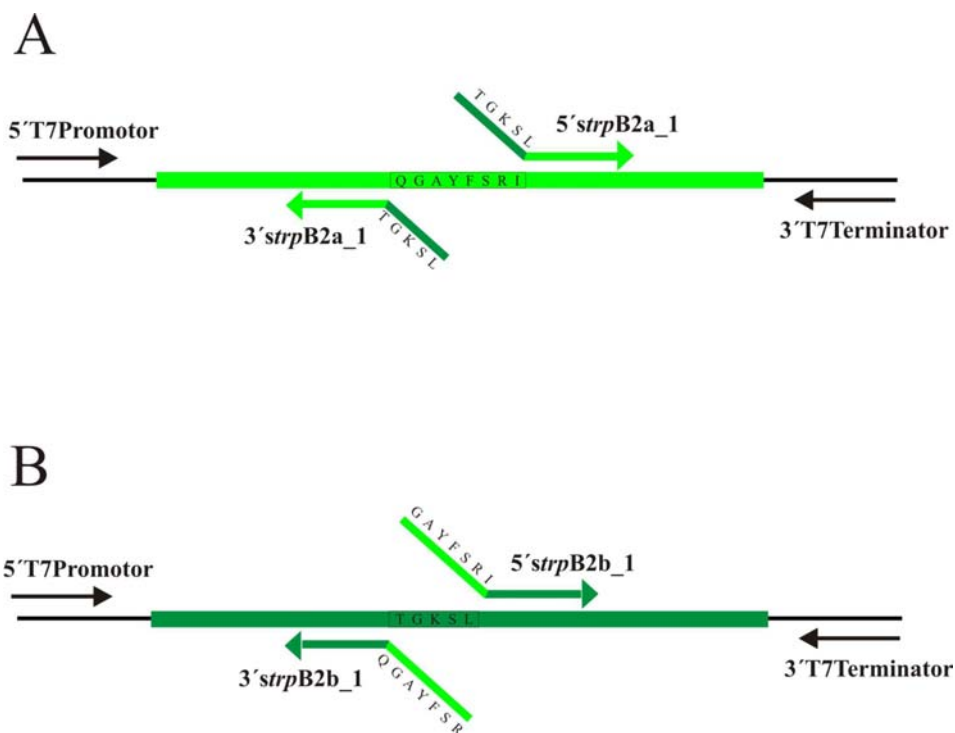


Abbildung 27: Erster Schritt der SOE-PCR für die Erstellung der Varianten (A) *strpB2a_1* und (B) *strpB2b_1*.

Die Abbildung zeigt die wildtypischen Gene mit den auszutauschenden Bereichen und die überlappenden Mutationsprimer mit den einzuführenden Bereichen als translatierte Aminosäuresequenz. Zur Amplifikation der überlappenden Fragmente im ersten PCR-Schritt wurden zusätzlich die gezeigten randständige Primer verwendet.

Zur Herstellung von *strpB2a_1* wurden die Mutationsprimer 5'*strpB2a_1* und 3'*strpB2a_1* verwendet. Sie waren so zusammengesetzt, dass sie zur Hälfte komplementär zur wildtypischen Sequenz *downstream* bzw. *upstream* der auszutauschenden Region waren, während die jeweils andere Hälfte die einzusetzende Sequenz enthielt. Zur Amplifikation der überlappenden Fragmente im ersten PCR-Schritt wurden als weitere Primer die randständigen Oligonukleotide 3'T7Terminator bzw. 5'T7Promotor verwendet. Im zweiten Schritt wurde mit den überlappenden Fragmenten als Matrize für die Oligonukleotide 5'T7Promotor und 3'T7Terminator das Gesamtlängenprodukt amplifiziert. Bei der Herstellung von *strpB2b* wurde entsprechend verfahren, wobei im ersten PCR-Schritt die Mutationsprimer 5'*strpB2b_1* und 3'*strpB2b_1*, sowie die randständigen Oligonukleotide 3'T7Terminator bzw. 5'T7Promotor verwendet wurden. Das Gesamtlängenprodukt wurde wiederum mit den überlappenden Fragmenten als Matrize für die Primer 3'T7Terminator bzw. 5'T7Promotor hergestellt. Analog wurden für die Klonierung von *strpB2a_3* und *strpB2a_4* bzw. *strpB2b_3* und *strpB2b_4* die Mutationsprimer 5'- und 3' *strpB2a_3*, *strpB2a_4*, *strpB2b_3* und *strpB2b_4* eingesetzt, zusammen mit den oben genannten randständigen Primern. Diese wurden auch wiederum zur Amplifikation der Gesamtlängenprodukte verwendet.

Die *strpB2a* Varianten wurden über die Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den pET21a Vektor kloniert. Dadurch wird bei der Expression ein Hexahistidin-Tag unmittelbar an den C-Terminus des Proteins angehängt, der zur Reinigung mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie genutzt werden kann. Alle *strpB2b* Varianten wurden über die Schnittstellen *NdeI* und *HindIII* in den pET28a Vektor kloniert. Dadurch wird bei der Expression ein N-terminaler Hexahistidin-Tag angefügt, der nach der Reinigung proteolytisch abgespalten werden kann. Die eingeführten Basenaustausche wurden nach den Klonierungen durch vollständige Sequenzierung der Gene verifiziert.

Die Klonierung von *strpB2a_2* und *strpB2b_2*, bei denen der 5'-seitige Bereich ausgetauscht wurde, erfolgte ebenfalls über SOE-PCR (3.3.2.6). In Abbildung 28 ist das Prinzip exemplarisch für *strpB2a_2* gezeigt.

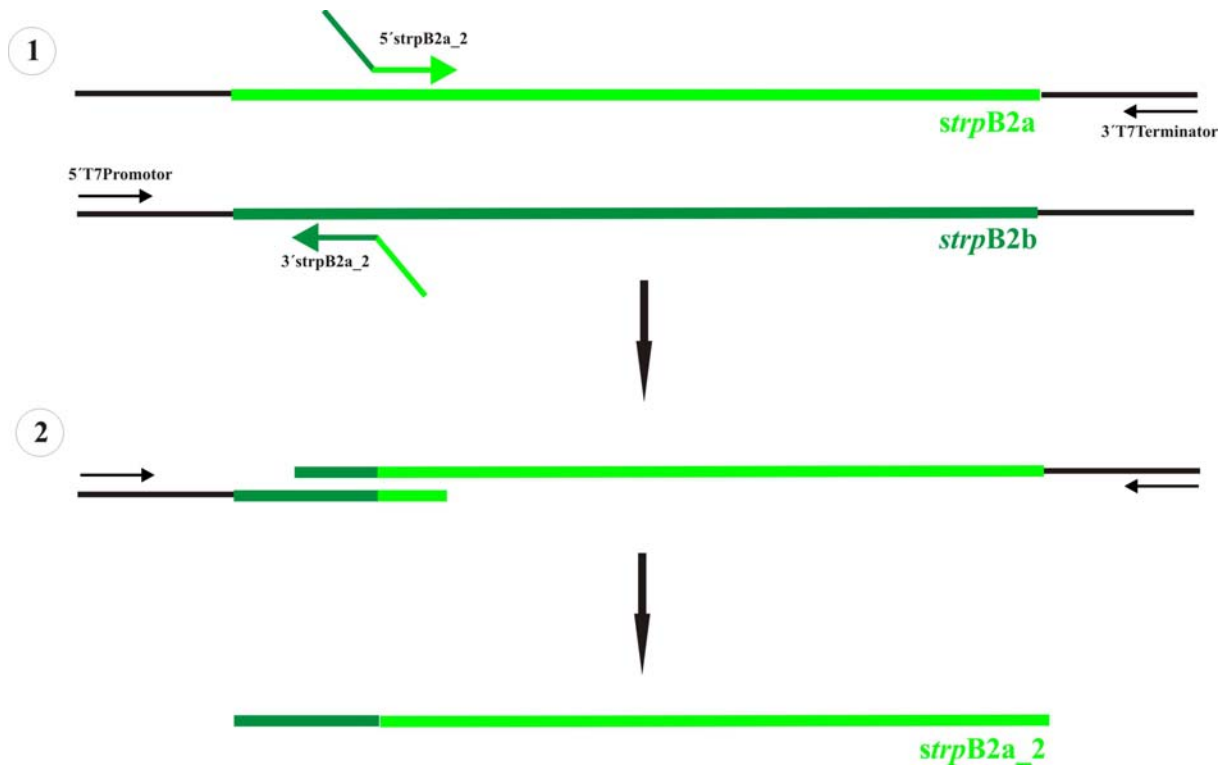


Abbildung 28: Schema der Klonierung von *strpB2a_2* mittels SOE-PCR

Im ersten Schritt wurden in zwei getrennten PCR-Ansätzen die sich überlappenden Fragmente amplifiziert. Dabei diente in einem Ansatz in pET21a kloniertes *strpB2a* (3.1.1) als Matrize für die Oligonukleotide 5'*strpB2a_2* und 3'T7Terminator. Im zweiten Ansatz diente in pET28a kloniertes *strpB2b* (3.1.1) als Matrize für die Oligonukleotide 5'T7Promotor und 3'*strpB2a_2*. Im zweiten Schritt wurde das Vollängenprodukt amplifiziert, wobei die überlappenden Fragmente als Matrize für die Oligonukleotide 5'T7Promotor und 3'T7Terminator dienten. Bei der Klonierung von *strpB2a_2* wurde in anloger Weise verfahren, wobei in pET28a(+) kloniertes *strpB2b* (3.1.1) als Matrize für die Oligonukleotide 5'*strpB2b_2* und 3'T7Terminator diente. Im zweiten Ansatz diente in pET21a(+) kloniertes *strpB2a* (3.1.1) als Matrize für die Oligonukleotide 5'T7Promotor und 3'*strpB2b_2*. Im zweiten Schritt wurde das Vollängenprodukt amplifiziert, wobei die überlappenden Fragmente als Matrize für die Oligonukleotide 5'T7Promotor und 3'T7Terminator dienten. Die Variante *strpB2a_2* wurde mittels der Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den pET21a Vektor kloniert, die Variante *strpB2b_2* mittels *NdeI* und *HindIII* in den pET28a Vektor. Die eingeführten Basenaustausche wurden nach den Klonierungen durch vollständige Sequenzierung der Gene verifiziert.

4.6 Heterologe Expression der klonierten Varianten und Reinigung der Proteinprodukte

Zur Herstellung der Varianten wurden *E. coli* BL21 C+ Zellen mit den verschiedenen Konstrukten transformiert, in LB-Medium mit Ampicillin (pET21a_ *strpB2a*_1-4) bzw. Kanamycin (pET28a_ *strpB2b*_1-4) und Chloramphenicol angezogen, und nach Induktion der Genexpression mit 0,5 – 1 mM IPTG über Nacht bei 37 °C inkubiert. Entsprechend den wildtypischen Proteinen, wurden die sTrpB2a Varianten zu etwa 95% und die sTrpB2b Varianten, bis auf sTrpB2b_3, zu etwa 30% in unlöslicher Form hergestellt. Die Reinigung erfolgte jedoch, wie auch für sTrpB2a (4.1.3) und sTrpB2b (4.1.4), aus dem löslichen Teil des Zellextraktes (3.3.3.2). Zunächst wurde wiederum ein 20minütiger Hitzeschritt bei 65°C (sTrpB2a Varianten) bzw. 75°C (sTrpB2b Varianten) durchgeführt. Daran schloss sich jeweils eine Metallchelate-Affinitätschromatographie (POROS MC/20 Säule; 3.3.3.3) an, bei der der C-terminale (sTrpB2a Varianten) bzw. der N-terminale His-Tag (sTrpB2b Varianten) zur Anreicherung der rekombinanten Proteine genutzt wurde.

Im Falle der sTrpB2b Varianten wurde der His-tag durch Thrombin abgespalten (3.3.3.6) und zusammen mit der Protease über einen Anionenaustauscher (MonoQ, 3.3.3.5) entfernt. Nach Dialyse gegen 10 mM KP pH 7,5 bei 4 °C über Nacht wurden alle sTrpB2b Varianten einkonzentriert, in flüssigen Stickstoff eingetropfelt und bei – 80 °C gelagert.

Obwohl sTrpB2a_2 in großer Menge in unlöslicher Form produziert wurde, konnte das Protein in keiner der Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie detektiert werden. Möglicherweise haben die Aminosäuresubstitutionen in dieser Variante die Löslichkeit so weit verringert, dass praktisch das gesamte hergestellte Protein in Form von *inclusion bodies* anfällt. Zur Gewinnung von sTrpB2a mussten diese in chaotropem Detergenz gelöst und das Protein anschliessend rückgefaltet werden. Da diesbezügliche Versuche mit wildtypischem sTrpB2a fehlschlagen (Daten nicht gezeigt), wurde die Rückfaltung von sTrpB2a_2 im Rahmen dieser Arbeit nicht versucht. Die Varianten sTrpB2a_1 und sTrpB2a_3 wurden nach Entfernung des Imidazols mittels Dialyse gegen 10 mM KP pH 7,5 bei 4 °C üN über eine zweite Metallchelate-Affinitätschromatographie (HisTrap Säule; 3.3.3.3) weiter aufgereinigt. Im Falle von sTrpB2a_4 bestand der abschließende Anreicherungsschritt aus einer Anionenaustauschchromatographie (MonoQ; 3.3.3.5). Nach Dialyse gegen 10 mM KP pH 7,5 bei 4 °C über Nacht wurden sTrpB2a_1,_3,_4 einkonzentriert, und entweder direkt vermessen (sTrpB2a_1) oder zunächst in flüssigen Stickstoff eingetropfelt und bei -80 °C gelagert (sTrpB2a_3,_4).

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Ausbeuten der verschiedenen Varianten und die erreichten Endkonzentrationen.

Tabelle 13: Übersicht über die Ausbeuten und Konzentrationen der gereinigten sTrpB2a und sTrpB2b Varianten.

Proteinvariante	sTrpB2a				sTrpB2b			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Ausbeute [mg] pro 1 l Bakterienkultur	0,14	-	0,075	0,056	1,4	1	0,012	1,9
Konzentration direkt nach der Reinigung [mg/ml]	0,36	-	0,25	0,16	2	1,24	0,24	1,1

Die Ausbeuten der sTrpB2a Varianten lagen im Bereich des wildtypischen sTrpB2a Proteins, von dem zwischen 0,03 und 0,16 mg pro 1 l Bakterienkultur gewonnen werden konnten (4.1.3). Die Ausbeuten der sTrpB2b Varianten waren dagegen deutlich geringer als beim wildtypischen sTrpB2b Protein, von dem zwischen 6 und 9 mg pro 1 l Bakterienkultur angereichert wurden (4.1.4). Vermutlich haben die Aminosäureaustausche zu einer geringeren Löslichkeit und/oder Stabilität geführt, weswegen sich weniger rekombinantes Protein im löslichen Zellextrakt befand und/oder ein größerer Teil davon im Hitzeschritt denaturiert und ausgefällt wurde. Besonders niedrig ist die Ausbeute für die Variante sTrpB2b_3, von der nur 0,012 mg aus 1 l Bakterienkultur gewonnen werden konnten und die sich nur bis zu einer Konzentration von 0,24 mg/ml einengen ließ.

Abbildung 29 zeigt die Analyse der gereinigten Varianten mittels SDS-PAGE. Die Variante sTrpB2a_1 wurde direkt nach der Reinigung aufgetragen, die Varianten sTrpB2a_3 und _4 und alle gezeigten sTrpB2b Varianten dagegen nach Lagerung bei -80°C.

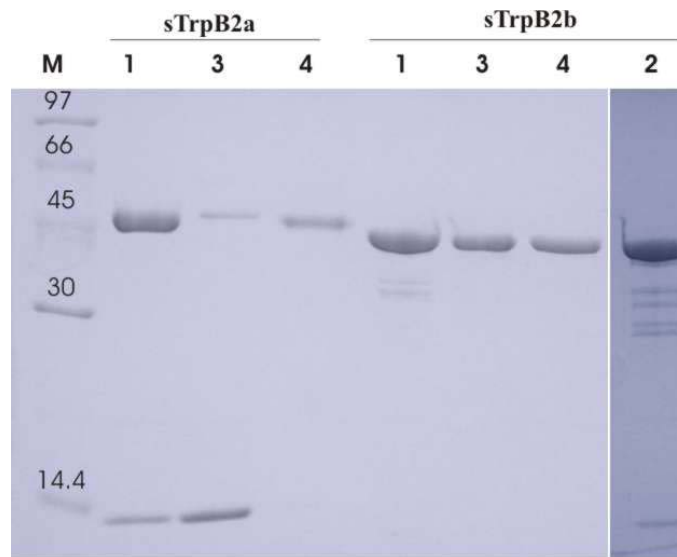


Abbildung 29: Reinheitsgrad der angereicherten Varianten sTrpB2a_1, _3, _4 und sTrpB2b_1, _2, _3, _4, dokumentiert über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid).

M: Low Molecular Weight Marker mit Molekulargewichten M_R in kDa. Aufgetragenes Volumen: sTrpB2a_1, _3_4: je 20 μ l; sTrpB2b_1: 3 μ l, sTrpB2b_3: 20 μ l; sTrpB2b_4: 3 μ l; sTrpB2b_2: 5 μ l. Das berechnete Molekulargewichte für die Monomere der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten betragen ca. 48,4 bzw. 47,7 kDa.

Das Gel belegt, dass die aufgereinigten sTrpB2b Varianten auch nach Lagerung bei -80°C als homogene Proteine vorliegen. Dagegen enthält die Probe mit sTrpB2a_1 etwa 10% und die Probe mit sTrpB2a_3 sogar etwa 70% eines Fremdproteins von weniger als 14 kDa, das durch die His-Trap Säule nicht abgetrennt wurde. Die im Falle von sTrpB2a_4 durchgeführte Anionenaustauschchromatographie führte dagegen zur Entfernung dieser Verunreinigung. Auffallend ist auch, dass sTrpB2a_1 in einer wesentlich größeren Menge vorhanden ist als sTrpB2a_3 und sTrpB2a_4, obwohl in allen Fällen das gleiche Volumen aufgetragen wurde und die drei Proteine unmittelbar nach der Reinigung in vergleichbaren Konzentrationen vorlagen (Tabelle 13). Man muss deshalb davon ausgehen, dass wesentliche Anteile der sTrpB2a_3 und sTrpB2a_4 Proteine während des Einfrierens und Auftauens abgebaut wurden.

4.7 Spektroskopische Charakterisierung der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten

Zur Überprüfung der Reinheit und der Tertiärstruktur der Varianten wurden Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen. Das Maximum und Minimum der Absorptionsspektren lag jeweils bei etwa 280 nm und 250 nm, der Wert des Quotienten $OD_{280/260}$ war stets größer als 1,8 und bei Wellenlängen oberhalb von 300 nm wurde keine wesentliche Absorption beobachtet (Daten nicht gezeigt). Daraus folgt, dass die Proteinproben keine größeren Mengen an Aggregaten oder Verunreinigungen mit Nucleinsäuren enthielten.

Außer für die Varianten sTrpB2a_3 und sTrpB2a_4, die nach dem Auftauen in zu geringer Menge vorlagen (Abbildung 29), wurden Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 280 nm und 295 nm aufgenommen. In Tabelle 14 sind die ermittelten Emissionsmaxima zusammengestellt.

Tabelle 14: Maxima der Fluoreszenzemissionsspektren der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten im Vergleich zu den wildtypischen Proteinen.

	Maxima der Fluoreszenzemissionsspektren [nm] nach Anregung bei	
	280 nm	295 nm
sTrpB2a	328	331
sTrpB2a_1	329	329
sTrpB2b	327	327
sTrpB2b_1	325	331
sTrpB2b_2	325	329
sTrpB2b_3	325	331
sTrpB2b_4	324	329

Messbedingungen: 5 μ M (aktive Zentren) Protein in 10 mM KP Puffer pH 7,5 bei 25 °C. Die angegebenen Werte sind das Mittel der Maxima aus 10 Spektren.

Die Emissionsmaxima der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten sind im Rahmen der Messgenauigkeit (± 2 nm) identisch mit denen der wildtypischen Proteine. Dies bedeutet, dass die Aminosäuresubstitutionen keinen wesentlichen Einfluss auf die Umgebung der

Tryptophane und somit auf die Tertiärstruktur der Enzyme haben. Da die Absorptionsspektren von sTrpB2a_3 und _4 keine Hinweise auf Aggregation lieferten und die Fähigkeit zur Katalyse der B-Reaktion erhalten blieb (siehe 4.8.1), sollten auch die Strukturen dieser Proteine durch die eingeführten Austausche nicht wesentlich verändert worden sein.

4.8 Steady-state enzymkinetische Charakterisierung

4.8.1 B-Reaktion der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten

Die B-Reaktion der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten wurde bei 60°C und 80°C verfolgt (3.3.4.8.2). Im Gegensatz zu den Messungen mit den wildtypischen Proteinen (4.3.4) wurden jedoch nur Sättigungskurven für Serin und nicht zusätzlich solche für Indol aufgenommen. Die aus den Messungen abgeleiteten Werte für die steady-state enzymkinetischen Parameter sind in Tabelle 15 zusammen mit den Werten der wildtypischen Enzyme (aus Tabelle 11 in 4.3.4) aufgelistet.

Tabelle 15: Steady-state enzymkinetische Parameter (B-Reaktion) der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten im Vergleich mit den wildtypischen Proteinen.

Protein	Temperatur	k_{cat} [s ⁻¹]	K_M^{Serin} [mM]	k_{cat}/K_M^{Serin} [mM ⁻¹ s ⁻¹]
sTrpB2a ^a	60 °C	0,2	35	0,006
sTrpB2a_1 ^b	60 °C	0,15	46	0,003
sTrpB2a ^a	80 °C	1,4	54	0,26
sTrpB2a_3 ^c	80 °C	0,72	n.d.	n.d.
sTrpB2a_4 ^c	80 °C	0,81	n.d.	n.d.
sTrpB2b ^d	60 °C	0,026/0.038	151	0,00017
sTrpB2b_1 ^d	60 °C	0,06	1234	0,00005
sTrpB2b_2 ^d	60 °C	0,025	141	0,0002
sTrpB2b_3 ^e	60 °C	0,08	150	0,0005
sTrpB2b_4 ^f	60 °C	0,06	392	0,0002

Reaktionsbedingungen: 100 mM KP Puffer pH 7,5, mit 180 mM KCl und 40 μ M Pyridoxal 5'-phosphat, 200 μ M Indol (sättigend). Konzentrationen der Proteine (in aktiven Zentren): ^a 0,76 μ M sTrpB2a; ^b 0,5 μ M sTrpB2a_1; ^c 0,25 μ M sTrpB2a_3 bzw. sTrpB2a_4; ^d 4 μ M sTrpB2b, sTrpB2b_1, sTrpB2b_2; ^e 0,25 μ M sTrpB2b_3; ^f 1 μ M sTrpB2b_4.

Wegen der geringen Menge an vorhandenem Protein, wurde für sTrpB2a_3 und _4 jeweils nur eine Umsatzkurve unter Vollsättigung mit Serin und Indol aufgenommen. Damit konnten zumindest die k_{cat} -Werte dieser Varianten ermittelt werden.

Die Wechselzahlen der sTrpB2a und der sTrpB2b Varianten unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der wildtypischen Enzyme. Gleiches gilt für die Michaelis-Konstanten für Serin, sieht man von den etwa 8- bzw. 2,5-fach erhöhten Werten von sTrpB2B_1 und sTrpB2b_4 ab. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der Fluoreszenzspektren, wonach die Aminosäuresubstitutionen zu keinen wesentlichen Änderungen der Proteinstruktur geführt haben.

4.8.2 A-Reaktion von sTrpA in Anwesenheit der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die eingeführten Aminosäureaustausche die Komplexbildung mit sTrpA beeinflussen. Dazu wurde die Aktivität von sTrpA in Gegenwart der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten untersucht. Da die Aktivierung von sTrpA durch sTrpB2a vor allem über die Erhöhung des k_{cat} -Wertes erfolgt und am stärksten in Gegenwart von Serin ausgeprägt ist (Tabelle 10 in 4.3.1), wurden die Messungen in Gegenwart sättigender Konzentrationen an IGP (1 mM) und hoher Konzentrationen an Serin (2 M) durchgeführt. In Tabelle 16 sind die ermittelten Wechselzahlen und die daraus abgeleiteten Aktivierungsfaktoren aufgelistet. Die Wechselzahl von sTrpA wird durch die sTrpB2b Varianten ebenso wenig beeinflusst wie durch wildtypisches sTrpB2b. In analoger Weise wird sTrpA durch sTrpB2a_4 genauso stark aktiviert wie durch wildtypisches sTrpB2a. Dagegen fällt die Erhöhung der Wechselzahl von sTrpA durch sTrpB2a_1 und sTrpB2a_3 um etwa den Faktor 3 bzw. 2 niedriger aus: Diese Beobachtung könnte zum einen auf eine Abschwächung der funktionalen Koppelung zwischen den Untereinheiten zurückgehen. In diesem Fall sollte die Aktivierung auch durch höhere Konzentrationen der sTrpB2a Varianten nicht gesteigert werden können. Alternativ könnte der physikalische Kontakt zwischen den

Untereinheiten abgeschwächt sein, was einer Erhöhung des K_d -Wertes für die Komplexbildung entspräche.

Tabelle 16: Wechselzahlen von sTrpA in Gegenwart der sTrpB2a und sTrpB2b Varianten bei 60 °C

Protein	k_{cat} [s^{-1}]	Aktivierung
sTrpA ^a	0,0007	
sTrpA + sTrpB2a ^b	0,08	114 x
sTrpA + sTrpB2a_1 ^b	0,03	43 x
sTrpA + sTrpB2a_3 ^c	0,04	57 x
sTrpA + sTrpB2a_4 ^b	0,08	114 x
sTrpA + sTrpB2b ^b	0,0007	1 x
sTrpA + sTrpB2b_1 ^d	0,0008	1,1 x
sTrpA + sTrpB2b_2 ^b	0,0005	0,7 x
sTrpA + sTrpB2b_3 ^b	0,0006	0,9 x
sTrpA + sTrpB2b_4 ^b	0,0006	0,9 x

Reaktionsbedingungen: 100 mM EPPS/KOH pH 7,5 mit 180 mM KCl und 40 μ M Pyridoxal 5'-phosphat, 6 mM NAD^+ , 5,5 μ M tmGAPDH, 1 mM IGP und 2 M Serin.

^a 14 μ M sTrpA; ^b 0,5 μ M (aktive Zentren) B-Protein plus 10 μ M sTrpA; ^c 0,15 μ M (aktive Zentren) sTrpB2a_3 plus 10 μ M sTrpA; ^d 10 μ M (aktive Zentren) sTrpB2b_1 plus 0,5 μ M sTrpA.

Um den K_d -Wert abschätzen zu können, wurden - in Anwesenheit sättigender Konzentrationen an IGP und Serin - zu einer konstanten Menge an sTrpB2a_1 bzw. sTrpB2a_3 zunehmend höhere Konzentrationen an sTrpA zutitriert. Als Maß für die Menge an gebildetem Komplex diente, wie bei der Titration von wildtypischem sTrpB2a mit sTrpA beschrieben (Abbildung 21A in 4.3.3), die gemessene A-Aktivität. Diese wurde wiederum um die (sehr niedrige) Aktivität von überschüssigem sTrpA korrigiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

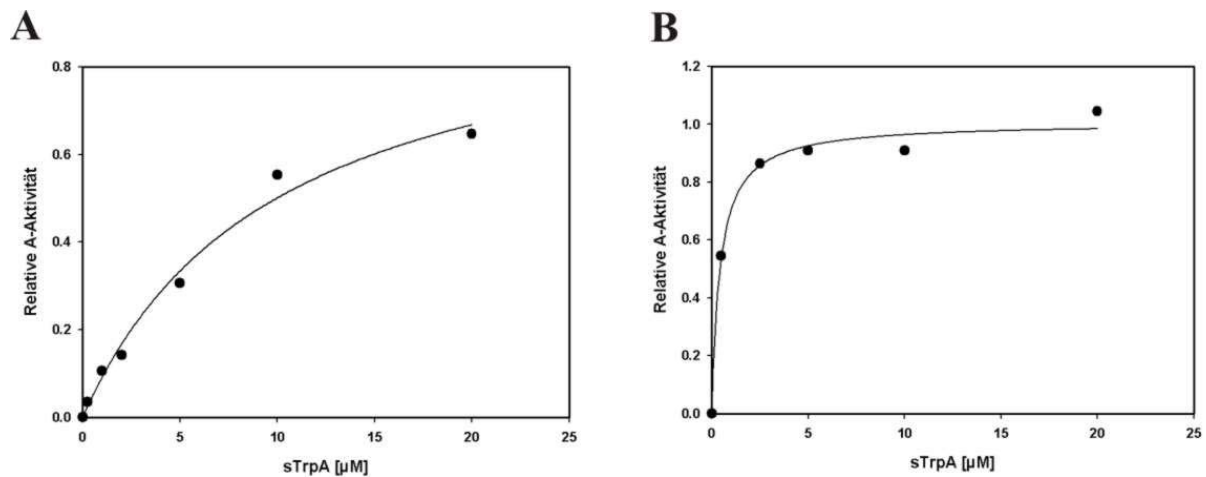


Abbildung 30: Titration von (A) sTrpB2a_1 und (B) sTrpB2a_3 mit sTrpA

Zu (A) 0,5 µM (aktive Zentren) sTrpB2a_1 und (B) 0,15 µM (aktive Zentren) sTrpB2a_3 wurden jeweils ansteigende Konzentrationen an sTrpA pipettiert und anschließend die A-Reaktion gemessen.

Reaktionsbedingungen: 100 mM EPPS/KOH pH 7,5 bei 60°C mit 180 mM KCl und 40 µM Pyridoxal 5'-phosphat, 6 mM NAD⁺, 5,5 µM tmGAPDH, 1 mM IGP, 2 M Serin.

Beide Bindungskurven konnten mit einer hyperbolischen Funktion gefittet werden. Die daraus ermittelten K_d -Werte für die Komplexbildung mit sTrpA lagen für sTrpB2a_1 bei 10 µM und für sTrpB2a_3 bei 0,43 µM. Der auf identische Weise ermittelte K_d -Wert für die Komplexbildung zwischen wildtypischem sTrpB2a und sTrpA liegt bei 0,28 µM (Abbildung 21 in 4.3.3).

Dies bedeutet, dass die abgeschwächte Aktivierung von sTrpA durch sTrpB2a_3 nicht auf eine Abschwächung der physikalischen Wechselwirkung, sondern auf eine Beeinträchtigung der funktionellen Interaktion zurückgehen muss. Dies wird durch die Beobachtung belegt, dass die maximale sTrpA Aktivität in Anwesenheit von 0,15 µM sTrpB2a_3 mit 19,4 nM/s um den Faktor 7 niedriger liegt als in Anwesenheit von 0,5 µM sTrpB2a, wo 132 nM/s ermittelt wurden. Bei gleich starker Aktivierung dürfte die maximale Umsatzrate nur proportional zu Konzentration, d.h. 3,3fach niedriger liegen.

Dagegen ist die physikalische Interaktion zwischen sTrpB2a_1 und sTrpA etwa 36fach schwächer als zwischen sTrpB2a und sTrpA. Zudem scheint die funktionale Koppelung beeinträchtigt zu sein, da die maximale Umsatzrate bei gleicher Konzentration (0,5 µM) von sTrpB2a und sTrpB2a_1 für die Variante mit 75 nM/s etwa 1,8-fach unter der des wildtypischen Enzyms mit 132 nM/s liegt.

4.9 Nachweis von tmTrpB2 in *T. maritima* Zellextrakten

Das Vorkommen von TrpB2 Proteinen in hauptsächlich thermophilen oder hyperthermophilen Prokaryoten lässt auf eine Funktion im Zusammenhang mit dieser extremen Lebensweise schließen. Als Indol-Rettungsprotein könnte tmTrpB2 z.B. aus dem Tunnel der Tryptophan Synthese entweichendes Indol abfangen und zu Tryptophan umsetzen (2.5.1).

Vorraussetzung für eine Funktion innerhalb der Zelle ist die Expression des entsprechenden Gens und die Translation in ein stabiles Protein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels Western-Blotting untersucht, ob tmTrpB2 und zum Vergleich tmTrpB1 in *T. maritima* unter verschiedenen physiologischen Bedingungen exprimiert wird. Dazu wurden *T. maritima* Zellen in Vollmedium bei 85 ° (a) und in Minimalmedium bei 85 °C (b), 75 °C (c) und 65 °C (d) gezogen (Durchgeführt von Dr. H. Huber, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg). Nach der Zellernte wurden die resultierenden Zellpellets bei -80 °C gelagert.

Für die Western-Blot Analyse wurden von (a) 13 mg Zellen in 880 µl PBS, (b) 46 mg Zellen in 930 µl PBS, (c) 74 mg Zellen in 500 µl PBS und von (c) 85 mg Zellen in 860 µl PBS resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte durch Sonifikation (Branson Digital Sonifier, Model W-250 D, 3 x 30 sec, Amplitude 25 %). Anschließend wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt, aufgekocht und zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über SDS-PAGE (3.3.4.2). Abbildung 31 zeigt das Ergebnis der anschließenden Western Blot Analyse (3.3.4.3).

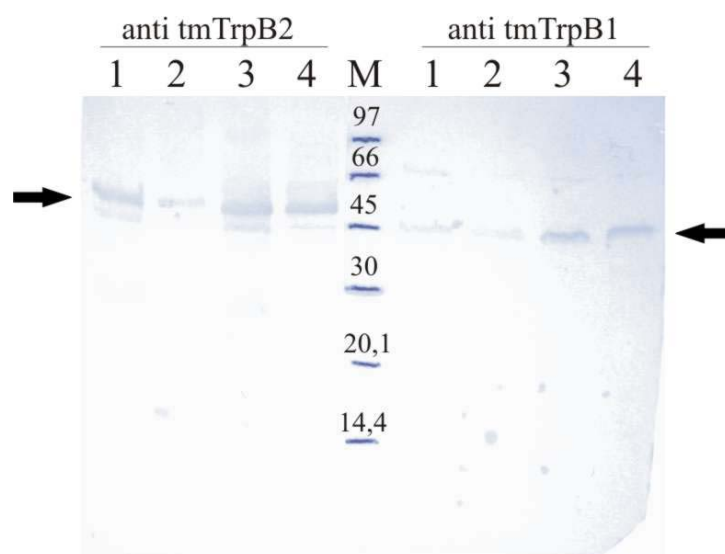


Abbildung 31: Western-Blot von *T. maritima* Zellextrakten mit anti_TrpB2 (links) und anti_TrpB1 (rechts) Antikörpern

1: Zellen gezogen bei 85 °C in Vollmedium, 2: Zellen gezogen bei 85 °C in Minimalmedium, 3: Zellen gezogen bei 75 °C in Minimalmedium, 4: Zellen gezogen bei 65 °C in Minimalmedium. Aufgetragene Mengen: 1: 20µl, 2: 20 µl, 3: 5µl, 4: 10 µl. Pfeile markieren die tmTrpB2, bzw. tmTrpB1 Banden. M: Low Molecular Weight Marker

Die Abbildung zeigt, dass tmTrpB2 und tmTrpB1 unter allen untersuchten Bedingungen synthetisiert wurden. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass tmTrpB2 eine funktionelle Bedeutung in *T. maritima* hat. In Vollmedium (Probe 1, Abbildung 31) sollte das *trp*-Operon reprimiert sein. Trotzdem konnte tmTrpB1 auch unter diesen Bedingungen eindeutig nachgewiesen werden. Außerdem scheinen sowohl tmTrpB1 wie tmTrpB2 bei 75 °C und 65 °C in vergleichbarer Menge hergestellt zu werden wie bei 85 °C, was die Hypothese von TrpB2 als Indol-Rettungsprotein (Hettwer & Sterner 2002) nicht unterstützen würde. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass eine definitive Aussage über die Mengenverhältnisse erst nach genauer Quantifizierung und Normierung der geblotteten Proteinmenge auf z.B. die Zellzahl erfolgen kann.

5 Diskussion

5.1 Die Tryptophan Synthase als Modell für Protein-Protein Interaktionen in Multienzymkomplexen

Die Tryptophan Synthase stellt ein Modellsystem zur Untersuchung funktioneller und struktureller Wechselwirkungen in Multienzymkomplexen dar. Seit den späten 50er Jahren wurde am Enzym aus *E. coli* die Komplexbildung studiert, die Mechanismen der A- und B-Teilreaktionen und ihrer Koordination charakterisiert, sowie die zugrunde liegenden Konformationsänderungen untersucht (Crawford & Yanofsky 1958, Goldberg & Baldwin 1967, Marabotti et al. 2001, Miles 1979, Miles 1991, Raboni et al. 2005). Die Aufklärung der Röntgenstruktur der $\alpha\beta\alpha$ -Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium* (Hyde et al. 1988) leistete einen entscheidenden Beitrag zur Identifizierung katalytisch essentieller Reste und zur Deutung einer Besonderheit, die bei diesem Enzym erstmals entdeckt wurde, dem molekularen *channeling* von Intermediaten. In der Tryptophan Synthase diffundiert das Produkt der A-Reaktion, Indol, direkt durch einen von hydrophoben Resten ausgekleideten Tunnel zum aktiven Zentrum von TrpB (Anderson et al. 1991, Dunn et al. 1990). Die jüngst erfolgte Aufklärung der Strukturen der isolierten α -Monomere (Asada et al., Nishio et al. 2005) und $\beta\beta$ -Dimere (Hioki et al. 2004), sowie des $\alpha\beta\alpha$ Komplexes aus *Pyrococcus furiosus* (Lee et al. 2005) lieferte neue Hinweise auf die mit der Komplexbildung verbundenen Konformationsänderungen in den Untereinheiten. Aufgrund seiner „prominenten“ $(\beta\alpha)_8$ -barrel Faltung ist TrpA zusätzlich in den letzten Jahren zu einem Modell für die Untersuchung von Proteinfaltungsmechanismen geworden (Beasty & Matthews 1985), (Wintrode et al. 2005, Wu et al. 2005).

5.2 Neuartige Tryptophan Synthase -Untereinheiten aus Hyperthermophilen: Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen *T. maritima* und *S. solfataricus*

Einen neuen Aspekt im Bezug auf das Vorkommen von und die Komplexbildung in Tryptophan Synthasen erbrachte die vollständige Sequenzierung von Genomen hyperthermophiler Prokaryoten. Es zeigte sich, dass ein großer Teil dieser Organismen neben der im *trp*-Operon kodierten β -Untereinheit (TrpB1) ein Gen außerhalb des Operons enthält, das für eine weitere β -Untereinheit (TrpB2) kodiert. Für das hyperthermophile Bakterium *Thermotoga maritima* konnte gezeigt werden, dass rekombinant hergestelltes tmTrpB2 zwar in der Lage ist, die natürliche B-Reaktion mit vergleichbarer Effizienz wie tmTrpB1 zu katalysieren, aber im Gegensatz zu diesem keinen nachweisbaren $\alpha\beta\beta\alpha$ Komplex mit tmTrpA bildet (Hettwer & Sterner 2002). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen mehrerer TrpB1 und TrpB2 Proteine deckte charakteristische Unterschiede auf, durch die ein TrpB-Protein eindeutig einer der beiden Gruppen zugeordnet werden kann (Abbildung 6). Dies sind eine N-terminale Extension von 26 Aminosäuren und zwei kleinere Insertionen von 5 bzw. 10 Aminosäuren (jeweils für tmTrpB2 im Vergleich zu tmTrpB1). Die Projektion der Aminosäuresequenz auf die Struktur der Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium* zeigte, dass diese zusätzlichen Sequenzabschnitte im Bereich der Kontaktfläche zu TrpA liegen. Es lag die Vermutung nahe, dass eine Interaktion zwischen tmTrpA und tmTrpB2 durch diese zusätzlichen Aminosäuren verhindert wird (Hettwer & Sterner 2002).

Auch das hyperthermophile Archaeon *Sulfolobus solfataricus* aus der Gruppe der Crenarchaeota kodiert für zwei verschiedene β -Untereinheiten, die jedoch beide im Bezug auf die Aminosäuresequenz zur TrpB2 Gruppe gehören. Damit stellte sich die Frage, ob *S. solfataricus* keinen herkömmlichen $\alpha\beta\beta\alpha$ Tryptophan Synthase Komplex besitzt oder, entgegen der oben aufgestellten Hypothese, auch Proteine aus der TrpB2 Sequenzfamilie mit TrpA assoziieren können. Zur Klärung dieser Frage wurden in der vorliegenden Arbeit die Enzyme sTrpA, sTrpB2a (im Operon kodiert) und sTrpB2b (außerhalb des Operons kodiert) als rekombinante Proteine in *E. coli* hergestellt, gereinigt und, teilweise im Vergleich zu tmTrpA und tmTrpB2, charakterisiert.

5.3 Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2a im Vergleich zu Tryptophan Synthasen aus TrpA und TrpB1 Untereinheiten

Steady-state Enzymkinetik zeigte, dass die Aktivität von sTrpA durch sTrpB2a stark erhöht, dagegen durch die Anwesenheit sTrpB2b nicht beeinflusst wird (Tabelle 10). Eine Aktivierung setzt notwendigerweise eine physikalische Interaktion der beiden Untereinheiten voraus, die jedoch mittels analytischer Gelfiltration nicht (Abbildung 18) und mittels analytischer Ultrazentrifugation nicht eindeutig (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden konnte. Dagegen sind die [TrpA-TrpB1]₂ Komplexe aus *T. maritima* (Hettwer & Sterner 2002) und *E. coli* (Daten nicht gezeigt) mit diesen Methoden zweifelsfrei nachweisbar. Die experimentellen Bedingungen beim Test der Enzymaktivität und bei der analytischen Gelfiltration unterschieden sich in drei wesentlichen Parametern, die für die abweichenden Ergebnisse verantwortlich sein könnten.

(i) Während der Aktivitätstest bei 60 °C durchgeführt wurde, fand die analytische Gelfiltration bei Raumtemperatur statt. Es ist somit vorstellbar, dass temperatur-induzierte Konformationsänderungen die Tendenz zur Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2a entscheidend beeinflussen. Beispiele für die temperaturabhängige Assoziation bzw. Dissoziation von Proteinen finden sich bei den Chaperonen (Hartl & Hayer-Hartl 2002). Die kleinen Hitzeschockproteine (sHsps) sind Oligomere von 9-40 Untereinheiten (Buchner et al. 1998, Kappe et al. 2002). Sie bilden stabile Komplexe mit ungefalteten Proteinen und wirken als Faltungshelfer, indem sie Aggregation und Missfaltung verhindern. Die Bindung der ungefalteten Proteine verläuft dabei über hydrophobe Bereiche der sHsps, die jedoch im oligomeren Zustand verdeckt sind. Induziert durch einen Temperaturanstieg, dissoziieren die Untereinheiten der sHsps, wodurch die hydrophoben Flächen exponiert werden und eine Bindung von ungefalteten Proteinen ermöglicht wird (Fu & Chang 2004, Haslbeck et al. 1999). Ein Beispiel für den Einfluss der Temperatur auf Wechselwirkungen zwischen Proteinen bietet auch die Tryptophan Synthase selbst. Für das Enzym aus *S. typhimurium* konnte gezeigt werden, dass eine Steigerung der Temperatur von 5 auf 50 °C zu einer Stabilisierung der geschlossenen und damit aktiven Form des Komplexes (Abbildung 5) führt (Fan et al. 2000, Fan et al. 2000). Allerdings ist der $\alpha\beta\beta\alpha$ Komplex bei jeder untersuchten Temperatur stabil, es ändert sich lediglich seine Konformation.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse liefern keine Hinweise für eine Temperaturabhängigkeit der Komplexbildung. Die Arrheniusdiagramme von sTrpA in Ab- und Anwesenheit von sTrpB2a verlaufen parallel (Abbildung 20), d.h. die Aktivierung von

sTrpA durch sTrpB2a ist im Bereich von 45 bis 60°C vergleichbar stark. Obwohl nicht grundsätzlich auszuschließen ist, dass eine schwächere Tendenz zur Komplexbildung (d.h. eine höhere Dissoziationskonstante) bei niedrigen Temperaturen durch eine stärkere Aktivierung innerhalb des Komplexes kompensiert wird, erscheint dies als Erklärung für die erhaltenen Ergebnisse eher unwahrscheinlich. Auch dürfte sich das Bild bei 25°C, wo wegen der geringen Aktivität von sTrpA die Wechselzahl in Abwesenheit von sTrpB2a nicht zuverlässig bestimmt werden konnte, nicht grundsätzlich ändern.

(ii) Die Messung der Aktivität von sTrpA beruht auf der Umsetzung des Substrates IGP und erfolgt folglich in dessen Anwesenheit. Die Bindung von IGP an sTrpA könnte zu einer Konformationsänderung führen, die eine Assoziation mit sTrpB2a erst möglich macht. Die ligandenabhängige Bildung von Proteinkomplexen ist ein Mechanismus, der bei der Signaltransduktion vielfach beobachtet wird. Ein bekanntes Beispiel stellt die G-Protein vermittelte Signaltransduktion dar (Birnbauer et al. 1990, Simon et al. 1991, Whiteway et al. 1989). GTP-Bindeproteine (G-Proteine) bestehen aus drei Untereinheiten, α , β und γ . Im inaktiven Zustand bilden sie ein Heterotrimer, an welches GDP gebunden ist. Vermittelt durch die Bindung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors wird GDP gegen GTP ausgetauscht. Dies führt zur Abdissoziation der α -Untereinheit mit dem gebundenen GTP, welche wiederum andere Proteine der Signaltransduktionskaskade aktivieren kann. Die intrinsische GTPase Aktivität der α -Untereinheit führt nach wenigen Minuten zur Hydrolyse von GTP zu GDP, was die Reassoziierung des Trimers zur Folge hat. Somit legt die Natur des gebundenen Liganden den Oligomerisierungszustand des G-Proteins fest. Weitere Beispiele liefern die Steroidhormone und ihre Rezeptoren. Das Hormon Östrogen ist in vielen Geweben verantwortlich für die Regulation von Zellwachstum und Zelldifferenzierung. Die Östrogenrezeptoren wirken dabei als Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Induziert durch die Bindung des Hormons bilden sie einen Komplex mit Kofaktoren aus, was zur Transkription der Zielgene führt (Beato et al. 1995, Thenot et al. 1999).

Aber auch bei den Tryptophan Synthasen aus *E. coli* und *S. typhimurium* wurden Effekte der Ligandenbindung an einen Interaktionspartner auf den anderen beobachtet. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung verschiedener TrpA Liganden wie IGP, IPP oder GA3P zur Aktivierung von TrpB führt (Peracchi *et al.* 1996). Umgekehrt erhöht die Bindung von Serin an TrpB die katalytische Effizienz von TrpA (Kirschner *et al.* 1991). Ein direktes Maß für den Einfluss der Substrate auf die Stärke der Komplexbildung liefert der Vergleich der Dissoziationskonstanten für die Bildung des $\alpha\beta\beta\alpha$ Tryptophan Synthase Komplex aus den α - und $\beta\beta$ -Untereinheiten in An- und Abwesenheit von Liganden. Ein derartiger Vergleich

wurde im Falle der Tryptophan Synthase aus *E. coli* über stopped-flow Messungen bei 25°C durchgeführt (Lane *et al.* 1984). Der aus den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation und Dissoziation der Untereinheiten abgeleitete K_d -Wert betrug in Abwesenheit von Liganden etwa 0,45 nM, in Anwesenheit von IPP etwa 0,06 nM, und in Anwesenheit von Serin etwa 0,0015 nM. Dies bedeutet, dass durch die Liganden die Affinität für die Bildung des *E. coli* $\alpha\beta\alpha$ Komplexes aus den α – und $\beta\beta$ - Untereinheiten um eine (IPP) bzw. zwei (Serin) Größenordnungen zunimmt. Mit dem gleichen Enzym war bereits früher die Bildung des Komplexes über die wechselseitige Stimulation der ecTrpA und ecTrpB Aktivitäten bei 37°C verfolgt worden (Creighton & Yanofsky 1966). In Anwesenheit von IGP wurde die apparente Dissoziationskonstante zu 250 nM, in Anwesenheit von Serin zu 31 nM (1,25 nM in Gegenwart von 0,1 M NaCl) und in Anwesenheit beider Substrate zu 1,85 nM (0,38 nM in Gegenwart von 0,1 M NaCl) ermittelt. Ebenfalls bei 37°C wurde mittels isothermischer Titrationskalorimetrie in Abwesenheit von Liganden der K_d -Wert zu 131 nM bestimmt (Ogasahara *et al.* 2003). Obwohl sich die mit den unterschiedlichen Methoden ermittelten K_d -Werte unterschieden, vermutlich zum Teil wegen der unterschiedlichen Temperaturen und Pufferbedingungen, ist die gleiche Tendenz sichtbar. Beide Substrate führen zu einem Anstieg der Affinitäten der Untereinheiten zu einander, wobei der Effekt von Serin noch stärker ist als der von IGP. Wegen der thermodynamischen Kopplung der Protein-Protein Bindung mit den Protein-Ligand Bindungsvorgängen ist aus diesem Grund die Affinität von TrpB für Serin im $\alpha\beta\alpha$ Komplex von *E. coli* noch stärker erhöht als die Affinität von TrpA für IGP (Lane *et al.* 1984). Auf der Basis dieser Untersuchungen an der *E. coli* Tryptophan Synthase erscheint es wahrscheinlich, dass auch die Assoziation der Untereinheiten im Tryptophan Synthase Komplex aus *S. solfataricus* durch Ligandenbindung befördert wird. In diesem Fall sollte umgekehrt auch die Komplexierung der Proteine ihre Affinität zu den Liganden erhöhen. Tatsächlich bindet IGP nach Massgabe der K_M -Werte mit etwa 3-fach höherer Affinität an komplexiertes als an isoliertes sTrpA (Tabelle 10). Dagegen ist nach dem gleichen Kriterium die Bindung von Serin an komplexiertes sTrpB2a vergleichbar schwach wie an isoliertes (Tabelle 11) und dürfte somit auch die Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2a nicht wesentlich fördern. In jedem Fall scheint jedoch - bei vergleichbarer Ligandierung- die Affinität von sTrpA zu sTrpB2a stets deutlich niedriger sein als die Affinität von TrpA zu TrpB1 Proteinen. Dafür spricht, (a) dass in Abwesenheit der Liganden unter den Bedingungen der Gelfiltration der Komplex aus sTrpA und sTrpB2a nicht stabil ist (Abbildung 18), wohl jedoch der Komplex aus tmTrpA und tmTrpB1 (Hettwer & Sterner, 2002); (b) die über Aktivitätstitration ermittelte apparente Dissoziationskonstante in Anwesenheit von IGP und

Serin für den Komplex aus sTrpA und sTrpB2a bei 280 nM (Abbildung 21A) liegt, für die Komplexe aus tmTrpA und tmTrpB1 bzw. ecTrpA und ecTrpB1 jedoch bei nur 4 nM (Abbildung 21B) bzw. 1.85 nM (Creighton & Yanofsky 1966). Unklar muss im Moment bleiben, warum bei der Gelfiltration auch in Anwesenheit von IPP und Serin kein stabiler Komplex aus sTrpA und sTrpB2a nachgewiesen werden konnte (4.2.4.2). Möglich wäre, dass die Affinität zwischen sTrpA und sTrpB2a auch in Anwesenheit der Liganden zu niedrig ist, um nach Verdünnung der Proteine auf der Gelfiltration die Dissoziation des Komplexes und damit die getrennte Elution der Untereinheiten zu verhindern. Um den Einfluss der Liganden auf die Komplexbildung quantitativ beschreiben zu können, sollten in zukünftigen Experimenten direkte Bindungsstudien zwischen sTrpA und sTrpB2a in An- und Abwesenheit von IGP bzw. IPP und Serin durchgeführt werden.

5.4 Strukturelle Unterschiede zwischen sTrpB2a und sTrpB2b mit Relevanz für die Interaktion mit sTrpA

Die oben diskutierten Ergebnisse lassen aber noch immer offen, warum sTrpB2a – obwohl zur TrpB2 Gruppe gehörend – zumindest während der Katalyse einen Komplex mit sTrpA ausbildet, während sTrpB2b dazu nicht in der Lage ist. Um diese Frage zu klären, wurden auf der Basis von multiplen Sequenzalignments und Strukturmodellierungen (4.4.1, 4.4.2) charakteristische Unterschiede zwischen TrpB2a und TrpB2b Proteinen identifiziert und die entsprechenden Bereiche in sTrpB2a und sTrpB2b wechselseitig ausgetauscht. Dadurch sollte die physikalische und/oder funktionelle Interaktion zwischen sTrpA und sTrpB2a abgeschwächt bzw. eine Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2b etabliert werden. Die erzielten Ergebnisse sind von generellem Interesse, weil sTrpB2a und sTrpB2b wegen ihrer großen Ähnlichkeit auf Sequenz- und Strukturebene ein gutes Modellsystem zur detaillierten Analyse der für eine Komplexbildung zwischen Proteinen entscheidenden Faktoren darstellen.

Tatsächlich waren die vier produzierten sTrpB2b Varianten ebensowenig in der Lage sTrpA zu aktivieren, wie das wildtypische sTrpB2b Enzym (Tabelle 16). Dies schliesst aber nicht aus, dass ein physikalischer Kontakt hergestellt wurde, die strukturellen Voraussetzungen für eine funktionelle Wechselwirkung aber nicht gegeben sind. Dies wird mit Methoden zu überprüfen sein, die Wechselwirkungen zwischen Proteinen direkt detektieren, wie z. B.

Titrationsskalorimetrie oder Plasmonoberflächenresonanz (Ladbury 2004, Pattnaik 2005). Dagegen war im umgekehrten Fall die maximale Aktivierung von sTrpA durch sTrpB2a_1 und sTrpB2a_3 auf etwa die Hälfte reduziert, was für eine leichte Einschränkung der funktionellen Kopplung spricht (4.8.2). Die 36-fache Erhöhung des apparenten K_d -Wertes in der Aktivitätstiteration von sTrpA mit sTrpB2a_1 belegt, dass die Deletion von drei konservierten Aminosäuren in der unmittelbaren Kontaktregion (Abbildung 25) zu einer deutlichen Erniedrigung der Affinität der beiden Proteine führt und diese Reste somit einen wichtigen Beitrag zur Assoziation der beiden Untereinheiten leisten. Damit ist ein erster Schritt zur Identifizierung der strukturellen Grundlagen für das unterschiedliche Assoziationsverhalten von sTrpB2a und sTrpB2b gelungen. Leider konnte sTrpB2a_2, welches den gesamten N-terminalen Bereich von sTrpB2b (inklusive der auch in sTrpB2a_1 enthaltenen Deletion) trägt, nicht in löslicher Form gewonnen werden. Hier sollten in Zukunft systematische Versuche zur Rückfaltung unternommen werden, um diese - im Licht der Eigenschaften von sTrpB2a_1 - besonders interessante Variante doch noch charakterisieren zu können. Trotz uneingeschränkter Fähigkeit zur Aktivierung von sTrpA bei hohen Protein- und sättigenden Ligandenkonzentrationen (Tabelle 16), kann im Prinzip auch die Affinität von sTrpB2a_4 zu sTrpA verringert sein. Um dies zu testen, sollten in Zukunft auch mit dieser Variante Aktivitätstiterationen durchgeführt werden.

In einem ähnlichen Ansatz wurde kürzlich versucht, in der heterodimeren Imidazolglycerinphosphat Synthase aus *T. maritima* (Douangamath *et al.* 2002) die Interaktionen zwischen tmHisF (Synthase-Untereinheit) und tmHisH (Glutaminase-Untereinheit) abzuschwächen, sowie einen neuen Komplex aus tmHisF und tmTrpG (mit tmHisH verwandte Glutaminase-Untereinheit der Anthranilat Synthase) zu etablieren (Häger 2005). Wie bei sTrpB2a und sTrpB2b, wurden dazu kurze Sequenzabschnitte aus tmHisH und tmTrpG wechselseitig ausgetauscht. Dadurch gelang es, die funktionelle Interaktion im tmHisF-tmHisH Komplex zu stören, wohingegen kein nachweisbarer tmHisF-tmTrpG Komplex erzeugt werden konnte. Die Größe der Kontaktfläche zwischen TrpA und TrpB aus *S. typhimurium* beträgt 1440 \AA^2 (Hyde *et al.*, 1988), die zwischen HisF und HisH aus *T. maritima* 1050 \AA^2 (Douangamath *et al.*, 2002). Somit ist es nicht überraschend, dass der Austausch einer begrenzten Anzahl von Aminosäuren nicht zur vollständigen Auflösung der bestehenden sTrpB2a-sTrpA und tmHisF-tmHisH Komplexe bzw. zur Etablierung stabiler sTrpB2b-sTrpA bzw. tmHisF-tmTrpG Interaktionen geführt hat. Es wird erforderlich sein, die Austausche vielversprechender sTrpB2a/sTrpB2b bzw. tmHisH/tmTrpG Varianten zu kombinieren, um diesen Zielen noch näher zu kommen. Die im Rahmen dieser Arbeiten

erreichten Ergebnisse sind erste ermutigende Schritte, vor allem weil praktisch alle Varianten in als stabile Proteine hergestellt werden konnten und sich in isolierter Form in ihren spektroskopischen und katalytischen Eigenschaften nicht wesentlich von den wildtypischen Enzymen unterschieden (Tabelle 14, 15; Häger, 2005). Dies verdeutlicht, dass die verwendeten Enzyme aus den Hyperthermophilen *S. solfataricus* und *T. maritima* sehr robust sind und sich deshalb für umfangreiche Mutationsanalyse ausgezeichnet eignen.

Gezielte Modifizierungen der Kontaktfläche heterodimerer Proteine sind im Prinzip schwieriger durchzuführen als bei Homodimeren, in denen jeder Aminosäureaustausch beide assoziierte Untereinheiten in gleicher Weise betrifft und somit stabilisierende Wechselwirkungen zweifach abgeschwächt werden. Entsprechend gelang es, die homodimere Phosphoribosylanthranilat Isomerase aus *T. maritima* durch gezielte Deletionen und Aminosäureaustausche an der symmetrischen Kontaktfläche in eine katalytisch voll aktive monomere Variante umzuwandeln, die allerdings eine verminderte Thermostabilität aufwies (Thoma *et al.* 2000).

Nichtdestoweniger ist aber gerade das *protein design* an Kontaktflächen nicht identischer Proteine von großer Relevanz, da diese bei vielen Vorgängen in der Zelle eine entscheidende Rolle spielen. Die an einfachen Modellsystemen wie der Tryptophan Synthase gewonnenen Einsichten sind dabei von genereller Bedeutung, da die daraus abgeleiteten Prinzipien einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung biologischer Zusammenhänge und der Ursache von Krankheiten leisten können. Die Möglichkeit Proteine mit einer gewünschten, spezifischen Bindungsfähigkeit auszustatten, bietet sowohl im therapeutischen als auch im diagnostischen Bereich breite Anwendungsmöglichkeiten. Ein aktuelles Beispiel für eine Einsatzmöglichkeit stellen Prionen-Erkrankungen wie die spongiforme Enzephalitis, insbesondere die für den Menschen gefährliche Creutzfeldt-Jacob Krankheit dar. Ursache der Erkrankung ist die Umlagerung normaler Wirts Prion-Proteine (PrP^c, zelluläres-Prion-Protein) in abnormale, protease-resistente Formen (PrP^{sc}, Scrapie Prion-Protein) (Campbell 2005, Johnson 2005). Eine Möglichkeit der therapeutischen Behandlung stellt die Entwicklung von Proteinen dar, die das zelluläre Prion-Protein spezifisch binden, stabilisieren und so vor der Umlagerung schützen (Sassoon *et al.* 2005).

5.5 Die Evolution der Tryptophan Synthase

Die Organisation von Enzymen eines Biosyntheseweges in Form von Multienzymkomplexen hat eine Reihe von Vorteilen. So können sich die Untereinheiten wechselseitig stabilisieren, ihre Aktivitäten koordinieren und instabile oder membrangängige Metabolite direkt zwischen den aktiven Zentren transportiert werden. Es ist plausibel anzunehmen, dass Multienzymkomplexe aus diesem Gründen einen Selektionsvorteil darstellen und deshalb im Laufe der Evolution aus zunächst physikalisch und funktionell isolierten Enzymen entstanden sind. Die Tryptophan Synthase ist ein lehrreiches Beispiel, in welchen Stufen dieser Prozess abgelaufen sein könnte. Die verschiedenen Klassen von β -Untereinheiten, TrpB1 und TrpB2a bilden unterschiedlich stabile Komplexe mit den entsprechenden TrpA Proteinen, mit unterschiedlich starker Kopplung der Einzelreaktionen. So liegen die Dissoziationskonstanten der bisher untersuchten TrpB1 Varianten aus *E. coli* und *T. maritima* mit ihren jeweiligen TrpA Proteinen durchgehend im nM-Bereich (Creighton & Yanofsky, 1966; Lane et al., 1984; Ogasahara et al., 2003). In den resultierenden (TrpA-TrpB1)₂ Komplexen aktivieren sich die Untereinheiten wechselseitig, was zu einer beträchtlichen Steigerung der katalytischen Effizienzen im Vergleich zu den isolierten TrpA und TrpB1 Proteinen führt (Hettwer & Sterner 2002, Miles 1979). Der einzige bisher untersuchte Vertreter der TrpB2a Gruppe, das in dieser Arbeit bearbeitete sTrpB2a, bildet einen wesentlich schwächeren und bisher nur in Aktivitätsmessungen nachweisbaren Komplex mit dem kognaten sTrpA Protein aus (Abbildung 18; Tabelle 10). Auch wird lediglich die Aktivität von sTrpA durch die Anwesenheit von sTrpB2a erhöht (Tabelle 10), nicht jedoch umgekehrt (Tabelle 12). Für die bislang charakterisierten Vertreter der nicht im *trp*-Operon kodierten TrpB Proteine, tmTrpB2 und sTrpB2b, liess sich bislang weder ein physiologischer Komplex oder eine funktionelle Wechselwirkung mit tmTrpA bzw. sTrpA nachweisen (Hettwer & Sterner 2002)(2002; Abbildung 18; Tabelle 10, 12). Entsprechend sollten sie den ursprünglichen Typ der β -Untereinheit repräsentieren. Abbildung 32 zeigt ein Modell, wie sich daraus die TrpB2a und TrpB1 Proteine entwickelt haben könnten.

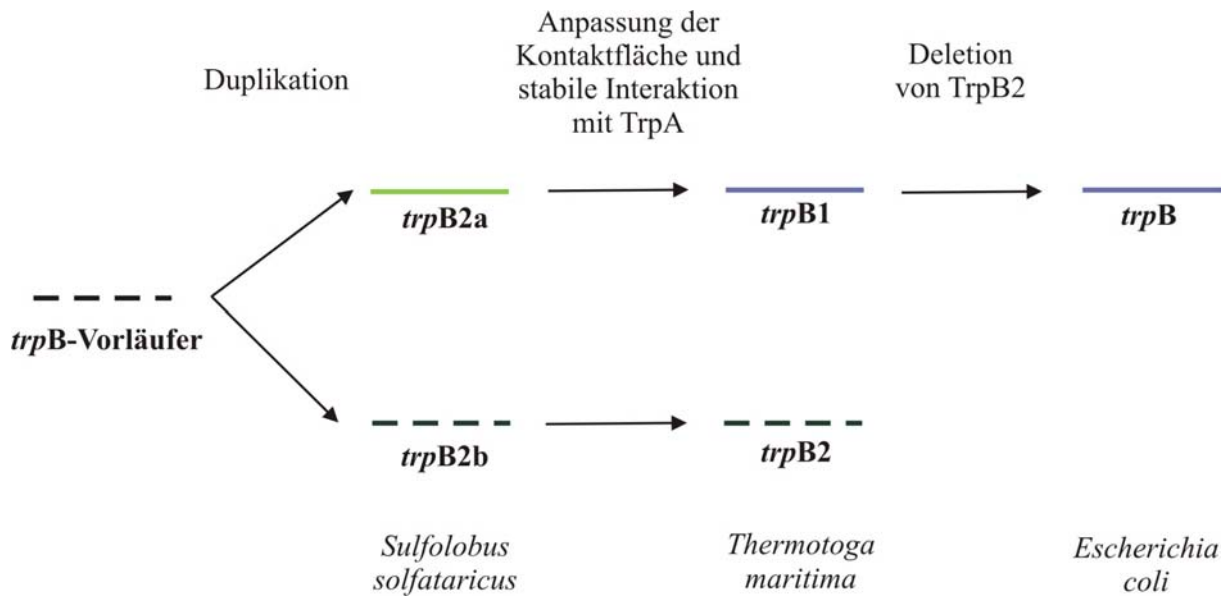


Abbildung 32: Modell zur Evolution der Tryptophan Synthase β -Untereinheit.

Die gestrichelten *trpB*-Gene liegen ausserhalb des *trp*-Operons und kodieren für Proteine, die keinen Komplex mit TrpA ausbilden. Die farbig markieren Gene liegen innerhalb des *trp*-Operons und kodieren für Proteine, die sich zu schwachen (grün) bzw. starken (blau) Komplexen mit TrpA zusammenlagern.

Nach diesem Modell hätten sich nach der Duplikation eines *trpB2*-artigen Vorläufergens die beiden Kopien unterschiedlich entwickelt. Eine Kopie wäre als *trpB2b* ausserhalb des *trp*-Operons verblieben. Die andere Kopie wäre als *trpB2a* ins Operon integriert worden, wodurch es zu einer koordinierten Expression mit *trpA* und parallel dazu zur Ausbildung eines schwachen TrpB2a-TrpA Komplexes gekommen sein könnte. Diese Situation wäre in *S. solfataricus* erhalten geblieben. Im weiteren Verlauf der Evolution hätte sich TrpB2a zu TrpB1 weiter entwickelt, verbunden mit einer Intensivierung der strukturellen und funktionellen Wechselwirkung mit TrpA. Dies entspräche der Situation in *T. maritima*. Schliesslich könnte in Organismen, die TrpB2 nicht mehr benötigen, das Gen dafür deletiert worden sein, entsprechend der Situation in *E. coli* und anderen mesophilen Prokaryonten. Dies wäre plausibel, wenn es sich bei TrpB2 wie postuliert um ein Indol-Rettungsprotein handeln würde, das bei den hohen physiologischen Temperaturen von Hyperthermophilen den Verlust des hydrophoben Metaboliten durch Diffusion über die Zellmembran verhindert (Hettwer & Sterner 2002). Diese Modell würde gestärkt, wenn andere TrpB2a Varianten, z.B. die aus *P. torridus*, *S. tokodaii* (Abbildung 24) ebenfalls schwache Komplexe mit ihren kognaten TrpA Proteinen ausbildeten. Dies wird in Zukunft zu untersuchen sein.

5.6 Mögliche alternative Funktionen der TrpB2 Proteine

Trotz der postulierten Rolle als „Indol-Rettungsprotein“ ist bisher nicht endgültig geklärt, welche Funktion TrpB2 Proteine wie sTrpB2b und tmTrpB2 haben, die sich nicht mit dem jeweiligen TrpA zum Tryptophan Synthase Komplex zusammenlagern können. Der immunologische Nachweis von tmTrpB2 im Extrakt von *T. maritima* Zellen (Abbildung 31) spricht in jedem Fall für eine Funktion des Proteins im Metabolismus und macht es unwahrscheinlich, dass tmtrpB2 und seine Homologen lediglich Pseudogene darstellen.

Die TrpB Proteine gehören zur Gruppe der PLP-abhängigen Enzyme, die praktisch ausschliesslich an Biosynthesen beteiligt sind, welche Aminogruppen einschließen (Percudani & Peracchi 2003). Dabei katalysieren sie Transaminierungsreaktionen, sowie Decarboxylierungen, Desaminierungen, Racemisierungen und Aldolspaltungen am α -Kohlenstoffatom, sowie Eliminierungsreaktionen am β - oder γ -Kohlenstoff. Aus dieser chemischen Vielfalt resultiert eine gewisse Promiskuitivität der PLP-abhängigen Enzyme, die meistens mehrere Nebenreaktionen katalysieren können. Dies gilt auch für die β -Untereinheit der Tryptophan Synthase. Schon früh wurde gezeigt, dass ecTrpB sowohl die Desaminierung (Irving et al., 1964) als auch die Transaminierung von L-Serin (Miles *et al.* 1968) katalysieren kann. Diese Nebenreaktionen werden durch die Komplexbildung mit ecTrpA allerdings unterdrückt (Miles *et al.* 1968). Alle Organismen mit einem trpB2 Gen besitzen kein Serin-Desaminase Gen. Es wurde deshalb postuliert, dass in diesen Organismen das TrpB2 Protein als Serin-Deaminase wirkt (Xie et al., 2002). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass tmTrpB2 und sTrpB2b die Serin-Deaminase Reaktion katalysieren, jedoch mit noch niedrigerer Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{Serin}} < 0,002 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$) als tmTrpB1 ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{Serin}} = 0,01 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$) und $[\text{tmTrpA}*\text{tmTrpB1}]_2$ ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{Serin}} = 0,34 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$) (Stefan Hettwer und Sonja Leopoldseder, unveröffentlichte Ergebnisse). Gegenwärtig wird versucht, Hinweise auf mögliche Funktionen des tmTrpB2 Proteins durch die Analyse des Genkontextes und die Abhängigkeit seiner Synthese in *T. maritima* von der Temperatur und der Zusammensetzung des Anzuchtmediums zu erhalten.

6 Literatur

- Anderson, K. S., Miles, E. W., and Johnson, K. A. (1991)** Serine modulates substrate channeling in tryptophan synthase. A novel intersubunit triggering mechanism *J Biol Chem* **266**, 8020-8033
- Asada, Y., Yokoyama, S., Kuramitsu, S., Miyano, M., and Kunishima, N.** Crystal Structure of Tryptophan Synthase A-Subunit from *Thermus Thermophilus* Hb8. *To be published*
- Bahar, I., and Jernigan, R. L. (1999)** Cooperative fluctuations and subunit communication in tryptophan synthase *Biochemistry* **38**, 3478-3490
- Banner, D. W., Bloomer, A., Petsko, G. A., Phillips, D. C., and Wilson, I. A. (1976)** Atomic coordinates for triose phosphate isomerase from chicken muscle *Biochem Biophys Res Commun* **72**, 146-155
- Barona-Gomez, F., and Hodgson, D. A. (2003)** Occurrence of a putative ancient-like isomerase involved in histidine and tryptophan biosynthesis *EMBO Rep* **4**, 296-300
- Beasty, A. M., and Matthews, C. R. (1985)** Characterization of an early intermediate in the folding of the alpha subunit of tryptophan synthase by hydrogen exchange measurement *Biochemistry* **24**, 3547-3553
- Beato, M., Herrlich, P., and Schutz, G. (1995)** Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot *Cell* **83**, 851-857
- Beismann-Driemeyer, S., and Sterner, R. (2001)** Imidazole glycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima*. Quaternary structure, steady-state kinetics, and reaction mechanism of the hienzyme complex *J Biol Chem* **276**, 20387-20396
- Birnbaumer, L., Abramowitz, J., and Brown, A. M. (1990)** Receptor-effector coupling by G proteins *Biochim Biophys Acta* **1031**, 163-224
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem* **72**, 248-254
- Brzovic, P. S., Hyde, C. C., Miles, E. W., and Dunn, M. F. (1993)** Characterization of the functional role of a flexible loop in the alpha-subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium* by rapid-scanning, stopped-flow spectroscopy and site-directed mutagenesis *Biochemistry* **32**, 10404-10413
- Buchner, J., Ehrnsperger, M., Gaestel, M., and Walke, S. (1998)** Purification and characterization of small heat shock proteins *Methods Enzymol* **290**, 339-349
- Campbell, P. N. (2005)** Bovine spongiform encephalopathy--some surprises for biochemists *IUBMB Life* **57**, 273-276

- Chakrabarti, P., and Janin, J. (2002)** Dissecting protein-protein recognition sites *Proteins* **47**, 334-343
- Chervenka, C. H. (1973)** A manual of methods for the analytical ultracentrifuge. *Spinicio Division of Beckman Instruments, Palo Alto*
- Clark, A. J., and Adelberg, E. A. (1962)** Bacterial conjugation *Annu Rev Microbiol* **16**, 289-319
- Cohn, E., and Edsall, J. (1943)** Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions *Reinhold, New York*, 370 - 381, 428 - 431
- Crawford, I. P., and Yanofsky, C. (1958)** On the separation of the tryptophan synthetase of *Escherichia coli* into two protein components *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**, 1161 - 1170
- Creighton, T. E. (1970)** A steady-state kinetic investigation of the reaction mechanism of the tryptophan synthetase of *Escherichia coli* *Eur J Biochem* **13**, 1-10
- Creighton, T. E., and Yanofsky, C. (1966)** Association of the alpha and beta-2 subunits of the tryptophan synthetase of *Escherichia coli* *J Biol Chem* **241**, 980-990
- Darwin, C. (1859)** On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. *John Murray, London*
- Deremble, C., and Lavery, R. (2005)** Macromolecular recognition *Curr Opin Struct Biol* **15**, 171-175
- Douangamath, A., Walker, M., Beismann-Driemeyer, S., Vega-Fernandez, M. C., Sterner, R., and Wilmanns, M. (2002)** Structural evidence for ammonia tunneling across the (beta alpha)₈ barrel of the imidazole glycerol phosphate synthase bienzyme complex *Structure (Camb)* **10**, 185-193
- Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988)** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-6145
- Drewe, W. F., Jr., and Dunn, M. F. (1985)** Detection and identification of intermediates in the reaction of L-serine with *Escherichia coli* tryptophan synthase via rapid-scanning ultraviolet-visible spectroscopy *Biochemistry* **24**, 3977-3987
- Dubnau, D. (1999)** DNA uptake in bacteria *Annu Rev Microbiol* **53**, 217-244
- Dunn, M. F., Aguilar, V., Brzovic, P., Drewe, W. F., Jr., Houben, K. F., Leja, C. A., and Roy, M. (1990)** The tryptophan synthase bienzyme complex transfers indole between the alpha- and beta-sites via a 25-30 Å long tunnel *Biochemistry* **29**, 8598-8607
- Durchschlag, H. (1986)** Specific Volumes of Biological Macromolecules *in Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology* **Springer-Verlag, Berlin**
- Eason, D. D., Cannon, J. P., Haire, R. N., Rast, J. P., Ostrov, D. A., and Litman, G. W. (2004)** Mechanisms of antigen receptor evolution *Semin Immunol* **16**, 215-226

- Eberhard, M. (1990)** A set of programs for analysis of kinetic and equilibrium data *Comput Appl Biosci* **6**, 213-221
- Fan, Y. X., McPhie, P., and Miles, E. W. (2000)** Regulation of tryptophan synthase by temperature, monovalent cations, and an allosteric ligand. Evidence from Arrhenius plots, absorption spectra, and primary kinetic isotope effects *Biochemistry* **39**, 4692-4703
- Fan, Y. X., McPhie, P., and Miles, E. W. (2000)** Thermal repair of tryptophan synthase mutations in a regulatory intersubunit salt bridge. Evidence from arrhenius plots, absorption spectra, and primary kinetic isotope effects *J Biol Chem* **275**, 20302-20307
- Felsenstein, J. (1995)** PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.57c *Department of Genetics, University of Washington, Seattle*
- Fu, X., and Chang, Z. (2004)** Temperature-dependent subunit exchange and chaperone-like activities of Hsp16.3, a small heat shock protein from *Mycobacterium tuberculosis* *Biochem Biophys Res Commun* **316**, 291-299
- Gogarten, J. P., and Townsend, J. P. (2005)** Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution *Nat Rev Microbiol* **3**, 679-687
- Goldberg, M. E., and Baldwin, R. L. (1967)** Interactions between the subunits of the tryptophan synthetase of *Escherichia coli*. Optical properties of an intermediate bound to the alpha-2 beta-2 complex *Biochemistry* **6**, 2113-2119
- Griffith, F. (1928)** The significance of pneumococcal types *Journal of Hygiene* **27**, 113-159
- Häger, M. (2005)** Evolution und Regulation von Protein-Protein Interaktionen in zwei Glutamin-Amidotransferasen aus der Biosynthese von Histidin und Tryptophan *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades, Universität Regensburg*
- Haldane, J. (1932)** The causes of evolution *Langman and Green, London*
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids *J Mol Biol* **166**, 557-580
- Hancock, J. M. (2005)** Gene factories, microfunctionalization and the evolution of gene families *Trends Genet*
- Hardison, R. (1998)** Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression *J Exp Biol* **201**, 1099-1117
- Hartl, F. U., and Hayer-Hartl, M. (2002)** Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein *Science* **295**, 1852-1858
- Hartman, H., and Fedorov, A. (2002)** The origin of the eukaryotic cell: a genomic investigation *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1420-1425

- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R., and Buchner, J. (1999)** Hsp26: a temperature-regulated chaperone *Embo J* **18**, 6744-6751
- Henn-Sax, M., Thoma, R., Schmidt, S., Hennig, M., Kirschner, K., and Sterner, R. (2002)** Two (betaalpha)(8)-barrel enzymes of histidine and tryptophan biosynthesis have similar reaction mechanisms and common strategies for protecting their labile substrates *Biochemistry* **41**, 12032-12042
- Hentzelt, S. (1999)** Thermostable Tryptophan Synthase from *Thermotoga maritima*: Structure-Function Relationships of the Multienzyme Complex and its Subunits *Inauguraldissertation, Universität Basel*
- Hentzelt, S. (1999)** Thermostable tryptophan synthase from *Thermotoga maritima*: structure-function relationships of the multienzyme complex and its subunits *Inauguraldissertation der Universität Basel*
- Hettwer, S. (2001)** Tryptophansynthasen bei hohen Temperaturen: Charakterisierung der thermostabilen Enzyme aus *Thermotoga maritima* *Dissertation*
- Hettwer, S., and Sterner, R. (2002)** A novel tryptophan synthase beta-subunit from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*. Quaternary structure, steady-state kinetics, and putative physiological role *J Biol Chem* **277**, 8194-8201
- Hioki, Y., Ogasahara, K., Lee, S. J., Ma, J., Ishida, M., Yamagata, Y., Matsuura, Y., Ota, M., Ikeguchi, M., Kuramitsu, S., and Yutani, K. (2004)** The crystal structure of the tryptophan synthase beta subunit from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. Investigation of stabilization factors *Eur J Biochem* **271**, 2624-2635
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989)** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction *Gene* **77**, 51-59
- Holtzhauer, M. (1996)** Methoden in der Proteinanalytik *Springer-Verlag, Berlin*
- Horecker, L., and Kornberg, A. (1948)** The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides *Journal of Biological Chemistry* **175**, 385 - 390
- Huang, X., Holden, H. M., and Raushel, F. M. (2001)** Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions *Annu Rev Biochem* **70**, 149-180
- Hubbard, S. J. (1998)** The structural aspects of limited proteolysis of native proteins *Biochim Biophys Acta* **1382**, 191-206
- Huber, R. H., Langworthy, T. A., König, H., Thomm, M., Woese, C. R., Sleytr, U. B., and Stetter, K. O. (1986)** *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C. *Arch. Microbiol.* **144**, 324-333
- Hyde, C. C., Ahmed, S. A., Padlan, E. A., Miles, E. W., and Davies, D. R. (1988)** Three-dimensional structure of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 multienzyme complex from *Salmonella typhimurium* *J Biol Chem* **263**, 17857-17871

- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids *Gene* **96**, 23-28
- Irwin, D. M., and Wilson, A. C. (1989)** Multiple cDNA sequences and the evolution of bovine stomach lysozyme *J Biol Chem* **264**, 11387-11393
- Ivens, A. (1998)** Characterization of Anthranilate Synthase and Anthranilate Phosphorybosyltransferase from *Thermotoga maritima* and *Sulfolobus solfataricus* *Phd Thesis, Universität Basel*
- Jeong, M. S., Jeong, J. K., Lim, W. K., and Jang, S. B. (2004)** Structures of wild-type and P28L/Y173F tryptophan synthase alpha-subunits from *Escherichia coli* *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 1257-1264
- Johnson, R. T. (2005)** Prion diseases *Lancet Neurol* **4**, 635-642
- Jones, S., and Thornton, J. M. (1996)** Principles of protein-protein interactions *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13-20
- Jurgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M., and Sterner, R. (2000)** Directed evolution of a (beta alpha)₈-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9925-9930
- Kappe, G., Leunissen, J. A., and de Jong, W. W. (2002)** Evolution and diversity of prokaryotic small heat shock proteins *Prog Mol Subcell Biol* **28**, 1-17
- Kirschner, K., Lane, A. N., and Strasser, A. W. (1991)** Reciprocal communication between the lyase and synthase active sites of the tryptophan synthase holoenzyme complex *Biochemistry* **30**, 472-478
- Kopetzki, E., Schumacher, G., and Buckel, P. (1989)** Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast alpha-glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth conditions *Mol Gen Genet* **216**, 149-155
- Kortemme, T., and Baker, D. (2004)** Computational design of protein-protein interactions *Curr Opin Chem Biol* **8**, 91-97
- Kulik, V., Hartmann, E., Weyand, M., Frey, M., Gierl, A., Niks, D., Dunn, M. F., and Schlichting, I. (2005)** On the structural basis of the catalytic mechanism and the regulation of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium* and BX1 from maize, two evolutionarily related enzymes *J Mol Biol* **352**, 608-620
- Kuper, J., Doenges, C., and Wilmanns, M. (2005)** Two-fold repeated (beta alpha)₄ half-barrels may provide a molecular tool for dual substrate specificity *EMBO Rep* **6**, 134-139
- Kurland, C. G., Canback, B., and Berg, O. G. (2003)** Horizontal gene transfer: a critical view *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9658-9662
- Ladbury, J. E. (2004)** Application of isothermal titration calorimetry in the biological sciences: things are heating up! *Biotechniques* **37**, 885-887

- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227**, 680-685
- Lane, A. N., Paul, C. H., and Kirschner, K. (1984)** The mechanism of self-assembly of the multi-enzyme complex tryptophan synthase from *Escherichia coli* *Embo J* **3**, 279-287
- Lee, S. J., Ogasahara, K., Ma, J., Nishio, K., Ishida, M., Yamagata, Y., Tsukihara, T., and Yutani, K. (2005)** Conformational Changes in the Tryptophan Synthase from a Hyperthermophile upon $\alpha(2)\beta(2)$ Complex Formation: Crystal Structure of the Complex *Biochemistry* **44**, 11417-11427
- Leopoldseder, S., Claren, J., Jurgens, C., and Sterner, R. (2004)** Interconverting the catalytic activities of $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzymes from different metabolic pathways: sequence requirements and molecular analysis *J Mol Biol* **337**, 871-879
- Lo Conte, L., Chothia, C., and Janin, J. (1999)** The atomic structure of protein-protein recognition sites *J Mol Biol* **285**, 2177-2198
- Lorenz, M. G., and Wackernagel, W. (1994)** Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment *Microbiol Rev* **58**, 563-602
- Lottspeich, F., and Zorbas, H. (1998)** Bioanalytik *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*
- Lynch, M., and Force, A. (2000)** The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization *Genetics* **154**, 459-473
- Marabotti, A., De Biase, D., Tramonti, A., Bettati, S., and Mozzarelli, A. (2001)** Allosteric communication of tryptophan synthase. Functional and regulatory properties of the β S178P mutant *J Biol Chem* **276**, 17747-17753
- Miles, E. W. (1979)** Tryptophan synthase: structure, function, and subunit interaction *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **49**, 127-186
- Miles, E. W. (1991)** Structural basis for catalysis by tryptophan synthase *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **64**, 93-172
- Miles, E. W. (1995)** Tryptophan synthase. Structure, function, and protein engineering *Subcell Biochem* **24**, 207-254
- Miles, E. W., Hatanaka, M., and Crawford, I. P. (1968)** A new thiol-dependent transamination reaction catalyzed by the B protein of *Escherichia coli* tryptophan synthetase *Biochemistry* **7**, 2742-2753
- Miles, E. W., and Higgins, W. (1978)** An active $\alpha_2\beta_2$ derivative of tryptophan synthase formed by limited proteolysis *J Biol Chem* **253**, 6266-6269
- Miles, E. W., McPhie, P., and Yutani, K. (1988)** Evidence that glutamic acid 49 of tryptophan synthase α subunit is a catalytic residue. Inactive mutant proteins substituted at position 49 bind ligands and transmit ligand-dependent to the β subunit *J Biol Chem* **263**, 8611-8614

- Miles, E. W., Rhee, S., and Davies, D. R. (1999)** The molecular basis of substrate channeling
J Biol Chem **274**, 12193-12196
- Muller, H. (1935)** The origination of chromatin deficiencies as minute deletions subject to insertion elsewhere *Genetics* **17**, 237-252
- Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987)** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction *Methods Enzymol* **155**, 335-350
- Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T., and Chothia, C. (1995)** SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures *J Mol Biol* **247**, 536-540
- Nagata, S., Hyde, C. C., and Miles, E. W. (1989)** The alpha subunit of tryptophan synthase. Evidence that aspartic acid 60 is a catalytic residue and that the double alteration of residues 175 and 211 in a second-site revertant restores the proper geometry of the substrate binding site *J Biol Chem* **264**, 6288-6296
- Nakamura, Y., Itoh, T., Matsuda, H., and Gojobori, T. (2004)** Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes *Nat Genet* **36**, 760-766
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M. D., Pratt, M. S., Phillips, C. A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Eisen, J. A., White, O., Salzberg, S. L., Smith, H. O., Venter, J. C., and Fraser, C. M. (1999)** Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima* *Nature* **399**, 323-329
- Nishio, K., Morimoto, Y., Ishizuka, M., Ogasahara, K., Tsukihara, T., and Yutani, K. (2005)** Conformational changes in the alpha-subunit coupled to binding of the beta 2-subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*: crystal structure of the tryptophan synthase alpha-subunit alone *Biochemistry* **44**, 1184-1192
- Nooren, I. M., and Thornton, J. M. (2003)** Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions *J Mol Biol* **325**, 991-1018
- Ogasahara, K., Ishida, M., and Yutani, K. (2003)** Stimulated interaction between and subunits of tryptophan synthase from hyperthermophile enhances its thermal stability *J Biol Chem* **278**, 8922-8928
- Ohno, S. (1970)** Evolution by Gene Duplication *Springer Verlag, Berlin*
- Osborne, A., Teng, Q., Miles, E. W., and Phillips, R. S. (2003)** Detection of open and closed conformations of tryptophan synthase by ¹⁵N-heteronuclear single-quantum coherence nuclear magnetic resonance of bound L-tryptophan *J Biol Chem* **278**, 44083-44090

- Pan, P., and Dunn, M. F. (1996)** beta-Site covalent reactions trigger transitions between open and closed conformations of the tryptophan synthase holoenzyme complex *Biochemistry* **35**, 5002-5013
- Pappenberger, G., Schurig, H., and Jaenicke, R. (1997)** Disruption of an ionic network leads to accelerated thermal denaturation of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* *J Mol Biol* **274**, 676-683
- Pattnaik, P. (2005)** Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction *Appl Biochem Biotechnol* **126**, 79-92
- Peracchi, A., Bettati, S., Mozzarelli, A., Rossi, G. L., Miles, E. W., and Dunn, M. F. (1996)** Allosteric regulation of tryptophan synthase: effects of pH, temperature, and alpha-subunit ligands on the equilibrium distribution of pyridoxal 5'-phosphate-L-serine intermediates *Biochemistry* **35**, 1872-1880
- Percudani, R., and Peracchi, A. (2003)** A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes *EMBO Rep* **4**, 850-854
- Poirot, O., O'Toole, E., and Notredame, C. (2003)** Tcoffee@igs: A web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments *Nucleic Acids Res* **31**, 3503-3506
- Raboni, S., Bettati, S., and Mozzarelli, A. (2005)** Identification of the geometric requirements for allosteric communication between the alpha- and beta-subunits of tryptophan synthase *J Biol Chem* **280**, 13450-13456
- Raushel, F. M., Thoden, J. B., and Holden, H. M. (2003)** Enzymes with molecular tunnels *Acc Chem Res* **36**, 539-548
- Rhee, S., Miles, E. W., and Davies, D. R. (1998)** Cryo-crystallography of a true substrate, indole-3-glycerol phosphate, bound to a mutant (alphaD60N) tryptophan synthase alpha2beta2 complex reveals the correct orientation of active site alphaGlu49 *J Biol Chem* **273**, 8553-8555
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase *Science* **239**, 487-491
- Sambrook, J., Fritsch, E. E., and Maniatis, T. (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467
- Sassoon, J., Sadowski, M., Wisniewski, T., and Brown, D. R. (2005)** Therapeutics and prion disease: can immunisation or drugs be effective? *Mini Rev Med Chem* **5**, 361-366

- Schneider, T. R., Gerhardt, E., Lee, M., Liang, P. H., Anderson, K. S., and Schlichting, I. (1998)** Loop closure and intersubunit communication in tryptophan synthase *Biochemistry* **37**, 5394-5406
- Sears, L. E., Moran, L. S., Kissinger, C., Creasey, T., Perry-O'Keefe, H., Roskey, M., Sutherland, E., and Slatko, B. E. (1992)** CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase *Biotechniques* **13**, 626-633
- She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C. C., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P. M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A. C., Kozera, C. J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H. P., Redder, P., Schenk, M. E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R. L., Doolittle, W. F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R. A., Ragan, M. A., Sensen, C. W., and Van der Oost, J. (2001)** The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2 *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7835-7840
- Simon, M. I., Strathmann, M. P., and Gautam, N. (1991)** Diversity of G proteins in signal transduction *Science* **252**, 802-808
- Slatko, B. E. (1994)** Thermal cycle dideoxy DNA sequencing *Methods Mol Biol* **31**, 35-45
- Sterner, R., and Hocker, B. (2005)** Catalytic Versatility, Stability, and Evolution of the (betaalpha)₈-Barrel Enzyme fold *Chemical Reviews* **in press**
- Sterner, R., and Hocker, B. (2005)** Catalytic Versatility, Stability, and Evolution of the (betaalpha)₈-Barrel Enzyme Fold *Chem Rev* **105**, 4038-4055
- Sterner, R., Kleemann, G. R., Szadkowski, H., Lustig, A., Hennig, M., and Kirschner, K. (1996)** Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer *Protein Sci* **5**, 2000-2008
- Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986)** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes *J Mol Biol* **189**, 113-130
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990)** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes *Methods Enzymol* **185**, 60-89
- Tatusov, R. L., Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Kiryutin, B., Koonin, E. V., Krylov, D. M., Mazumder, R., Mekhedov, S. L., Nikolskaya, A. N., Rao, B. S., Smirnov, S., Sverdlov, A. V., Vasudevan, S., Wolf, Y. I., Yin, J. J., and Natale, D. A. (2003)** The COG database: an updated version includes eukaryotes *BMC Bioinformatics* **4**, 41
- Thenot, S., Bonnet, S., Boulahtouf, A., Margeat, E., Royer, C. A., Borgna, J. L., and Cavailles, V. (1999)** Effect of ligand and DNA binding on the interaction between human transcription intermediary factor 1alpha and estrogen receptors *Mol Endocrinol* **13**, 2137-2150

- Thoma, R., Hennig, M., Sterner, R., and Kirschner, K. (2000)** Structure and function of mutationally generated monomers of dimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* *Structure Fold Des* **8**, 265-276
- Thomas, C. M., and Nielsen, K. M. (2005)** Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria *Nat Rev Microbiol* **3**, 711-721
- Tiefenbach, K.-J. (1997)** Hydrodynamische und Thermodynamische Untersuchungen an Protein-SDS-Komplexen *Diplomarbeit am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg*
- Tsai, C. J., Xu, D., and Nussinov, R. (1998)** Protein folding via binding and vice versa *Fold Des* **3**, R71-80
- Vadrevu, R., Falzone, C. J., and Matthews, C. R. (2003)** Partial NMR assignments and secondary structure mapping of the isolated alpha subunit of Escherichia coli tryptophan synthase, a 29-kD TIM barrel protein *Protein Sci* **12**, 185-191
- Valdar, W. S., and Thornton, J. M. (2001)** Protein-protein interfaces: analysis of amino acid conservation in homodimers *Proteins* **42**, 108-124
- Wales, M., Adler, F. T., and Van Holde, K. E. (1951)** Sedimentation equilibria of polydisperse non-ideal solutes. VI Number-average molecular weight and molecular-weight distribution functions *J Phys Colloid Chem* **55**, 145-161
- Weber-Ban, E., Hur, O., Bagwell, C., Banik, U., Yang, L. H., Miles, E. W., and Dunn, M. F. (2001)** Investigation of allosteric linkages in the regulation of tryptophan synthase: the roles of salt bridges and monovalent cations probed by site-directed mutation, optical spectroscopy, and kinetics *Biochemistry* **40**, 3497-3511
- Weischet, W. O., and Kirschner, K. (1976)** Steady-state kinetic studies of the synthesis of indoleglycerol phosphate catalyzed by the alpha subunit of tryptophan synthase from Escherichia coli. Comparison with the alpha2 beta2-complex *Eur J Biochem* **65**, 375-385
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S. R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., Perna, N. T., Mobley, H. L., Donnenberg, M. S., and Blattner, F. R. (2002)** Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Escherichia coli *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 17020-17024
- Weyand, M., Schlichting, I., Herde, P., Marabotti, A., and Mozzarelli, A. (2002)** Crystal structure of the beta Ser178--> Pro mutant of tryptophan synthase. A "knock-out" allosteric enzyme *J Biol Chem* **277**, 10653-10660
- Whiteway, M., Hougan, L., Dignard, D., Thomas, D. Y., Bell, L., Saari, G. C., Grant, F. J., O'Hara, P., and MacKay, V. L. (1989)** The STE4 and STE18 genes of yeast encode potential beta and gamma subunits of the mating factor receptor-coupled G protein *Cell* **56**, 467-477

- Wierenga, R. K. (2001)** The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes *FEBS Lett* **492**, 193-198
- Wintrode, P. L., Rojsajakul, T., Vadrevu, R., Matthews, C. R., and Smith, D. L. (2005)** An obligatory intermediate controls the folding of the alpha-subunit of tryptophan synthase, a TIM barrel protein *J Mol Biol* **347**, 911-919
- Wodak, S. J., and Janin, J. (2002)** Structural basis of macromolecular recognition *Adv Protein Chem* **61**, 9-73
- Woese, C. R. (1987)** Bacterial evolution *Microbiol Rev* **51**, 221-271
- Woese, C. R., and Fox, G. E. (1977)** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5088-5090
- Wu, Y., Vadrevu, R., Yang, X., and Matthews, C. R. (2005)** Specific structure appears at the N terminus in the sub-millisecond folding intermediate of the alpha subunit of tryptophan synthase, a TIM barrel protein *J Mol Biol* **351**, 445-452
- Xie, G., Forst, C., Bonner, C., and Jensen, R. A. (2002)** Significance of two distinct types of tryptophan synthase beta chain in Bacteria, Archaea and higher plants *Genome Biol* **3**, RESEARCH0004
- Xie, G., Keyhani, N. O., Bonner, C. A., and Jensen, R. A. (2003)** Ancient origin of the tryptophan operon and the dynamics of evolutionary change *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 303-342, table of contents
- Xiu, Z. L., Chang, Z. Y., and Zeng, A. P. (2002)** Nonlinear dynamics of regulation of bacterial trp operon: model analysis of integrated effects of repression, feedback inhibition, and attenuation *Biotechnol Prog* **18**, 686-693
- Yamagata, Y., Ogasahara, K., Hioki, Y., Lee, S. J., Nakagawa, A., Nakamura, H., Ishida, M., Kuramitsu, S., and Yutani, K. (2001)** Entropic stabilization of the tryptophan synthase alpha-subunit from a hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. X-ray analysis and calorimetry *J Biol Chem* **276**, 11062-11071
- Yanofsky, C. (2003)** Using studies on tryptophan metabolism to answer basic biological questions *J Biol Chem* **278**, 10859-10878
- Yanofsky, C., Miles, E., Baeuerle, R., and Kirschner, K. (1999)** Trp operon *T.E. Creighton (ed), Encyclopedia of molecular biology, vol 4 John Wiley and sons, Inc. New York, N.Y.*, 2676-2689
- Yao, H., Kristensen, D. M., Mihalek, I., Sowa, M. E., Shaw, C., Kimmel, M., Kaviraki, L., and Lichtarge, O. (2003)** An accurate, sensitive, and scalable method to identify functional sites in protein structures *J Mol Biol* **326**, 255-261
- Yphantis, D. A. (1964)** Equilibrium Ultracentrifugation of Dilute Solutions *Biochemistry* **3**, 297-317

Yutani, K., Ogasahara, K., Tsujita, T., Kanemoto, K., Matsumoto, M., Tanaka, S., Miyashita, T., Matsushiro, A., Sugino, Y., and Miles, E. W. (1987) Tryptophan synthase alpha subunit glutamic acid 49 is essential for activity. Studies with 19 mutants at position 49 *J Biol Chem* **262**, 13429-13433

Zhaxybayeva, O., and Gogarten, J. P. (2004) Cladogenesis, coalescence and the evolution of the three domains of life *Trends Genet* **20**, 182-187

7 Abkürzungsverzeichnis

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

PRFAR	N'-[(5'-phosphoribulosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid- ribonukleotid
ProFAR	N'-[(5'-phosphoribosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid- ribonukleotid
A	Absorption; Adenin
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
A _x	Absorption bei einer Wellenlänge x nm
bla	β-Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	lösliche Fraktion des Zellextraktes (<i>crude extract</i>); Cytosin
c	Konzentration
ca.	circa
cat	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
cm	Zentimeter ($1 \cdot 10^{-2} \text{ m}$)
C-terminal	Carboxyterminales Ende einer Polypeptidkette
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
d. h .	das heißt
Da	Dalton [$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$]
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
D _x	x mM DTT

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E ₀	Enzymkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere (Autoren) (<i>et alii</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
E _x	x mM EDTA
f	Verdünnungsfaktor
g	Gramm
G	Guanosin
GA3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
H	löslicher Überstand des Hitzeschritts
h	Stunde
<i>his</i>	Gene, die für Enzyme des Histidinbiosyntheseweges kodieren, z.B. kodiert <i>hisF</i> für das Enzym HisF
HisA	5'-ProFAR Isomerase
HisF	Synthase-Einheit der ImGP-S
HisH	Glutaminase-Einheit der ImGP-S
HisI-E	Phosphoribosyl-ATP-Phosphohydrolase
His-Tag	Aminosäureschwanz bestehend aus sechs Histidinen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
i.d.R.	in der Regel
inkl.	inklusive
IGP	Indolglycerinphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
K	Kelvin; Gleichgewichtskonstante
K _a	thermodynamische Assoziationskonstante
Kana	Kanamycin
k _{cat}	Wechselzahl
k _{cat} /K _M	katalytischer Effizienzparameter
K _d	thermodynamische Dissoziationskonstante
kDa	kiloDalton (1*10 ³ g/mol)
K _M	Michaelis-Konstante, entspricht der Enzymkonzentration, bei der halbmaximale Geschwindigkeit erreicht ist
KP	Kaliumphosphat Puffer

l	Liter
LB	Luria-Bertani (-Medium)
ln	natürlicher Logarithmus
log	dekadischer Logarithmus
M	Molar (mol/l); Längenstandard (Marker)
max.	maximal
min	Minute
MPa	Megapascal ($1 \cdot 10^3$ Pa)
M_r	Relatives Molekulargewicht des Proteins[Da]
n	Nano ($1 \cdot 10^{-9}$)
NAD	Nicotinamiddinukleotid
NADH+H ⁺	reduziertes Nikotinamiddinukleotid
N-terminal	Aminoterminales Ende einer Polypeptidkette
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
ori	Replikationsstartpunkt eines Plasmids (<i>origin of replication</i>)
P	unlösliche Fraktion des Zellextraktes (Pellet)
<i>P. aerophilum</i>	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Datenbank
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
pmol	pico mol ($1 \cdot 10^{-12}$ mol)
PRPP	5-Phosphoribosyl- α -1-Pyrophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
S	Substrat; Svedberg
SCOP	<i>Structural Classification of Proteins</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SOE	<i>overlap extension</i>
ssDNA	Einzelstrang-DNA
sTrpA	α -Untereinheit der Tryptophan Synthase aus <i>S. sulfolobus</i>

T	Temperatur; Thymidin
tmTrpA	α -Untereinheit der Tryptophan Synthase aus <i>T. maritima</i>
<i>T. maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
t ₀	Zeitpunkt t = 0
T _A	Annealing-Temperatur [°C]
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
T _M	Schmelztemperatur [°C]
T _E	Transformations-Effizienz
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>trp</i>	Gene, die für Enzyme des Tryptophanbiosynthesewege kodieren
<i>trpI</i>	Phosphoribosylanthranilat-Isomerase aus <i>S. cerevisiae</i>
U	Unit, 1U entspricht der Menge an Enzym, die unter Standardbedingungen 1 μ mol Substrat pro Minute umsetzt.
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
vgl.	vergleiche
v _i	Anfangsgeschwindigkeit
V _{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
Vol	Volumen [l]
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
wt / WT	Wiltyp
z. B.	zum Beispiel
	% GC relativer molarer GC-Gehalt
Ø	Durchmesser
Δ	Differenz
°C	Grad Celcius
μ	Mikro (1*10 ⁻⁶)
^{0,1%} A _x	spezifischer Extinktionskoeffizient bei x nm
λ	Wellenlänge [nm]
ϵ_x	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge x [^l /M cm]

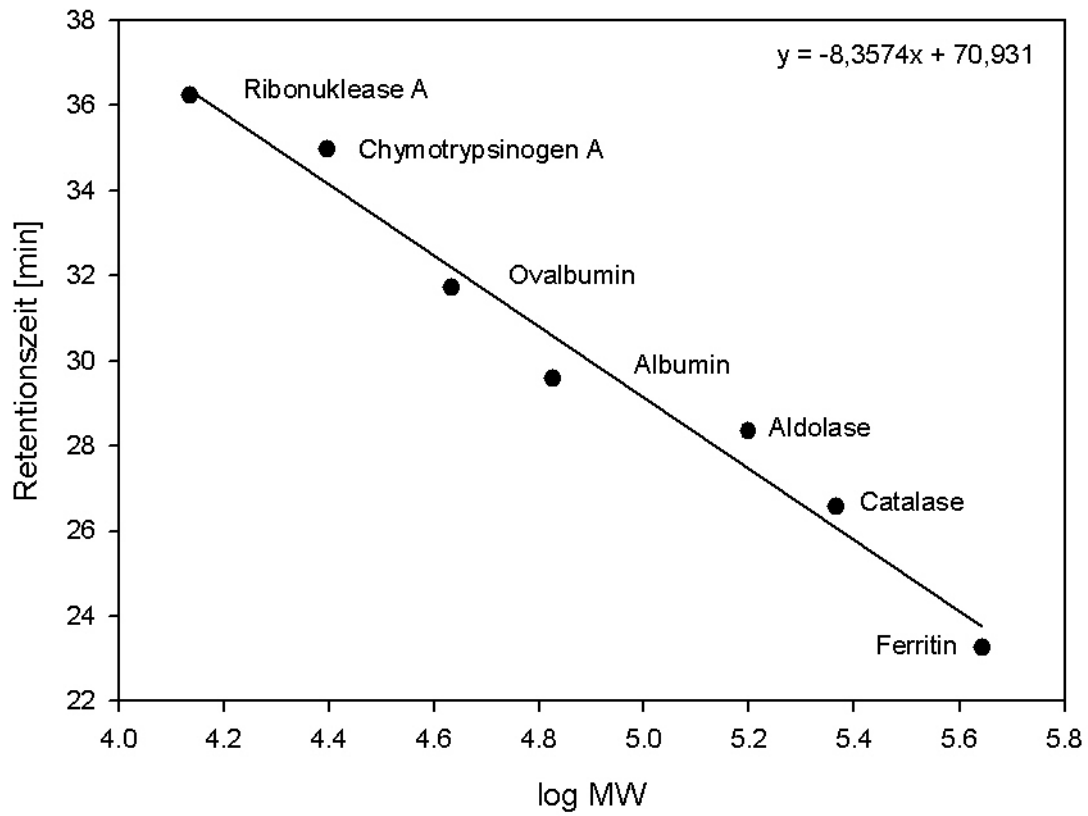
8 Anhang

8.1 Organismennamen

Ac_ac	Actinobacillus actinomycetemcomitans
Ae_pe	Aeropyrum pernix
Aq_ae	Aquifex aeolicus
Ar_fu	Archaeoglobus fulgidus
Ar_th	Arabidopsis thaliana
Ba_ha	Bacillus halodurans
Ba_st	Bacillus stearothermophilus
Ba_su	Bacillus subtilis
Bo_pe	Bordetella pertussis
Buch	Buchnera sp. APS
Ca_cr	Caulobacter crescentus
Ca_je	Campylobacter jejuni
Ch_ps	Chlamydia psittaci
Ch_te	Chlorobium tepidum
Cl_ac	Clostridium acetobutylicum
Co_di	Corynebacterium diptheriae
De_ra	Deinococcus radiodurans
De_et	Dehalococcoides ethenogenes
Ec_co	Eschichia coli
Fe_ac	Ferroplasma acidarmanus
Ge_su	Geobacter sulfurreducens
Ha_in	Haemophilus influenza
He_py	Helicobacter pylori
Hal	Halobacterium sp.
Kl_pn	Klebsiella pneumoniae
La_la	Lactococcus lactis
Le_pn	Legionella pneumophila
Me_ba	Methanosarcina barkeri
Me_ja	Methanococcus jannaschii
Me_lo	Mesorhizobium loti
Me_th	Methanobacterium thermoautotrophicum

My_bo	Mycobacterium bovis
My_le	Mycobacterium leprae
My_sm	Mycobacterium smegmatis
My_tu	Mycobacterium tuberculosis
Ne_go	Neisseria gonorrhoeae
Ne_me	Neisseria meningitides
Ni_eu	Nitrosomonas europaea
Pa_mu	Pasteurella Multocida
Ps_ae	Pseudomonas aeruginosa
Py_ab	Pyrococcus abyssi
Py_ae	Pyrobaculum aerophilum
Py_fu	Pyrococcus furiosus
Py_ho	Pyrococcus horikoshii
Rh_ca	Rhodobacter capsulatus
Rh_pa	Rhodopseudomonas palustris
Th_ac	Thermoplasma acidophilum
Sa_ty	Salmonella typhimurium
St_au	Staphylococcus aureus
St_co	Streptomyces coelicolor
St_mu	Streptococcus mutans
St_pn	Streptococcus pneumoniae
Su_so	Sulfolobus solfataricus
Th_fu	Thermomonospora fusca
Th_ma	Thermotoga maritima
Th_vo	Thermoplasma volcanium
Vi_ch	Vibrio cholerae
Xy_fa	Xylella fastidiosa
Ya_pe	Yersinia pestis
Ya_ps	Yersinia pseudotuberculosis

8.2 Kalibrierung der analytischen Gelfiltrationssäule Superdex 200



9 Danksagung

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

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Sterner für ein spannendes Thema und die Möglichkeit dieses sehr selbstständig bearbeiten zu dürfen. Ich danke für die stete Bereitschaft zur Diskussion und die große fachliche Unterstützung.

Prof. Dr. Michael Thomm danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Dr. Helmut Durchschlag und Klaus-Jürgen Tiefenbach danke ich herzlich für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugationsläufe und die Hilfe bei deren Auswertung. Bei Dr. Rainer Merkl möchte ich mich für das Interesse an meiner Arbeit und das große Engagement bei der computergestützten Sequenzanalyse bedanken. Sonja Fuchs danke ich für die riesige Unterstützung bei der Expression und Reinigung der Proteine. Dr. Harald Huber danke ich für die Anzucht der *Thermotoga maritima* Zellen. Ein großes Dankeschön gilt Dr. Stefan Hettwer für das anhaltende Interesse an Tryptophan Synthesen und meinem Befinden.

Dem Fonds der chemischen Industrie danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Ich danke Miriam Deuss für eine Kollegialität, aus der sich eine Freundschaft entwickelt hat, die mir den Arbeitsalltag oft erleichterte. Bei Simona Cerrone bedanke ich mich für eine sehr schöne Zeit in Köln und eine über die Arbeit hinaus bestehende Verbindung. Markus Richter, der mir seine Heimat mit viel Herzlichkeit näher gebracht hat, danke ich dafür dass ich mich in Regensburg einleben konnte. Michaela Häger danke ich für einen Ausgleich zu manchem Frust und die sehr förderlichen wissenschaftlichen Diskussionen. Iris Lambeck, Birgit Schneider und Susanne Marquardt: Der Umzug und die vielen gemeinsamen Fahrten haben uns sehr verbunden und ich danke für viele Unternehmungen und eine fröhliche Arbeitsatmosphäre. Felix List danke ich für einen erfrischenden Zynismus am Arbeitsplatz und spannende Tischtennismatches. Susanne Dietrich danke ich für fröhliche Mittagessen und Bowling-Turniere. Ich danke Jörg Claren für nette Gespräche während der Heimfahrten. Andre Fischer und Marion Strieder danke ich ganz besonders für die fachliche Erweiterung

und Auflockerung der Arbeitsgruppe. Außerdem möchte ich mich bei Catharina Dönges, Tobias Seitz, Jeannette Ueckert, Christiane Endres, Lorella Ungar, Mr und Mrs Barbinger, Barbara Kellerer und Melanie Vollmer für eine herzliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Bei Tuncay bedanke ich mich für das Verständnis und die unendliche Unterstützung über 600 km hinweg. Meinen Eltern danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die weihnachtlichen Plätzchenrationen. Susanne und Katharina danke ich für eine Freundschaft, auf die ich mich immer verlassen konnte.