

**Tryptophansynthesen bei hohen Temperaturen:  
Charakterisierung der thermostabilen Enzyme aus *Thermotoga  
maritima* und  
Etablierung eines Selektionssystems zur Stabilisierung thermolabiler  
Enzyme in *Thermus thermophilus***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Stefan Hettwer

aus Bad Driburg

Köln, 2001

Berichterstatter:

Prof. Dr. R. Sterner

Prof. Dr. R. Krämer

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 29.11.2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1998 bis September 2001 in der Abteilung für Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen und am Institut für Biochemie der Universität zu Köln unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Sterner angefertigt.

*Die Tätigkeit ist eine Folge verzweifelter Handlungen,  
welche erlauben, die Hoffnung zu bewahren.*

*Georges Braques*

## **Inhaltsverzeichnis**

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	4
2.1	Leben nahe dem Siedepunkt des Wassers .....	4
2.2	Die Tryptophan Biosynthese.....	5
2.3	Zielsetzung.....	7
3	Material und Methoden.....	9
3.1	Materialien .....	9
3.1.1	Bakterienstämme.....	9
3.1.1.1	<i>E. coli</i> Stämme:.....	9
3.1.1.2	<i>T. thermophilus</i> Stämme:.....	9
3.1.2	Plasmide.....	9
3.1.2.1	pET21a und pET24a .....	9
3.1.2.2	pET28a.....	10
3.1.2.3	pDS56/RBSII/SphI .....	11
3.1.2.4	pKM1-tmgapdh.....	12
3.1.2.5	pYK109.....	12
3.1.2.6	pMK18 .....	13
3.1.3	Oligonukleotide.....	14
3.1.3.1	Primer für die Tryptophan Synthase aus <i>T. maritima</i> .....	14
3.1.3.2	Primer für die Stabilisierung von TrpA aus <i>E. coli</i> .....	14
3.1.4	Längenstandards .....	15
3.1.4.1	DNA-Längenstandard .....	15
3.1.4.2	Protein-Längenstandard .....	16
3.1.5	Enzyme .....	16
3.1.6	Chemikalien, Geräte und Kits.....	16
3.1.6.1	Chemikalien .....	16
3.1.6.2	Geräte und Materialien .....	17
3.1.6.3	Kits:.....	18
3.1.7	Lösungen und Puffer .....	18
3.1.8	Nährmedien.....	22
3.1.8.1	Medien für <i>E. coli</i> .....	22
3.1.8.2	Medien für <i>T. thermophilus</i> .....	23
3.1.9	Software .....	26
3.2	Methoden .....	26
3.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	26
3.2.1.1	Abtötung von Mikroorganismen.....	26
3.2.1.2	Sterilfiltration von Lösungen .....	26
3.2.1.3	Anzucht und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> .....	26
3.2.1.4	Anzucht und Lagerung von <i>Thermus thermophilus</i> .....	27
3.2.1.5	Transformation von <i>Thermus thermophilus</i> .....	27
3.2.1.6	Präparation und Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen (Inoue et al., 1990).....	28
3.2.1.7	Präparation elektrisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen .....	28

3.2.1.8	Vorbereitung von DNA für die Elektroporation.....	29
3.2.1.9	Elektroporation nach Dower et al. (1988).....	29
3.2.1.10	<i>In vivo</i> Komplementationstest.....	29
3.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	30
3.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini- Präparation) durch modifizierte alkalische Lyse .....	30
3.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen .....	31
3.2.2.3	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>Thermus thermophilus</i> . .....	31
3.2.2.4	Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen.....	32
3.2.2.4.1	Fällung von DNA mit Ethanol.....	32
3.2.2.4.2	Fällung von DNA mit Isopropanol .....	33
3.2.2.5	Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol oder Chloroform.....	33
3.2.2.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	33
3.2.2.7	Ligation von DNA-Enden.....	34
3.2.2.8	Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) .....	34
3.2.2.9	Insert-screening .....	36
3.2.2.10	Einführung von Punktmutationen in Gene .....	36
3.2.2.11	DNA Shuffling.....	37
3.2.2.11.1	Amplifikation des Gens .....	38
3.2.2.11.2	DNaseI Verdau .....	39
3.2.2.11.3	Self-primed PCR.....	39
3.2.2.11.4	Finale PCR.....	40
3.2.2.12	Agarosegelelektrophorese.....	41
3.2.2.13	Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen .....	41
3.2.2.14	DNA-Sequenzierung.....	42
3.2.2.15	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE), (Laemmli, 1970) .....	43
3.2.3	Proteinchemische Methoden.....	44
3.2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	44
3.2.3.1.1	Halb-quantitative Proteinbestimmung nach Bradford (1976).. .....	44
3.2.3.1.2	Proteinbestimmung durch UV-Absorption.....	44
3.2.3.2	Expression und Anreicherung von Proteinen in analytischen Mengen .....	45
3.2.3.3	Expression und Anreicherung von Proteinen in präparativem Maßstab .....	46
3.2.3.4	Dialyse von Proteinlösungen .....	47
3.2.3.5	Anionenaustauschchromatographie .....	48
3.2.3.6	Präparative Gelfiltration.....	48
3.2.3.7	Analytische Gelfiltration.....	49
3.2.3.8	Analytische Ultrazentrifugation.....	50
3.2.3.9	Steady state Enzymkinetik.....	50
3.2.3.9.1	Messung der TrpA Aktivität .....	51

3.2.3.9.2	Messung der TrpB Aktivität .....	52
3.2.3.9.3	Messung der Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase mit dem gekoppelten Enzymtest .....	53
3.2.3.9.4	Messung der Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase mit dem direkten Enzymtest.....	54
3.2.3.9.5	Messung der Tryptophanaseaktivität .....	55
4	Ergebnisse und Diskussion .....	56
4.1	Die Tryptophan Synthase aus <i>T. maritima</i> .....	56
4.1.1	Die Reaktionen der Tryptophan Synthase .....	56
4.1.2	Struktur und Funktion der Tryptophan Synthase.....	56
4.1.3	Die aktiven Zentren der TrpA- und TrpB-Untereinheiten.....	59
4.1.4	Allosterische Wechselwirkungen zwischen der TrpA und TrpB ..	60
4.1.5	Eine zusätzliche $\beta$ -Untereinheit.....	60
4.1.6	Klonierung des tmtrpB2-Gens .....	65
4.1.7	Expression und Reinigung von tmTrpA .....	65
4.1.8	Expression und Reinigung von tmTrpB1 und tmTrpB2.....	67
4.1.9	Reinigung des Hilfsenzym Glyzerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase.....	70
4.1.10	Bestimmung der apparenten Molekulargewichte und der Komplexbildung mittels analytischer Gelfiltration .....	71
4.1.10.1	Läufe mit isolierten Proteinen.....	71
4.1.10.1.1	tmTrpA.....	72
4.1.10.1.2	tmTrpB1 .....	72
4.1.10.1.3	tmTrpB2.....	72
4.1.10.2	Läufe mit Proteinmischungen .....	73
4.1.10.2.1	tmTrpA mit tmTrpB1 .....	73
4.1.10.2.2	tmTrpA mit tmTrpB2.....	74
4.1.11	Bestimmung der apparenten Molekulargewichte und der Stöchiometrie der Komplexbildung mittels analytischer Ultrazentrifugation ... ..	75
4.1.12	Hitzeinaktivierungen.....	76
4.1.13	Bestimmung der enzymkinetischen Parameter bei physio-logischer Temperatur .....	78
4.1.13.1	A-Reaktion .....	78
4.1.13.2	B-Reaktion .....	83
4.1.13.2.1	tmTrpB1 .....	84
4.1.13.2.2	tmTrpB2.....	85
4.1.13.3	Die Gesamtreaktion der Tryptophansynthase.....	86
4.1.13.3.1	Gekoppelter TS-Test.....	88
4.1.13.3.2	Direkter TS-Test .....	89
4.1.13.3.3	Diskussion: Gesamtreaktion und Einzelreaktionen in den [(TrpA·TrpB1) <sub>2</sub> ]-Komplexen aus <i>T. maritima</i> und <i>E. coli</i> .....	90
4.1.13.3.4	Vergleich zu Messungen bei physiologischer Temperatur von Tryptophan Synthasen aus anderen hyperthermophilen Organismen .....	91
4.1.14	Messungen der Aktivität von tmTrpB2 bei Raumtemperatur und daraus resultierende Experimente .....	92

4.1.14.1	Tryptophanasetest .....	92
4.1.14.2	Effekt des Aminosäureaustausches tmTrpB2 W140H auf die TrpB-Aktivität.....	94
4.1.14.2.1	Erzeugung der Variante tmTrpB2 W140H.....	95
4.1.14.2.2	Messung der enzymkinetischen Parameter von tmTrpB2 W140H .....	96
4.1.14.3	Diskussion: physiologische Bedeutung von tmTrpB2.....	96
4.1.15	Ausblick .....	100
4.2	Stabilisierung von TrpA aus <i>E. coli</i> .....	101
4.2.1	Klonierung des <i>ectrpA</i> Gens in pYK109 .....	103
4.2.2	Klonierung des <i>ttrpA</i> Gens in pYK109.....	105
4.2.3	Komplementationstests .....	105
4.2.4	Klonierung eines starken <i>Thermus thermophilus</i> Promotors.....	107
4.2.5	Aufbau eines Selektionssystems mit dem Plasmid pMK18 .....	107
4.2.6	Komplementationstests .....	109
4.2.7	Erzeugung eines Pools an mutagenisierten eTrpA Varianten.....	110
4.2.8	Herstellung einer Bank von <i>ectrpA</i> -Genvarianten in pMK18 ....	112
4.2.9	Ist die Größe der Bank ausreichend? .....	113
4.2.10	Anzahl und Verteilung der Mutationen in der <i>ectrpA</i> -Genbank .	115
4.2.11	Diskussion.....	116
4.2.12	Selektion in <i>Thermus thermophilus</i> von stabilisierten ecTrpA-Varianten.....	117
4.2.13	Diskussion.....	117
4.2.14	Ausblick .....	120
5	Literaturverzeichnis .....	121
6	Anhang.....	129
6.1	Abkürzungsverzeichnis .....	129
6.1.1	Allgemeine Abkürzungen .....	129
6.1.2	Organismennamen .....	131
6.2	Steady-state enzymkinetische Parameter .....	132
6.3	Alignment von TrpB-Sequenzen .....	134
6.4	Kalibrierung der Superdex75-Gelfiltrationssäule.....	135
6.5	DNA-Sequenzen der 10 sequenzierten Klone aus der pMK18p- <i>ectrpA</i> Genbank .....	136
6.6	Aminosäure-Sequenzen der 10 sequenzierten Klone aus der pMK18p- <i>ectrpA</i> Genbank .....	139
6.7	Mögliche Aminosäureaustausche bei singulären Nukleotidaustauschen in einem Codon .....	140
7	Kurzzusammenfassung .....	141
8	Abstract .....	142
9	Lebenslauf.....	146



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der 16S rRNA Stammbaum des Lebens. ....	4
Abbildung 2: Die Tryptophan Biosynthese. ....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Expressionsvektoren pET21a und pET24a. ....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pET28a. ....	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pDS56/RBSII/ <i>Sph</i> I. ....	12
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Shuttlevektors pYK109. ....	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Shuttleplasmids pMK18. ....	14
Abbildung 8: Die Reaktionen der Tryptophan Synthase und ihrer Untereinheiten. ....	56
Abbildung 9: Struktur der Tryptophan Synthase ( $\alpha\beta\beta\alpha$ -Komplex) aus <i>S. typhimurium</i> ....	58
Abbildung 10: TrpB-Proteine lassen sich in zwei Sequenzfamilien einteilen. ....	61
Abbildung 11: Aignment von tmTrpB1 und tmTrpB2. ....	62
Abbildung 12: Die aktiven Zentren der TrpB1- und TrpB2-Proteine unterscheiden sich nur wenig. ....	63
Abbildung 13: Zusätzliche Sequenzabschnitte in TrpB2 liegen in Kontaktbereichen zwischen TrpB1 und TrpA. ....	64
Abbildung 14: Fließdiagramm der Reinigung von tmTrpA. ....	66
Abbildung 15: Analyse der Reinigung von tmTrpA mittels SDS-PAGE. ....	66
Abbildung 16: Fließdiagramm der Reinigung von tmTrpB1 und tmTrpB2. ....	68
Abbildung 17: Analyse der Reinigung von tmTrpB1 und tmTrpB2 mittels SDS-PAGE. ....	68
Abbildung 18: Analyse der Reinigung der tmGAPDH mittels SDS-PAGE. ....	70
Abbildung 19: Bestimmung der apparenten Molekulargewichte von tmTrpA, tmTrpB1, tmTrpB2 sowie von Proteinmischungen aus tmTrpA mit tmTrpB1 bzw. tmTrpB2 durch analytische Gelfiltration. ....	71
Abbildung 20: tmTrpA bildet einen Komplex mit tmTrpB1, jedoch nicht mit tmTrpB2. ....	74
Abbildung 21: Hitzeinaktivierungen. ....	77
Abbildung 22: Reaktionsschema der gekoppelten Reaktion zur Messung der A-Reaktion der Tryptophansynthase. ....	79
Abbildung 23: Sättigungskurven der A-Reaktion. ....	80
Abbildung 24: Arrhenius Diagramme der enzymkinetischen Parameter der A-Reaktion. ....	81
Abbildung 25: Zunehmende Aktivierung von tmTrpA durch tmTrpB1 mit ansteigender Temperatur. ....	82
Abbildung 26: tmTrpA wird bei 60 °C nicht durch tmTrpB2 aktiviert. ....	83
Abbildung 27: Reaktionsschema zur Messung der B-Reaktion der Tryptophan Synthase. ....	84
Abbildung 28: Reaktionsschema zur Messung der Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase nach Lane und Kirschner (1991). ....	87

Abbildung 29: Reaktionsschema zur Messung der Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase nach Brzovic <i>et al.</i> (1992). .....	87
Abbildung 30: Zur Bestimmung des $K_M$ -Wertes für Serin mit dem gekoppelten TS-Test der Gesamtreaktion wurde die bereits vorhandene „Grundaktivität“ von tmTrpA abgezogen.....	88
Abbildung 31: Arrhenius Diagramme der enzymkinetischen Parameter der Gesamtreaktion. ....	89
Abbildung 32: Reaktionsschema des gekoppelten Tests zur Bestimmung der Tryptophanaseaktivität.....	93
Abbildung 33: Nachweis der Tryptophanaseaktivität von tmTrpB2.....	93
Abbildung 34: Analyse der Reinigung von tmTrpB2 W140H mittels SDS-PAGE .....	95
Abbildung 35: Mögliche Funktionen des TrpB2 Proteins in <i>Thermotoga maritima</i> . .....	99
Abbildung 36: Strategie zur Stabilisierung von ecTrpA durch gerichtete Evolution.....	103
Abbildung 37: Klonierungsschema zur Erzeugung des Vektors pYK109-etrpA. ....	104
Abbildung 38: Klonierungsschema zur Herstellung des Plasmids pMK18-ectrpA. ....	109
Abbildung 39: Schematische Darstellung der Hybridisierungsstellen der beim DNA-Shuffling verwendeten Primer in Bezug auf das <i>ectrpA</i> -Gen im Plasmid pMK18-ectrpA. ....	110
Abbildung 40: Überprüfung der durch DNA-Shuffling erhaltenen DNA-Fragmente via Agarosegelelektrophorese.....	111
Abbildung 41: Kalibrierung der Superdex S75-Gelfiltrationssäule.....	135
Abbildung 42: Mögliche Aminosäureaustausche, die durch singuläre Mutationen in einem Codon erzeugt werden können.....	140

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Der SmartLadder DNA-Standard .....	15
Tabelle 2: Der LowRange Protein-Längenstandard .....	16
Tabelle 3: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels.....	43
Tabelle 4: Programmierung für die Reinigung von Proteinen mit der MonoQ Säule.....	48
Tabelle 5: Vergleich von Promotorsequenzen von Genen aus <i>T. maritima</i> . .....	64
Tabelle 6: Apparente und errechnete Molekulargewichte von tmTrpA, tmTrpB1 und tmTrpB2, sowie der Proteinmischungen aus tmTrpA mit tmTrpB1 und tmTrpA mit tmTrpB2.....	75
Tabelle 7: Halbwertszeiten der thermischen Inaktivierung bei 85 °C von tmTrpA, tmTrpB1, tmTrpB2 und des Tryptophan Synthase Komplexes, (tmTrpA•tmTrpB1) <sub>2</sub> .....	77
Tabelle 8: Steady state enzymkinetische Parameter für die A-Reaktion der Tryptophan Synthase aus <i>T. maritima</i> bei 80 °C und <i>E. coli</i> bei 25 °C. ....	81
Tabelle 9: Steady-state kinetische Parameter der B-Reaktion der Tryptophan Synthasen aus <i>T. maritima</i> bei 80 °C und <i>E. coli</i> bei 25 °C. ....	84
Tabelle 10: Vergleich der Steady-state kinetischen Parameter der B-Reaktion von tmTrpB2 und tmTrpB1 bei 80 °C. ....	85
Tabelle 11: Steady-state enzymkinetische Parameter der Gesamtreaktion und der Einzelreaktionen von [(tmTrpA•tmTrpB) <sub>2</sub> ] bei 80 °C und von [(ecTrpA•ecTrpB) <sub>2</sub> ] bei 25 °C.....	90
Tabelle 12: Enzymkinetische Parameter von tmTrpB2 und tmTrpB2 W140H bei 80 °C. ....	96
Tabelle 13: Untersuchung der DNA-Sequenz von 10 Klonen der Primärbank...115	
Tabelle 14: Aminosäureaustausche von 10 Klonen der Primärbank.....116	
Tabelle 15: Steady state enzymkinetische Parameter für die A-Reaktion der Tryptophan Synthase aus <i>T. maritima</i> bei verschiedenen Temperaturen ....132	
Tabelle 16: Steady state enzymkinetische Parameter für die Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase aus <i>T. maritima</i> bei verschiedenen Temperaturen, gekoppelter TS-Test.....133	
Tabelle 17: Steady state enzymkinetische Parameter für die Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase aus <i>T. maritima</i> bei verschiedenen Temperaturen, direkter TS-Test. ....133	

## **Formelverzeichnis**

Gleichung 1: Berechnung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids. ....	35
Gleichung 2: Bestimmung der <i>Annealing</i> -Temperatur in einer PCR-Reaktion. ...	35
Gleichung 3: Bestimmung der DNA-Konzentration anhand der Absorption bei 260 nm .....	42
Gleichung 4: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten eines Proteins aus der Aminosäuresequenz. ....	45
Gleichung 5: Das Lambert-Beersche Gesetz .....	45
Gleichung 6: Michaelis Menten Gleichung .....	79
Gleichung 7: Hyperbelfunktion .....	79
Gleichung 8: Berechnung der Wechselzahl $k_{cat}$ .....	80
Gleichung 9: Berechnung der Größe einer Genbank.....	113
Gleichung 10: Errechnung der Anzahl möglicher Varianten für das <i>etpA</i> Gen bei zwei Nukleotidaustauschen pro Gen.....	114
Gleichung 11: Errechnung der Mindestgröße der Genbank <i>S</i> , um mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit <i>P</i> alle Genvarianten der Selektion unterziehen zu können. ....	114
Gleichung 12: Berechnung der Mindestgröße der <i>ectrpA</i> -Genbank, um mit 95 %iger Sicherheit alle Gen-Varianten mit zwei Mutationen der Selektion unterziehen zu können. ....	114

# 1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde (A) die Tryptophansynthase aus *Thermotoga maritima* strukturell und funktionell charakterisiert und (B) ein Selektionssystem zur Stabilisierung der thermolabilen  $\alpha$ -Untereinheit der Tryptophansynthase aus *Escherichia coli* etabliert.

(A) In den bisher untersuchten Organismen besteht die Tryptophansynthase aus einem Komplex aus je zwei  $\alpha$ -Untereinheiten (TrpA) und zwei  $\beta$ -Untereinheiten (TrpB), die einem  $(\text{TrpA}\cdot\text{TrpB})_2$  Komplex ausbilden. Darin katalysiert TrpA die Spaltung von Indolglyzerinphosphat (IGP) zu Glyzerinaldehyd-3-phosphat (G3P) und Indol, welches durch einen hydrophoben Kanal zum aktiven Zentrum von TrpB diffundiert, um dort mit Serin zu Tryptophan zu kondensieren. Durch dieses "channeling" von Indol wird der Verlust dieses hydrophoben Metaboliten durch Diffusion über die Cytoplasmamembran verhindert. TrpA und TrpB können ihre Reaktionen auch in isolierter Form katalysieren, aktivieren sich jedoch im  $[(\text{TrpA}\cdot\text{TrpB})_2]$ -Komplex gegenseitig.

Die Sequenzierungen der Genome hyperthermophiler Archaea und Bacteria identifizierten zusätzlich zu den im *trp* Operon benachbarten *trpA*- und *trpB1*-Genen ein weiteres *trpB2*-Gen außerhalb des Operons. Um die Rolle dieser drei Gene in der Tryptophansynthese von *T. maritima* zu untersuchen, wurden sie heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und die Genprodukte tmTrpA, tmTrpB1 und tmTrpB2 gereinigt und charakterisiert. Durch analytische Gelfiltration und Ultrazentrifugation wurde gezeigt, dass isoliertes tmTrpA als Monomer vorliegt, während die isolierten tmTrpB1 und tmTrpB2 Proteine jeweils zu Homodimeren assoziieren. Nach Mischung von tmTrpA mit tmTrpB1 bildete sich ein  $[(\text{tmTrpA}\cdot\text{tmTrpB1})_2]$ -Komplex, während tmTrpA und tmTrpB2 nicht assoziierten. Dieser Unterschied scheint darauf zurückzuführen zu sein, dass tmTrpB2 in der potenziellen Kontaktregion zu tmTrpA störende Aminosäureinsertionen enthält, die in tmTrpB1 fehlen.

Die enzymkinetische Charakterisierung unter steady-state Bedingungen von tmTrpA, tmTrpB1, tmTrpB2 und des [(tmTrpA·tmTrpB1)<sub>2</sub>]-Komplexes erbrachte folgende Ergebnisse:

*Aktivität von tmTrpA:* Die Aktivierung von tmTrpA durch tmTrpB1 im [(tmTrpA·tmTrpB)<sub>2</sub>]-Komplex wird mit zunehmender Temperatur stärker und bei 80 °C ist sie vergleichbar der von TrpA aus *E. coli* (ecTrpA) durch ecTrpB im [(ecTrpA·ecTrpB)<sub>2</sub>]-Komplex bei 25 °C.

*Aktivität von tmTrpB1 und tmTrpB2 bei 80 °C:* Die katalytischen Effizienzen  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{Indol}}$  von isoliertem tmTrpB1 und tmTrpB2 sind vergleichbar hoch, wobei tmTrpB1 einen deutlich höheren  $k_{\text{cat}}$ -Wert und einen deutlich höheren  $K_{\text{M}}^{\text{Indol}}$  Wert aufweist als tmTrpB2; die katalytische Effizienz  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{Serin}}$  von isoliertem tmTrpB1 ist dagegen etwa 4-mal höher als die von tmTrpB2. Die  $K_{\text{M}}^{\text{Indol}}$ - und  $K_{\text{M}}^{\text{Serin}}$ -Werte von tmTrpB1 werden durch TrpA im [(tmTrpA·tmTrpB)<sub>2</sub>]-Komplex leicht bzw. stark erniedrigt, während sich der  $k_{\text{cat}}$ -Wert kaum verändert; dies führt zu einer erhöhten katalytischen Effizienzen im komplexierten tmTrpB1, sowohl in der Umsetzung von Indol, als auch insbesondere der von Serin.

*Gesamtaktivität des [(tmTrpA·tmTrpB)<sub>2</sub>]-Komplexes bei 80 °C im Vergleich zum [(ecTrpA·ecTrpB)<sub>2</sub>] Komplex bei 25 °C:* a) Die katalytischen Effizienzen  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{IGP}}$  und  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{Serin}}$  des [(tmTrpA·tmTrpB)<sub>2</sub>]-Komplexes bei 80 °C liegen etwa um eine Größenordnung über denen des [(ecTrpA·ecTrpB)<sub>2</sub>]-Komplexes bei 25 °C.

b) Die Geschwindigkeit der Gesamtraktion des [(tmTrpA·tmTrpB)<sub>2</sub>]-Komplexes scheint in etwa gleicher Weise durch die beiden Teilreaktionen begrenzt zu werden, während im [(ecTrpA·ecTrpB)<sub>2</sub>]-Komplex eindeutig die TrpA-Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist.

*Vergleich der Gesamtaktivität des [(tmTrpA·tmTrpB)<sub>2</sub>]-Komplexes mit den A- und B-Einzelreaktionen in diesem Komplex:*  $K_{\text{M}}^{\text{IGP}}$  und  $K_{\text{M}}^{\text{Serin}}$  sind in der Gesamtreaktion, wo sie unter sättigenden Konzentrationen des jeweils anderen Substrates gemessen werden, um etwa eine Größenordnung kleiner als in den entsprechenden A- und B-Einzelreaktionen des Komplexes, wo sie in Abwesenheit des jeweils anderen Substrates gemessen werden. Dies bedeutet, dass die Bindung von IGP an tmTrpA die Bindungsaffinität von Serin an tmTrpB deutlich erhöht und umgekehrt.

Weitere enzymkinetische Messungen unter steady-state Bedingungen ergaben, dass tmTrpB2 bei 37 °C eine schwache Tryptophanaseaktivität zeigt, deren physiologische Bedeutung bei 80 °C jedoch nicht klar ist.

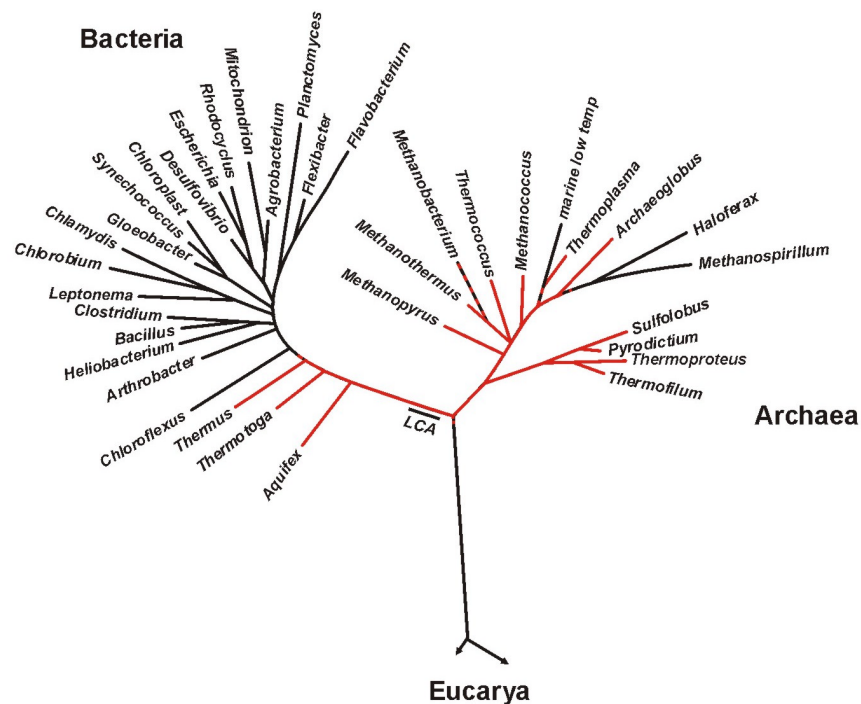
Zusammenfassend läßt sich vermuten, dass in *T. maritima* bei 80 °C der [(tmTrpA·tmTrpB)<sub>2</sub>]-Komplex dieselbe Funktion hat wie der [(ecTrpA·ecTrpB)<sub>2</sub>]-Komplex in *E. coli* bei 37 °C. Das TrpB2 Protein könnte in *T. maritima* und anderen Hyperthermophilen dagegen die Rolle eines Indol-Rettungssystems spielen. Denkbar wäre z. B., dass Indol bei den hohen Temperaturen aus dem Kanal zwischen TrpA und TrpB2 entweicht, von TrpB2 mit hoher Affinität gebunden wird (der  $K_M^{\text{Indol}}$ -Wert ist extrem niedrig!) und anschließend mit Serin zu Tryptophan kondensiert. Möglicherweise hat TrpB2 aber auch andere, bisher unbekannt Funktionen, die nur bei hyperthermophilen Temperaturen wichtig sind.

(B) Das thermolabile Enzym ecTrpA sollte durch gerichtete Evolution unter Verwendung eines *Thermus thermophilus* *trpA*-Defizienzstammes stabilisiert werden. Zu diesem Zweck wurde der *trpA*-Defizienzstamm mit einer Plasmidbank von *ectrpA*-Genen, die durch Zufallsmutagenese mittels DNA-Shuffling hergestellt worden war, transformiert. Die Transformanten wurden auf Minimalmedium ohne Tryptophan plattiert. Durch Wachstum bei 50 °C sollten Zellen identifiziert werden, die stabilisierte ecTrpA-Varianten aufgenommen haben. Obwohl durch Kontrolltransformationen des *trpA*-Defizienzstammes mit *ectrpA* und *trpA* aus *T. Thermophilus* (ttTrpA) die Funktionalität des Systems belegt werden konnte, ließen sich keine stabilisierten ecTrpA-Varianten isolieren. Mögliche Ursachen dafür könnten eine zu hohe Mutationsrate in der *ectrpA*-Genbank oder eine mangelhafte Wechselwirkung von ecTrpA mit ttTrpB bei erhöhten Temperaturen sein.

## 2 Einleitung

### 2.1 Leben nahe dem Siedepunkt des Wassers

Das Leben, wie wir es als Eukaryoten kennen, spielt sich bei moderaten Temperaturen ab. Leben nahe des Siedepunkts von Wasser mutet daher exotisch an. Der auf den Sequenzen der 16S rRNA basierende phylogenetische Stammbaum der Organismen deutet jedoch darauf hin, dass das Leben in heißer Umgebung entstanden ist. (Pace, 1997; Abbildung 1).



**Abbildung 1: Der 16S rRNA Stammbaum des Lebens.**

Die Einteilung in die drei phylogenetischen Domänen Bacteria, Eucarya und Archaea geht auf Woese *et al.* (1990) zurück. **LCA**: Letzter gemeinsamer Vorfahre aller Bacteria, Eucarya und Archaea. **rot**: Hyperthermophile und extrem thermophile Organismen. Gezeichnet nach Daniel und Cowan (2000).

Deutlich sichtbar ist die Häufung von hyperthermophilen<sup>1</sup> und extrem thermophilen Organismen (Abbildung 1, rot) um den postulierten letzten gemeinsamen Vorfahren aller Bacteria, Archaea und Eucarya (LCA). Fast alle hyperthermo-

<sup>1</sup> Die Bezeichnungen hyperthermophil und extrem thermophil gehen auf Stetter (1996) zurück. Hiernach sind hyperthermophile Organismen solche, deren optimale Wachstumstemperatur oberhalb 80 °C liegt und thermophile Organismen solche, deren optimale Wachstumstemperatur zwischen 50 °C und 80 °C liegt. Extrem Thermophile wachsen an der Obergrenze dieses Temperaturbereichs.



philen und extrem thermophilen Organismen sind Archaeen und einige wenige sind Bakterien. Extrem thermophile oder hyperthermophile Eukaryoten wurden dagegen nicht identifiziert. Es stellt sich die Frage, wie Enzyme bei diesen hohen Temperaturen ihre strukturelle Integrität aufrechterhalten und ob sie spezifische funktionelle Anpassungen aufweisen. Diese Fragen wurden in der vorliegenden Arbeit am Beispiel von Enzymen aus der Tryptophanbiosynthese der hyperthermophilen bzw. extrem thermophilen Bakterien *Thermotoga maritima* und *Thermus thermophilus* untersucht und werden in Kap. 4.2 noch ausführlicher einleitend besprochen.

*Thermotoga maritima* ist ein strikt anaerobes, gram-negatives Bakterium, das aus der Umgebung von unterseeischen hydrothermalen Quellen in Italien und den Azoren isoliert wurde (Huber *et al.*, 1986). Das Bakterium kann in einem Temperaturbereich von 55 °C bis 90 °C leben und hat eine optimale Wachstumstemperatur von 80 °C. Das Genom von *Thermotoga maritima* wurde kürzlich sequenziert (Nelson *et al.*, 1999).

*Thermus thermophilus* ist ein gram-negatives, strikt aerobes extrem thermophiles Bakterium. Es kann zwischen 47 °C und 85 °C wachsen, optimal jedoch bei etwa 72 °C. Ursprünglich wurde *Thermus thermophilus* in heißen Quellen in Japan isoliert und von Oshima und Imahori (1974) beschrieben. *Thermus thermophilus* ist ein im Labor gut zu handhabender Organismus, der mit Fremd-DNA transformiert und genetisch manipuliert werden kann. (Koyama *et al.*, 1986).

## **2.2 Die Tryptophan Biosynthese**

Chorismat wird im Shikimat-Syntheseweg gebildet und dient bei der Synthese aller aromatischen Aminosäuren als Substrat. Tryptophan wird in Bakterien, Archaeen und vielen Pflanzen synthetisiert, nicht aber in Tieren.

Reaktionsverlauf	Intermediat	Enzym	
	Chorismat	<b>Synthase</b> (TrpE, E.C.4.1.3.27)	<b>Anthranilat Synthase</b>
	Anthranilat	<b>Glutaminase</b> (TrpG, E.C.4.1.3.27)	
	N-(5'-Phosphoribosyl)-anthranilat (PRA)	<b>Anthranilat Phosphoribosyl Transferase</b> (TrpD, E.C.2.4.2.18)	<b>Tryptophan Synthase</b>
	1-(o-Carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5-phosphat (CdRP)	<b>Phosphoribosylanthranilat Isomerase</b> (TrpF, E.C.5.3.1.24)	
	Indol-3-glycerinphosphat (IGP)	<b>Indol Glycerinphosphat Synthase</b> (TrpC, E.C.4.1.1.48)	
	Indol	<b>Indolglycerinphosphat Aldolase</b> (TrpA, E.C.4.1.2.8)	<b>Tryptophan Synthase</b>
	Tryptophan	<b>L-Serin Hydro-Lyase</b> (TrpB, E.C.4.2.1.20)	

**Abbildung 2: Die Tryptophan Biosynthese.**  
 PRPP: Phosphoribosylpyrophosphat; **Gln**: Glutamin; **Glu**: Glutamat; **PPi**: Pyrophosphat.

Der erste Schritt in der Biosynthese von Tryptophan wird durch die Anthranilat Synthase katalysiert. Es handelt sich hierbei um einen Enzymkomplex bestehend aus der Synthase Untereinheit TrpE und der Glutaminamidotransferase-Untereinheit TrpG. In der Reaktion wird Chorismat zu Anthranilat und Pyruvat, sowie Glutamin zu Glutamat umgesetzt. Anschließend wird Anthranilat durch die Anthranilat-Phosphoribosyl Transferase (TrpD) mit Phosphoribosyl-pyrophosphat (PRPP) verknüpft, wodurch N-5'-Phosphoribosyl-anthranilat (PRA) entsteht. Die Reaktion wird durch die Hydrolyse des freigesetzten Pyrophosphats angetrieben. Katalysiert durch die Phosphoribosyl-anthranilat Isomerase (TrpF) kommt es dann

zu einer Amadori-Umlagerung der Aminoaldose in die Aminoketose 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose-5-phosphat (CdRP). Die Indol-3-Glyzerinphosphat Synthase (TrpC) benutzt dies als Substrat, um durch Decarboxylierung und Dehydratisierung den heterozyklischen Indolring zu schließen und Indol-3-glyzerinphosphat (IGP) zu bilden. Aus diesem wird in der Tryptophan Synthase, einem  $\alpha_2\beta_2$ -Komplex aus je zwei IGP-Lyase (TrpA) und Synthase-Untereinheiten (TrpB), das Endprodukt Tryptophan hergestellt. Hierbei wird zunächst IGP an TrpA zu Glyzerinaldehyd 3-phosphat und Indol gespalten, das durch einen hydrophoben Tunnel zu TrpB diffundiert, wo es mit Serin zu Tryptophan kondensiert. Auf die Tryptophan Synthase wird in Kap.4.1 noch ausführlicher einleitend eingegangen.

Die Strukturen aller Enzyme der Tryptophan Biosynthese mit Ausnahme von TrpD sind bekannt (Yanofski *et al.*, 1999). Bei TrpF, TrpC (Priestle *et al.*, 1987; Wilmanns *et al.*, 1992) und TrpA (Hyde *et al.*, 1988) handelt es sich um Proteine mit  $(\beta\alpha)_8$ -barrel Faltungstopologie (Wierenga, 2001; Höcker *et al.*, 2001), die übrigen bestehen aus gemischten  $\beta\alpha$ -Strukturen.

## 2.3 Zielsetzung

In Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Projekte durchgeführt, die sich mit der Struktur und Funktion von Tryptophansynthasen bei hohen Temperaturen beschäftigten.

A. (Kap.4.1) Im Zuge der Sequenzierung des Genoms von *T. maritima* wurde zusätzlich zum Operon-ständigen *trpB1*-Gen ein weiteres *trpB2*-Gen außerhalb des *trp*-Operons identifiziert (Nelson *et al.*, 1998). Zur Klärung der relativen Bedeutung der *tmtrpB1* und *tmtrpB2* Genprodukte für die Tryptophanbiosynthese von *T. maritima* sollten beide Gene in *E. coli* heterolog exprimiert und die gereinigten tmTrpB1 und tmTrpB2 Proteine *in vitro* charakterisiert werden. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden: Wie hoch sind die enzymatischen Aktivitäten der beiden Enzyme bei physiologischen Temperaturen von *T. maritima*? Welches der beiden Enzyme bildet einen Komplex mit TrpA aus *T. maritima*? Wie stark ist die wechselseitige Aktivierung von TrpA und TrpB in

einem solchen Komplex? Wie unterscheiden sich die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Tryptophan Synthasen aus *T. maritima* und *E. coli* bei den jeweiligen physiologischen Temperaturen? Vermag tmTrpB1 oder tmTrpB2 noch andere Reaktionen zu katalysieren als die Synthese von Tryptophan?

B. (Kap.4.2) Aus wissenschaftlicher und auch biotechnologischer Sicht ist die Stabilisierung thermolabiler Enzyme, z. B. durch gerichtete Evolution, von großer Bedeutung. Es sollte daher ein System etabliert werden, um die thermolabile TrpA-Untereinheit aus *E. coli* (ecTrpA) durch eine Kombination aus Zufallsmutagenese und Selektion in *T. thermophilus* zu stabilisieren. Stabilisierte ecTrpA-Varianten sollten dann überproduziert, aufgereinigt und *in vitro* charakterisiert werden, um die strukturelle Basis der Stabilisierung zu verstehen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Bakterienstämme

Es wurde sowohl mit *Escherichia coli*, als auch mit *Thermus thermophilus* Stämmen gearbeitet.

##### 3.1.1.1 *E. coli* Stämme:

**BL21 (DE3)** (Studier und Moffatt, 1986)

*hsdS*, *gal*, [*I*<sub>cl</sub>, *ts857*, *cmd1*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *relA1*]

**DH5a** (Hanahan, 1983)

[F<sup>-</sup>, *endA1*, *hsdR17* (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>-</sup>), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA* (Nal<sup>r</sup>), *relA1*, Δ(*lacZYA-argF*)U169, Φ80*lacZ*ΔM15]

**XL1blue** (Stratagene)

*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*[F<sup>'</sup> *proAB*, *lacI*<sup>q</sup>ΔM15, Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

**JMB9r<sup>-</sup>m<sup>+</sup>DtrpA** (Sternier *et al.*, 1995 EMBO)

**JMB9r<sup>-</sup>m<sup>+</sup>DtrpAB** (Sternier *et al.*, 1995 EMBO)

##### 3.1.1.2 *T. thermophilus* Stämme:

**HB27** (Oshima und Imahori, 1974)

**HB27 DtrpA** (freundliche Gabe von Y. Koyama, National Institute of Bioscience and Human-Tech., Tsukuba Science City, Ibaraki, Japan)

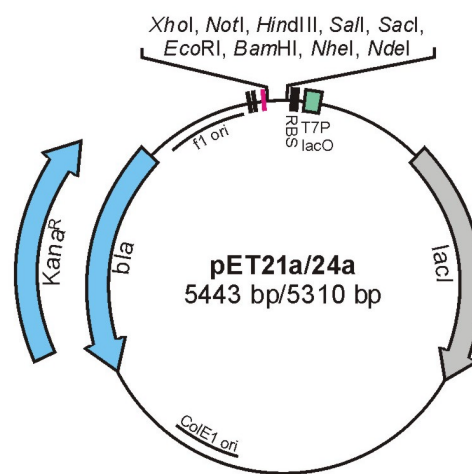
**HB27 DtrpB** (freundliche Gabe von Y. Koyama, National Institute of Bioscience and Human-Tech., Tsukuba Science City, Ibaraki, Japan)

#### 3.1.2 Plasmide

##### 3.1.2.1 *pET21a* und *pET24a*

In pET-Vektoren (Novagen) klonierte Gene stehen unter der Kontrolle des *lac*-Operatorsystems und werden von der T7-RNA-Polymerase transkribiert (Studier

*et al.*, 1990). Daher können sie nur in *E. coli* Stämmen exprimiert werden, die das Gen für die T7-RNA-Polymerase besitzen, z.B. BL21(DE3). Durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) wird die Expression des sonst reprimierten Systems ermöglicht. Der lac-Repressor ist plasmidcodiert und wird konstitutiv exprimiert. Als Selektionsmarker stehen im pET21a Vektor das  $\beta$ -Laktamasegen und im pET24a das Kanamycinresistenzgen zur Verfügung. Die klonierten Gene können 3'-seitig mit der Sequenz für einen Hexa-histidin Tag versehen werden.



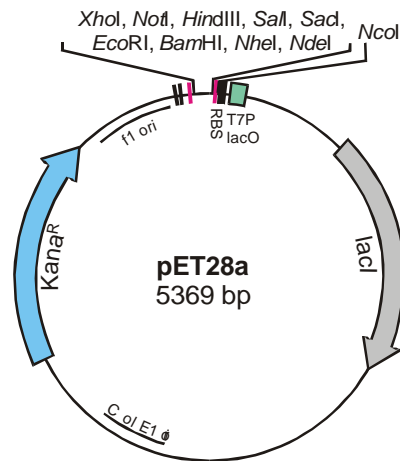
**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Expressionsvektoren pET21a und pET24a.**

**RBS:** Ribosomenbindungsstelle; **T7P:** T7 Promotor; **lacO:** lac Operator; **lacI:** Gen für den lac-Repressor; **ColE1ori:** Replikationsursprung für *E. coli*; **bla:**  $\beta$ -Laktamasegen; **Kana<sup>R</sup>:** Gen für die Kanamycin Nukleotidyl Transferase; **f1 ori:** Replikationsursprung für den Phagen f1. der **rote Balken** gibt die Lage einer 6 Histidin codierenden Sequenz zum Anhängen eines 6 x His Tags an das zu exprimierende Protein an. **Schwarzer Doppelbalken:** T7 Terminator.

### 3.1.2.2 pET28a

Der Vektor pET28a entspricht im wesentlichen den Vektoren pET21a und pET24a. Unterschiede zeigen sich im Bereich der Klonierungsstelle. Hier ist hinter die Ribosomenbindungsstelle eine *NcoI* Schnittstelle mit nachfolgender Sequenz für einen Hexa-histidin Tag eingefügt, so dass einem zu exprimierenden Protein optional N-terminal oder C-terminal ein Hexa-histidin Tag angefügt

werden kann. Als Selektionsmarker steht das Kanamycinresistenzgen zur Verfügung.

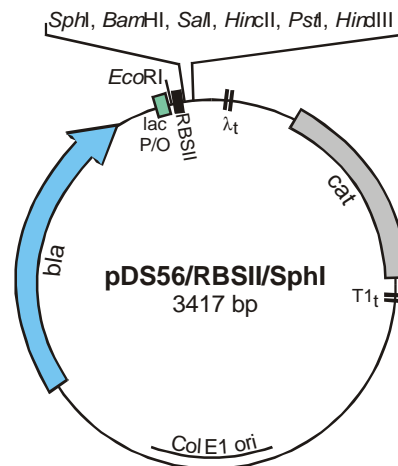


**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pET28a.**

**RBS:** Ribosomenbindungsstelle; **T7P:** T7 Promotor; **lacO:** lac Operator; **lacI:** Gen für den lac-Repressor; **ColE1ori:** Replikationsursprung für *E. coli*; **Kana<sup>R</sup>:** Gen für die Kanamycin Adenosyl Transferase; **f1 ori:** Replikationsursprung für den Phagen f1. **Die roten Balken** geben die Lage einer 6 Histidin codierenden Sequenz zum Anhängen eines 6 x His Tags an das zu exprimierende Protein an. **Schwarzer Doppelbalken:** T7 Terminator.

### 3.1.2.3 pDS56/RBSII/SphI

Der Vektor pDS56/RBSII/SphI (Bujard *et al.*, 1987; Stüber *et al.*, 1990) stellt klonierte Gene unter die Kontrolle des *lac*-Promotor/Operatorsystems und ermöglicht so eine Expression des klonierten Gens unter Zugabe von IPTG. Es steht kein cistronisches Gen für den lac-Repressor zur Verfügung; als Selektionsmarker dient das  $\beta$ -Laktamasegen. Die synthetische Ribosomenbindungsstelle RBSII ermöglicht eine effiziente Translation der transkribierten mRNA. Das Gen für die Chloramphenicol Acetyl Transferase wird nicht exprimiert.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pDS56/RBSII/SphI.**

**RBSII:** synthetische Ribosomenbindungsstelle; **λt:** Terminator des Phagen lambda; **cat:** Gen für die Chloramphenicol Acetyl Transferase. **T1t:** Terminator des Phagen T1; **ColE1ori:** Replikationsursprung für *E. coli*; **bla:** Gen für die β-Laktamase; **lacP/O:** lac Promotor/Operator.

### 3.1.2.4 pKM1-tmgapdh

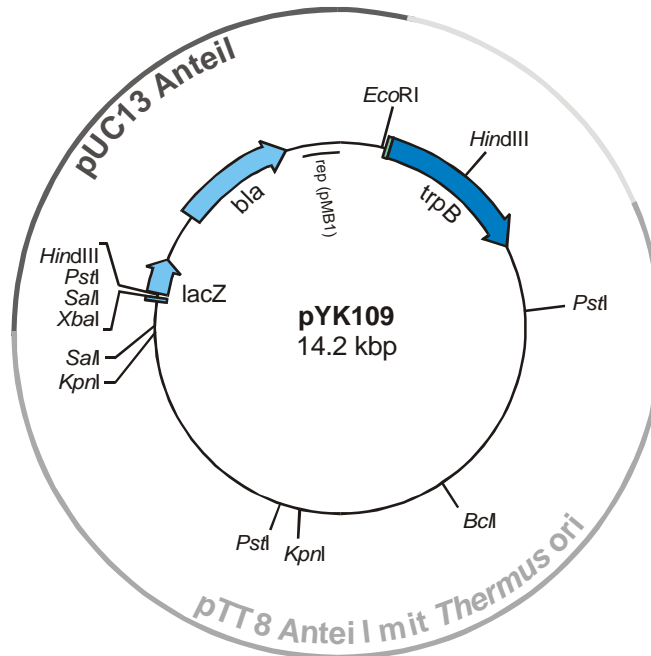
Der Vektor pKM1-tmgapdh wurde von G. Pappenberger, Universität Regensburg zur Verfügung gestellt. In diesem steht das *tmgapdh*-Gen unter der Kontrolle des T7 Promotors. Es ist mit den Schnittstellen *Xba*I und *Hind*III herauspaltbar. Der Vektor codiert ein β-Laktamasegen zur Ausbildung einer Ampicillinresistenz und besitzt das Gen für den lac-Repressor.

### 3.1.2.5 pYK109

Der Vektor pYK109 (Koyama *et al.*, 1990) kann sowohl in *E. coli*, als auch in *T. thermophilus* repliziert werden. Es handelt sich um ein Konstrukt mit pUC13 Anteil, auf dem die β-Laktamase sowie die β-Galactosidase kodiert sind und außerdem der Replikationsursprung des in *E. coli* replizierbaren Plasmids pBM1 befindlich ist. Um die Replikation in *T. thermophilus* zu ermöglichen, ist ein Fragment des Plasmids pTT8 vorhanden, das ein natürlich vorkommendes Plasmid im *Thermus thermophilus* Stamm HB8 ist und den entsprechenden Replikationsursprung aufweist. Als Selektionsmarker in *Thermus* dient das Gen



der  $\beta$ -Untereinheit der Tryptophansynthase aus *Thermus* T2. Für die Selektion muss daher ein *trpB* defizienter Stamm verwendet werden.

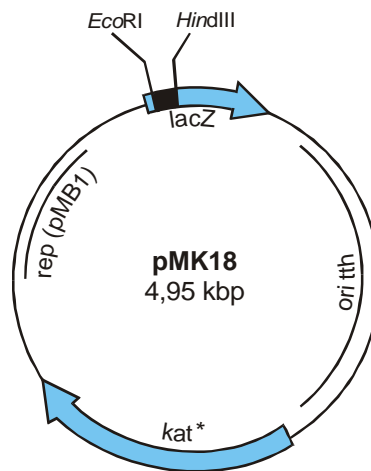


**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Shuttlevektors pYK109.**

**rep(pMB1):** Replikationsursprung für *E. coli*. **trpB:** Gen für die  $\beta$ -Untereinheit der Tryptophan Synthase aus *Thermus* T2; **lacZ:**  $\beta$ -Galaktosidasegen; **bla:**  $\beta$ -Laktamasegen.

### 3.1.2.6 pMK18

pMK18 (de Grado *et al.*, 1999) ist ein kleines Shuttleplasmid, das sowohl in *Escherichia coli*, als auch in *Thermus thermophilus* repliziert werden kann. Es enthält einen pUC18 Anteil mit einem voll funktionsfähigen *lacZ*-Gen, und dem Replikationsursprung von pBM1 für die Replikation in *E. coli*. Für die Replikation in *T. thermophilus* steht der minimale Replikationsursprung eines kryptischen *Thermus* Plasmids (de Grado *et al.*, 1998) zur Verfügung. Die Selektion erfolgt in beiden Organismen durch Expression einer bis 70 °C stabilisierten Kanamycin-Nukleotidyl-Transferase, die eine Resistenz gegenüber Kanamycin in einer Konzentration von 30  $\mu\text{g/ml}$  ermöglicht.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Shuttleplasmids pMK18.**

**lacZ:**  $\beta$ -Galaktosidasegen; **ori tth:** Replikationsursprung für *T. thermophilus*; **kat\*:** Gen einer bis auf 70 °C stabilisierten Kanamycin Nukleotidyl Transferase; **rep (pMB1):** Replikationsursprung für *E. coli*.

### 3.1.3 Oligonukleotide

#### 3.1.3.1 Primer für die Tryptophan Synthase aus *T. maritima*

5' *ttoga\_trpB2* *NdeI*      5' ACC GCA TAT GAG AAT TGT TGT GAA 3'  
 3' *ttoga\_trpB2* *HindIII*    5' CAG GAA TTC AAG CTT TCA CAC GTA CGC TGT 3'

*ttoga\_trpB2\_W140H*      5' GAG CGC TGC CGT GTT GAC CCG CTC CCG 3'  
*ttoga\_trpB2\_W140Hk*    5' CGG GAG CGG GTC AAC ACG GCA GCG CTC 3'

*T7 Promotor*              5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'  
*T7 Terminator*          5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'

#### 3.1.3.2 Primer für die Stabilisierung von *TrpA* aus *E. coli*

5' *eTSaPstI*                5' ATC CCC TGC AGA TGG AAC GCT ACG AAT CTC TG 3'  
 3' *pDSHindEco*          5' CAG CGA ATT CAA GCT TAA CTG CGC GTC 3'  
 5' *pDSEco-Mun*         5' CAC ACA CAA TTG ATT AAA GAG GAG 3'  
 5' *eTSaP*                 5' CCGTAAGCATGCAACGCTACGAATCTC 3'

5' *tTSa\_SphI*              5' CGA GCA TGC CCA CCC TCG AGG CCT TCG CCA AGG 3'  
 3' *tTSa\_Eco*              5' CCA GAA TTC AGG ACA ACG GCT TCT TTG AGC 3'  
 5' *tTSa\_PstI*             5' ATC CCC TGC AGA TGA CCA CCC TCG AGG CCT TC 3'  
 3' *tTSa\_HindIII*         5' CCT AAG CTT CAG GAC AAC GGC TTC TTT GAG 3'

**5' EcoRIpromthRBSIIPstIeTSa** 5' CCC GAA TTC TTG CCA ATC CGC CCC TTA GAG TCT ACC  
ATA GCG ATT GCC CGA GGC CCT GTA AAA CGA CGG CCA GTG CAA TTC AAT AAA GAG GAG AAA  
TTA ACT GCA GAT GGA ACG C 3'

**5' pYK109promth** 5' GTC CAA TTG TTG CAA ATC CGC CCC TTA GAG TGT ACC ATA GCG  
ATT GCC CGA GGC CTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG AAT G 3'

**5' pYK109** 5' CGC GCC TCT TCG CTA TTA CGC CAG 3'

**3' pYK109** 5' TCA TCG ACT ACC TCA TGC GCC ACC 3'

**5' pMK18** 5' GCTCCGGCTCGTATGTTG 3'

**3' pMK18** 5' GGATGTGCTGCAAGGCGA 3'

### 3.1.4 Längenstandards

#### 3.1.4.1 DNA-Längenstandard

**SmartLadder:** Eurogentec (Seraing, Belgien)

Die SmartLadder kann sowohl als Längenstandard zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten dienen, als auch um DNA-Mengen im Gel zu ermitteln, da die enthaltenen Fragmente in definierter Menge vorhanden sind.

**Tabelle 1: Der SmartLadder DNA-Standard**

Bandengröße (bp)	ng/Bande*
10 000	100
8000	80
6000	60
5000	50
4000	40
3000	30
2500	25
2000	20
1500	15
1000	100
800	80
600	60
400	40
200	20

\*=bei Auftrag von 5 µl Standard; bp=Basenpaare

### 3.1.4.2 Protein-Längenstandard

**LowRange Marker:** Pharmacia (Mannheim)

Tabelle 2: Der LowRange Protein-Längenstandard

Protein	M <sub>R</sub>
Phosphorylase B	97000
Albumin	66000
Ovalbumin	45000
Carbonic-Anhydrase	30000
Trypsin-Inhibitor	20100
α-Laktalbumin	14400

M<sub>R</sub>=relatives Molekulargewicht

### 3.1.5 Enzyme

**Restriktionsendonukleasen:** MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) oder New England Biolabs (Biolabs, Bad Schwalbach)

**Benzonase:** Merck Eurolabs (Lohmar)

**DNaseI:** Gibco BRL, jetzt Invitrogen (Karlsruhe)

**T4-DNA-Ligase:** MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) oder Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

**Taq-DNA-Polymerase:** Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

**Tfl-DNA-Polymerase:** Promega (Mannheim)

**Pfu-DNA-Polymerase:** Stratagene (La Jolla, Californien, USA)

**Laktat Dehydrogenase:** Sigma (Deisenhofen)

**Lysozym:** Sigma (Deisenhofen)

**Proteinase K:** Sigma (Deisenhofen)

### 3.1.6 Chemikalien, Geräte und Kits

#### 3.1.6.1 Chemikalien

Alle für molekularbiologische Arbeiten benötigten Chemikalien besaßen den größtmöglichen Reinheitsgrad. War dies nicht der Fall, waren sie i.d.R. zu mehr als 99% rein. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von Merck

Eurolabs (Lohmar), Fluka (Neu-Ulm), Riedel-de Haen (Seelze), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

**Bacto Agar, Trypton, Pepton, Hefeextrakt, Casamino acids:** Difco (Dreiech)

**Bio-Rad Protein Assay-Färbelösung:** Bio-Rad (München)

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

**Protogel:** BioZym (Hessisch Oldendorf)

**SequaGel XR-Puffer, SeqaGel Complete:** Biozym (Hessisch Oldendorf)

### **3.1.6.2 Geräte und Materialien**

#### **Absorptionsspektrophotometer:**

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

**Dialyseschläuche:** Serva (Heidelberg)

**Elektroporator 2510:** Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg)

**Elektroporationsküvetten:** 2mm Elektrodenabstand, Molecular BioProducts (San Diego, Californien, USA) oder Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)

**FPLC-Anlage:** Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

**Glaswaren:** Schott (Mainz), Fisher Scientific (Schwerte)

**Hoefer Elektrophoresekammer:** Mighty Small II, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) sowie **Multi Gel Caster Gelgießstand**

**Magnetrührer** (beheizbar): Ika RCT basic: Ika-Labortechnik (Staufen)

**Mikroliterpipetten:** Gilson Pipetman P20, P200, P1000, Abimed Analysentechnik (Langenfeld)

**Microliterspritze:** Microliter-Syringe, Hamilton (Banaduz, Schweiz)

**Nitrozellulosemembran:** Filtertyp: 0,0025 µm, weiß, 13 mm, Millipore (Eschborn)

**PCR-Gerät:** T3 Thermocycler, Biometra (Göttingen)

#### **Perfusionschromatographie:**

BioCAD SPRINT Perfusion Chromatography System, Perkin Elmer (Weiterstadt)

**pH-Meter:** InoLab WTW (Weilheim)

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

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

**Pufferfiltration:** Sartorius Minisart NML Sterilfilter, 0.22 µm (Göttingen)

**Quarzküvetten:** Hellma (Mühlheim)

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

**Thermoblock V2.0:** O. Waase (Göttingen)

**Ultraschallgerät:** Branson Sonifier D-250: Heinemann (Schwäbisch Gmünd)

**Vortexer:** Reax Top: Heidolph (Kelheim)

**Waagen:** Scaltec SBA 52-Laborwaage, Scaltec SBA 33-Feinwaage: Scaltec Instruments (Heiligenstadt)

**Wasserfiltration:** Millipore Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage (Eschborn)

**Zentrifugen:** Sorvall RC-5C, Heraeus Biofuge *pico*, Heraeus Biofuge *fresco*: Kendro Laboratory Products (Hanau)

Centrifuge 5810 R, Eppendorf (Hamburg)

### **3.1.6.3 Kits:**

**NucleobondAX** Plasmid-DNA-Extraktionskit, Macherey-Nagel (Düren)

**QIAquick Gel Extraction Kit:** Qiagen (Hilden)

**GenElute Plasmid Miniprep Kit:** Sigma-Aldrich (Steinheim)

**Quick Change Site Directed Mutagenesis:** Stratagene (La Jolla, Californien, USA)

**LMW-Kalibrierungskit für Gelfiltration:** Pharmacia (Mannheim)

### **3.1.7 Lösungen und Puffer**

Die Fertigung von Puffern und Lösungen, die nicht von Firmen bezogen wurden, ist im Folgenden beschrieben. Soweit nicht anders vermerkt, wurden wässrige Lösungen hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert.

**Ampicillin-Stammlösung**

Es wird eine 150 mg/ml Lösung des Na<sup>+</sup>-Ampicillin-Salzes in Wasser hergestellt, sterilfiltriert und bei –20 °C gelagert.

**APS-Stammlösung**

250 mg/ml Ammoniumperoxodisulfat werden in Wasser gelöst und bei –20 °C gelagert.

**Ammoniumacetat-Stammlösung**

7 M Ammoniumacetat

**Coomassie-Färbelösung**

50% Ethanol (96% ig)

10% Essigsäure (100% ig, „Eisessig“)

0,1% (w/v) Coomassie Brillantblau G250

in Wasser lösen und durch einen Papierfilter filtrieren.

**dNTP-Stammlösung**

Die 100 mM-Stammlösungen der einzelnen Desoxynukleotidtriphosphate werden zusammengegeben und mit TE, pH 7,0 auf eine Konzentration von 10 mM verdünnt.

**EDTA-Stammlösung**

0,5 M Na-EDTA

unter Zugabe von NaOH lösen und pH auf 8,0 einstellen.

**FeCl<sub>3</sub>-Stammlösung**

10 mM FeCl<sub>3</sub>, sterilfiltriert

**IPTG-Stammlösung**

1 M IPTG, sterilfiltriert und bei –20 °C gelagert.

**Kanamycin-Stammlösung**

75 mg/ml Kanamycin-Sulfat in Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei –20 °C gelagert.

**1 x SDS-PAGE-Laufpuffer**

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1% (w/v) SDS

**2 x SDS-PAGE-Probenpuffer**

44% (v/v) SDS-PAGE-Sammelgelpuffer

35% (v/v) Glycerin

1,7% (w/v) SDS

5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

0,05% (w/v) Bromphenolblau

**SDS-PAGE-Sammelgelpuffer**

0,5 M Tris

0,4% (w/v) SDS

pH-Wert mit HCl auf 6,8 eingestellt.

**SDS-PAGE-Trenngelpuffer**

1,5 M Tris

0,4% (w/v) SDS

pH-Wert mit HCl auf 8,8 eingestellt.

**SDS-Stammlösung**

10% (w/v) SDS

**Sucrose-Farbmarker**

60% (w/v) Saccharose

0,05% (w/v) Bromphenolblau

0,05% Xylencyanol FF

in 0,5 x TBE-Puffer

**5 x TBE-Puffer**

90 mM Tris

90 mM Borsäure

2,5 mM EDTA

**TE-Puffer**

10 mM Tris

10 mM EDTA

pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt



**TFB I**

100 mM KCl

50 mM MnCl<sub>2</sub>

30 mM KOAc

10 mM CaCl<sub>2</sub>

15 % (v/v) Glyzerin

pH-Wert mit Essigsäure auf 5,8 – 6,2 eingestellt

**TFB II**

10 mM Tris-HCl

10 mM KCl

75 mM CaCl<sub>2</sub>

15 % Glyzerin (v/v)

pH-Wert mit KOH auf 7,0 eingestellt.

**Thiamin-Stammlösung**

1 mg/ml Thiamin

sterilfiltriert, bei 4 °C gelagert.

### **3.1.8 Nährmedien**

#### **3.1.8.1 Medien für *E. coli***

##### **dYT**

1% (w/v) Hefeextrakt

1,6% (w/v) Trypton

0,5% (w/v) NaCl

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

0,5% (w/v) Hefeextrakt

1% (w/v) Trypton

1% (w/v) NaCl

##### **SOB**

2% (w/v) Trypton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl, autoklavieren.

Nach dem Autoklavieren hinzufügen:

10 mM MgCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O

10 mM MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O

##### **SOC**

SOB + 20 mM Glucose

**Vogel-Bonner-Minimalmedium** (Vogel und Bonner, 1956)

20% (w/v) Glucose

1,7% (w/v) Bacto-Agar

in Wasser, autoklavieren.

Nach dem Autoklavieren der lauwarmen Lösung hinzuzufügen:

4% (v/v) 25 x Vogel-Bonner-Mineralsalz

0,01 mM FeCl<sub>3</sub>

1 mg Thiamin

**25 x Vogel-Bonner-Mineralsalz** (Vogel & Bonner, 1956)0,5% (w/v)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 

5% (w/v) Citric acid

12,5% (w/v)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (anhydrous)4,4% (w/v)  $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 

Die Komponenten werden zunächst separat gelöst, dann vereinigt, auf das Endvolumen gebracht und autoklaviert.

**3.1.8.2 Medien für *T. thermophilus*****TVM-Medium** (Koyame *et al.*, 1986; Vollmedium, Angaben für 1000 ml)

8 g Pepton

4 g Hefeextrakt

2 g NaCl

100 ml 10 x Basal Salze

**10 x Basalsalze für TM-Medium**Lösung 1:

1 g Nitrilotriessigsäure

0,6 g  $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 

0,08 g NaCl

1,03 g  $\text{KNO}_3$ 6,89 g  $\text{NaNO}_3$ 1,11 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ad 980 ml mit WasserLösung 2:0,4 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ad 10 ml mit Wasser

Lösung 3:

0,5 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

3,16 g MnSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O

0,5 g ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O

0,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

0,025 g CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O

0,025 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O

0,046 g CoCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O ad 10 ml mit Wasser

Lösungen 1 bis 3 werden gemischt und ergeben die 10 x Basalsalzlösung zur Herstellung von TM-Medium.

Vor dem Autoklavieren muss der pH-Wert überprüft und mit NaOH ggf. auf pH 7,5 eingestellt werden.

**TMM** (Koyama *et al.*, 1986; Minimalmedium, Angaben für 1000 ml Medium)

5 g Saccharose

0,75 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,25 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2 g NaCl

2,5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

5 g Casamino acids

100 µg Biotin

1 mg Thiamin

100 µl Molybdänlösung

100 µl Vanadiumlösung

100 µl Manganlösung

100 µl Kupfer/Zinklösung

nach dem Autoklavieren:

10 ml Lösung B

100 µl Lösung C

Molybdänlösung:

1,2 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  ad 100 ml mit Wasser

Vanadiumlösung:

0,1 g  $\text{VOSO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  ad 100 ml mit Wasser

Manganlösung:

0,5 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  ad 100 ml mit 0,1N HCl

Kupfer/Zinklösung:

0,060 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0,015 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  ad 100 ml mit Wasser

Lösung B:

0,125 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

0,025 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  ad 10 ml mit Wasser

Lösung C:

6 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0,8 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

0,020 g  $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  ad 100 ml mit 0,01 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Der pH-Wert des Mediums wird vor Zugabe von Lösungen B und C mit NaOH auf pH 7,0 bis 7,2 eingestellt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren werden die sterilfiltrierten Lösungen B und C zugefügt.

**Agarplatten**

Sollten Agarplatten mit entsprechendem Medium hergestellt werden, wurde 1,5% Bacto-Agar vor dem Autoklavieren zugefügt. Antibiotika wurden in 1:1000 Verdünnung der entsprechenden Stammlösung nach dem Autoklavieren in das handwarme Medium gegeben.

### **3.1.9 Software**

**GCG Package** (Wisconsin group) gcg Version 10 zur Bearbeitung von DNA und Proteinsequenzen inkl. Pileup zur Erstellung von sequenzbasierten Alignments.

**Sigma Plot Version 5** (Jandel Scientific) zur Erstellung von Graphen

**SwissPDBviewer** Version 3.70b zur Darstellung von Strukturdaten (pdb), <http://www.expasy.ch/spdbv/> .

**POVRay for Windows** Version v. 1999 zur Erstellung von Grafiken aus pdb Dateien, <http://www.povray.org> .

**COSY Version 5.5** public version (Eberhard 1990) zur Analyse ganzer enzymatischer Umsatzkurven auf die enzymkinetischen Parameter.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Mikrobiologische Methoden**

#### **3.2.1.1 Abtötung von Mikroorganismen**

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

#### **3.2.1.2 Sterilfiltration von Lösungen**

Lösungen, die nicht durch Autoklavieren sterilisiert werden konnten, wurden durch einen Minisart NML Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert, wodurch die Mikroorganismen aus der Lösung entfernt wurden. Ebenso konnten Lösungen für den Gebrauch an den chromatographischen Anlagen entgast und von Partikeln befreit werden.

#### **3.2.1.3 Anzucht und Lagerung von *Escherichia coli***

*E. coli*-Stämme wurden bei 37 °C angezogen. Bei plasmidtragenden Stämmen wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in der Regel in LB-Medium. Bei Transformationen wurde außerdem SOC-Medium verwendet. Kulturvolumina bis zu 5 ml wurden in einem 15 ml Kulturröhrchen geschüttelt, für Volumina bis zu 50 ml wurden 100 ml

Erlenmeyerkolben verwendet. Die Röhren und Kolben wurden bei 250 Upm geschüttelt.

Das Wachstum der Zellen wurde durch Trübungsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) gegen Medium verfolgt.

Sollten Einzelkolonien erhalten werden, wurde auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die dauerhafte Lagerung von Bakterienstämmen erfolgte als Glycerin-Kultur. Dabei wurden Übernachtskulturen auf 50% (v/v) Glycerin eingestellt und bei -80 °C gelagert. Für die Anzucht von *E. coli*-Kulturen wurde ein kleines Aliquot der Glycerinkultur mit einer gelben Pipettenspitze abgekratzt und das vorbereitete Medium damit versetzt.

#### **3.2.1.4 Anzucht und Lagerung von *Thermus thermophilus***

Die Anzucht und Lagerung von *T. thermophilus*-Kulturen erfolgte analog zu der unter Kap. 3.2.1.3 beschriebenen Weise für *E. coli*. Hier wurde jedoch als Aufzuchtmedium i.d.R. TVM-Medium verwendet. Wurden plasmidtragende Stämme angezogen, wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum (30 µg/ml Kanamycin) zugesetzt. Die Inkubationstemperatur wurde hier auf 65 °C eingestellt, während Stämme ohne Plasmid bei 72 °C inkubiert wurden. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C als Glycerinkultur (50 % v/v).

#### **3.2.1.5 Transformation von *Thermus thermophilus***

*Thermus thermophilus* ist ein natürlich kompetentes Bakterium, d.h. es ist in der Lage, ohne weitere Vorbehandlung DNA aufzunehmen (Koyama *et al.*, 1986). Für die Transformation wurden 10 ml TVM Medium mit einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 72 °C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde frisches TVM-Medium zu einer  $OD_{600}$  von 0,1 bis 0,2 angeimpft und bis zu einer  $OD_{600} = 1$  unter gleichen Bedingungen wachsen lassen. Sodann wurde 1 ml der Kultur in ein neues Kulturröhrchen überführt, mit 1 µg DNA versetzt und 2 Stunden weiterinkubiert. Wurde ein Plasmid mit dem Gen einer thermostabilisierten Variante der Kanamycin Nucleotidyl Transferase verwendet, durfte die Inkubationstemperatur nicht höher als 65 °C sein, damit das Protein

nicht denaturiert und somit seine Aktivität verliert. Nach der Inkubationszeit wurde der Transformationsansatz durch Zentrifugation in der Heraeus Tischzentrifuge pico (13000 Upm, 1 min, RT) eingeengt und auf entsprechende Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden i.d.R. bei 65 °C inkubiert.

### **3.2.1.6 Präparation und Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli* Zellen (Inoue et al., 1990)**

Zur Präparation von chemisch kompetenten Zellen wurden 300 ml SOC-Medium in einem 3 l Kolben mit Zellen des entsprechenden Stammes (z.B. DH5 $\alpha$ ) angeimpft und bei 37°C und 250 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,5 angezogen. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt, in Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 4000 Upm, 10 min, 4 °C) geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in 90 ml eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Es wurde erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert und das Pellet in 12 ml TFB II-Puffer aufgenommen. Sofort nach der Resuspendierung wurden 200  $\mu$ l Aliquots der Zellsuspension in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und die zur Transformation dienende DNA wurde in einem Volumen von maximal 20  $\mu$ l zugesetzt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für 45 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, kurz auf Eis abgekühlt und dann 800  $\mu$ l LB-Medium zugegeben. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend Aliquots auf Selektivagar ausplattiert. Transformanten konnten nach Inkubation über Nacht bei 37 °C detektiert werden.

### **3.2.1.7 Präparation elektrisch kompetenter *Escherichia coli* Zellen**

Für die Herstellung von elektrisch kompetenten Zellen wurde eine Kultur analog zu Kap. 3.2.1.6 bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,5 angezogen. Anschließend wurden die Zellen für 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend 15 min bei 4 °C und 4000 Upm (Eppendorf Centrifuge 5810 R) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und erneut 15 min auf Eis gehalten. Nach der sich anschließenden Zentrifugation wie zuvor wurden die Zellen in



25 ml eiskaltem Wasser resuspendiert, daraufhin erneut 15 min auf Eis gehalten, zentrifugiert und in 10 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach einem letzten Inkubations- und Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vollständig abgossen und die Zellen auf Eis gestellt. Nach 5 min wurden sie in dem Restwasser, das an der Gefäßwandung herabgelaufen war, resuspendiert. Üblicherweise wurde so eine 500 – 700  $\mu$ l Zellsuspension erhalten. Die Zellen wurden stets frisch verwendet und nicht eingefroren.

### **3.2.1.8 Vorbereitung von DNA für die Elektroporation**

Bei einer Elektroporation ist es unerlässlich, dass die DNA-Lösung, die zur Transformation dient, keine Ionen enthält, da diese beim elektrischen Puls in der Küvette einen Kurzschluss auslösen würden. Sofern die DNA-Lösung in einem salzhaltigen Puffer vorlag, wurde sie auf Nitrozellulosefilter (Millipore) aufgebracht und gegen Wasser für 1 h dialysiert.

### **3.2.1.9 Elektroporation nach Dower et al. (1988)**

Für die Transformation wurden 100  $\mu$ l der elektrokompetenten *E. coli* Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm) überführt und mit nicht mehr als 10  $\mu$ l salzfreier DNA Lösung versetzt. Nach dem elektrischen Puls (2500 V, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ ) im Elektroporator (Eppendorf-Netheler-Hinz) wurden die Zellen sofort mit 900  $\mu$ l auf 37 °C vorgewärmtem SOB-Medium gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf entsprechendes Selektivmedium plattiert. Wurde auf Minimalnährböden plattiert, wurden die Zellen zuvor durch dreimaliges Zentrifugieren in der Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge *pico*) und Resuspendieren in jeweils 1 ml Minimalmedium gewaschen und dann plattiert.

### **3.2.1.10 In vivo Komplementationstest**

*In vivo* Komplementationstests wurden in Tryptophan auxotrophen Stämmen durchgeführt. *T. thermophilus*  $\Delta$ *trpA* wurde nach Kap. 3.2.1.5 transformiert, *E. coli*  $\Delta$ *trpA* und  $\Delta$ *trpAB* wurden durch Elektroporation Kap. 3.2.1.9 transformiert. Vor Plattierung auf Minimalmedium wurden die Zellen dreimal mit Minimal-

medium gewaschen, um das Vollmedium, das während der Transformation benutzt wurde, vollständig zu entfernen.

### **3.2.2 Molekularbiologische Methoden**

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

Die Mini Präparation von Plasmid-DNA wurde basierend auf dem Prinzip der alkalischen-SDS-Lyse (Le Gouill *et al.*, 1994) durchgeführt. Hierbei werden die Zellen durch Zugabe von Natriumhydroxid und SDS aufgeschlossen und Proteine und genomische DNA durch Neutralisation gefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt.

Plasmidtragende Zellen wurden in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (Innova 4000) in einem 15 ml Kulturröhrchen bei 250 Upm geschüttelt und von der Zellsuspension 1,5 ml in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß geerntet (Heraeus Tischzentrifuge *pico*, 13000 Upm, 30 s, RT). Die Zellen wurden in 100 µl S1 Lösung des Nukleobond AX100 Kits (Macherey Nagel) resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 100 µl S2 Lösung des Nukleobond AX100 Kits (Macherey Nagel) für 5 min bei RT lysiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 100 µl S3 Lösung des Nukleobond AX100 Kits (Macherey Nagel). Zur Extraktion von Proteinen wurden 300 µl Chloroform hinzugegeben und die Lösung 30 sec geschüttelt. Durch Zentrifugation (Heraeus Tischzentrifuge *pico*, 13000 Upm, 5 min, RT) kam es zur Ausbildung einer sehr kompakten Interphase, die aus den gefällten Stoffen bestand. Die plasmidhaltige wässrige Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA anschließend mit Ethanol gefällt (Kap. 3.2.2.4.1). Das mit 70% Ethanol gewaschene und getrocknete Pellet wurde in 30 µl Wasser aufgenommen und 10 bis 30 min auf den Schüttler gestellt.

Die erhaltenen Plasmidmengen lagen, je nach Plasmid, um 5 µg. Sie konnten für Restriktionsendonukleasespaltungen und als PCR-Templat verwendet werden.

Um besonders reine DNA zu erhalten, die für Sequenzierungsreaktionen benutzt werden konnte, wurde das GenElute Plasmid Miniprep Kit der Firma Sigma-

Aldrich Chemie GmbH, Steinheim nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA lag dann in 50 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8 vor.

### **3.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen**

Die Isolierung von DNA in präparativen Mengen (50 – 150 µg) erfolgte mit dem Nucleobond AX DNA-Extraktionskit (Macherey-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers. Es wurde die Säule AX-100 verwendet; die von der Säule eluierte DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und 1 h bei 4 °C zentrifugiert (Heraeus Tischzentrifuge *pico*, 13000 Upm). Anschließend wurde das Pellet mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen (Kap. 3.2.2.4.2) und in 100 µl Wasser aufgenommen. Die Güte der Präparation wurde durch die Aufnahme eines DNA-Spektrums überprüft (Kap 3.2.2.13).

Zur Herstellung einer Genbank wurde nicht wie im Herstellerprotokoll angegeben eine 50 ml *E. coli*-Übernachtskultur für die Anzucht von Zellen verwendet, sondern Kolonien von einer 33 x 38 cm Agarplatte abgeschabt. Hierzu wurde ein abgeflammter Spatel verwendet und die Zellmasse vor der Weiterverarbeitung nach Herstellerangaben zunächst in 10 ml Resuspensionspuffer S1 des Kits aufgenommen und anschließend durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810R, 10 min, 4000 Upm, 4 °C) pelletiert.

### **3.2.2.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus *Thermus thermophilus***

Die Zellen einer zugewachsenen 50 ml *Thermus thermophilus* Kultur in TVM-Medium wurden durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810R, 4000 Upm, 10 min, 4°C) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml Wasser resuspendiert und erneut wie zuvor zentrifugiert, um das Medium vollständig zu entfernen. Die Zellen wurden in 10 ml S1-Lösung des Nucleobond AX100 Kits (Macherey Nagel) resuspendiert und mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt. Nach 20 minütiger Inkubation bei RT wurde 1 ml 10 %iger SDS Lösung (w/v) sowie eine Spatelspitze Proteinase K zugesetzt und bei 65 °C für 30 Minuten inkubiert. Zur Trennung der DNA von den Proteinbestandteilen der Zelle folgte eine Phenolextraktion durch Zusatz von 10 ml Phenol und 200 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) und kurzem, kräftigem Schütteln. Die Phasen

der Emulsion wurden durch Zentrifugation in der Eppendorf Centrifuge 5810 R (10 min, 4000 Upm, 4 °C) getrennt. Die wässrige Oberphase wurde in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die Prozedur einmal mit Phenol ohne Ethidiumbromid und zweimal mit Chloroform wiederholt. Anschließend folgte eine Ethanolfällung wie in Kap 3.2.2.4.1 beschrieben, wobei jedoch das Pellet nach dem Waschen mit 70 %igem Ethanol bei 65 °C getrocknet wurde. Zum Schluss wurde die DNA in 3 ml Wasser aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Der Erfolg der Präparation wurde durch ein Absorptionsspektrum und Auftrag eines Aliquots auf ein 1 %iges Agarosegel überprüft. Im Falle von sauber präparierter genomischer DNA lag eine Bande weit oberhalb von 10000 bp vor.

#### **3.2.2.4 Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen**

DNA kann in wässriger Lösung mit verschiedenen Methoden ausgefällt werden. Hierdurch kann eine Reinigung der DNA erreicht werden, wenn sich die betreffenden Kontaminationen (z.B. Salze, Proteine) unter den gewählten Bedingungen im Überstand lösen. Durch Lösen der DNA in einem geringeren Volumen Lösungsmittel als das der Ausgangslösung kann eine höhere Konzentrierung der DNA-Lösung erreicht werden.

##### **3.2.2.4.1 Fällung von DNA mit Ethanol**

In der Regel wurde DNA aus wässrigen Lösungen mit Ethanol gefällt. Hierdurch können u.a. Kontaminationen wie Salze und freie Nukleotide entfernt werden. Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Vol 7 M Ammoniumacetat Lösung und 3 Vol 96 %igem Ethanol je nach zu erwartender DNA-Menge 5 bis 30 min bei -20 °C gefällt und danach abzentrifugiert (Heraeus Biofuge pico, 13000 Upm, 10 min, RT). Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und 5 min unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vollständig abgenommen und die Reaktionsgefäße zum Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur offen stehen gelassen, bis sich das Ethanol vollständig verflüchtigt hatte. Die DNA wurde sodann in Wasser gelöst.

#### 3.2.2.4.2 *Fällung von DNA mit Isopropanol*

DNA kann wie mit Ethanol auch mit Isopropanol gefällt werden. Bei der Verwendung von Isopropanol wird die Kopräzipitation von Salzen vermindert. Diese Methode wurde bei der Präparation von Plamid-DNA in präparativen Mengen benutzt. Dabei wurde die Probe mit 0,7 Vol Isopropanol versetzt und sofort bei 4 °C in der Kühlzentrifuge (Heraeus Biofuge fresco, 13000 Upm) für eine Stunde zentrifugiert. Wie nach der Ethanolfällung wurde anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen.

#### 3.2.2.5 *Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol oder Chloroform*

Die Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v)) dient zur Entfernung von Proteinen, Ethidiumbromid oder Resten anderer hydrophober Kontaminationen. Zur Entfernung von Phenol aus der wässrigen Phase und zur weiteren Denaturierung der Proteine wurde eine Extraktion mit Chloroform vorgenommen.

Die DNA Lösung wurde mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol oder Chloroform versetzt und gründlich gemischt. Zur Beschleunigung der Phasentrennung wurde der Ansatz zentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 13000 Upm, 5 min, RT) und die wässrige Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde eine Ethanolfällung (Kap. 3.2.2.4.1) durchgeführt.

#### 3.2.2.6 *Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen*

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den vom jeweiligen Hersteller des Enzyms empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen gespalten. Für analytische Zwecke wurden i.d.R. 300 bis 500 ng DNA mit etwa 2 u Enzym gespalten, sollten DNA-Fragmente präparativ verdaut werden, wurden 1 bis 10 µg DNA und mindestens 20 u Enzym verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug bei analytischem Verdau 10 bis 20 µl, bei präparativen Restriktionen wurde ein 100 µl Ansatz verwendet. Sollte ein DNA-Fragment mit zwei Enzymen gespalten werden, so wurde ein geeigneter Puffer gewählt, in dem beide Enzyme volle Aktivität besaßen; traf dies nicht zu, so wurde nacheinander verdaut, wobei nach

der ersten Restriktion eine Ethanol-fällung durchgeführt wurde (Kap 3.2.2.4.1). Der Erfolg der Spaltungen wurde gelelektrophoretisch (Kap 3.2.2.12) überprüft.

### **3.2.2.7 Ligation von DNA-Enden**

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Produkt wurde das DNA-Insert-Fragment in einem drei- bis fünffachen molaren Überschuss zum Vektorfragment zugesetzt. Sowohl das Vektorfragment als auch das Insert-Fragment wurden zuvor mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus einem Agarosegel gereinigt. Die Ligation erfolgte in T4 DNA-Ligase-Puffer (Roche) mit 2 u T4 DNA-Ligase (Roche) für 16 h bei 16 °C in einem Gesamtvolumen von 20 µl.

### **3.2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1988)**

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. 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 in einer Duplex-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 denaturierten Matrizen-DNA. In der Extensions-Phase werden bei höherer Temperatur die Primer durch eine thermostabile DNA-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 definiert. Die Reaktionen

wurden in 100 µl Gesamtvolumen durchgeführt und enthielten folgende Komponenten: 1 bis 50 ng Matrizen-DNA (bei Verwendung chromosomaler DNA bis zu 1 µg), 20 bis 50 pmol eines jeden Primers, 200 µM jeden dNTPs, 10 % (v/v) DNA-Polymerase-Puffer (10 x), 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 u DNA-Polymerase. Sollten Gene möglichst ohne Fehler synthetisiert werden, wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase benutzt, die eine 3'-5' Exonukleaseaktivität und somit *Proofreading*-Aktivität besitzt. Für Kontroll-PCR Reaktionen wie z.B. *Insertscreens* und mutagenen PCR Reaktionen wurde die *Tfl*- oder *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Die Länge und Temperatur der einzelnen Schritte eines Zyklus sowie die Anzahl der Zyklen wurde durch die Wahl der Matrize, der Basenzusammensetzung, der Länge der Primer und durch die Länge der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt: Nach einer anfänglichen Denaturierung für 5 min bei 95 °C wurde der eigentliche Reaktionszyklus gestartet. Die Denaturierung erfolgte in der Regel für 30 s bei 95 °C, das Primer-*Annealing* für 30 s bei der unten beschriebenen für das Primerpaar charakteristischen Temperatur und die Elongation für 1 min/kb (bei Verwendung der *Pfu*-Polymerase 2 min/kb) bei 72 °C; es wurden jeweils 30 bis 35 Zyklen durchgeführt.

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

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

**Gleichung 1:** Berechnung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids.

Sie lag i.d.R. zwischen 50 und 65 °C. Die *Annealing*-Temperatur  $T_A$  wurde meist für eine Polymerasekettenreaktion durch

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

**Gleichung 2:** Bestimmung der *Annealing*-Temperatur in einer PCR-Reaktion.

berechnet, wobei  $T_{M1}$  und  $T_{M2}$  die Schmelztemperaturen der beiden Primer sind.

### 3.2.2.9 *Insert-screening*

Zur schnellen Überprüfung des Erfolgs einer Klonierung wurden die nach einer Transformation erhaltenen Kolonien wie folgt behandelt: Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde der Kolonie etwas Zellmaterial entnommen, auf eine neue Agarplatte mit Zahlenraster überführt und der Rest der Zellmasse, die an der Pipettenspitze haften blieb, in einem bereits vorbereiteten PCR-Ansatz suspendiert. Der Ansatz enthielt i.d.R. Primer, die *upstream* und *downstream* der *Multi Cloning Site* des Plasmids lagen. Während der PCR-Reaktion werden die Zellen lysiert und geben die Plasmide für die Polymerase Kettenreaktion frei. Nach erfolgter PCR wurde die Größe des gewonnenen PCR Produkts durch Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.2.2.12) bestimmt.

### 3.2.2.10 *Einführung von Punktmutationen in Gene*

Für die Einführung von Punktmutationen in Genen wurde auf das Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene zurückgegriffen. Diese Methode eignet sich sehr gut für das Einführen von Nukleotidaustauschen in mittleren Regionen von Genen. Das zu verändernde Gen muss hierbei bereits in dem gewünschten Vektor kloniert sein. Für den Austausch werden zwei komplementäre Primer an die Stelle des Gens definiert, an der die Veränderung vorgenommen werden soll. Die veränderten Nukleotide liegen hierbei in der Mitte der Primer. Zur Synthese des mutierten Gens wird eine PCR Reaktion durchgeführt, bei der das gesamte Plasmid amplifiziert wird. Für die Berechnung der *Annealing*-Temperatur des Primerpaares wurde die Gleichung 2 benutzt. Die Primerlänge betrug 27 Basen. In einem 50 µl Ansatz wurden 10 % (v/v) *Pfu*-DNA-Polymerase Puffer (10 x) sowie 50 ng Template DNA eingesetzt. Weiterhin wurden je 125 ng der Primer, 1 mM dNTPs und 1 u *Pfu*-Polymerase zugesetzt. Nach einer Vordenaturierungsphase von 30 s bei 95 °C wurden 16 Zyklen mit je 30 s bei 95 °C, 1 min bei entsprechender *Annealing*-Temperatur und 2 min/kb bei 68 °C durchgeführt.

Anschließend wurde durch Zusatz von 10 u *DpnI*, welches nur methylierte DNA spaltet, das Elterplasmid abverdaut. Nach einer Stunde Verdau wurde der Ansatz auf Nitrozellulosefilter gegen Wasser dialysiert und 10 µl für eine Elektro-



transformation von *E. coli* XL1blue-Zellen eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde auf entsprechenden Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der geglückte Nukleotidaustausch wurde durch Plasmidisolierung (Kap3.2.2.2) mit anschließender Sequenzierung verifiziert.

### **3.2.2.11 DNA Shuffling**

Als Methode zur Zufallsmutagenese eines Gens wurde das DNA-Shuffling (Stemmer 1994a, 1994b) in modifizierter Form angewendet (Volkov und Arnold, 2000). Es sei angemerkt, dass bei PCR-basierten Zufallsmutagenesen nicht alle Aminosäureaustausche an einer bestimmten Position möglich sind, sondern im Durchschnitt nur 5,7 (Miyazaki und Arnold, 1999), da mehrere Nukleotidaustausche in einem Codon sehr selten sind. Abbildung 42 im Anhang zeigt die möglichen Austausche bei Mutation eines Nukleotids in einem Codon auf. Das DNA-Shuffling besteht aus 4 Arbeitsschritten: Zuerst muss in einer PCR-Reaktion genügend Ausgangsmaterial für den weiteren Prozess gewonnen werden. Für alle Teilreaktionen wurde die *Taq*-DNA-Polymerase verwendet, da diese keine *proofreading* Aktivität besitzt. Als Template DNA dient ein geeigneter Vektor, in dem das zu mutagenisierende Gen kloniert ist. Es werden mehrere Parallelansätze mit Primern durchgeführt, die das Gen mit etwa 150 bp Vektorsequenz auf beiden Seiten umschließen. Als zweiter Schritt schließt sich eine Fragmentierung der DNA mit DNaseI an. Der Verdau wird so lange durchgeführt, bis das Maximum der gespaltenen DNA-Fragmente zwischen 50 und 200 bp liegt. Es schließt sich eine PCR Reaktion an, bei der das Ausgangsfragment reassembliert wird. Hierzu werden die DNaseI verdauten Fragmente gleichzeitig als Template und als Primer in einen PCR Ansatz gegeben, dem weitere Primer fehlen. Die Reaktion wird daher auch als *self-primed* PCR bezeichnet. In diesem Schritt werden weitere Mutationen eingeführt, da es hier zu häufigen Primerverlängerungen durch die Polymerase kommt. Nach der Reassemblierung des Ausgangsprodukts werden vollständig assemblierte Gene durch eine abschließende PCR, die sog. *primed PCR*, amplifiziert. Hier werden neben dem Amplifikat aus der *self-primed* PCR auch Primer mit in den Ansatz gegeben, die

das Gen umschließen. Die folgenden Angaben sind für ein etwa 1100 bp Genfragment gemacht.

### 3.2.2.11.1 *Amplifikation des Gens*

Um genügend Ausgangsprodukt für den Shuffling Prozess zu gewinnen, wurden vier PCR Ansätze vorbereitet. Jeder Ansatz enthielt folgende Zusammensetzung:

Template DNA	50 ng
<i>upstream</i> Primer (100 µM)	1 µl
<i>downstream</i> Primer (100 µM)	1 µl
dNTPs (10mM)	2 µl
10 x <i>Taq</i> -DNA-Polymerase Puffer	10 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	8 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (2,5 u)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Die PCR Ansätze wurden bis zum Erreichen der 95 °C des PCR-Blocks auf Eis gehalten und erst dann in den Block eingesetzt. Da der PCR-Block über einen auf 110 °C beheizbaren Deckel verfügte, musste die Probe nicht mit Mineralöl überschichtet werden.

Für die PCR-Reaktion wurde folgendes Programm durchgeführt:

Schritt 1	Denaturierung	95 °C 5 min
Schritt 2	Denaturierung	95 °C 45 s
Schritt 3	<i>Annealing</i>	52 °C 45 s
Schritt 4	Elongation	72 °C 1 min 20 s
Schritt 5	Elongation	72 °C 10 min

Schritt 2 bis 4 wurden 30 Mal wiederholt, anschließend wurden die Ansätze auf 4 °C abgekühlt.

Der Erfolg der PCR wurde mit einer Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.2.2.12) überprüft.

### 3.2.2.11.2 *DNaseI Verdau*

Die zuvor hergestellten PCR-Ansätze wurden ohne weitere Behandlung einem DNaseI Verdau unterzogen. Hierzu wurde je einer der 4 Ansätze mit 0,2 u, 0,4 u, 0,8 u und 1,6 u DNaseI (Gibco) versetzt und für 7 min bei 20 °C im PCR-Block inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Block für 20 min auf 99 °C temperiert, um die DNaseI zu inaktivieren. Der Erfolg des Verdau wurde durch Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.2.2.12) überprüft und diejenige Probe weiterverwendet, bei der der entstandene DNA-Schmier eine Größe zwischen 50 und 200 bp aufwies. Waren alle Proben noch nicht weit genug fragmentiert, wurde die Prozedur unter Zugabe neuen Enzyms wiederholt, bis das gewünschte Ergebnis vorlag.

### 3.2.2.11.3 *Self-primed PCR*

Für die Reassemblierung des DNA-Abschnitts wurde eine PCR-Reaktion ohne Zugabe von Primern durchgeführt. Da der vorangegangene DNaseI Verdau zu zufälligen Fragmenten führte, können in dieser Reaktion homologe Bereiche hybridisieren, als Primer dienen und durch die Polymerase verlängert werden. Auch hier war eine weitere Behandlung der Probe nicht notwendig. Folgender PCR Ansatz wurde gemacht:

Template DNA (aus DNaseI-Verdau)	8 µl
dNTPs (10mM)	2 µl
10 x <i>Taq</i> -DNA-Polymerase Puffer	10 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	8 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (2,5 U)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Schritt 1	Denaturierung	95 °C 5 min
Schritt 2	Denaturierung	95 °C 30 s
Schritt 3	<i>Annealing</i>	52 °C 40 s
Schritt 4	Elongation	72 °C 1 min 10 s

Schritt 5      Extension                      72 °C 5 min

Schritt 2 bis 4 wurden 50 Mal wiederholt, anschließend wurden die Ansätze auf 4 °C abgekühlt.

Der Erfolg der PCR wurde auch hier mit einer Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.2.2.12) überprüft. Unter günstigen Umständen konnte hier bereits ein schwaches PCR Produkt der Ausgangsgröße ausgemacht werden, typischerweise wurde jedoch ein Schmier erhalten, der oberhalb der zu erwartenden Fragmentgröße ein Maximum erreichte.

#### 3.2.2.11.4      *Finale PCR*

Um das reassemblierte DNA Fragment stark anzureichern, wurde im letzten Schritt des DNA-Shufflings eine finale PCR-Reaktion mit Zugabe von Primern durchgeführt. Es können hierbei endständige Primer benutzt werden, die Ausbeute erhöht sich jedoch signifikant, wenn stattdessen Primer gewählt werden, die das Gen selbst umfassen und somit etwa 150 bp von den Fragmentenden hybridisieren (Volkov und Arnold, 2000). Es wurde folgender Ansatz pipettiert:

Template DNA (aus <i>self primed</i> PCR)	4 µl
<i>upstream</i> Primer (100 µM)	1 µl
<i>downstream</i> Primer (100 µM)	1 µl
dNTPs (10mM)	2 µl
10 x <i>Taq</i> -DNA-Polymerase Puffer	10 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	8 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (2,5 u)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Das PCR-Programm wurde wie in Kap. 3.2.2.11.1 beschrieben durchgeführt:

Schritt 1	Denaturierung	95 °C 5 min
Schritt 2	Denaturierung	95 °C 45 s
Schritt 3	<i>Annealing</i>	52 °C 45 s

Schritt 4	Elongation	72 °C 1 min 20 s
Schritt 5	Elongation	72 °C 10 min

Schritt 2 bis 4 wurden 30 Mal wiederholt, anschließend wurden die Ansätze auf 4 °C abgekühlt.

Der Erfolg der PCR wurde mit einer Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.2.2.12) überprüft. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt (Kap. 3.2.2.4.1), in Wasser aufgenommen und zur Klonierung in einen geeigneten Vektor mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (Kap. 3.2.2.6).

### **3.2.2.12 Agarosegelelektrophorese**

Die Auftrennung von doppelsträngiger DNA wurde in Agarosegelen von 1% (w/v) Agarose in 0,5 x TBE-Puffer durchgeführt. Die Agarose wurde in einem handelsüblichen Mikrowellengerät gekocht und mit 0,5 µg/ml (Endkonzentration) Ethidiumbromid versetzt. Die Proben wurden mit mindestens 1/5 Vol Sucrose-Farbmarker versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Als Längenstandard wurde die Smart Ladder (Eurogentec) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 190 V durchgeführt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht von 302 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und gegebenenfalls für eine Reinigung mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. So gewonnene DNA-Fragmente wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll gereinigt und lagen anschließend in 30 µl Elutionspuffer (100 mM Tris HCl, pH 8,5) vor.

### **3.2.2.13 Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen**

Die DNA-Konzentration in einer wässrigen Lösung lässt sich aus der Absorption bei 260 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmen. Gemessen wurde gegen Wasser in einer Quarzküvette (Schichtdicke = 1 cm). Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht in etwa einer Konzentration von 50 µg dsDNA/ml. In der Regel wurde eine 200fache Verdünnung der DNA-Lösung in einem Endvolumen von 1 ml her-

gestellt. Das Verhältnis von  $OD_{260}/OD_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der Lösung; bei proteinfreien Proben ist dieser Quotient größer als 1,8. Für die Messung wurde ein Spektrum von 240 nm bis 340 nm Wellenlänge mit dem CARY Bio 100 Spektralphotometer (Varian) aufgenommen.

Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte nach

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

c = Konzentration

F = Verdünnungsfaktor

$A_{260}$  = Absorption bei 260 nm

**Gleichung 3:** Bestimmung der DNA-Konzentration anhand der Absorption bei 260 nm

Eine grobe Abschätzung der DNA-Konzentration konnte auch durch Vergleich der Bandenintensitäten nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA im Agarosegel mit den Banden der Smart Ladder (Eurogentec) erfolgen.

### **3.2.2.14 DNA-Sequenzierung**

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz von Genen wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte durch Auftragssequenzierung des Service Labors des Zentrums für Molekulare Medizin Köln sequenziert. Hier wurde das Kettenabbruch-Verfahren von Sanger *et al.* (1977) verwendet. Es wurden verschiedene fluoreszenzfarbstoffmarkierte 2',3'-Dideoxynukleotide zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden in der *Thermal Cycle Sequencing* Reaktion (Sears *et al.*, 1992; Slatko, 1994) eingesetzt, so dass es in der polymerasekatalysierten Strangsynthese zu zufälligen, 3'-terminal fluoreszenzmarkierten Einzelstrang Abbruchfragmenten kommt. Die erhaltenen Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das endständige Nukleotid anhand seiner Fluoreszenzeigenschaften detektiert. Als Matrize wurden 200 bis 400 ng Plasmid DNA eingesetzt. Die Primermenge im Ansatz betrug 10 pmol. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit dem GCG Wisconsin Package.

### 3.2.2.15 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE), (Laemmli, 1970)

Zur Analyse von Proteinproben wurde die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) herangezogen (Laemmli 1970). Hier können in Anwesenheit des Detergens Natriumdodecylsulfat Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts getrennt werden. Die durchwanderte Strecke im Gel pro Zeiteinheit ist hierbei dem Logarithmus des Molekulargewichts in etwa proportional. Durch Vergleich mit dem ebenfalls auf das Gel aufgetragenen Proteinlängenstandards kann das Molekulargewicht eines Proteins abgeschätzt werden.

Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 30 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 12 – 13 Gele gleichzeitig gegossen werden konnten. Für die Fertigung wurde nach dem Rezept aus Tabelle 3 vorgegangen. Zur Lagerung der fertigen Gele wurden diese in mit SDS-PAGE-Puffer getränkten Papiertücher geschlagen und bei 4 °C aufbewahrt.

**Tabelle 3: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels.**

	Sammelgel (6%)	Trenngel (12,5%)
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	4,4 ml	27,1 ml
Sammelgel-/Trenngelpuffer	6,8 ml	14,8 ml
Wasser	15,2 ml	23,0 ml
10 % (w/v) APS	100 µl	130 µl
TEMED	22,0 µl	32,5 µl

Die fertigen Gele wurden in eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresekammer (Hofer) gesetzt und mit den zu untersuchenden Proben (bis zu 20 µl pro Tasche) beladen. Die Proben wurden zuvor in 2 x SDS-PAGE-Probenpuffer 5 min bei 100 °C erhitzt und dann abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 13000 Upm, 1 min, RT). Als Längenstandard diente der *low range* Proteinmarker (Pharmacia). Als Laufpuffer diente SDS-PAGE-Laufpuffer. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Hierzu

wurde das Gel 10 min in Coomassiefärbelösung geschwenkt und anschließend in Wasser in der Mikrowelle (3 x 2 min, 900 W) entfärbt.

### **3.2.3 Proteinchemische Methoden**

#### **3.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

##### **3.2.3.1.1 Halb-quantitative Proteinbestimmung nach Bradford (1976)**

Um den Proteingehalt einer wässrigen Lösung annähernd zu bestimmen, wurde die Quantifizierungsmethode nach Bradford (1976) verwendet. Das in der Bio-RAD Protein Assay-Färbelösung (Biorad) enthaltene Coomassie Brilliantblau bindet unspezifisch an Proteine, wobei eine Präferenz für kationische, unpolare und hydrophobe Reste besteht. Hierdurch wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 zu 595 nm verschoben. Die Absorption hängt in einem Bereich von etwa 0,2 bis 1,4 mg/ml (ca. 20 bis 140 µg Gesamtprotein) linear von der Proteinkonzentration der Lösung ab.

Zu 800 µl Proteinlösung wurden 200 µl Bio-RAD Protein Assay-Färbelösung gegeben und gemischt. Nach kurzer Zeit bildete sich der Protein-Farbstoffkomplex, der nach etwa 5-minütiger Inkubationszeit im Spektralphotometer (Cary Bio 100, Varian) bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen eine Referenz mit gleichem Puffer gemessen wurde. Die ungefähre Konzentration des Proteins konnte durch einen Vergleich mit einer zuvor aufgenommenen Kalibrierungsgeraden für BSA ermittelt werden.

##### **3.2.3.1.2 Proteinbestimmung durch UV-Absorption**

Von den Aminosäurebausteinen eines Proteins absorbieren nur Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, sowie Disulfidbrücken (Cystine) in nennenswertem Maß in einem Bereich von 250 bis 300 nm. Hierbei nimmt die Tryptophanabsorption den gewichtigsten Teil des Spektrums ein, gefolgt von Tyrosin. Für die Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung durch UV-Absorption spielen die Phenylalanine kaum eine Rolle. Mit der von Pace *et al.* (1995) entwickelten Formel (Gleichung 4) kann für Proteine bekannter Aminosäurezusammensetzung der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  wie folgt berechnet werden:



$$\epsilon_{280} (M^{-1}cm^{-1}) = \sum Trp \cdot 5500 + \sum Tyr \cdot 1490 + \sum Cystine \cdot 125$$

$\epsilon_{280}$  = molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm

**Gleichung 4:** Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten eines Proteins aus der Aminosäuresequenz.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung kann nun der berechnete molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) sowie die gemessene Absorption ( $A$ ) der Lösung bei 280 nm in das Lambert-Beersche Gesetz (Gleichung 5) eingesetzt werden:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad \Leftrightarrow \quad c = \frac{A}{\epsilon \cdot d}$$

$A$  = Absorption

$c$  = Konzentration (M)

$d$  = Schichtdicke (cm)

**Gleichung 5:** Das Lambert-Beersche Gesetz

### 3.2.3.2 **Expression und Anreicherung von Proteinen in analytischen Mengen**

Um zu untersuchen, ob sich die klonierten Gene überexprimieren lassen, wurden sog. „Probeexpressionen“ durchgeführt. Alle zu exprimierenden Gene lagen in Vektoren der pET-Serie (Novagen) vor und standen somit unter Kontrolle des T7 Promotor- und *lac* Operator- Systems.

Mit einer frisch transformierten *E. coli* BL21 (DE3) Kolonie wurden 5 ml LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C über Nacht inokuliert. Mit dieser Übernacht-Kultur wurden weitere 20 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer Zelldichte von  $OD_{600} = 0,5$  geschüttelt. Daraufhin wurde der Ansatz auf zwei Kolben verteilt und der eine mit 1 mM IPTG induziert, der andere ohne Zugabe von IPTG belassen. Nach Wachstum über Nacht wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min (Eppendorf Centrifuge 5810R, 4000 Upm, 4 °C) pelletiert und in 1 ml Aufschlusspuffer (10 mM Kaliumphosphat- oder 10 mM EPPS-Puffer, pH 7,5) resuspendiert. Die Zellen wurden mit einem Ultraschall Desintegrator (Branson Digital Sonifier, Model 250 D; Amplitude 50 %, 2 x 1 min) aufgeschlossen.

Die Proben wurden in der Tischzentrifuge (Heraeus *pico*, 13000 Upm, 5 min, RT) zentrifugiert und der Überstand vollständig in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das so erhaltene Pellet, also die unlöslichen Zellbestandteile (P), wurde wieder in 1 ml Aufschlusspuffer resuspendiert, 100 µl 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 hitzestabilen Proteinen gearbeitet wurde, konnte der Rest des löslichen Zellextrakts einem Hitzeschritt unterzogen werden. Hierzu wurde die Probe für 20 min in einem Heizblock auf 75 – 80 °C erhitzt und anschließend für 10 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert (Heraeus *pico*, 13000 Upm, 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 zur Denaturierung und Ausbildung des Protein-SDS-Komplexes für 5 min im Heizblock bei 99°C inkubiert, anschließend kurz zentrifugiert (Heraeus *pico*, 13000 Upm, 30 s, RT) und per SDS-PAGE (Kap. 3.2.2.15) analysiert.

### **3.2.3.3 Expression und Anreicherung von Proteinen in präparativem Maßstab**

Um große Proteinmengen im Milligramm-Maßstab zu reinigen, wurden kompetente (chemisch- oder elektrokompetente) *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit dem entsprechenden Konstrukt transformiert, welches das zu exprimierende Gen trug. Nach Wachstum auf Selektivagar wurde eine Einzelkolonie gepickt und über Nacht in 50 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum inkubiert. Mit 2 ml dieser Übernachtskultur wurde 1 l LB-Medium im 3 l Erlenmeyer Schikankolben angeimpft und i.d.R. bei 37 °C inokuliert. Zeigte die Probeexpression (Kap. 3.2.3.2) an, dass eine Induktion mit IPTG notwendig war, wurde beim Erreichen einer Zelldichte von  $OD_{600} = 0,5$  mit 1 mM IPTG induziert. In Einzelfällen wurde die Expressionstemperatur herabgesetzt (*tmTrpB1* und *tmTrpB2*),

insbesondere dann, wenn die Probeexpression gezeigt hatte, dass sich der Großteil des überexprimierten Proteins in der Pelletfraktion befand. Nach Wachstum über Nacht wurden die Zellen geerntet (Zentrifugation mit Sorvall RC-5B, Rotor HFA12500, 5000 Upm, 15 min, 4 °C) und in 30 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Für tmTrpA, tmTrpB1, tmTrpB2 und tmTrpB2 W140H wurde 10 mM Kaliumphosphat Puffer pH 7,5, für die tmGAPDH wurde 10 mM EPPS-Puffer pH 7,5 verwendet. Der Zellaufschluss erfolgte durch Sonifizieren mit dem Branson Digital Sonifier, Model 250 D; Amplitude 50 %, 3 x 3 min mit jeweils 1 min Pause. Die Probe wurde während der gesamten Prozedur auf Eis gehalten, um eine übermäßige Erwärmung der Lösung zu vermeiden. Die Probe wurde scharf zentrifugiert (Sorvall RC-5C, Rotor HFA 22500, 13000 Upm, 30 min) und der Überstand in einen 300 ml Erlenmeyerkolben überführt, zuvor wurde jedoch ein Aliquot von 100 µl für die spätere Analyse mittels SDS-PAGE abgenommen (*crude extract* oder Rohextrakt, C). Um Nukleinsäuren zu entfernen, wurden 100 µl Benzonase zugegeben und bei 37 °C für mindestens 1 h inkubiert. Das zuvor erhaltene Pellet wurde wieder in 30 ml Aufschlusspuffer aufgenommen und ein 100 µl Aliquot abgenommen (Pelletfraktion P). Nach dem Benzonase Verdau wurde die Probe einem Hitzeschritt unterzogen. Dazu wurde der Erlenmeyerkolben in ein auf 75 °C geheiztes Wasserbad gestellt und gelegentlich geschwenkt. Die Länge der Inkubationszeit betrug i.d.R. 20 bis 30 min. Anschließend wurde wieder scharf zentrifugiert (Sorvall RC-5C, Rotor HFA 22500, 13000 Upm, 30 min) und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Ein 100 µl Aliquot wurde für die spätere Analyse via SDS-PAGE abgenommen (Hitzeschritt H). Alle Proben P, C, H wurden mit SDS-PAGE (Kap 3.2.3.2) analysiert.

#### **3.2.3.4 Dialyse von Proteinlösungen**

War ein Pufferwechsel zwischen Reinigungsschritten notwendig, wurden die Proteinlösungen gegen einen mindestens 100fachen Volumenüberschuss an gewünschtem Puffer für mindestens 4 Stunden bei 4 °C im Dialyseschlauch (Spektrapor 2, Ausschlussgröße 12000 – 14000) dialysiert, wobei der Puffer 2 bis 3 mal gewechselt wurde. Die Probe wurde anschließend scharf abzentrifugiert (Sorvall RC-5C, Rotor HFA 22500, 13000 Upm, 30 min).

### 3.2.3.5 Anionenaustauschchromatographie

In der Anionenaustauschchromatographie werden Materialien verwendet, deren funktionelle Gruppen eine positive Ladung trägt. Verwendet wurde eine MonoQ Säule (Pharmacia, MonoQ HR 16/10, Partikelgröße 10  $\mu\text{m}$ , Säulenvolumen 20 ml). Hier ist an einer hydrophilen Polyether Matrix eine quartäre Ammoniumverbindung gekoppelt, die für die Eigenschaft der Säule als starker Anionentauscher verantwortlich zeichnet. Proteine binden hier also entsprechend ihrer Ladung bei den verwendeten Pufferbedingungen unterschiedlich stark und werden im Gradienten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen eluiert.

Zur Reinigung von Proteinen wurde nach dem Hitzeschritt eine Anionenaustauschchromatographie mit einer Perfusionschromatographie Anlage (BioCAD Sprint, PE Biosystems) durchgeführt. Die MonoQ Säule wurde mit dem Laufpuffer äquilibriert, die Probe aufgetragen und nach Waschen mit mehreren Säulenvolumina mit einem KCl Gradienten eluiert (Tabelle 4). Die Detektion erfolgte über Absorptionmessungen bei den Wellenlängen 280 nm und 260 nm.

**Tabelle 4:** Programmierung für die Reinigung von Proteinen mit der MonoQ Säule.

Flussrate	4 ml/min
Äquilibrieren	1 SV Laufpuffer <sup>a</sup>
Laden	20 – 50 ml Probe
Waschen	5 SV Laufpuffer <sup>a</sup>
Eluieren	15 SV Gradient von 0 – 750 mM KCl in Laufpuffer <sup>a</sup>
Hochsalz	1 SV 1,5 M KCl in Laufpuffer <sup>a</sup>
Regenerieren	3 SV Laufpuffer <sup>a</sup>

a = 100 mM Kaliumphosphat Puffer, pH 7,5 für die Reinigung von tmTrpA; 100 mM Kaliumphosphat Puffer pH 7,5 mit 40  $\mu\text{M}$  Pyridoxal 5'-phosphat für die Reinigung von tmTrpB1, tmTrpB2 und tmTrpB2 W140H.

Das Elutionsprofil wurde durch das Perfusionschromatographiegerät aufgezeichnet. Anhand dieses Profils wurden einzelne Proben ausgewählt, die mit dem Bradford Assay (Kap 3.2.3.1.1) überprüft und bei positivem Befund zur Identifizierung des Proteins auf ein SDS-Polyacrylamid Gel aufgetragen wurden.

### 3.2.3.6 Präparative Gelfiltration

Zur weiteren Aufreinigung der Proteine wurde eine Gelfiltration in präparativem Maßstab durchgeführt. Hiermit konnten verunreinigende Proteine hinreichend gut

abgetrennt werden. Die Probe durfte maximal 1/100 des Säulenvolumens betragen und wurde daher mit Hilfe von Centriprep 10 Konzentratoren (Millipore) nach Herstellerangaben auf ca. 2 ml einkonzentriert und gegebenenfalls mit NAP 10 oder NAP 25 Säulchen nach Anweisungen des Herstellers in 50 mM KP, 300 mM KCl, pH 7,5 umgepuffert. Hier war eventuell eine weitere Einkonzentrierung mit Centriprep Konzentratoren nötig. Die Probe wurde in den *Superloop* der FPLC Anlage (Amersham Pharmacia Biotech) eingebracht und von dort durch die Anlage auf die Säule geladen. Verwendet wurde eine präparative Gelfiltrationssäule (HiLoad 26/60 Superdex 75 pg, Bettvolumen 320 ml). Diese wurde zuvor mit 1 Volumen 50 mM KP, 300 mM KCl, pH 7,5 äquilibriert. Die Flussrate wurde auf 0,5 ml/min (max. Rückdruck: 0,3 MPa) eingestellt; insgesamt wurden 480 ml 50 mM KP, 300 mM KCl, pH 7,5 für den Lauf über die Säule gepumpt. Der Fraktionssammler nahm ab 30 ml bis zum Ende des Laufs alle 6 ml eine Fraktion. Alle Fraktionen wurden mittels qualitativem Bradford Assay (Kap 3.2.3.1.1) auf Proteingehalt überprüft, positive Proben wurden durch SDS-PAGE (Kap. 3.2.2.15) analysiert.

Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten wurden gegen 50 mM KP, 50 mM KCl, pH 7,5 dialysiert (Kap.3.2.3.4), mit Centriprep Konzentratoren einkonzentriert und anschließend in flüssigem Stickstoff tropfenweise eingefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.2.3.7 Analytische Gelfiltration**

Mit Hilfe der analytischen Gelfiltration kann das apparente Molekulargewicht sowie der Oligomerisierungszustand eines Proteins bestimmt werden. Bei globulären Proteinen besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und dem Elutionsvolumen. Das apparente Molekulargewicht eines Proteins unbekanntes Molekulargewichts oder Oligomerisierungszustands 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.

Die analytische Gelfiltration eignete sich auch, um geringe Mengen an Protein-komplexen zu reinigen.

Zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden wurde eine analytische Superdex 75 HR 10/30 Säule (Bettvolumen 24 ml) mit 1 Volumen Gelfiltrationspuffer (50 mM KP, 300 mM KCl, pH 7,5) äquilibriert. Anschließend wurden die Proteine des LMW-Gelfiltrationskalibrierungskits (Amersham Pharmacia Biotech) nacheinander nach Anweisung des Herstellers auf die Säule gegeben. Die Kalibrierungsgerade wurde durch Auftragen des Logarithmus des theoretischen Molekulargewichts gegen die Elutionszeit ermittelt (vgl. Anhang, S. 135). Nach der Kalibrierung wurde die Proteinprobe über den Probenloop mit einem Volumen von nicht mehr als 200  $\mu$ l auf die Säule aufgebracht und bei gleicher Flussrate wie die Standardproteine (0,5 ml/min, max. Rückdruck 1,7 MPa) eluiert. Die Konzentration der analysierten Proteinproben lag bei 10 bis 50  $\mu$ M, was bei 200  $\mu$ l Probe 2 bis 10 nmol Protein entspricht. Das apparente Molekulargewicht wurde durch Vergleich mit der Kalibrierungsgeraden ermittelt.

### **3.2.3.8 Analytische Ultrazentrifugation**

Die apparenten relativen Molekulargewichte von tmTrpB1, tmTrpB2 und tmTrpA sowie der Assoziationszustand einer tmTrpA:tmTrpB2 Proteinmischung wurden durch analytische Ultrazentrifugation in einer mit einer Absorptionsoptik ausgestatteten Beckmann XLA Ultrazentrifuge bestimmt (Ariel Lustig, Biozentrum der Universität Basel). Die Gleichgewichts- und Sedimentationsläufe wurden bei 20 °C durchgeführt. Die Konzentrationen der Proteine und Pufferbedingungen sind in Kap. 4.1.11 im Ergebnisteil genau beschrieben.

### **3.2.3.9 Steady state Enzymkinetik**

Die katalytischen Parameter  $k_{\text{cat}}$  und  $K_M$  wurden für die A- und B- Reaktionen sowie für die Gesamtreaktion der Tryptophansynthase aus *Thermotoga maritima* unter Fließgleichgewichtsbedingungen („steady state“) bestimmt. Die Enzymtests wurden soweit wie möglich bei physiologischer Temperatur, d.h. 80 °C durchgeführt. Konnte nicht bei 80 °C gemessen werden (A-Reaktion, Gesamtreaktion),

wurde bei verschiedenen Temperaturen unterhalb von 80 °C gemessen und eine Extrapolation mit einem Arrheniusplot gemacht.

### 3.2.3.9.1 *Messung der TrpA Aktivität*

Die A-Reaktion der Tryptophansynthase ist die aldolytische Spaltung von 1-Indol(3yl)glyzerin 3-phosphat (Indolglyzerinphosphat, IGP) zu Indol und Glycerinaldehyd 3-phosphat. Sie wird von der  $\alpha$ -Untereinheit (TrpA) katalysiert, wobei es sich um eine reversible Reaktion handelt. Da sich hierbei keine Absorptionsänderung ergibt, und somit eine photometrische Messung des Umsatzes nicht möglich ist, wird das Glycerinaldehyd 3-phosphat durch die Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase weiter zu 1-Arseno 3-phosphoglycerat umgesetzt, wobei  $\text{NAD}^+$  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 erreicht, sondern auch das Gleichgewicht der A-Reaktion auf die rechte Seite verlagert. Die Reaktionsfolge ist schematisch in Abbildung 22, Kap. 4.1.13.1, S. 79 dargestellt.

Für die Messungen von  $k_{\text{cat}}$  und  $K_M$  der A-Reaktion wurden folgende Reaktionsansätze verwendet:

100 mM EPPS/KOH, pH 7,5

180 mM KCl

40  $\mu\text{M}$  Pyridoxal 5' phosphat

6 mM  $\text{NAD}^+$

20 mM Arsenat

50  $\mu\text{g}$  tmGAPDH

33  $\mu\text{M}$  – 10000 $\mu\text{M}$  IGP

7,66  $\mu\text{M}$  TrpA

Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 300  $\mu\text{l}$  durchgeführt und durch Zugabe von IGP gestartet. Zuvor wurde der vorbereitete Reaktionsansatz 5 Minuten bei der gewünschten Temperatur im beheizten Probenschlitten des Spektrophotometers (Cary 100 Bio, Varian) inkubiert. Die Messung wurde bei 340 nm ( $\Delta\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) durchgeführt. Die A-Reaktion wurde sowohl mit tmTrpA allein als auch im Komplex mit tmTrpB1 (1,04  $\mu\text{M}$  Tryptophansynthase – aktive Zentren von TrpA und TrpB - wurden verwendet) bzw. in Mischung mit tmTrpB2 (12,2  $\mu\text{M}$  tmTrpA und 13,5  $\mu\text{M}$  tmTrpB2, aktive Zentren) gemessen. Die Proteine wurden vor Benutzung mit einer NAP Säule in 10 mM EPPS Puffer, pH 7,5 umgepuffert.

### 3.2.3.9.2 *Messung der TrpB Aktivität*

In der B-Reaktion der Tryptophansynthase werden L-Serin und Indol zu Tryptophan kondensiert. Diese Reaktion ist irreversibel und kann photometrisch gemessen werden. Hier wurde der Unterschied der Extinktionskoeffizienten von Indol und Tryptophan ausgenutzt, der bei 290 nm  $1,89 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Tryptophan-Indol) beträgt. Die Reaktion ist schematisch in Abbildung 27, Kap. 4.1.13.2, S. 84 dargestellt.

Die katalytischen Parameter  $k_{\text{cat}}$  und  $K_{\text{M}}$  konnten über vollständige Umsatzkurven oder über Messungen der Anfangssteigungen bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt werden. Da die B-Reaktion zwei Substrate aufweist, musste bei den Messungen jeweils ein Reaktionspartner in sättigender Konzentration vorgelegt werden. Hierdurch wurde eine Reaktion pseudo erster Ordnung erhalten und konnte somit ausgewertet werden. Die Reaktion wurde in 1000  $\mu\text{l}$  Volumen sowohl für TrpB1 als auch für TrpB2 durchgeführt und enthielt folgende Komponenten:



100 mM Kaliumphosphat Puffer, pH 7,5  
180 mM KCl  
40  $\mu$ M Pyridoxal 5' phosphat  
500  $\mu$ M Indol bzw. 500 mM Serin (Substrat in sättigender Konzentration)  
10 – 1600 mM Serin bzw. 6 – 880  $\mu$ M Indol (Substrat in variabler Konzentration)  
466 nM TrpB1 bzw. 337 nM TrpB2 (aktive Zentren)

Die B-Reaktion wurde auch im Tryptophansynthase Komplex gemessen, also unter Anwesenheit von TrpA. Hierzu wurde ein etwa 2facher molarer Überschuss an TrpA gegenüber TrpB zu den Reaktionskomponenten gegeben. Im Falle von TrpB1 wurden 1,1  $\mu$ M TrpA verwendet, bei TrpB2 waren es 700  $\mu$ M TrpA. Der jeweilige Ansatz wurde 5 min bei 80 °C im beheizten Probenschlitten des Spektrophotometers inkubiert und die Reaktion durch Zusatz des variablen Substrats gestartet. Die Reaktionen wurden bei 80 °C durchgeführt. Wurde für die Ermittlung der katalytischen Parameter auf vollständige Umsatzkurven zurückgegriffen (tmTrpB2, indolabhängige Reaktion), wurden sie mit Hilfe des Programms COSY (Eberhard, 1990) ausgewertet.

#### 3.2.3.9.3 *Messung der Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase mit dem gekoppelten Enzymtest*

Die Gesamtreaktion der Tryptophansynthase kann gemessen werden, indem man beide benötigte Substrate, nämlich IGP und Serin dem  $\alpha\beta\beta\alpha$  Komplex anbietet. Zur Messung eignet sich der gleiche Assay, der bei der Messung der A-Reaktion verwendet wurde: die Reaktion wird an die Umsetzung des in der A-Reaktion entstehenden Glycerinaldehyd 3-phosphats durch die GAPDH gekoppelt. Der wichtige Unterschied ist hier die Anwesenheit des Serins im Reaktionsansatz, das der  $\beta$ -Untereinheit mit dem naszendierenden Indol aus der A-Reaktion als Substrat dient und zu Tryptophan umgesetzt wird. Da der  $k_{cat}$  der  $\beta$ -Untereinheit im Komplex wesentlich größer als der von TrpA im Komplex ist, kann auf diese Weise gemessen werden. Abbildung 28, Kap. 4.1.13.3.1, S. 87 zeigt eine schematische Darstellung des Assays.

Die Reaktionsansätze enthielten folgende Komponenten:

100 mM EPPS/KOH, pH 7,5

180 mM KCl

40  $\mu$ M Pyridoxal 5' phosphat

6 mM NAD<sup>+</sup>

20 mM Arsenat

50  $\mu$ g tmGAPDH

500  $\mu$ M IGP bzw. 500 mM Serin (Substrat in sättigender Konzentration)

33 – 10000 mM Serin bzw. 3 – 660  $\mu$ M IGP (Substrat in variabler Konzentration)

0,79  $\mu$ M bzw. 1,04  $\mu$ M tmTryptophan Synthase (aktive Zentren von TrpA und TrpB1)

Die Reaktionen wurden in 300  $\mu$ l Gesamtvolumen durchgeführt und die katalytischen Parameter durch Aufnahme von Anfangssteigungen bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt.

#### 3.2.3.9.4 *Messung der Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase mit dem direkten Enzymtest*

Die Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase kann auch direkt über die Bildung von Tryptophan verfolgt werden. Brzovic *et al.* (1992) geben den Unterschied in den Extinktionskoeffizienten von Tryptophan und IGP mit  $\Delta\epsilon_{290(\text{Trp-IGP})} = 0,56 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  an. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 29, Kap. 4.1.13.3.2, S. 87 dargestellt. Zur Messung der Reaktion wurde folgende Ansätze verwendet:

100 mM Kaliumphosphat Puffer, pH 7,5

180 mM KCl

40  $\mu$ M Pyridoxal 5' phosphat

500  $\mu$ M IGP bzw. 500 mM Serin (Substrat in sättigender Konzentration)

333 – 10000 mM Serin bzw. 20 – 666  $\mu$ M IGP (Substrat in variabler Konzentration)

0,81  $\mu$ M bzw. 0,59  $\mu$ M tmTryptophan Synthase (aktive Zentren von TrpA und TrpB1)

### 3.2.3.9.5 *Messung der Tryptophanaseaktivität*

Die Bildung von Indol, Pyruvat und Ammoniak aus Tryptophan wurde mit einem gekoppelten Enzymtest photometrisch verfolgt. Hierbei wird das gebildete Pyruvat von der Laktat Dehydrogenase zu Laktat umgesetzt, wobei  $\text{NADH}+\text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert wird. Die daraus resultierende Änderung des Extinktionskoeffizienten ( $\Delta\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) diene als Messsignal.

Das Reaktionsschema ist in Abbildung 32, Kap. 4.1.14.1, S. 93 dargestellt. Die Reaktionsansätze enthielten folgende Komponenten:

100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5

180 mM KCl

40  $\mu\text{M}$  PLP

150  $\mu\text{M}$   $\text{NADH}+\text{H}^+$

6,8 u Laktat Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel (Sigma Aldrich)

5 – 22  $\mu\text{M}$  tmTrpB2

Die Reaktion wurde mit 1 mM Tryptophan gestartet. Als Messtemperatur wurden 37 °C gewählt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Die Tryptophan Synthase aus *T. maritima*

#### 4.1.1 Die Reaktionen der Tryptophan Synthase

Die Tryptophan Synthase (E.C. 4.2.1.20) katalysiert die beiden letzten Schritte der Biosynthese von Tryptophan. Die  $\alpha$ -Untereinheit (TrpA) katalysiert die reversible Spaltung von Indol(3-yl)glyzerinphosphat (Indolglyzerinphosphat, IGP) zu D-Glyzerinaldehyd 3-phosphat und Indol (IND). Diese Reaktion wird als A-Reaktion bezeichnet. Die  $\beta$ -Untereinheit (TrpB) katalysiert die Kondensationsreaktion von Indol und Serin zu Tryptophan und Wasser (B-Reaktion). Hierbei spielt Pyridoxal 5'-phosphat (PLP) eine wichtige Rolle als Koenzym (Lane und Kirschner, 1983a). Die Gesamtreaktion beschreibt die Umsetzung von Indolglyzerinphosphat und Serin zu Tryptophan, Glyzerinaldehyd 3-phosphat und Wasser (Abbildung 8).

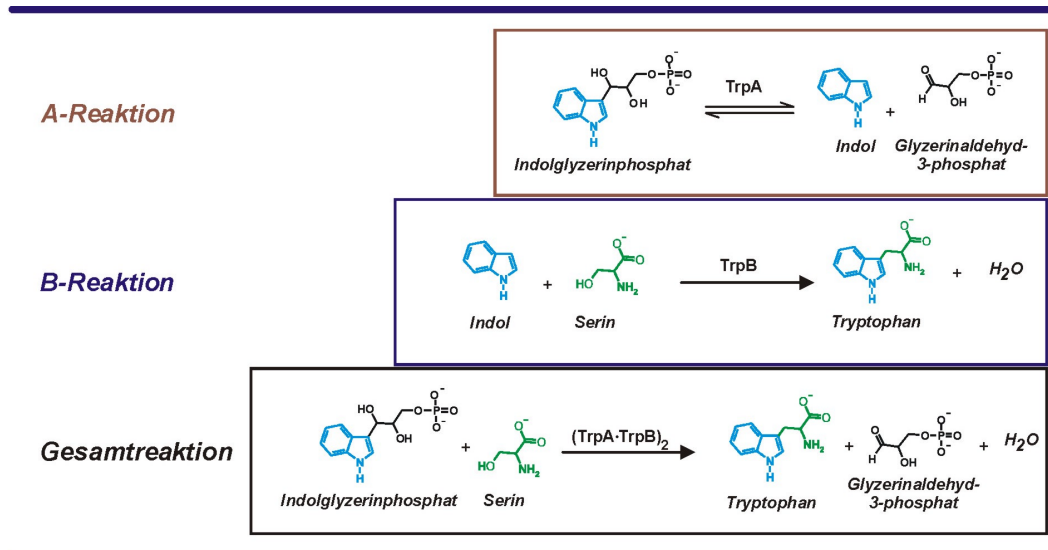


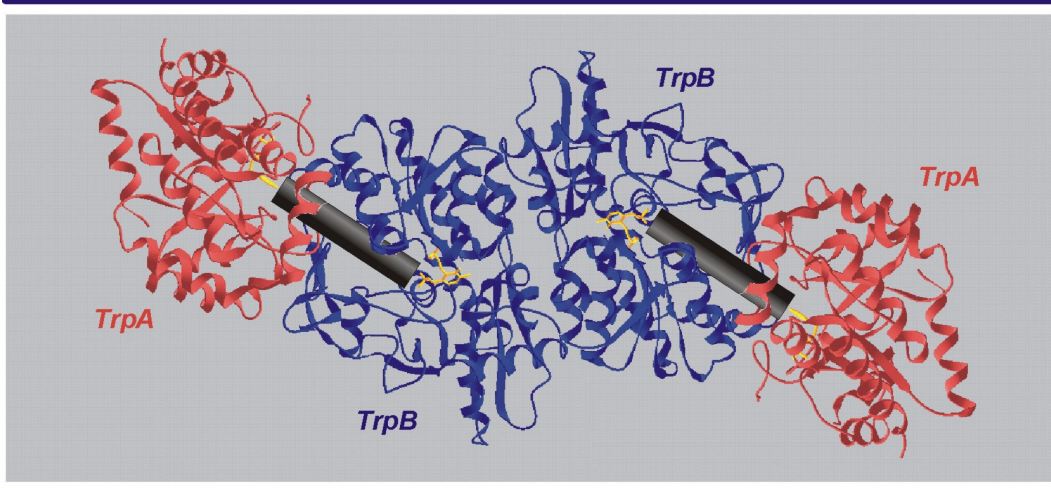
Abbildung 8: Die Reaktionen der Tryptophan Synthase und ihrer Untereinheiten.

#### 4.1.2 Struktur und Funktion der Tryptophan Synthase

In den meisten bisher untersuchten Prokaryoten liegen die Gene, die für TrpA und TrpB kodieren, benachbart in einem Operon in der Reihenfolge *trpB trpA* vor (GenBank database). In Pilzen wie *Saccharomyces cerevisiae* (Zalkin und Yanofsky, 1982), *Neurospora crassa* (Matchett und DeMoss, 1975) und *Coprinus*

*cinereus* (Skrzynia *et al.*, 1989) wurden *trpA-trpB* Fusionsgene gefunden, die für eine einzige Polypeptidkette codieren und bei denen das *trpA* Gen vor dem *trpB* Gen im Operon liegt.

Kristallographische Studien zeigten, dass die Untereinheiten der *S. typhimurium* Tryptophan Synthase ein gestrecktes Heterotetramer mit der Anordnung  $\alpha\beta\beta\alpha$  bildet (Abbildung 9, Hyde *et al.*, 1988). Die Länge dieses Komplexes beträgt 150 Å. Das Zentrum des Tetramers wird von einem TrpB-Dimer gebildet. Die thermodynamische Dissoziationskonstante zwischen den beiden TrpB-Untereinheiten beträgt ohne Koenzym im *E. coli* Enzymkomplex 1  $\mu$ M und wird durch Bindung von Pyridoxal 5'-phosphat um eine Größenordnung gesenkt (Creighton und Yanofski, 1966). Die TrpA-Untereinheiten liegen auf gegenüberliegenden Seiten im Komplex. Die aktiven Zentren von TrpA und TrpB sind 25 Å voneinander entfernt und durch einen hydrophoben Tunnel verbunden. Dieser hat die Funktion, das an TrpA erzeugte Indol zum aktiven Zentrum von TrpB zu „channeln“ und schirmt es dabei vom Lösungsmittel ab. Außer in der Tryptophan Synthase, bei der zum ersten Mal ein Tunnel zwischen zwei aktiven Zentren ausgemacht werden konnte, ist in späterer Zeit auch bei anderen Multienzymkomplexen Substratchanneling festgestellt bzw. vermutet worden. Beispiele hierfür sind die Carbamoylphosphat Synthase, die Glutamin Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase, die Asparagin Synthase (Huang *et al.*, 2001), sowie der Imidazolglyzerinphosphat Synthase (Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001).



**Abbildung 9: Struktur der Tryptophan Synthase (abba-Komplex) aus *S. typhimurium*** (Struktur (2TRS, nach Huang *et al.*, 2001)). Die Symmetrieachse für die Heterodimere steht senkrecht zur Bildebene. **Rot:** TrpA, **blau:** TrpB, **gelb:** Indolpropanolphosphat an TrpA gebunden und Pyridoxal 5'-phosphat an TrpB gebunden. **Die schwarzen Zylinder** deuten den Tunnel zwischen den aktiven Zentren der Untereinheiten an.

Die Faltungstopologie von TrpA ist die eines  $(\beta\alpha)_8$ -Fasses (Wierenga, 2001; Höcker *et al.*, 2001), die zuerst an der Triosephosphat-Isomerase gefunden wurde (Banner *et al.*, 1975) und daher auch den Namen TIM-barrel Faltung trägt. TrpA besitzt zusätzlich zur Grundausrüstung, die aus 8 alternierenden  $\beta\alpha$ -Einheiten besteht, drei weitere  $\alpha$ -Helices, die am N-Terminus und hinter den  $\beta$ -Strängen 2 und 8 liegen. In der Kristallstruktur (1WSY) konnte der Loop nach  $\beta$ -Strang 6 (Reste 179 – 192) nicht aufgelöst werden. In Anwesenheit des Inhibitors 5-Fluorindolpropanolphosphat am aktiven Zentrum wird der Loop dagegen fixiert und sichtbar (Schneider *et al.*, 1998). Man spricht von einer „offenen“ und „geschlossenen“ Konformation. Der geschlossenen Konformation wird eine entscheidende Rolle zugesprochen, das naszendierende Indol vom Lösungsmittel fernzuhalten und so die Passage durch den Tunnel zum aktiven Zentrum von TrpB zu gewährleisten.

TrpB ist aus zwei Domänen aufgebaut, die jeweils aus einem zentralen offenen  $\beta$ -Faltblatt mit umgebenden  $\alpha$ -Helices bestehen und sehr ähnliche Topologien aufweisen. Das aktive Zentrum, an dem Pyridoxal 5'-phosphat kovalent als Schiff-Base am Rest Lysin 87 vorliegt, befindet sich zwischen den beiden Domänen (Hyde *et al.* 1988).

#### **4.1.3 Die aktiven Zentren der TrpA- und TrpB-Untereinheiten**

Neben dem Rest GLU49 (Miles *et al.*, 1988; Yutani *et al.*, 1987) ist ASP60 (Nagata *et al.*, 1989) in TrpA für die Katalyse essenziell. In der geschlossenen Konformation bildet der Rest THR183 des flexiblen Loops eine Wasserstoffbrücke mit ASP60, so dass die bei der Katalyse wichtige Carboxylatgruppe von ASP60 in die korrekte Ausrichtung zum Substrat kommt und eine Wasserstoffbrücke zur sekundären Aminogruppe des Indolrings von Indolglyzerinphosphat ausbilden kann. Ein vermuteter Mechanismus (Kirschner *et al.*, 1991) geht von einer Polarisierung des Stickstoffatoms des Indolrings durch ASP60 aus. GLU49 dient als Protonendonator für das C3-Kohlenstoff des Indolrings und bewirkt durch anschließende Abstraktion des Hydroxyl-Protons des Glyzerinaldehyd 3-phosphat Anteils eine Spaltung in Indol und Glyzerinaldehyd 3-phosphat. ASP60 stabilisiert die zwischenzeitlich auftretende positive Ladung des Ringstickstoffs.

Die Kondensation von L-Serin und Indol am aktiven Zentrum von TrpB ist eine typische Pyridoxal 5'-phosphat abhängige  $\beta$ -Substitutionsreaktion (Miles 1991). Der Reaktionsmechanismus ist detailliert charakterisiert und beschrieben worden (Lane und Kirschner, 1983b; Miles, 1991): In Abwesenheit von Serin ist der Kofaktor, Pyridoxal 5'-phosphat, kovalent als Schiff-Base an die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin 87 gebunden. In Anwesenheit von Serin am aktiven Zentrum erfolgt eine Transiminierung wobei Pyridoxal 5'-phosphat (PLP) und Serin kovalent verknüpft werden und sich die Bindung zwischen PLP und Lysin 87 löst. Das entstandene Aldimin-Intermediat wird unter Freisetzung eines Protons in ein Quinoid-Intermediat überführt, das nach Abspaltung eines Hydroxylanions zu einem Aminoacrylat führt. Dies ist der Zustand, in dem eine Reaktion mit Indol möglich ist. Die Kondensation des Aminoacrylat-Intermediats mit Indol führt zu einem zweiten Quinoid-Intermediat, das nach Protonierung in ein zweites Aldimin-Intermediat überführt wird. Die nachfolgende Freisetzung von Tryptophan schließt den Katalysezyklus und das Pyridoxal 5'-phosphat liegt als Schiff-Base wieder an Lysin 87 gebunden vor.

#### **4.1.4 Allosterische Wechselwirkungen zwischen der TrpA und TrpB**

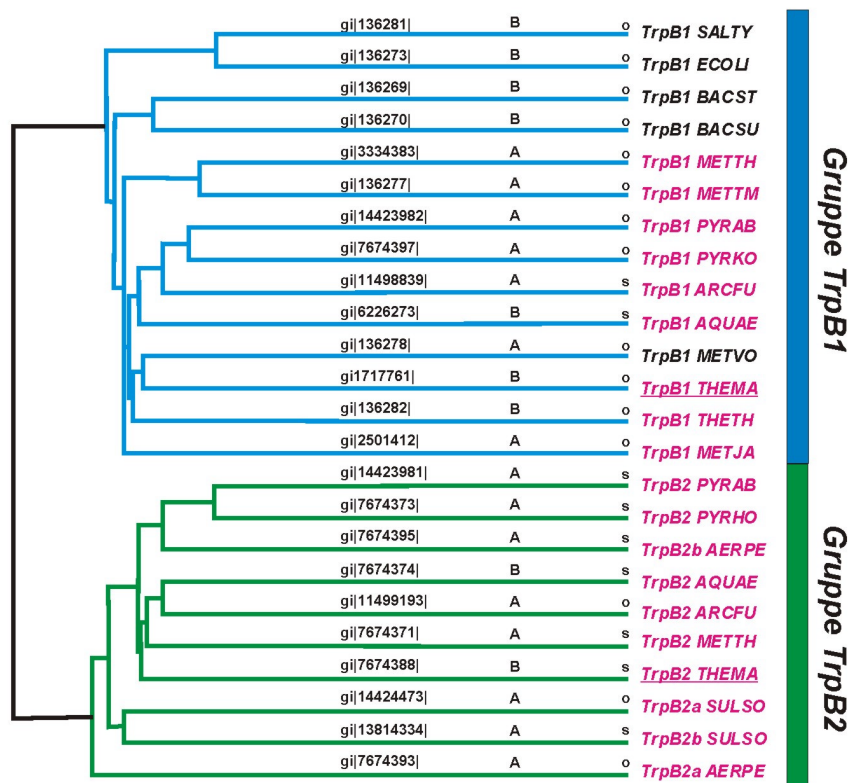
Anderson *et al.* (1991) und Leja *et al.* (1995) zeigten, dass bei 25 °C nur Spuren von Indol aus dem Tunnel zwischen TrpA und TrpB von *E. coli* entweichen. Die Transferrate von Indol zwischen den beiden aktiven Zentren beträgt  $\geq 1000$  pro Sekunde (Anderson *et al.*, 1991). Die Mutation E109D in TrpB verlangsamt die Kondensation des Aminoacrylates mit Indol, welches im Tunnel akkumuliert und in Lösung freigesetzt wird (Anderson *et al.*, 1991). Dies offenbart die Notwendigkeit einer allosterischen Kommunikation zwischen den beiden Untereinheiten, die eine Koordination der beiden aktiven Zentren sicherstellt.

So erhöht die Bindung von IGP an TrpA die Affinität von TrpB für Serin und die „Channelingrate“, während die Bindung von Serin an TrpB zu einer drastischen Erhöhung der Spaltungsrate von IGP an TrpA führt (Anderson *et al.*, 1991).

#### **4.1.5 Eine zusätzliche b-Untereinheit**

Im Zuge der Sequenzierung des Genoms von *Thermotoga maritima* (Nelson. *et al.*, 1999) wurden Evidenzen für einen lateralen Gentransfer von DNA aus Archaeen festgestellt. Neben diesen oftmals großen DNA-Abschnitten archaeeller Herkunft wurde ein weiteres *trpB* Gen im *T. maritima* Genom annotiert, das sich von dem operonständigen Gen unterscheidet. Auch in anderen Organismen aus den Domänen der Bacteria und Archaea (Woese *et al.*, 1990) kann solch ein zusätzliches *trpB* Gen gefunden werden. Ein Sequenzalignment auf Aminosäureebene gibt Aufschluss über die Verwandtschaftsverhältnisse der Proteine (Abbildung 10).





**Abbildung 10: TrpB-Proteine lassen sich in zwei Sequenzfamilien einteilen.**

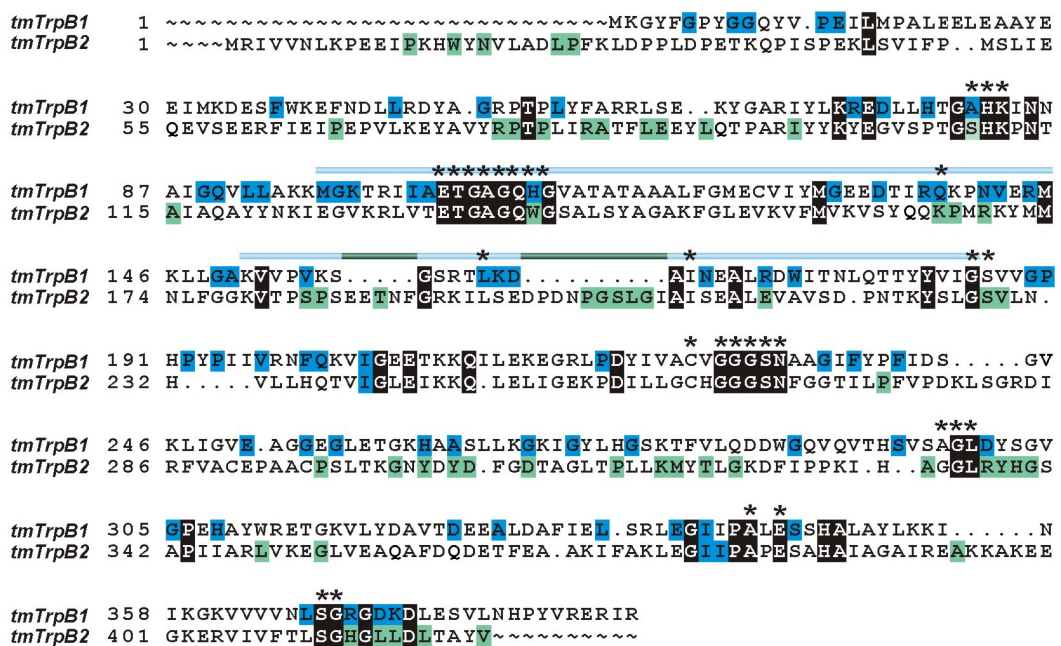
Stammbaum basierend auf einem Alignment mittels PILEUP (GCG Wisconsin Package) von zahlreichen TrpB-Aminosäuresequenzen. **Spalte 1:** Proteindatenbankeintrag, **Spalte 2:** A = Archaeon, B = Bakterium, **Spalte 3:** o = operonständig, s = solitär, **Spalte 4:** Protein und Organismenname (s. Abk. Verzeichnis, S. 131). *Thermotoga maritima* Proteine sind unterstrichen. **rot:** hyperthermophile und thermophile Organismen. Aufgrund irreführender Annotationen sind die Proteinamen vereinheitlicht. Die annotierten Proteinamen sind dem PILEUP (Anhang, S. 134) zu entnehmen.

Deutlich zu erkennen ist eine Aufspaltung der Sequenzen in zwei Gruppen. In der oberen Gruppe (blau) sind Proteine zu finden, die hohe Sequenzähnlichkeiten zu den operonständigen TrpB Proteinen aus *E. coli* oder *S. typhimurium* besitzen. Diese Gruppe wird im folgenden TrpB1 Gruppe genannt werden. Hier sind sowohl archaelle als auch bakterielle Proteine zu finden. Sequenzvergleiche innerhalb dieser Gruppe zeigen Identitäten von etwa 65 % und Ähnlichkeiten von etwa 70 %. Auch in der unteren Gruppe (grün, Gruppe TrpB2) sind Proteine aus beiden Domänen vertreten. Die Identitäten innerhalb dieser Gruppe liegen bei 55%, die Ähnlichkeiten bei 60 %. Zwischen Mitgliedern beider Gruppen sind Identitäten von ca. 32 % und Ähnlichkeiten von ca. 45 % auszumachen.

Organismen, die zwei TrpB Proteine besitzen, haben entweder je ein TrpB1 und TrpB2 (z.B. *Thermotoga maritima*, *Methanobacterium thermoautotrophicus* und

weitere) oder zwei TrpB2-Proteine (z.B. *Sulfolobus solfataricus*, *Aeropyrum pernix*). Kein Organismus scheint jedoch zwei TrpB1-Proteine zu besitzen. Alle Organismen, die zumindest ein *trpB2* Gen besitzen, sind extrem thermophil oder hyperthermophil. Auffällig ist noch, dass die *trpB2*-Gene häufiger solitär stehen als die *trpB1*-Gene. Hier ist anzumerken, dass die Bezeichnung operonständig dann gewählt wurde, wenn zumindest das *trpA* Gen proximal zum *trpB* Gen vorlag. Im Falle von *Aquifex aeolicus* gibt es kein Tryptophanoperon und somit auch kein operonständiges Gen. *Pyrococcus horikoshii* scheint außer dem *trpB2*-Gen über kein weiteres Gen für die Tryptophanbiosynthese zu verfügen.

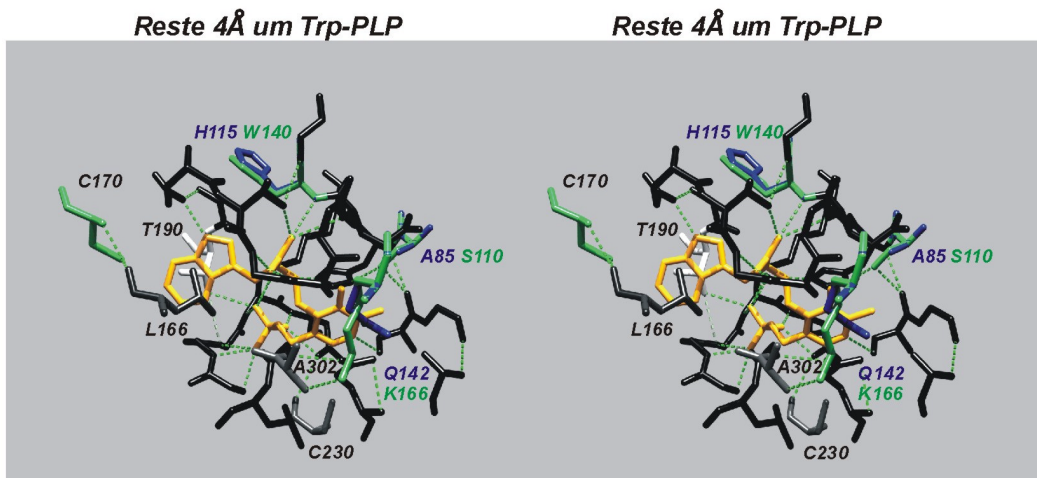
Ein Alignment der Aminosäuresequenzen zwischen den beiden TrpB-Proteinen aus *Thermotoga maritima*, tmTrpB1 und tmTrpB2 zeigt 33 % identische und 40 % ähnliche Reste (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Aignment von tmTrpB1 und tmTrpB2.**  
**Schwarze Boxen:** konservierte Reste in TrpB1 und TrpB2; **blaue Boxen:** konservierte Reste in TrpB1; **grüne Boxen:** konservierte Reste in TrpB2. \*: Reste in 4Å Entfernung um das an PLP gebundene, naszendierende Tryptophan (basierend auf der Struktur 2TYS). **Hellblauer Balken:** COMM Domäne in TrpB1; **dunkelgrüne Balken:** Insertionen in TrpB2. Der Rest A81 in tmTrpB1 wurde blau eingefärbt, obwohl in der *B. subtilis* Sequenz an dieser Stelle ein Serin vorkommt. Das gezeigte Alignment stellt einen Ausschnitt des Gesamtalignments zahlreicher TrpB-Sequenzen dar (vgl. Abbildung 10 und das PILEUP, S. 134).

In dem dargestellten Alignment wurden Aminosäurereste, die in den Gruppen TrpB1 und TrpB2 vollkommen konserviert sind, mit schwarzen Boxen unterlegt.

Aminosäuren, die nur in der Gruppe TrpB1 total konserviert sind, sind mit einer blauen Box in der Sequenz von tmTrpB1, und Reste, die nur in der Gruppe TrpB2 vollständig konserviert sind mit einer grünen Box in der Sequenz von tmTrpB2 markiert. Es zeigt sich, dass sowohl in TrpB1 als auch in TrpB2 konservierte Aminosäuren zum großen Teil in Clustern in der Nähe der aktiven Zentrums angeordnet sind (Abbildung 11). Abbildung 12 zeigt eine Darstellung des aktiven Zentrums von TrpB1, in der die entsprechenden Reste von TrpB2 ebenfalls dargestellt sind.

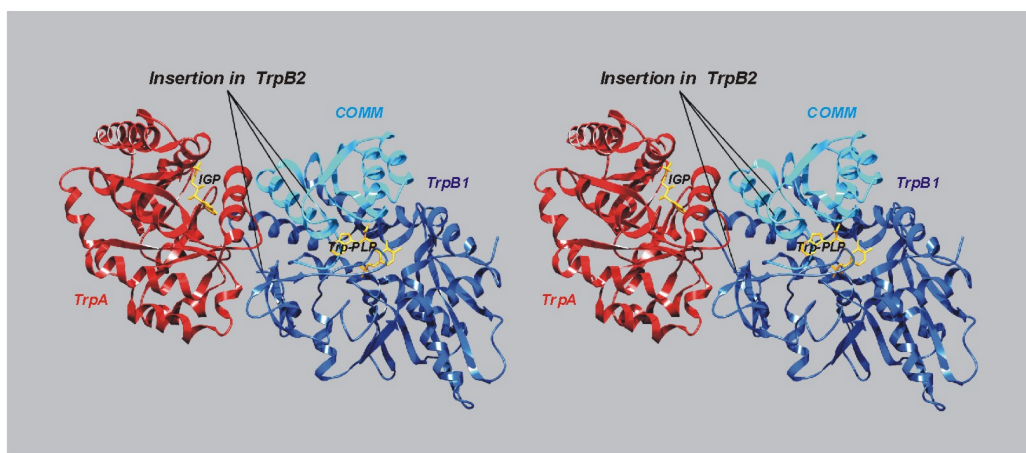


**Abbildung 12: Die aktiven Zentren der TrpB1- und TrpB2-Proteine unterscheiden sich nur wenig.** Stereodarstellung der Aminosäuren im Umkreis von 4 Å um das an PLP gebundene Tryptophan (**gelb**) in TrpB1 aus *S. typhimurium*, Struktur 2TYS. **Schwarz:** Reste, die in TrpB1 und TrpB2 konserviert sind; **blau:** Reste, die in TrpB1 konserviert sind; **grün:** Reste, die in TrpB2 konserviert sind; **weiß:** variable Reste. Alle Reste, die nicht in TrpB1 und TrpB2 konserviert sind, sind bezeichnet. Zählweise nach *S. typhimurium* TrpB1 bzw. *T. maritima* TrpB2 (grün). Rest T190 ist in 21 von 24 untersuchten TrpB Proteinen ein Serin, sonst Threonin. Rest L166 ist in 23 von 24 Sequenzen ein Leucin, Rest C230 in 20 von 24 Sequenzen ein Cystein und Rest C170 in 9 von 10 TrpB2 Sequenzen ein Isoleucin. **Gestrichelte grüne Linien** geben mögliche Wasserstoffbrückenbindungen an. Darstellung erzeugt mit SwissPDBviewer und POVray; TrpB2-Reste wurden unter Benutzung der Rotamerbibliothek des SwissPDBviewer eingefügt.

Die Darstellung unterstreicht, dass das aktive Zentrum der TrpB2-Proteine eine sehr ähnliche Struktur besitzen muss, wie die der TrpB1-Proteine. Auffallend ist, dass in der Nähe des aktiven Zentrums Aminosäuren alignen, die zwar in TrpB1 und TrpB2 jeweils konserviert sind, sich jedoch zwischen den beiden Gruppen unterscheiden. Generell sind diejenigen Aminosäuren, die nur in einer der beiden Gruppen konserviert sind, jedoch eher gleichmäßig über das Alignment verteilt.

TrpB2-Proteine weisen eine Extension am Aminoterminus auf. Diese besteht bei tmTrpB2 aus 26 Aminosäuren, die in tmTrpB1 fehlen. Betrachtet man die Lage

dieses Abschnitts in der Struktur der Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium*, so sieht man, dass der N-Terminus von TrpB proximal zum assoziierten TrpA liegt. Weiterhin fallen zwei Insertionen von 5 und 10 Aminosäuren in TrpB2 auf (zwischen Aminosäuren 158-159 und Aminosäuren 165–166, Zählweise tmTrpB1). Die flankierenden Bereiche dieser Insertionen liegen in TrpB1 ebenfalls proximal zum TrpA Protein. Sie sind Teil der sogenannten COMM Domäne, die eine wichtige Rolle in den Wechselwirkungen zwischen TrpA und TrpB spielt (Schneider *et al.*, 1998, Rondard und Bedouelle, 2000). Abbildung 13 veranschaulicht diese Befunde in einer Stereodarstellung.



**Abbildung 13: Zusätzliche Sequenzabschnitte in TrpB2 liegen in Kontaktbereichen zwischen TrpB1 und TrpA.**

Stereodarstellung der Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium*. Um die Lage der beiden aktiven Zentren zu kennzeichnen, wurden die Strukturen 1TYS (Struktur mit PLP gebundenem Tryptophan an TrpB1) und 1QOQ (Struktur mit IGP an TrpA gebunden) kombiniert. **Rot:** TrpA; **blau:** TrpB1; **hellblau:** COMM Domäne aus TrpB; **gelb:** gebundene Liganden; **Pfeile:** Positionen, an denen N-terminale Extensionen bzw. Insertionen in TrpB2 Proteinen vorliegen. Zur besseren Übersichtlichkeit ist nur eines der beiden identischen TrpA-TrpB1 Heterodimere dargestellt. Darstellung erzeugt mit SwissPDBviewer und POVray.

Um abzuschätzen, ob das *trpB2* Gen in *T. maritima* exprimiert werden könnte, wurde in der *Thermotoga maritima* Genomsequenz (Nelson *et al.*, 1999) nach Promotorsequenzen und einer Ribosomenbindungsstelle stromaufwärts des Startcodons gesucht.

**Tabelle 5: Vergleich von Promotorsequenzen von Genen aus *T. maritima*.**

Gen	-35	Abstand	-10	Abstand	RBS
<i>trpB2</i>	ATGATT	18	GATCTT	94	GGAGGG
<i>fdx<sup>a</sup></i>	TTGACA	18	GATTTT	73	GAGGGG
<i>dnaA<sup>a</sup></i>	TTGATT	18	GATAAT	21	GGGGG

a) aus Darimont und Sterner, 1994.

Der Vergleich mit anderen Genen aus *T. maritima* zeigt, dass hier ein putativer Promotor sowie eine putative Ribosomenbindungsstelle vorhanden sind (Tabelle 5). Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass das Gen *in vivo* – zumindest unter bestimmten Bedingungen – exprimiert wird.

#### **4.1.6 Klonierung des *tmtrpB2*-Gens**

Für die Klonierung des *tmtrpB2*-Gens wurde eine PCR Reaktion mit den Primern *ttoga\_trpB2\_NdeI* und *ttoga\_trpB2\_HindIII* durchgeführt. Als Templat diente genomische DNA aus *T. maritima* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. W. Liebl, Universität Göttingen). Das PCR-Fragment wurde zunächst über die *NdeI*- und *HindIII*-Schnittstellen in den Vektor pET28a kloniert, wodurch das Konstrukt pET28a-*tmtrpB2* entstand. Dadurch wird bei der Expression ein 6 Histidin-Tag an den N-Terminus des Proteins angefügt, was die Aufreinigung des Proteins mittels Metallchelatchromatographie ermöglicht. Um eventuelle Wechselwirkungen des His-Tags bei Interaktionsstudien mit TrpA zu vermeiden, wurde das *trpB2* Gen zusätzlich in den Vektor pET21a umkloniert. Hierzu wurde es aus pET28a-*tmtrpB2* mit *NdeI* und *HindIII* herausgeschnitten, aus einem Agarosegel gereinigt und mit einem ebenso gespaltenen Vektorfragment von pET21a ligiert. Die für *tmTrpA* und *tmTrpB1* kodierenden Gene lagen bereits in den Vektoren pET21a bzw. pET24a vor (Hentzelt, 1999).

#### **4.1.7 Expression und Reinigung von *tmTrpA***

Eine Expression von *tmTrpA* in analytischem Maßstab bei 37 °C zeigte, dass für die Proteinproduktion keine Induzierung mit IPTG vonnöten war. Stattdessen lieferten nicht-induzierte Übernachtkulturen eine ausreichende Menge an *tmTrpA* in der löslichen Zellfraktion. Abbildung 14 gibt einen Überblick über die Reinigung, die mittels SDS-PAGE verfolgt wurde (Abbildung 15).

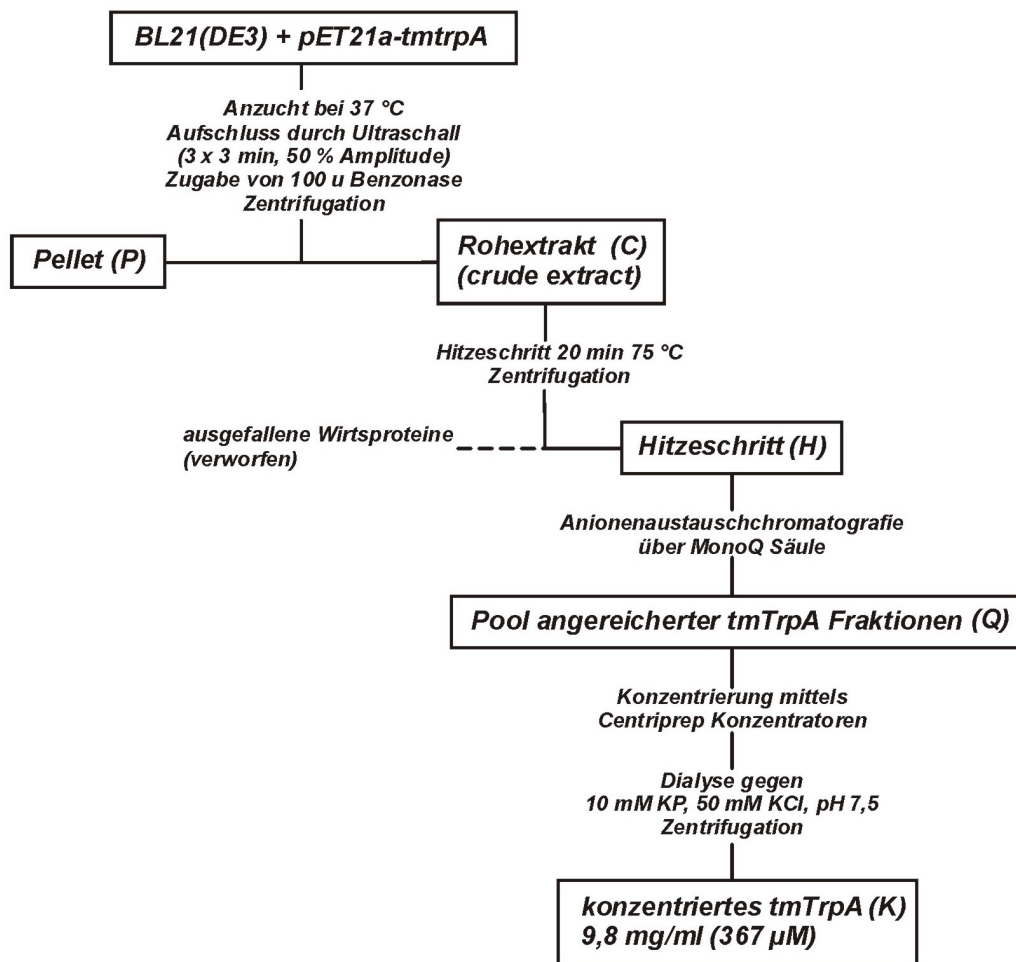


Abbildung 14: Fließdiagramm der Reinigung von tmTrpA.

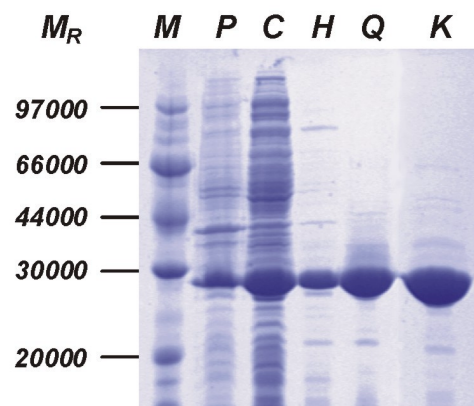


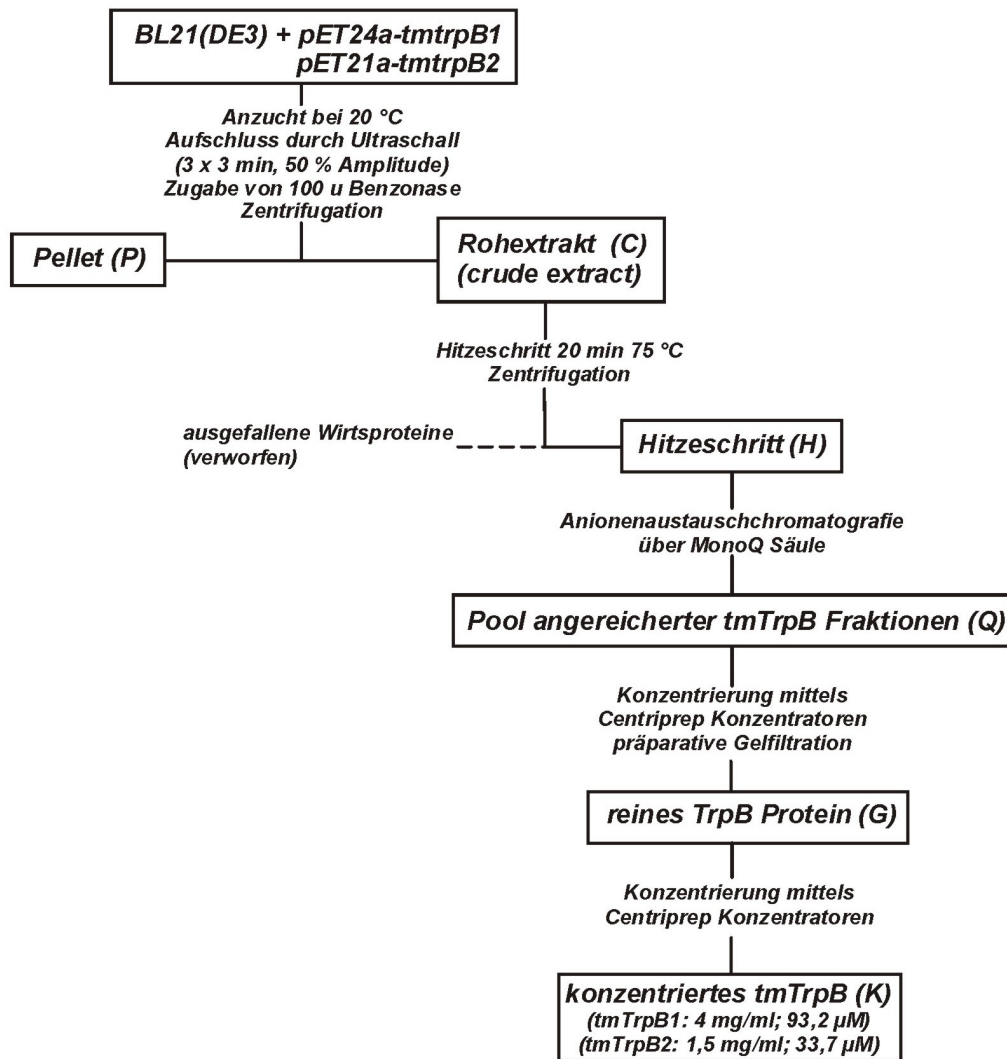
Abbildung 15: Analyse der Reinigung von tmTrpA mittels SDS-PAGE

(12,5 % Polyacrylamid). **M**: lowrange Marker (Pharmacia); **P**: Pelletfraktion; **C**: Rohextrakt; **H**: Hitzeschritt; **Q**: vereinigte Fraktionen nach Anionenaustauschchromatografie; **K**: konzentriertes Protein

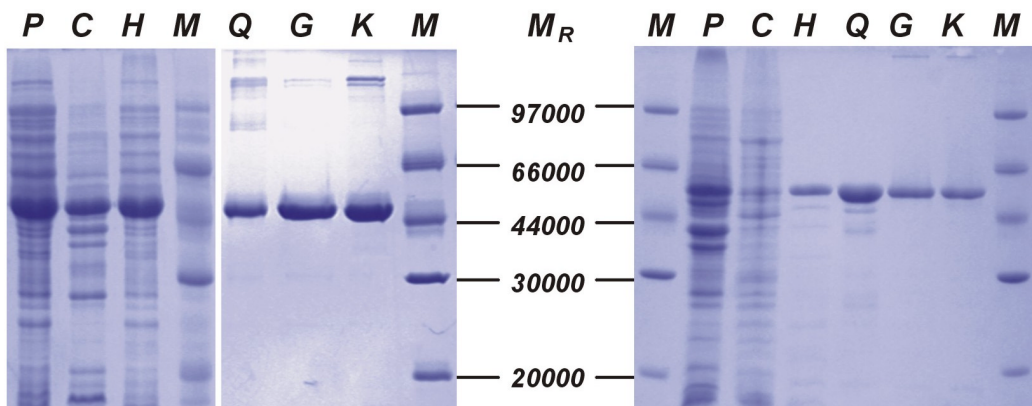
Danach befanden sich etwa 80 % des Proteins im löslichen Überstand (C). Durch Hitzeschritt (H), Anionenaustauschchromatographie (Q) und Konzentrierung konnte das Protein zu einer Reinheit von mehr als 95 % gebracht werden (K). TmTrpA wurde in 10 mM Kaliumphosphat Puffer, 50 mM KCl, pH 7,5 zu einer Konzentration von 9,8 mg/ml eingeeengt, was 367  $\mu$ M entspricht, in flüssigen Stickstoff eingetropt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das Absorptionsspektrum im Bereich von 240 nm bis 350 nm zeigte keine Hinweise auf Aggregatbildung. Die Gesamtausbeute aus 3 l Kultur betrug 150 mg tmTrpA.

#### **4.1.8 Expression und Reinigung von tmTrpB1 und tmTrpB2**

Die Reinigung der Proteine tmTrpB1 und tmTrpB2 erfolgte auf identische Weise. Eine Expression in analytischem Maßstab zeigte, dass auch hier für die Proteinproduktion keine Induzierung mit IPTG vonnöten war. Bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde jedoch der allergrößte Teil der Proteine in der unlöslichen Fraktion gefunden. Für das Wachstum der Zellen wurde daher eine Temperatur von  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gewählt, um einen größeren Anteil des Proteins in die lösliche Fraktion zu bringen (Kopetzki *et al.*, 1989). Abbildung 16 gibt einen Überblick über die Reinigung, die ebenfalls über SDS-PAGE verfolgt wurde (Abbildung 17).

**Abbildung 16: Fließdiagramm der Reinigung von tmTrpB1 und tmTrpB2.**

Die Proteine wurden auf gleiche Weise gereinigt und in 100 mM KP, 40 µM PLP, 300 mM KCl, pH 7,5 gelagert

**Abbildung 17: Analyse der Reinigung von tmTrpB1 und tmTrpB2 mittels SDS-PAGE**(12,5 % Polyacrylamid), TrpB1 rechts, TrpB2 links. **M**: lowrange Marker (Pharmacia); **P**: Pelletfraktion; **C**: Rohextrakt; **H**: Hitzeschritt; **Q**: vereinigte Fraktionen nach Anionenaustauschchromatografie; **G**: vereinigte Fraktionen nach Gelfiltration; **K**: konzentriertes Protein.

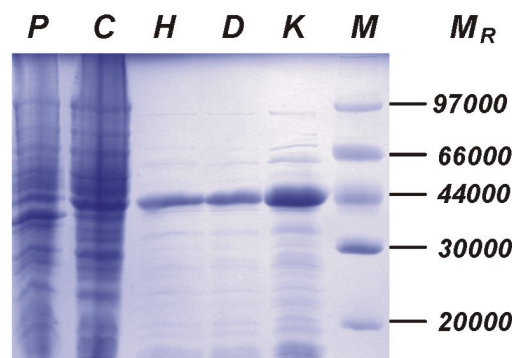


Im Falle von tmTrpB1 (Abbildung 17, links) ist zu sehen, dass ein deutlicher Anteil (ca. 60 %) des Proteins in der unlöslichen Pelletfraktion zu finden ist (P). Durch einen Hitzeschritt (H) konnte das im Rohextrakt befindliche Protein jedoch angereichert und in den nachfolgenden Chromatographien sukzessive zur Homogenität gereinigt werden. Das Protein wurde dann auf eine Konzentration von 4 mg/ml eingeeengt, was 93,2  $\mu\text{M}$  entspricht. Die Gesamtausbeute aus 3 l Kultur betrug 48 mg tmTrpB1.

Im Falle von tmTrpB2 (Abbildung 17, rechts) konnte nur ein geringer Teil des Proteins in den löslichen Zellextrakt exprimiert werden (C). Der überwiegende Teil, etwa 90 % war in der Pelletfraktion zu finden (P). Jedoch konnte auch hier das Protein durch den Hitzeschritt und die nachfolgenden Chromatographieschritte angereichert werden, das in einer Konzentration von 1,5 mg/ml (entsprechend 33,7  $\mu\text{M}$ ) in flüssigen Stickstoff eingetropt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. Aus 3 l Kultur wurden 18 mg tmTrpB2 erhalten.

#### 4.1.9 Reinigung des Hilfsenzym Glyzerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase

Das für die GAPDH aus *Thermotoga maritima* (tmGAPDH) kodierende Gen wurde in *E. coli* BL21(DE3) Zellen exprimiert. Das Expressionsplasmid, pKM1 (Pappenberger *et al.*, 1997) wurde freundlicherweise von G. Pappenberger, Universität Regensburg zur Verfügung gestellt. Das Protein wurde nur durch einen Hitzeschritt angereichert und Nukleinsäuren durch Dialyse entfernt. Nach Konzentrierung war die tmGAPDH für ihre Funktion als Hilfsenzym ausreichend rein und wurde mit einer Konzentration von etwa 5 mg/ml in flüssigen Stickstoff eingetroppt. Aus 3 l Zellkultur konnten ca. 42 mg Protein gewonnen werden. Der Reinigungsverlauf wurde mittels SDS-PAGE verfolgt (Abbildung 18).

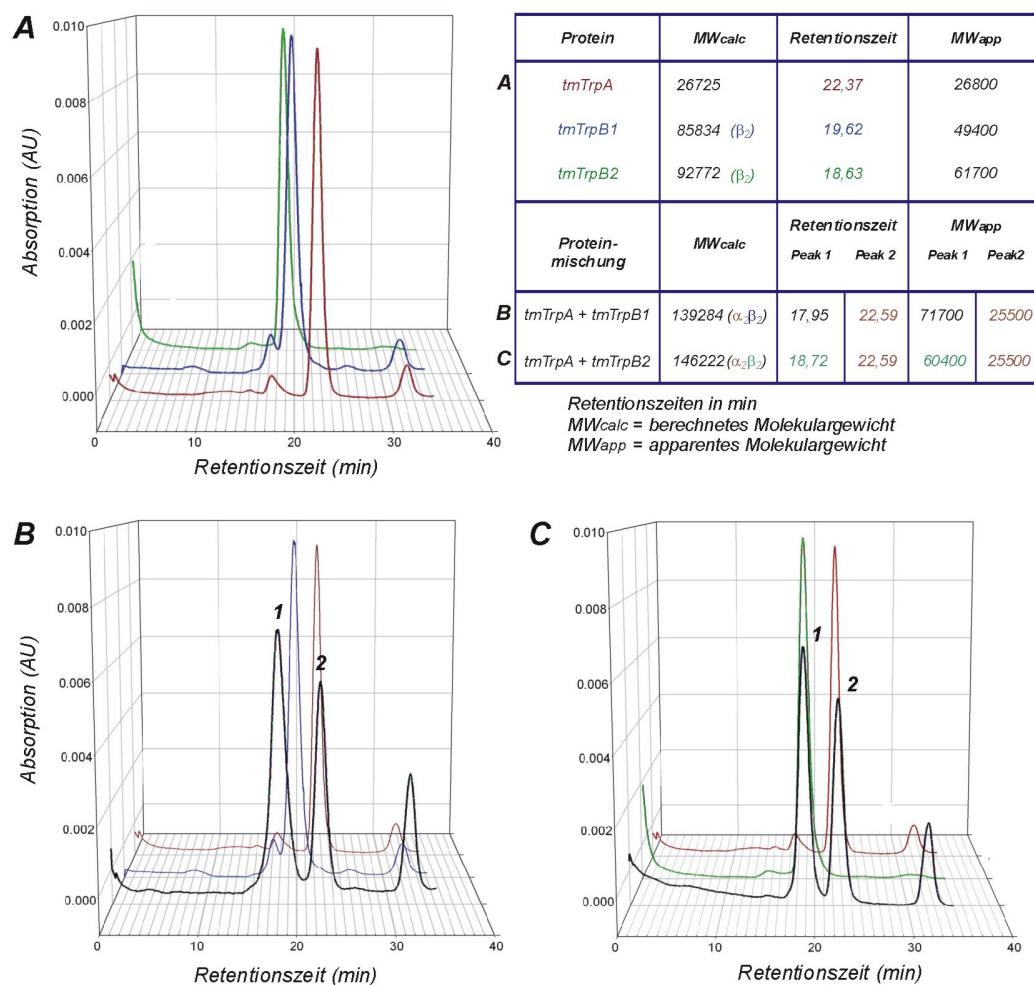


**Abbildung 18: Analyse der Reinigung der tmGAPDH mittels SDS\_PAGE** (12,5 % Polyacrylamid). **P:** Pelletfraktion; **C:** Rohextrakt; **H:** Hitzeschritt; **D:** Dialysat; **K:** konzentriertes Protein; **M:** low range Marker (Pharmacia).

#### 4.1.10 Bestimmung der apparenten Molekulargewichte und der Komplexbildung mittels analytischer Gelfiltration

##### 4.1.10.1 Läufe mit isolierten Proteinen

Die apparenten Molekulargewichte der gereinigten Proteine wurden mittels analytischer Gelfiltration auf einer kalibrierten Superdex 75 Säule bestimmt (Abbildung 19). Die Kalibrierungsgerade ist im Anhang, S. 135 abgebildet.



**Abbildung 19: Bestimmung der apparenten Molekulargewichte von tmTrpA, tmTrpB1, tmTrpB2 sowie von Proteinmischungen aus tmTrpA mit tmTrpB1 bzw. tmTrpB2 durch analytische Gelfiltration.**  
**A:** tmTrpA (rot), tmTrpB1 (blau) und tmTrpB2 (grün). **B:** tmTrpA (rot), tmTrpB1 (blau) sowie eine 2:1 molare Mischung aus tmTrpA und tmTrpB1 (schwarz). **C:** tmTrpA (rot), tmTrpB2 (grün) sowie eine 1,5:1 molare Mischung aus tmTrpA und tmTrpB2 (schwarz). **Tabelle:** Retentionszeiten sowie berechnete und apparente Molekulargewichte der Einzelproteine bzw. der Proteinkomplexe. **Bedingungen:** Elutionspuffer: 50 mM Kaliumphosphat Puffer, pH 7,5 mit 300 mM KCl; Flussrate: 0,5 ml/min; Temperatur: 25 °C. **Säule:** Superdex 75 HR 10/30, Bettvolumen 24 ml (Pharmacia); **Proteinmengen:** **A:** 1,7 nmol tmTrpA, 1 nmol tmTrpB1, 1,5 nmol tmTrpB2. **B:** für die Proteinmischung 3 nmol tmTrpA und 1,5 nmol tmTrpB1. **C:** für die Proteinmischung 1,5 nmol tmTrpA und 1 nmol tmTrpB2. Aufgetragen wurde in einem Volumen von 100  $\mu$ l.

#### 4.1.10.1.1 *tmTrpA*

Die bisher auf ihren Assoziationszustand hin untersuchten TrpA Proteine liegen als Monomer vor (z.B. Tang *et al.* 2000, Yamagata *et al.*, 2000, Henning *et al.*, 1962). Aus der Retentionszeit von tmTrpA errechnet sich ein apparentes Molekulargewicht von 26800, das dem für monomeres tmTrpA berechneten relativen Molekulargewicht von 26725 entspricht (Abbildung 19A, rotes Elutionsprofil und Tabelle). Das Elutionsprofil zeigt einen geringen Anteil an Aggregaten. Der kleinere Peak bei einer Elutionszeit von 32,2 min entspricht dem Pyridoxal 5'-phosphat, das im Auftragspuffer (100 mM KP, 40 µM PLP, 300 mM KCl ) vorlag.

#### 4.1.10.1.2 *tmTrpB1*

Die bisher auf ihren Assoziationszustand hin untersuchten TrpB Proteine liegen in isolierter Form als Dimere vor (Creighton und Yanofski, 1966; Hyde *et al.* 1988; Tang *et al.* 2000). Aus der Retentionszeit von tmTrpB1 errechnet sich jedoch ein apparentes Molekulargewicht von 49400 (Abbildung 19A, blaues Elutionsprofil und Tabelle), was eher dem für das Monomer berechneten Wert von 42917 entspricht. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass tmTrpB1 in einem schnellen Gleichgewicht zwischen monomerer und dimerer Form vorliegt. Ein derartiges Verhalten wurde auch für dimere und tetramere Zustände von Mutanten des Hämoglobins beobachtet (Vallone *et al.*, 1998). Weiterhin kann es durch eine Wechselwirkung des Proteins mit der Matrix der Säule zu einer Verschiebung des Elutionszeitpunkts kommen. Letztlich kann es sich bei tmTrpB1 um ein aberrantes Laufverhalten handeln, da man bei dem dimeren Protein nicht von einer globulären Form des Moleküls, sondern eher von einem stabförmigen Gestalt ausgehen muss (Abbildung 9). Wie bei tmTrpA entspricht der Peak bei 32,2 min dem Pyridoxal 5'-phosphat.

#### 4.1.10.1.3 *tmTrpB2*

Ebenso wie im Fall von tmTrpB1 weist auch das Protein tmTrpB2 ein zu kleines apparentes Molekulargewicht auf, wenn von einem Dimer ausgegangen wird

(Abbildung 19A, grünes Elutionsprofil und Tabelle). Die Retentionszeit entspricht einem Wert von 61700 gegenüber dem errechneten von 92772. Hier können die gleichen Gründe für ein unerwartetes Laufverhalten vorliegen, wie sie für tmTrpB1 angesprochen wurden. Da hier das Protein nicht vor dem Auftrag auf die Säule verdünnt wurde, ist der Pyridoxal 5'-phosphat Peak wesentlich weniger stark ausgeprägt als bei tmTrpA und tmTrpB1.

#### **4.1.10.2 Läufe mit Proteinmischungen**

Komplexbildungen von tmTrpA mit tmTrpB1 bzw. tmTrpB2 sollten durch die Analyse von Gemischen der jeweiligen Proteine mittels Gelfiltration nachgewiesen werden.

##### **4.1.10.2.1 tmTrpA mit tmTrpB1**

TmTrpA wurde in einem 2fachen molaren Überschuss mit tmTrpB1 gemischt. Anschließend wurde die Lösung einkonzentriert und scharf zentrifugiert. Nach Auftrag auf die Säule zeigte sich ein Elutionsprofil aus zwei Proteinpeaks bei 17,95 min und 22,59 min sowie dem Pyridoxal 5'-phosphat-Peak bei 32,2 min (Abbildung 19B, schwarzes Elutionsprofil und Tabelle). Peak 1 entspricht einem apparenten Molekulargewicht von 71700.

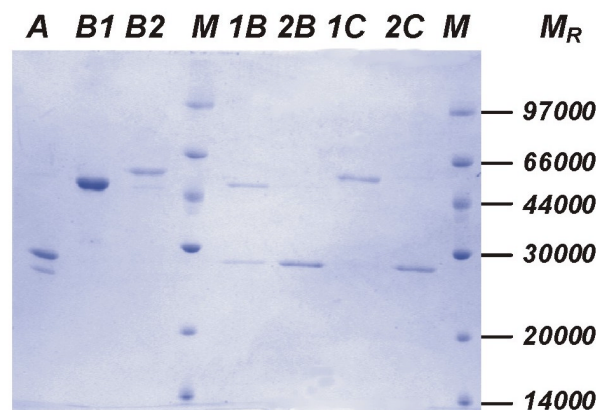
Dieser Wert liegt deutlich über dem für isoliertes tmTrpA (26800, rotes Elutionsprofil) bzw. tmTrpB1 (49499, blaues Elutionsprofil) ermittelten und deutet deshalb auf eine Komplexbildung zwischen den beiden Enzymen hin. Die bisher untersuchten Tryptophan Synthasen bilden einen tetrameren Komplex, der aus jeweils zwei TrpA und zwei TrpB Untereinheiten besteht ( $\alpha\beta\beta\alpha$ ) (Creighton und Yanofski, 1966; Hyde *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 2000). Im Falle von *Thermotoga maritima* beträgt das berechnete relative Molekulargewicht eines derartigen Komplexes 139284, also etwa das doppelte des apparenten Molekulargewichts von Peak 1. Die hier erzielten Ergebnisse lassen deshalb keine endgültige Aussage über die Stöchiometrie der Komplexbildung zwischen tmTrpA und tmTrpB1 zu. Bei Peak 2 des Gemisches handelt es sich offensichtlich um überschüssiges tmTrpA, welches in 2fachem molaren Überschuss zugegeben worden war.

4.1.10.2.2 *tmTrpA mit tmTrpB2*

Zur Untersuchung der Komplexbildung von tmTrpA mit tmTrpB2 wurde ein 1,5facher molarer Überschuss an tmTrpA verwendet. Auch hier wurde die Lösung vor dem Auftrag auf die Säule konzentriert und scharf zentrifugiert. Das Elutionsprofil der Proteinmischung (Abbildung 19C, schwarzes Elutionsprofil 1) weist drei Peaks auf. Peak 1 und 2 zeigen identische Elutionsverhalten wie isoliertes tmTrpB2 bzw. tmTrpA (Abbildung 19C, grünes bzw. rotes Elutionsprofil).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es unter den gegebenen experimentellen Bedingungen zu keiner nachweisbaren Komplexbildung zwischen tmTrpA und tmTrpB2 kommt.

Die Bildung eines Komplexes aus tmTrpA und tmTrpB1 sowie das Ausbleiben einer Komplexbildung zwischen tmTrpA und tmTrpB2 wurde durch die Analyse des jeweiligen Peak 1 aus Abbildung 19B und C nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden die Peaks aufgefangen, mittels Centrikon Konzentratoren einkonzentriert und ein Aliquot auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abbildung 20).



**Abbildung 20: tmTrpA bildet einen Komplex mit tmTrpB1, jedoch nicht mit tmTrpB2.**

Analyse der Elutionspeaks aus den Gelfiltrationsläufen. **Kontrollen:** **A:** isoliertes tmTrpA; **B1:** isoliertes tmTrpB1; **B2:** isoliertes tmTrpB2; **M:** low range Marker (Pharmacia); **1B:** Peak1 aus Gelfiltration mit Mischung aus tmTrpA und tmTrpB1 (vgl. Abbildung 19B); **2B:** Peak2 hieraus (vgl. Abbildung 19B); **1C:** Peak1 aus Gelfiltration mit Mischung aus tmTrpA und tmTrpB2 (vgl. Abbildung 19C); **2C:** Peak2 hieraus (vgl. Abbildung 19C).

Es zeigt sich, dass nach Mischung von tmTrpA mit tmTrpB1 im Peak 1 beide Proteine zu finden sind (Abbildung 20, Spur 1B). Offensichtlich entspricht Peak 1

einem Komplex aus tmTrpA und tmTrpB1. Peak 2 entspricht tmTrpA, das im Überschuss vorlag (Abbildung 20, Spur 2B).

Hingegen ist nach Mischung von tmTrpA mit tmTrpB2 im Peak 1 nur das tmTrpB2 Protein zu finden (Abbildung 20, Spur 1C). Sämtliches tmTrpA Protein eluierte im Peak 2 (Abbildung 20, Spur 2C).

#### 4.1.11 Bestimmung der apparenten Molekulargewichte und der Stöchiometrie der Komplexbildung mittels analytischer Ultrazentrifugation

Die in Kap. 4.1.10 präsentierte analytische Gelfiltration ergab keinen eindeutigen Hinweis auf die Stöchiometrie der Komplexbildung zwischen tmTrpA und tmTrpB1. Zur Klärung dieser Frage wurden analytische Ultrazentrifugationen in Form von Sedimentationsgeschwindigkeits- und Sedimentationsgleichgewichtsläufen durchgeführt (Ariel Lustig, Biozentrum der Universität Basel). Die Ergebnisse aus Gelfiltration und analytischer Ultrazentrifugation sind in Tabelle 6 gegenübergestellt.

**Tabelle 6: Apparente und errechnete Molekulargewichte von tmTrpA, tmTrpB1 und tmTrpB2, sowie der Proteinmischungen aus tmTrpA mit tmTrpB1 und tmTrpA mit tmTrpB2.**

Protein	berechnetes $M_R$	analytische Ultrazentrifugation						Gel-filtration $M_R$
		Sedimentationsgleichgewicht			Sedimentationsgeschwindigkeit			
		$M_R$	Upm	Konz	$S_{20,w}$	Upm	Konz	
tmTrpA	26725 ( $\alpha$ )	26200 + 50800	22000	18 $\mu$ M	2,8	54000	18,7 $\mu$ M	26800
tmTrpB1	85834 ( $\beta_2$ )	91000	8000	6,5 $\mu$ M	5,4	52000	13 $\mu$ M	49000
tmTrpB2	92772 ( $\beta_2$ )	98000	8000	5,4 $\mu$ M	5,4	52000	10,8 $\mu$ M	61600
tmTrpA mit tmTrpB1	139284 ( $\alpha_2\beta_2$ )	140000 <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	3 $\mu$ M <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	71700
tmTrpA mit tmTrpB2	146222 ( $\alpha_2\beta_2$ )	58000 + 103000	9000	3,4 $\mu$ M	2,8 + 5,4	52000	3,4 $\mu$ M	25500 + 60400

$M_R$  = relatives Molekulargewicht, in Klammern sind die vermuteten Zustandsformen der Proteine bzw. Proteinkomplexe angegeben; **Upm** = Umdrehungen pro Minute;  $S_{20,w}$  = Sedimentationskonstante; **Konz** = Konzentration. Molaritäten wurden für den in Spalte 2 (berechnetes  $M_R$ ) angegebenen Zustand berechnet. **Puffer für Ultrazentrifugation:** 100 mM KP, 40  $\mu$ M PLP, 180 mM KCl, pH 7,5, 20 °C. **a** = Daten von Hentzelt, 1999 übernommen (Puffer: 60 mM Kaliumphosphat Puffer, pH 7,5 mit 100 mM NaCl, 20 °C); **n.d.:** keine Angaben erhältlich

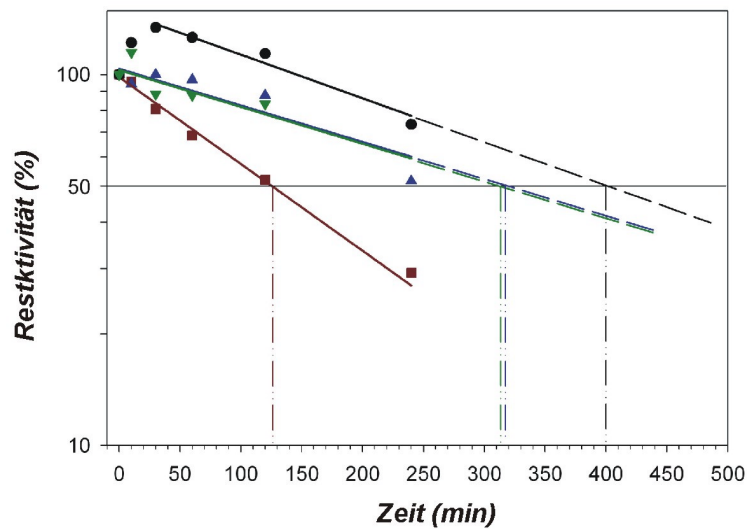
Die Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe belegen eindeutig, dass tmTrpA, tmTrpB1, tmTrpB2 und die Mischung aus tmTrpA und tmTrpB1 jeweils homogene Spezies mit einem definierten  $S_{20,w}$ -Wert darstellen. Der mit einer Mischung aus tmTrpA und tmTrpB2 durchgeführte Lauf lieferte dagegen zwei  $S_{20,w}$ -Werte, die denen der isolierten Proteine entsprechen.

Durch die Sedimentationsgleichgewichtsläufe wurde bestätigt, dass tmTrpA als Monomer vorliegt, allerdings scheint das Protein eine gewisse Tendenz zur Dimerisierung aufzuweisen. Es ist eindeutig, dass sowohl tmTrpB1 als auch tmTrpB2 Dimere bilden. Frühere Untersuchungen an tmTrpB1 ergaben mit geringer werdender Konzentration kleinere apparente Molekulargewichte. Daraus wurde gefolgert, dass sich das Protein in einem Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer befindet. Bei 20 °C wurde ein  $K_d$ -Wert von 0,2  $\mu$ M ermittelt (Hentzelt, 1999). Der bereits in der Gelfiltration nachgewiesene Komplex aus tmTrpA und tmTrpB1 hat eine  $\alpha_2\beta_2$  Stöchiometrie, was der aller bisher untersuchten Tryptophan Synthasen entspricht (z.B. Creighton und Yanofski, 1966; Hyde *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 2000).

#### **4.1.12 Hitzeinaktivierungen**

Da nachfolgend enzymkinetische Messungen bei physiologischen Temperaturen (80 °C) durchgeführt werden sollten, wurden die Halbwertszeiten der thermischen Inaktivierung für die Einzelproteine und den [(tmTrpA·tmTrpB1)<sub>2</sub>]-Komplex bestimmt. Dazu wurden die Proteine bei 85 °C inkubiert und nach verschiedenen Zeiten auf Eis gestellt. Die Restaktivität bei 60 °C wurde durch Aufnahme von Anfangssteigungen gemessen und mit der Aktivität zum Zeitpunkt 0 verglichen (Abbildung 21). Sowohl für die thermische Inaktivierung als auch für die Aktivitätsmessungen wurde 100 mM EPPS-Puffer mit 180 mM KCl, 40  $\mu$ M PLP, pH 7,5 verwendet. Mit einem Mittelpunkt des thermischen Übergangs bei 109 °C (Wrba *et al.*, 1990) weist die als Hilfsenzym verwendete GAPDH aus *Thermotoga maritima* eine ausreichende Stabilität für die enzymkinetischen Messungen auf.





**Abbildung 21: Hitzeinaktivierungen**

von tmTrpA (■), tmTrpB1 (▲), tmTrpB2 (▼) und der Tryptophan Synthase (tmTrpA•tmTrpB1)<sub>2</sub> (●). Die Hitzeinaktivierungen wurden in 100 mM EPPS, 180 mM KCl, 40 µM Pyridoxal 5' Phosphat, pH 7,5 bei 85 °C durchgeführt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Proben auf Eis abgekühlt und die Aktivität durch Aufnahme der Anfangsgeschwindigkeiten bei 60 °C unter Substratsättigung gemessen. Die Messwerte wurden mit einer Monoexponentiellen Funktion mit Sigma Plot gefittet und sind hier semilogarithmisch dargestellt. Halbwertszeiten wurden durch Extrapolation der erhaltenen Geraden auf die X-Achse bei 50 % Restaktivität bestimmt.

Die Halbwertszeiten der thermischen Inaktivierung bei 85 °C sind in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7: Halbwertszeiten der thermischen Inaktivierung bei 85 °C von tmTrpA, tmTrpB1, tmTrpB2 und des Tryptophan Synthase Komplexes, (tmTrpA•tmTrpB1)<sub>2</sub>.**

Protein	Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ )
tmTrpA ( $\alpha$ )	125 min
tmTrpB1 ( $\beta_2$ )	320 min
tmTrpB2 ( $\beta_2$ )	320 min
tmTryptophan Synthase ( $\alpha_2\beta_2$ )	400 min

Die Versuchsbedingungen finden sich in der Legende zu Abbildung 21.

Die Messungen zeigen, dass die Proteine tmTrpB1 und tmTrpB2 die gleiche Stabilität besitzen. Hier ist eine Halbwertszeit von 320 Minuten zu verzeichnen. TmTrpA ist weniger stabil und büßt bereits nach 15 Minuten 10 % seiner Aktivität ein, die Halbwertszeit beträgt 125 Minuten. Erstaunlicherweise führt die Hitzeinkubation der Tryptophan Synthase zunächst zu einem leichten Anstieg der

Aktivität. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für die Phosphoribosyl Anthranilat Isomerase aus *T. maritima* (tmPRAI) beobachtet (unveröffentlichte Daten, R. Sterner). Die Halbwertszeit des [(tmTrpA·tmTrpB)<sub>2</sub>]-Komplexes beträgt 400 min. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl tmTrpA, als auch tmTrpB, wenn auch in geringerem Maße, durch die Komplexbildung stabilisiert werden.

Die tmTrpA und tmTrpB Proteine zeigen eine vergleichbare Stabilität wie andere Enzyme aus der Tryptophanbiosynthese von *Thermotoga maritima*. Die tmPRAI besitzt bei 85 °C eine Halbwertszeit von 310 min (Sterner *et al.*, 1996), die Imidazolglyzerinphosphat Synthase (tmIGPS) bei 83,5 °C eine Halbwertszeit von 110 min (Merz *et al.*, 1999). Für diese beiden Enzyme wurde die Inaktivierung jeweils in Kaliumphosphat Puffer durchgeführt. Unter diesen Pufferbedingungen kann die Stabilität der untersuchten Proteine von der im verwendeten EPPS-Puffer abweichen. So wurde in früheren Untersuchungen für tmTrpA in Kaliumphosphatpuffer (mit 2,5 mM EDTA, 0,2 mM DTT und 40 µM PLP) bei pH 7,6 eine Halbwertszeit von nur 60 min ausgemacht (Hentzelt, 1999), was nur der Hälfte des in dieser Arbeit ermittelten Wertes entspricht. Dies ist erstaunlich, da die Anwesenheit von Phosphat solche Proteine stabilisieren sollte, dessen Substrate eine Phosphatgruppe tragen, was bei tmTrpA der Fall ist.

#### **4.1.13 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter bei physiologischer Temperatur**

##### **4.1.13.1 A-Reaktion**

Die A-Reaktion der Tryptophan Synthase ist die reversible aldolytische Spaltung von Indol 3-glyzerinphosphat (IGP) zu Indol und Glyzerinaldehyd 3-phosphat (Abbildung 8). Die IGP-Spaltung wurde in einem gekoppelten Enzymtest gemessen (Creighton, 1970).

Durch tmTrpA erzeugtes Glyzerinaldehyd 3-phosphat wird in Anwesenheit von Arsenat und NAD<sup>+</sup> durch die tmGAPDH zu 1-Arseno-3-phosphoglycerat umgesetzt. Die dabei erfolgende Reduktion von NAD<sup>+</sup> zu NADH+H<sup>+</sup> ( $\Delta\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) liefert das spektroskopische Signal zur Messung der Reaktion, die spontane Hydrolyse von 1-Arseno-3-phosphoglycerat macht sie irreversibel.

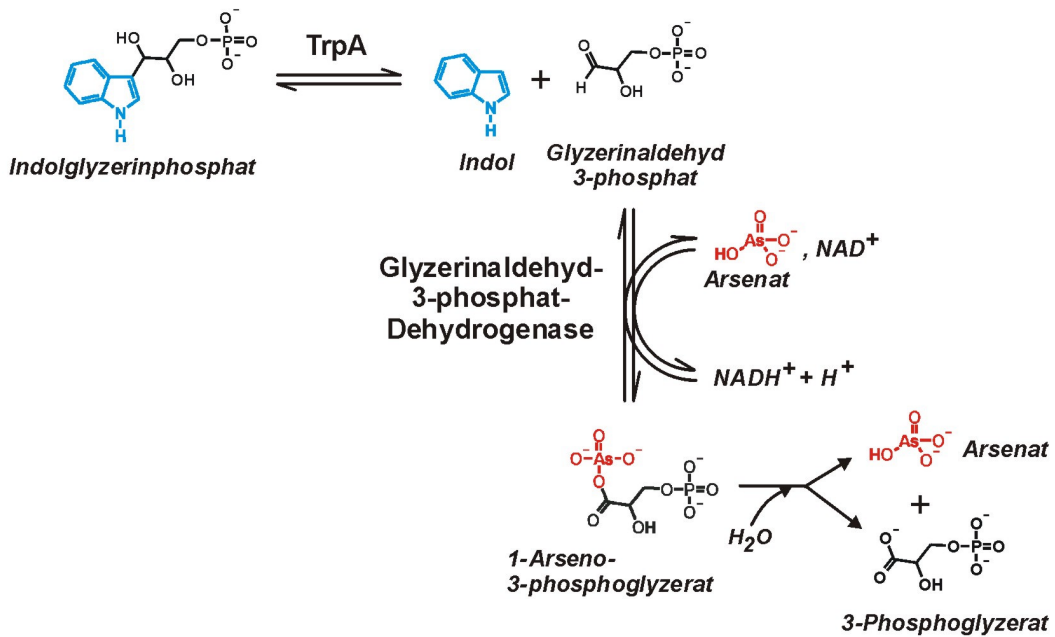


Abbildung 22: Reaktionsschema der gekoppelten Reaktion zur Messung der A-Reaktion der Tryptophan Synthase.

Die Reaktion wurde bei Temperaturen zwischen 30 °C und 60 °C in EPPS-Puffer verfolgt, wobei entweder isoliertes oder mit tmTrpB1 assoziiertes tmTrpA verwendet wurde. Dadurch sollte untersucht werden, in welchem Maße die Aktivität von tmTrpA durch die Komplexbildung mit tmTrpB1 erhöht wird (Weischet und Kirschner, 1976).

Bei jeder Temperatur wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion als Funktion der eingesetzten IGP-Konzentration gemessen. Die erhaltenen Sättigungskurven wurden gemäß der Michaelis-Menten Gleichung mit einer hyperbolischen Funktion gefittet. Dadurch wurden Werte für  $K_M$  und  $v_{max}$  ermittelt:

$$v = v_{max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

**Gleichung 6: Michaelis Menten Gleichung**

$$y = y_0 \cdot \frac{x}{x + b}$$

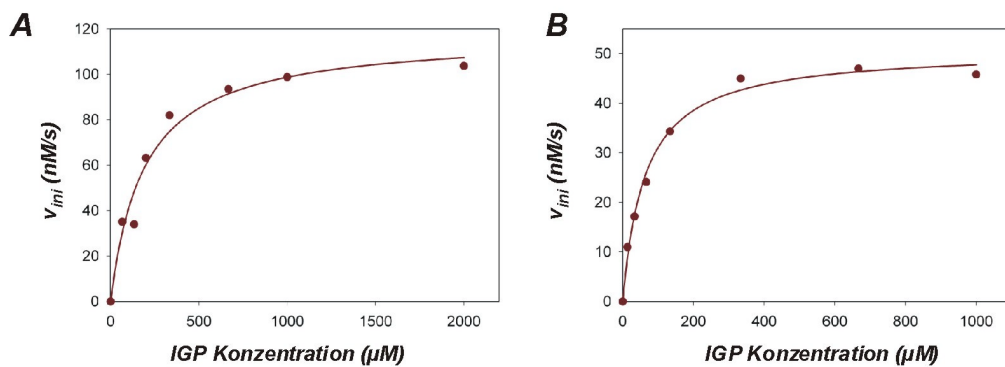
**Gleichung 7: Hyperbelfunktion**

Bei bekannter Enzymkonzentration ( $[E_0]$ ) lässt sich aus  $v_{\max}$  die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  ermitteln.

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{\max}}{[E_0]}$$

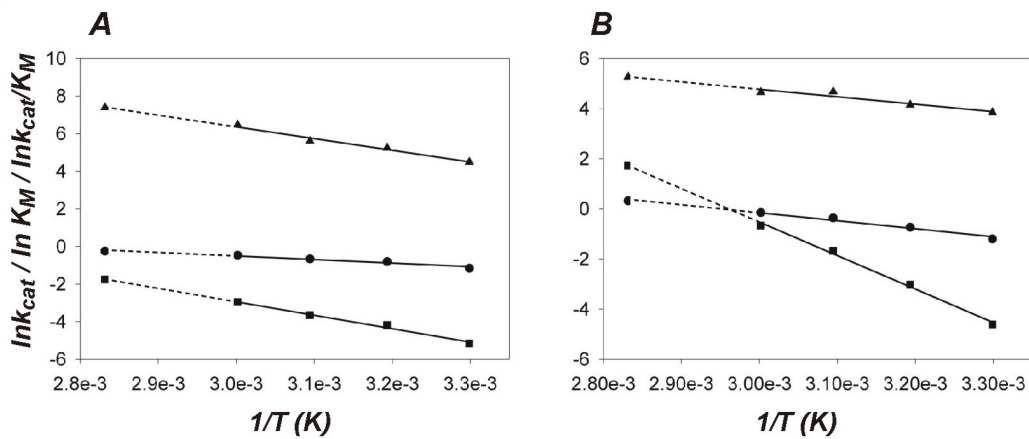
**Gleichung 8: Berechnung der Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$**

Beispielhaft sind Sättigungskurven für die A-Reaktion bei 40 °C für isoliertes tmTrpA (Abbildung 23A) und für tmTrpA im Komplex mit tmTrpB1 (Abbildung 23B) gezeigt.



**Abbildung 23: Sättigungskurven der A-Reaktion** von isoliertem tmTrpA (**A**) und von (tmTrpA·tmTrpB1)<sub>2</sub>. (**B**). **Reaktionsbedingungen:** 100 mM EPPS Puffer, pH 7,5 mit 180 mM KCl, 40 µM Pyridoxal 5'-phosphat, 6 mM NAD<sup>+</sup>, 20 mM Arsenat, 50 µg tmGAPDH, 40 °C. **A:** [tmTrpA] = 7,6 µM; **B:** [(tmTrpA·tmTrpB1)<sub>2</sub>] = 0,52 µM (= 1,04 µM aktive Zentren von tmTrpA und tmTrpB1).

Um die Aktivitäten bei der experimentell schwer zugänglichen physiologischen Temperatur um 80 °C abschätzen zu können, wurden die bei 30 °C bis 60 °C ermittelten  $K_M$ - und  $k_{\text{cat}}$ -Werte mit Hilfe eines Arrhenius-Diagrammes extrapoliert (Abbildung 24). (Eine Kontrollmessung bei 80 °C ergab  $k_{\text{cat}}$ - und  $K_M$ -Werte, die ca. um den Faktor 2 von den auf 80 °C extrapolierten Werten abwichen, was im Rahmen der zu erwartenden Messgenauigkeit liegt.)



**Abbildung 24: Arrhenius Diagramme der enzymkinetischen Parameter der A-Reaktion.**

Gemessene Werte von 30 °C bis 60 °C wurden auf 80 °C extrapoliert.  $\blacksquare$  =  $k_{cat}$ ;  $\blacktriangle$  =  $K_M$ ;  $\bullet$  =  $k_{cat}/K_M$ . A: isoliertes tmTrpA; B:  $(tmTrpA-tmTrpB1)_2$ . Die Pufferbedingungen entsprechen denen in der Legende zu Abbildung 23.

Die steady-state enzymkinetischen Parameter von tmTrpA bei 80 °C sind in Tabelle 8 denen von TrpA aus *E. coli* (ecTrpA) bei 25 °C gegenübergestellt.

**Tabelle 8: Steady-state enzymkinetische Parameter für die A-Reaktion der Tryptophan Synthase aus *T. maritima* bei 80 °C und *E. coli* bei 25 °C.**

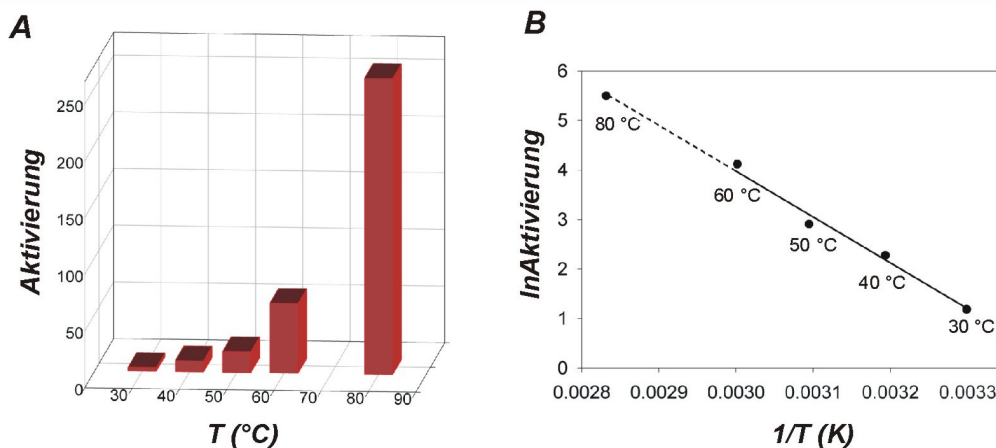
		tmTrpA	tmTS	Faktor	ecTrpA <sup>a</sup>	ecTS <sup>b</sup>	Faktor
		$\alpha$	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2/\alpha$	$\alpha$	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2/\alpha$
$k_{cat}$	(s <sup>-1</sup> )	0,174	5,6	32,2	0,0016	0,067	42
$K_M^{IGP}$	(mM)	1,62	0,19	0,12	0,48	0,14	0,3
$k_{cat}/K_M^{IGP}$	(mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0,11	29,5	268	$3,3 \cdot 10^{-3}$	0,48	145

**Reaktionsbedingungen:** 100 mM EPPS Puffer, pH 7,5 mit 180 mM KCl, 40  $\mu$ M PLP, 20 mM Arsenat, 6 mM NAD<sup>+</sup>; 50  $\mu$ g tmGAPDH. Für die Messung mit isoliertem tmTrpA wurden 7,66  $\mu$ M verwendet, für die Messung von  $(tmTrpA-tmTrpB1)_2$  1,04  $\mu$ M aktive Zentren von tmTrpA und tmTrpB1. **a** = entnommen aus Weischet und Kirschner (1976); Puffer: 50 mM Tris-HCl, 40 mM PLP, 1 mM EDTA, 0,2 mM DTT, 10 mM Arsenat, 1 mM NAD<sup>+</sup>, Überschuss GAPDH, 8,8  $\mu$ M ecTrpA; 25 °C; **b** = entnommen aus Kirschner *et al.* (1991). Puffer: wie a, jedoch 100 mM Kaliumphosphat Puffer, 0,2  $\mu$ M [(ecTrpA-ecTrpB)<sub>2</sub>]-Komplex, 25 °C. Für die Messung im Komplex ist eine Inhibition durch Phosphat anzunehmen;

Ein Vergleich der enzymkinetischen Parameter von ecTrpA bei 25 °C und tmTrpA bei 80 °C weist für das Enzym aus dem hyperthermophilen Bakterium eine höhere Aktivität aus. Die A-Reaktionen von tmTrpA und des  $[(tmTrpA-tmTrpB1)_2]$ -Komplexes zeigen einen um 1-2 Größenordnungen höheren  $k_{cat}$ -Wert als die homologen *E. coli* Proteine, während die  $K_M$ -Werte jeweils nur geringfügig höher liegen. Hieraus ergibt sich eine etwa 36fach höhere katalytische Effizienz von tmTrpA und eine etwa 61fach höhere katalytische

Effizienz des  $[(tmTrpA \cdot tmTrpB1)_2]$ -Komplexes aus *T. maritima* gegenüber den homologen Proteinen aus *E. coli*.

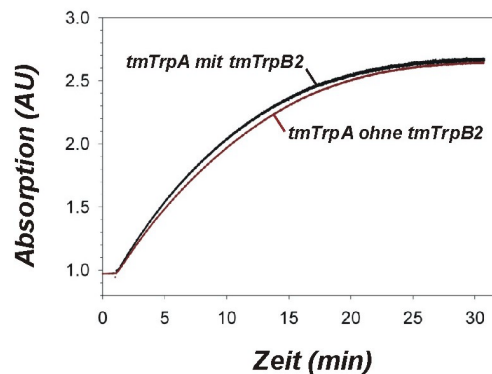
Vergleicht man die Daten von isoliertem mit komplexiertem  $tmTrpA$  bzw.  $ecTrpA$ , so fällt auf, dass sich bei beiden Proteinen der  $k_{cat}$  Wert im Komplex erhöht, während der  $K_M^{IGP}$ -Wert erniedrigt wird. Dies führt zu einer drastischen Erhöhung der katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M^{IGP}$ ) im Komplex. Diese Aktivierung von  $tmTrpA$  durch  $tmTrpB1$  nimmt mit Erhöhung der Temperatur exponentiell zu (Abbildung 25) und erreicht bei 80 °C den Faktor 268, ähnlich dem Faktor 145 der Aktivierung von  $ecTrpA$  durch  $ecTrpB1$  bei 25 °C (Weischet und Kirschner, 1976). Die Tatsache, dass die Aktivierung von  $tmTrpA$  durch  $tmTrpB1$  eine starke Temperaturabhängigkeit aufweist, deutet darauf hin, dass sie mit einem Konformationsübergang des Komplexes einhergeht. Vermutlich sind die Proteine bei niedrigen Temperaturen recht rigide und der Konformationsübergang nur bedingt möglich (Jaenicke, 2000).



**Abbildung 25: Zunehmende Aktivierung von  $tmTrpA$  durch  $tmTrpB1$  mit ansteigender Temperatur.**  
**A:** Aktivierung  $[(k_{cat}/K_M^{IGP} \alpha_2 \beta_2)/(k_{cat}/K_M^{IGP} \alpha)]$  der A-Reaktion durch Komplexbildung bei verschiedenen Temperaturen. Wert bei 80 °C extrapoliert durch Arrheniusplot (vgl. B). **B:** Arrhenius Diagramm der Daten aus A. Die enzymkinetischen Parameter bei allen gemessenen Temperaturen sind im Anhang, S. 132 aufgeführt.

In einem weiteren Experiment wurde geprüft, ob die Zugabe von  $tmTrpB2$  ebenfalls zu einer Aktivierung von  $tmTrpA$  führt. Zwar konnte bei 25 °C eine Komplexbildung dieser beiden Proteine nicht nachgewiesen werden (Kap. 4.1.10.2.2 und 4.1.11). Dies schließt aber nicht zwingend aus, dass es bei höheren Temperaturen zur Assoziation und Aktivierung kommen könnte.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde eine vollständige Umsatzkurve der A-Reaktion mit 12,2  $\mu\text{M}$  tmTrpA und einer Ausgangskonzentration von 268  $\mu\text{M}$  IGP bei 60 °C aufgenommen. In einer zweiten Messung wurde dem ansonsten identischen Ansatz 13,5  $\mu\text{M}$  tmTrpB2 zugegeben. Der Vergleich der beiden Umsatzkurven zeigt im Rahmen der Messgenauigkeit keinen Unterschied. Dies bedeutet, dass tmTrpA bei 60 °C durch tmTrpB2 nicht aktiviert wird (Abbildung 26).



**Abbildung 26: tmTrpA wird bei 60 °C nicht durch tmTrpB2 aktiviert.**

Umsatzkurven zweier TrpA-Reaktionen mit und ohne TrpB2. **Reaktionsbedingungen:** 100 mM EPPS-Puffer, pH 7,5 mit 180 mM KCl, 40  $\mu\text{M}$  Pyridoxal 5'-phosphat, 6 mM NAD<sup>+</sup>, 20 mM Arsenat, 50  $\mu\text{g}$  tmGAPDH, 268  $\mu\text{M}$  IGP, 12,2  $\mu\text{M}$  tmTrpA (+13,5  $\mu\text{M}$  tmTrpB2).

#### 4.1.13.2 B-Reaktion

Die B-Reaktion der Tryptophan Synthase umfasst die Kondensation von L-Serin und Indol zu L-Tryptophan (Abbildung 8). Die Reaktion wird photometrisch verfolgt, nämlich über die beim Übergang von Indol zu Tryptophan auftretende Erhöhung der Absorption bei 290 nm. Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen wurden unter sättigenden Bedingungen eines der Substrate in Abhängigkeit von der Konzentration des zweiten Substrates aufgenommen. Die erhaltenen Sättigungskurven wurden gemäß der Michaelis-Menten Gleichung (Gleichung 6, S. 79) mit einer hyperbolischen Funktion gefittet (Gleichung 7, S. 79), wodurch  $v_{\text{max}}$  (und damit  $k_{\text{cat}}$ , Gleichung 8, S. 80) und  $K_{\text{M}}$  erhalten wurden. Wegen der hohen Stabilität der tmTrpB Proteine (Tabelle 7) und der Substrate und Produkte der Reaktion konnte direkt bei 80 °C gemessen werden. Auf Messungen bei

niedrigerer Temperatur wurde daher verzichtet. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 27 dargestellt.

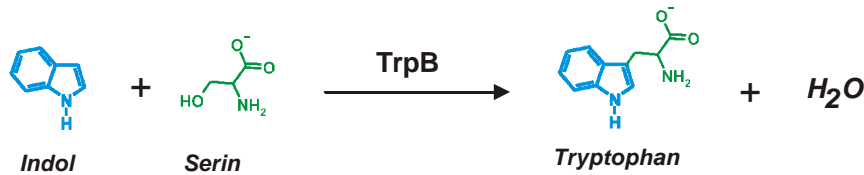


Abbildung 27: Reaktionsschema zur Messung der B-Reaktion der Tryptophan Synthase.

#### 4.1.13.2.1 *tmTrpB1*

TmTrpB1 wurde in isolierter Form und im [(tmTrpA·tmTrpB1)<sub>2</sub>]-Komplex vermessen. Die ermittelten steady-state enzymkinetischen Parameter sind in Tabelle 9 zusammengefasst und denen von ecTrpB1 gegenübergestellt.

Tabelle 9: Steady-state kinetische Parameter der B-Reaktion der Tryptophan Synthasen aus *T. maritima* bei 80 °C und *E. coli* bei 25 °C.

		tmTrpB1	tmTS	Faktor	ecTrpB1	ecTS <sup>b</sup>	Faktor
		$\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2/\beta_2$	$\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2/\beta_2$
$k_{\text{cat}}$	(s <sup>-1</sup> )	4,2	10	2,4	0,28 <sup>a</sup>	5,3	15
$K_M^{\text{IND}}$	(mM)	0,04	0,025	0,6	0,014 <sup>a</sup>	0,015	1,1
$k_{\text{cat}}/K_M^{\text{IND}}$	(mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	100	400	4	20 <sup>a</sup>	408	20
$k_{\text{cat}}$	(s <sup>-1</sup> )	3,8	8	2,1	0,18 <sup>b</sup>	5,3	29
$K_M^{\text{SER}}$	(mM)	110	3,7	0,034	0,95 <sup>b</sup>	0,43	0,45
$k_{\text{cat}}/K_M^{\text{SER}}$	(mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0,034	2,2	65	0,19 <sup>b</sup>	12	63,2

**Reaktionsbedingungen:** 100 mM Kaliumphosphat Puffer, pH 7,5 mit 180 mM KCl und 40 µM Pyridoxal 5' phosphat. Für die Messung mit isoliertem tmTrpB1 wurden 466 nM aktive Zentren verwendet, für die Messung mit (tmTrpA·tmTrpB1)<sub>2</sub> wurden 466 nM tmTrpB1 (aktive Zentren) und 1,1 µM tmTrpA verwendet.

**a** = entnommen aus Lane und Kirschner (1983a); Puffer: 100 mM Kaliumphosphat Puffer, pH 7,5 mit 40 µM PLP, 5 mM EDTA, 0,2 mM DTT, 0,49 µM ecTrpB1, T= 25 °C. **b** = entnommen aus Lane und Kirschner (1983b). Messbedingungen wie für a, jedoch 0,16 µM (ecTrpA·ecTrpB1)<sub>2</sub>. **IND** = Indol; **SER** = Serin.

Ein Vergleich der enzymkinetischen Parameter von ecTrpB1 bei 25 °C und tmTrpB1 bei 80 °C weist für tmTrpB1 eine etwas höhere katalytische Effizienz auf, während es im Komplex keine signifikanten Unterschiede gibt. In der Serin-abhängigen Reaktion ist dagegen ecTrpB1 etwas aktiver, bedingt durch den sehr hohen  $K_M^{\text{SER}}$  von tmTrpB1. Die Aktivierung durch Komplexbildung ist für beide Enzyme ähnlich und in der Serin-abhängigen Reaktion deutlich stärker ausgeprägt als in der Indol-abhängigen Reaktion. Im Falle von tmTrpB1 ist sie vor allem auf



die drastische Erniedrigung von  $K_M^{SER}$  zurückzuführen, der im isolierten Enzym einen Wert von 110 mM erreicht.

Interessanterweise scheint die Aktivierung von tmTrpB1 durch tmTrpA bei niedrigen Temperaturen stärker ausgeprägt zu sein. Hentzelt (1999) fand bei 40 °C eine 8fache Aktivierung in der Indol-abhängigen und eine 218fache Aktivierung in der Serin-abhängigen Reaktion, während bei 80 °C nur eine 4fache Aktivierung in der Indol-abhängigen und eine 65fache Aktivierung in der Serin-abhängigen Reaktion gemessen wurde (Tabelle 9). Umgekehrt nimmt die Aktivierung von tmTrpA durch tmTrpB1 mit steigender Temperatur exponentiell zu (Abbildung 25).

#### 4.1.13.2.2 *tmTrpB2*

**Tabelle 10: Vergleich der Steady-state kinetischen Parameter der B-Reaktion von tmTrpB2 und tmTrpB1 bei 80 °C.**

		tmTrpB2 $\beta_2$	tmTrpB2+ tmTrpA ( $2\alpha + \beta_2$ )	Faktor ( $2\alpha + \beta_2$ )/ $\beta_2$	tmTrpB1 $\beta_2$	tmTS $\alpha_2\beta_2$	Faktor ( $\alpha_2\beta_2$ )/ $\beta_2$
$k_{cat}$	(s <sup>-1</sup> )	0,46 <sup>a</sup>	0,48 <sup>a</sup>	1	4,2	10	2,4
$K_M^{IND}$	( $\mu$ M)	< 0,77 <sup>a</sup>	< 0,62 <sup>a</sup>	1,2	40	25	0,6
$k_{cat}/K_M^{IND}$	( $\mu$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	> 0,6	> 0,77	1,3	0,1	0,4	4
$k_{cat}$	(s <sup>-1</sup> )	0,44	0,37	0,8	3,8	8	2,1
$K_M^{SER}$	( $\mu$ M)	50200	9140	0,2	110000	3700	0,034
$k_{cat}/K_M^{SER}$	( $\mu$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$0,87 \cdot 10^{-5}$	$4,1 \cdot 10^{-5}$	4,7	$3,4 \cdot 10^{-5}$	$220 \cdot 10^{-5}$	65

**Reaktionsbedingungen:** isolierte Proteine wurden in 100 mM Kaliumphosphat Puffer, pH 7,5 gemessen, Proteinmischungen in EPPS Puffer, pH 7,5. Beide Puffer enthielten zusätzlich 180 mM KCl und 40  $\mu$ M Pyridoxal 5'-phosphat.

**a** = Werte wurden durch Analyse einer kompletten Umsatzkurve mit der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung erhalten. Der Wert für  $K_M^{IND}$  entspricht der abgeschätzten Obergrenze.

Für die Messung mit isoliertem tmTrpB2 wurden 337 nM in der serinabh. Reaktion und 780 nM in der indolabh. Reaktion verwendet, bei tmTrpB2 im Gemisch mit tmTrpA 337 nM tmTrpB2 und 700 nM tmTrpA in der serinabh. Reaktion, 780 nM tmTrpB2 und 1,22  $\mu$ M tmTrpA in der indolabh. Reaktion. Konzentrationen für tmTrpB2 entsprechen den Konzentrationen an aktiven Zentren. Die Daten für tmTrpB1 entsprechen denen aus Tabelle 9. **IND** = Indol; **SER** = Serin.

Die Aktivitätsmessungen von tmTrpB2 bei 80 °C erfolgten analog denen mit tmTrpB1. Dabei stellte sich heraus, dass der  $K_M^{IND}$ -Wert zu klein war, um genau bestimmt werden zu können. Bei den zur  $K_M^{IND}$ -Bestimmung erforderlichen niedrigen Substratkonzentrationen war die gemessene Signaländerung so gering, dass eine zuverlässige Bestimmung der Anfangssteigung nicht möglich war. Deshalb wurden hier komplette Umsatzkurven mit der integrierten Michaelis-Menten

Gleichung gefittet, wodurch sich zumindest eine obere Grenze für  $K_M^{\text{IND}}$  abschätzen ließ. Diese liegt unterhalb 1  $\mu\text{M}$ . Dadurch lässt sich abschätzen, dass die katalytischen Effizienzen von tmTrpB1 und tmTrpB2 in der Indol-abhängigen Reaktion in der gleichen Größenordnung liegen, wobei sich die Unterschiede in  $k_{\text{cat}}$  und  $K_M^{\text{IND}}$  in etwa kompensieren. Dagegen ist die katalytische Effizienz von tmTrpB1 in der Serin-abhängigen Reaktion um 1-2 Größenordnungen höher als die von tmTrpB2. Wie erwartet, wird tmTrpB2 im Gegensatz zu tmTrpB1 in der Indol-abhängigen Reaktion durch Komplexbildung mit tmTrpA nicht aktiviert. Worauf die durch Herabsetzung des  $K_M^{\text{SER}}$  bedingte, etwa 5fache Aktivierung von tmTrpB2 in der Serin-abhängigen Reaktion zurückzuführen ist, bleibt unklar. Analytische Gelfiltration (Kap. 4.1.10.2.2), analytische Ultrazentrifugation (Kap. 4.1.11) und die Messung der tmTrpA-Aktivität in Anwesenheit von tmTrpB2 (Kap. 4.1.13.1, Abbildung 26) hatten keinerlei Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen diesen beiden Proteinen geliefert.

#### **4.1.13.3 Die Gesamtreaktion der Tryptophansynthase**

Die Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase ist die Umwandlung von Indolglyzerinphosphat und Serin in Tryptophan, Glyzerinaldehyd 3-phosphat und Wasser (Abbildung 8). Dabei erfolgt zunächst an TrpA die Spaltung von IGP in Glyzerinaldehyd 3-phosphat und Indol (A-Reaktion, vgl. Kap. 4.1.13.1), welches durch einen Tunnel zum aktiven Zentrum von TrpB gelangt und dort mit Serin unter Wasserabspaltung zu Tryptophan kondensiert (B-Reaktion, vgl. Kap. 4.1.13.2). Es wurden zwei verschiedene Methoden zur Messung dieser Reaktion veröffentlicht. Lane und Kirschner (1991) beschreiben einen gekoppelten enzymatischen Test, der dem zur Messung der A-Reaktion entspricht, jedoch in Anwesenheit von Serin (Abbildung 28). Diesem Verfahren liegt die Annahme zugrunde, dass die A-Reaktion im Komplex sehr viel langsamer abläuft als die B-Reaktion und damit die Geschwindigkeit der Reaktion begrenzt. Dies ist für das Enzym aus *E. coli* tatsächlich der Fall (Lane und Kirschner, 1991), kann aber für das Enzym aus *T. maritima* nicht automatisch angenommen werden.

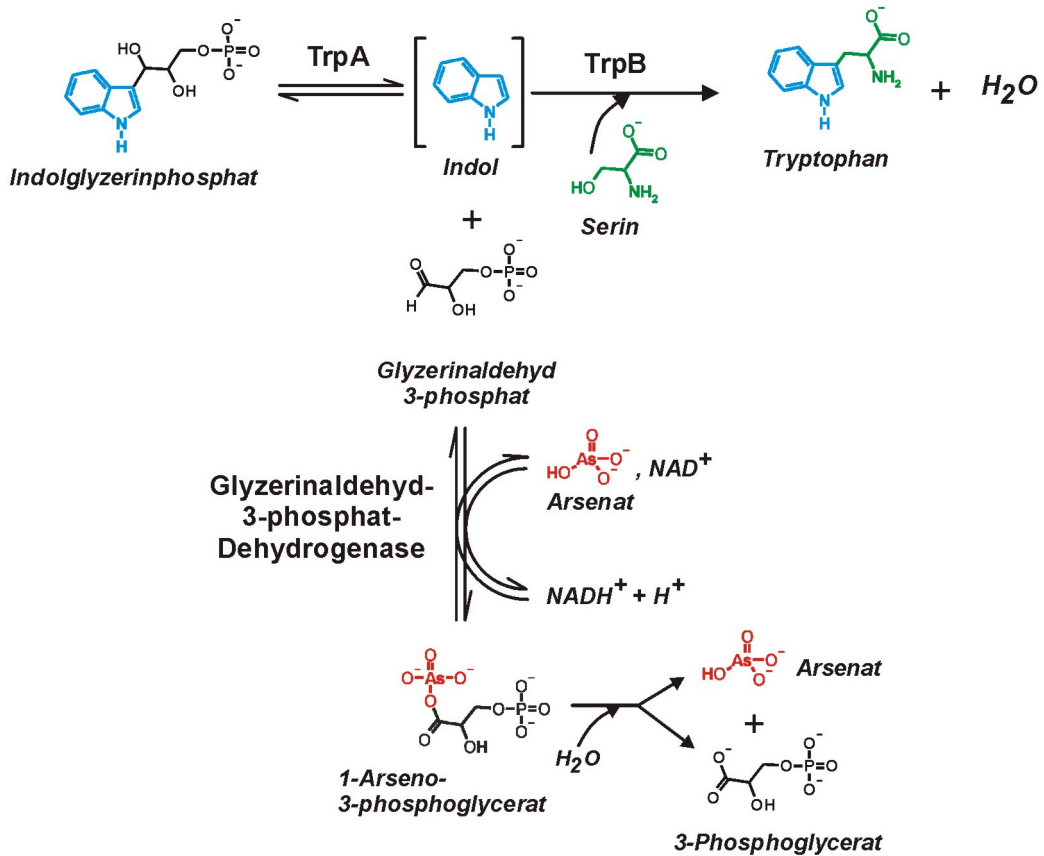


Abbildung 28: Reaktionsschema zur Messung der Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase nach Lane und Kirschner (1991).

Brzovic *et al.* (1992) nutzten dagegen den Absorptionsunterschied zwischen IGP und Tryptophan ( $\Delta\epsilon_{290}(\text{Tryptophan-IGP}) = 0,56 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), um den Verlauf der Reaktion direkt zu verfolgen (Abbildung 29).

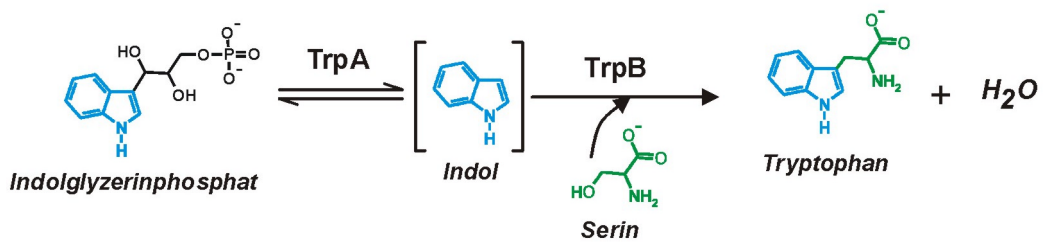


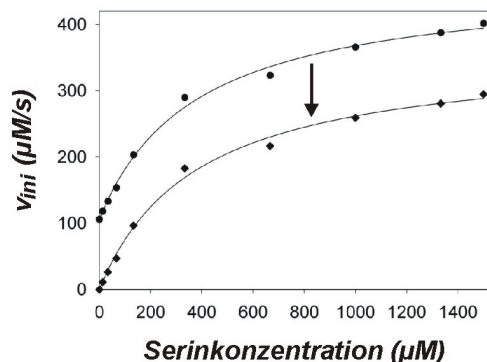
Abbildung 29: Reaktionsschema zur Messung der Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase nach Brzovic *et al.* (1992).

Im Folgenden wird auf beide Methoden eingegangen, wobei von „gekoppeltem“ TS-Test (Abbildung 28) bzw. „direktem“ TS-Test (Abbildung 29) gesprochen wird.

#### 4.1.13.3.1 Gekoppelter TS-Test

Zunächst wurden die enzymkinetischen Parameter mit Hilfe des gekoppelten Enzymtests bei Temperaturen zwischen 30 °C und 60 °C ermittelt, um anschließend mit Hilfe eines Arrhenius Diagramms auf 80 °C extrapolieren zu können. Dazu wurden Anfangssteigungen gemessen, wobei entweder IGP oder Serin in sättigendem Überschuss vorlag und die Konzentration des anderen Substrates variiert wurde. Die resultierenden Sättigungskurven wurden wiederum gemäß der Michaelis-Menten Gleichung (Gleichung 6, S. 79) mit einer hyperbolischen Funktion (Gleichung 7, S. 79) gefittet. Zur Messung wurde ein bereits gereinigter [(tmTrpA·tmTrpB)<sub>2</sub>]-Komplex verwendet (freundliche Gabe von H. Szadkowski, AG K. Kirschner, Biozentrum Basel).

Bei der Auswertung der Daten in der Serin-abhängigen Reaktion, d.h. unter sättigenden Bedingungen für IGP, musste berücksichtigt werden, dass tmTrpA eine „Grundaktivität“ der IGP-Spaltung besitzt (vgl. Tabelle 8). Dies bedeutet, dass bei einer Serinkonzentration von 0 µM bereits die Bildung von NADH+H<sup>+</sup> nachzuweisen ist. Von den erhaltenen Sättigungskurven wurde diese „Grundaktivität“ substrahiert, und die korrigierte Kurve mit der Michaelis-Menten Gleichung gefittet (Abbildung 30).



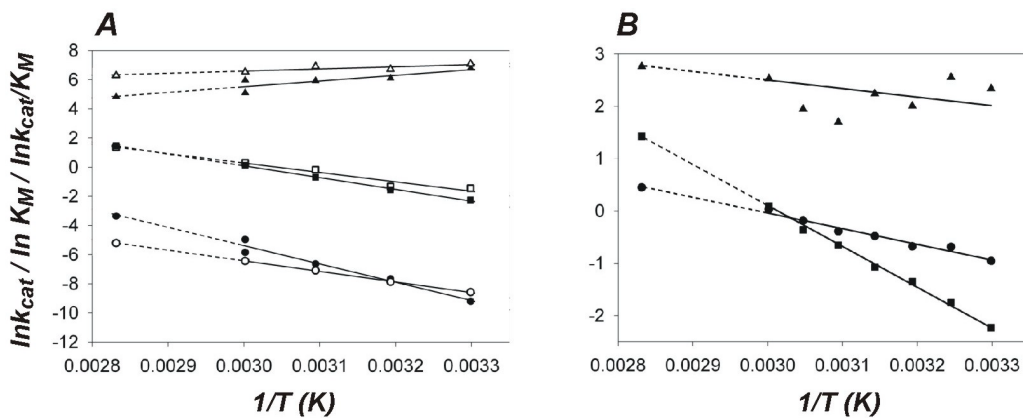
**Abbildung 30:** Zur Bestimmung des  $K_M$ -Wertes für Serin mit dem gekoppelten TS-Test der Gesamtreaktion wurde die bereits vorhandene „Grundaktivität“ von tmTrpA abgezogen.

● = Originaldaten; ◆ = korrigierte Daten. Es ist jeweils die hyperbolische Regression der Datenpunkte gezeigt. Die Daten stammen aus der Messung der Gesamtreaktion bei 50 °C unter sättigenden Konzentrationen an IGP. Die „Grundaktivität“ wurde durch Messung der Reaktion in Abwesenheit von Serin ermittelt. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

## 4.1.13.3.2 Direkter TS-Test

Für die IGP-abhängige Reaktion wurde nur eine Messung bei 60 °C durchgeführt. Die erhaltenen  $k_{\text{cat}}$ - und  $K_M^{\text{IGP}}$ -Werte entsprachen weitestgehend denen aus dem gekoppelten TS-Test.

Zur Messung der Serin-abhängigen Reaktion wurden Sättigungskurven zwischen 30 °C und 60 °C aufgenommen und der Wert für 80 °C durch Extrapolation mit Hilfe eines Arrhenius-Diagramms ermittelt (Abbildung 31). Die ermittelten enzymkinetischen Parameter bei allen gemessenen Temperaturen sind im Anhang, S. 133 aufgeführt.



**Abbildung 31: Arrhenius Diagramme der enzymkinetischen Parameter der Gesamtreaktion.**

**A:** Serin-abhängige Reaktion. Werte aus dem direkten Test, offene Symbole ( $\Delta$ ,  $\square$ ) und aus dem gekoppelten Test, geschlossene Symbole ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ).  $\square$ ,  $\blacktriangle$  =  $k_{\text{cat}}$ ;  $\Delta$ ,  $\blacktriangle$  =  $K_M^{\text{SER}}$ ;  $\bullet$ ,  $\circ$  =  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{SER}}$ . **B:** Indol-abhängige Reaktion. Es wurde nur mit dem gekoppelten Test gemessen.  $\blacktriangle$  =  $k_{\text{cat}}$ ;  $\blacktriangle$  =  $K_M^{\text{IGP}}$ ;  $\bullet$  =  $K_M^{\text{IGP}}/K_M^{\text{SER}}$ .

Hier zeigt sich, dass die Werte für  $K_M^{\text{IGP}}$  und  $K_M^{\text{SER}}$  weitgehend temperatur-unabhängig sind, während der  $k_{\text{cat}}$ - und damit auch die  $k_{\text{cat}}/K_M$ -Werte mit der Temperatur ansteigen. Die steady-state enzymkinetischen Parameter der Gesamtreaktion sowie der A- und B-Einzelreaktionen des  $[(\text{tmTrpA}\cdot\text{tmTrpB})_2]$ -Komplexes bei 80 °C sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Zum Vergleich sind die entsprechenden Parameter des  $[(\text{ecTrpA}\cdot\text{ecTrpB})_2]$ -Komplexes bei 25 °C aufgeführt.

**Tabelle 11: Steady-state enzymkinetische Parameter der Gesamtreaktion und der Einzelreaktionen von [(tmTrpA•tmTrpB)<sub>2</sub>] bei 80 °C und von [(ecTrpA•ecTrpB)<sub>2</sub>] bei 25 °C.**

		$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M^{IGP}$ (mM)	$k_{cat}/K_M^{IGP}$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M^{SER}$ (mM)	$k_{cat}/K_M^{SER}$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
<i>T. maritima</i> 80 °C	A-Reaktion <sup>a</sup>	5,6	0,19	29,5	-	-	-
	B-Reaktion <sup>b</sup>	-	-	-	8	3,7	2,2
	Gesamtreaktion	4,14	0,016	260	4,26	0,13	34
<i>E. coli</i> 25 °C	A-Reaktion <sup>c</sup>	0,067	0,14	0,48	-	-	-
	B-Reaktion <sup>c</sup>	-	-	-	5,3	0,43	12
	Gesamtreaktion <sup>c</sup>	1,4	0,069	20	1,4	0,34	4,1

**Bedingungen für die Gesamtreaktion und die Teilreaktionen von (tmTrpA•tmTrpB)<sub>2</sub>:** 100 mM EPPS-Puffer, pH 7,5 mit 180 mM KCl, 40 µM PLP, 6 mM NAD<sup>+</sup>, 20 mM Arsenat, 50 µg tmGAPDH. In der IGP-abhängigen Gesamtreaktion wurden 0,52 µM (tmTrpA•tmTrpB)<sub>2</sub> (= 1,04 µM aktive Zentren von tmTrpA und tmTrpB) verwendet, in der Serin-abhängigen Gesamtreaktion 0,39 µM (= 0,79 µM aktive Zentren). Pufferbedingungen für die A- bzw. B-Reaktion sind Tabelle 8 und Tabelle 9 zu entnehmen.

**a** = Daten aus Tabelle 8; **b** = Daten aus Tabelle 9; **c** = entnommen aus Lane und Kirschner (1991). **Reaktionsbedingungen:** 100 mM Kaliumphosphat Puffer, 5 mM EDTA, 0,2 mM DTT, 40 µM PLP, pH 7,6; 16,7 µM (ecTrpA•ecTrpB)<sub>2</sub> für Messung der A-Reaktion; 0,16 µM (ecTrpA•ecTrpB)<sub>2</sub> für Messung der B-Reaktion; 8,35 µM (ecTrpA•ecTrpB)<sub>2</sub> für die Messung der Gesamtreaktion.

#### 4.1.13.3 Diskussion: Gesamtreaktion und Einzelreaktionen in den [(TrpA•TrpB)<sub>2</sub>]-Komplexen aus *T. maritima* und *E. coli*

Die Analyse der Daten aus Tabelle 11 erlaubt Antworten auf folgende grundsätzliche Fragen:

1. Wie vergleichen sich die katalytischen Effizienzen von (tmTrpA•tmTrpB)<sub>2</sub> und (ecpA•ecpB)<sub>2</sub> bei den jeweiligen physiologischen Temperaturen?
2. Welche Teilreaktion limitiert die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion?
3. In welcher Weise beschleunigt die Bindung von Serin an TrpB1 die A-Reaktion bzw. die Bindung von IGP an TrpA die B-Reaktion?

Ad 1: Die katalytischen Effizienzen  $k_{cat}/K_M^{IGP}$  und  $k_{cat}/K_M^{SER}$  liegen für die Gesamtreaktion von (tmTrpA•tmTrpB)<sub>2</sub> bei 80 °C um etwa eine Größenordnung über denen von (ecTrpA•ecTrpB)<sub>2</sub> bei 25 °C. Ein ähnliches Ergebnis wurde für die A-Reaktion von tmTrpA und (tmTrpA•tmTrpB)<sub>2</sub> beobachtet (Tabelle 8).

Ad 2: Der  $k_{cat}$ -Wert der Gesamtreaktion beträgt bei 80 °C etwa 4 s<sup>-1</sup> und ist damit geringfügig niedriger als die  $k_{cat}$ -Werte der A-Reaktion (5,6 s<sup>-1</sup>) und der B-Reaktion (8s<sup>-1</sup>) von (tmTrpA•tmTrpB)<sub>2</sub> (Tabelle 11).

Dagegen ist der  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $(\text{ecTrpA}\cdot\text{ecTrpB})_2$  mit  $1,4 \text{ s}^{-1}$  in der Gesamtreaktion deutlich höher als der  $k_{\text{cat}}$  Wert der A-Reaktion im Komplex, der  $0,067 \text{ s}^{-1}$  beträgt (Tabelle 11). Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert der B-Reaktion in *E. coli* beträgt im Komplex  $5,3 \text{ s}^{-1}$ . Daraus lässt sich schließen, dass bei  $(\text{ecTrpA}\cdot\text{ecTrpB})_2$  die Gesamtreaktion (unter Substratsättigung) durch den  $k_{\text{cat}}$ -Wert der A-Reaktion begrenzt wird, während der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion von  $(\text{tmTrpA}\cdot\text{tmTrpB})_2$  aus den bisher durchgeführten Messungen nicht hervorgeht.

Ad 3:  $K_{\text{M}}^{\text{IGP}}$  und  $K_{\text{M}}^{\text{SER}}$  sind in der Gesamtreaktion, wo sie unter jeweils sättigenden Konzentrationen des zweiten Substrates gemessen werden, um etwa eine Größenordnung kleiner als die entsprechenden  $K_{\text{M}}$ -Werte in den A- bzw. B-Reaktionen des  $[(\text{tmTrpA}\cdot\text{tmTrpB1})_2]$ -Komplexes, wo sie in Abwesenheit des anderen Substrates gemessen werden. Für  $(\text{ecTrpA}\cdot\text{ecTrpB})_2$  sind  $K_{\text{M}}^{\text{IGP}}$  und  $K_{\text{M}}^{\text{SER}}$  in der Gesamtreaktion und in den beiden Einzelreaktionen dagegen ähnlich (Tabelle 11). Entscheidend verbessert wird durch die Bindung von Serin an ecTrpB1 allerdings der  $k_{\text{cat}}$ -Wert der A-Reaktion, welcher für die Gesamtreaktion geschwindigkeitsbestimmend ist (vgl. Punkt 1).

#### 4.1.13.3.4 Vergleich zu Messungen bei physiologischer Temperatur von Tryptophan Synthasen aus anderen hyperthermophilen Organismen

Bislang ist die Tryptophan Synthase von anderen hyperthermophilen Organismen nur bei dem Archaeon *Thermococcus kodakarensis* (vormals *Pyrococcus* zugeordnet) ansatzweise untersucht worden (Tang *et al.*, 2000). Es wurden die  $k_{\text{cat}}$ -Werte der isolierten tkTrpA und tkTrpB Proteine gemessen sowie die  $k_{\text{cat}}$ -Werte der A-, B- und Gesamtreaktionen des  $[(\text{tkTrpA}\cdot\text{tkTrpB1})_2]$ -Komplexes.  $K_{\text{M}}$ -Werte und damit die katalytischen Effizienzen wurden nicht bestimmt. Es zeigt sich, dass die Gesamtreaktion des  $[(\text{tkTrpA}\cdot\text{tkTrpB1})_2]$ -Komplexes bei  $80 \text{ °C}$  einen ähnlichen  $k_{\text{cat}}$ -Wert (ca.  $1,9 \text{ s}^{-1}$ ) hat wie der entsprechende Komplex aus *T. maritima* ( $4 \text{ s}^{-1}$ ). Auch die  $k_{\text{cat}}$ -Werte der B-Reaktionen der Komplexe (ca.  $1,8 \text{ s}^{-1}$  bei *T. kodakarensis* und  $8 \text{ s}^{-1}$  bei *T. maritima*) sind zumindest in der gleichen Größenordnung. Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert der A-Reaktion ist im  $[(\text{tkTrpA}\cdot\text{tkTrpB1})_2]$ -Komplex jedoch mit ca.  $0,09 \text{ s}^{-1}$  deutlich schlechter (ca. 56fach) als der des *T.*

*maritima* Komplexes und entspricht eher dem  $k_{\text{cat}}$ -Wert der A-Reaktion im *E. coli* Tryptophan Synthase Komplex ( $0,067 \text{ s}^{-1}$ ). Ähnlich wie in der *E. coli* Tryptophan Synthase wird auch bei der Tryptophan Synthase aus *T. kodakarensis* der  $k_{\text{cat}}$ -Wert für die Gesamtreaktion wohl durch die A-Reaktion begrenzt.

#### **4.1.14 Messungen der Aktivität von tmTrpB2 bei Raumtemperatur und daraus resultierende Experimente**

Die Aktivität von tmTrpB2 wurde zunächst bei 25 °C gemessen und aufgrund einer extrem geringen Anfangssteigung in Anwesenheit von 25 mM Serin und 200 µM Indol wurde geschlossen, dass das Protein nur sehr schwach aktiv sei. Zu diesem Zeitpunkt wurde noch nicht versucht, die Aktivität bei höherer Temperatur zu messen, es war also nicht bekannt, dass bei 80 °C tmTrpB2 eine ähnliche katalytische Effizienz in der Indol-abhängigen Reaktion wie tmTrpB1 besitzt (vgl. Kap.4.1.13.2.2). Die folgenden Messungen basieren also auf der Vermutung, das Enzym zeige keine bzw. nur eine sehr schwache B-Aktivität. Auf der Suche nach alternativen Funktionen bot sich ein Test auf Tryptophanaseaktivität an. Zum einen war für TrpB-Enzyme aus anderen Organismen früher schwache Tryptophanaseaktivität nachgewiesen worden (Miles, 1991), zum anderen fand sich im Genom von *T. maritima* kein Gen mit signifikanter Ähnlichkeit zu den bekannten Tryptophanasegenen (Nelson *et al.*, 1999).

##### **4.1.14.1 Tryptophanasetest**

Tryptophanasen bauen Tryptophan zu Indol, Pyruvat und Ammoniak ab. Steady-state enzymkinetische Messungen erfolgten über einen gekoppelten Enzymtest mit Laktat Dehydrogenase als Hilfsenzym. Dabei wird die Abnahme der Absorption bei 340 nm bei der Oxidation von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  verfolgt (Abbildung 32).



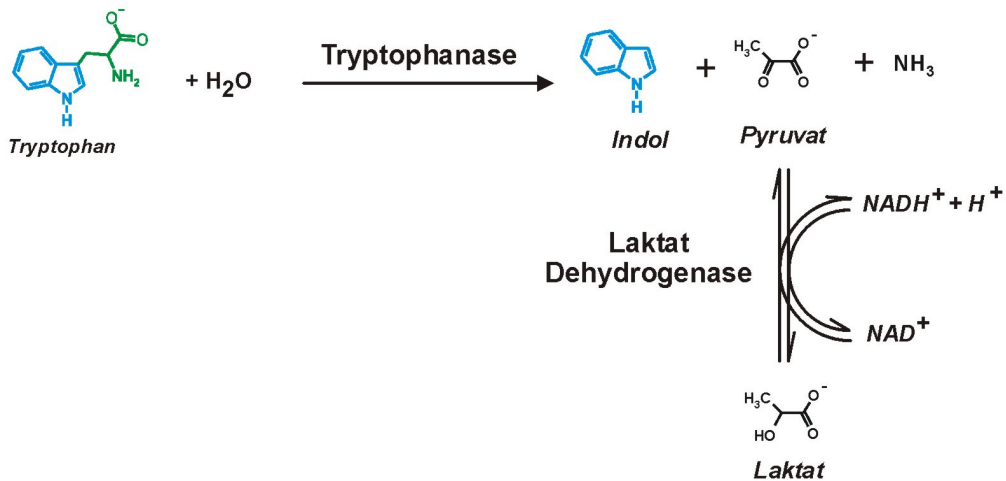


Abbildung 32: Reaktionsschema des gekoppelten Tests zur Bestimmung der Tryptophanaseaktivität.

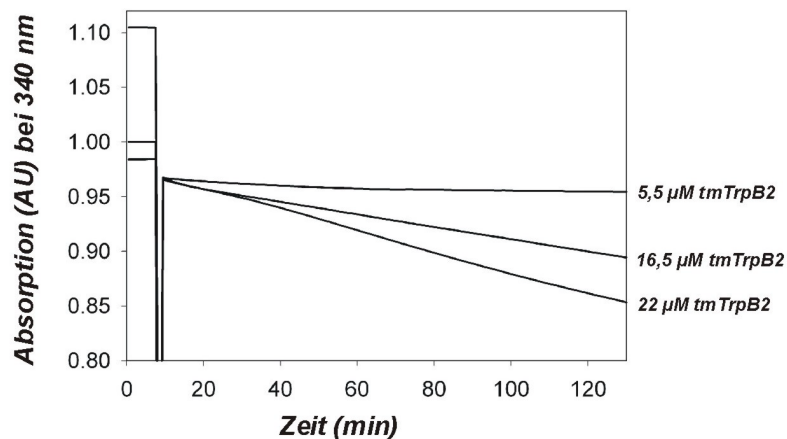


Abbildung 33: Nachweis der Tryptophanaseaktivität von tmTrpB2.

Dargestellt sind die ersten 120 min dreier Umsatzkurven mit verschiedenen Enzymkonzentrationen. **Reaktionsbedingungen:** 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 mit 180 mM KCl, 40 µM PLP, 150 µM NADH+H<sup>+</sup> sowie 6,8 u Laktat Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel (Sigma Aldrich) enthielt. Die Reaktion wurde mit 1 mM Tryptophan gestartet. Als Messtemperatur wurden 37 °C gewählt.

Abbildung 33 zeigt drei Umsatzkurven, die mit verschiedenen Proteinkonzentrationen erhalten wurden. Es wurden 5,5, 16,5 und 22 µM tmTrpB2 eingesetzt, was einem Verhältnis von 1:3:4 entspricht. Die Auswertung der Anfangssteigungen ergab ein Verhältnis von 1:2:3,3. Dieses Ergebnis entspricht in erster Näherung der für eine enzymkatalysierte Reaktion erwarteten proportionalen Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Proteinkonzentration. Die Umsatzraten sind jedoch sehr gering (0,8 – 2,7 nM/s). Unter der Annahme, dass tmTrpB2 bei einer Substratkonzentration von 1 mM mit

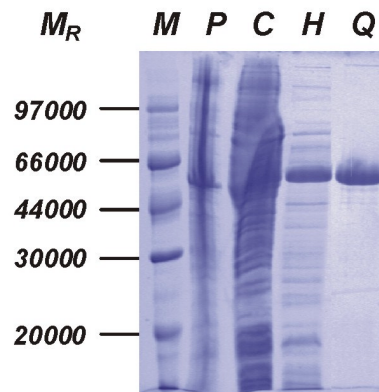
Tryptophan gesättigt ist, würde dies einem  $k_{\text{cat}}$ -Wert von ca.  $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  entsprechen. Die *E. coli* Tryptophanase ist sehr viel aktiver ( $k_{\text{cat}} = 5 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_M = 120 \text{ }\mu\text{M}$ ;  $k_{\text{cat}}/K_M = 41,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , Kawata *et al.*, 1990). Es bleibt aber zu bedenken, dass die Messungen der Tryptophanaseaktivität von tmTrpB2 bisher nur bei 37 °C erfolgt sind und die Aktivität bei 80 °C deutlich größer sein wird. In Ermangelung einer käuflichen thermostabilen Laktat Dehydrogenase konnte diese Messung jedoch noch nicht durchgeführt werden.

#### **4.1.14.2 Effekt des Aminosäureaustausches tmTrpB2 W140H auf die TrpB-Aktivität**

Betrachtet man die Struktur von TrpB1 aus *Salmonella typhimurium* (Hyde *et al.*, 1988) und ein Alignment der tmTrpB1 und tmTrpB2 Sequenz (Abbildung 11), so sieht man, dass die aktiven Zentren von beiden Enzymen in großen Teilen die gleiche Struktur haben müssen (Abbildung 12). Die Position T190 (*Salmonella* Zählweise) ist in beiden Enzymen aus *T. maritima* durch ein Serin vertreten, C170 durch ein Isoleucin. Dieser Rest wird als letzter Rest des Kanals zwischen den aktiven Zentren von TrpA und TrpB beschrieben und ihm soll eine Rolle bei der Indolbindung zukommen (Miles, 1991). Unterschiede sind in den Resten A85, H115 und Q142 (*Salmonella* Zählweise) zu sehen, die in den TrpB2-Proteinen durch S110, W140 bzw. K166 (Zählweise tmTrpB2) vertreten sind. Besonders interessant ist das Histidin 115, welches für die TrpB-Reaktion als nicht essenziell beschrieben wurde (Miles, 1991), aber dennoch eine gewisse Rolle in der Katalyse spielen könnte. Tryptophan 140 in tmTrpB2 und das Reaktionsprodukt Tryptophan in der *S. typhimurium* TrpB1-Struktur könnten unter Ausnutzung der Freiheitsgrade der Seitenkette von W140 in unmittelbarer Nachbarschaft zu liegen kommen. Dies könnte zu einer Behinderung der Produktfreisetzung vom aktiven Zentrum von tmTrpB2 führen, die durch den Austausch von W140 gegen Histidin aufgehoben werden müsste. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Variante tmTrpB2 W140H hergestellt und enzymkinetisch untersucht.

#### 4.1.14.2.1 Erzeugung der Variante tmTrpB2 W140H

Zur Einführung des Aminosäureaustausches W140H in tmTrpB2 wurde im entsprechenden Codon ein Nukleotidaustausch mittels gerichteter Mutagenese (QuickChange Site directed Mutagenesis Kit, Stratagene) durchgeführt. Eingesetzt wurden dabei die Primer tmTrpB2\_W140H und tmTrpB2\_W140Hk, die eine *HincII*-Restriktionsschnittstelle in das Gen einfügten sowie als Templat pET21a-tmTrpB2. Nach Verifizierung der Mutation mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung wurden mit dem resultierenden Plasmid BL21 (DE3)-Zellen transformiert und das Gen *tmtrpB2*-W140H exprimiert. Auch dazu war keine Induktion mit IPTG nötig. Die Kultivierungstemperatur wurde auf 20 °C gesetzt, um einen möglichst großen Anteil des Proteins in löslicher Form zu erhalten (vgl. Kap. 4.1.8). Die Aufreinigung erfolgte analog wie in Kap. 4.1.8 für tmTrpB1 und tmTrpB2 beschrieben. Eine präparative Gelfiltration war hier jedoch nicht von Nöten, da das Protein nach der Anionenaustauschchromatographie hinreichend rein war. Es wurde anschließend gegen 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 50 mM KCl und 400 µM PLP, pH7,5 dialysiert, auf 3,3 mg/ml (= 71µM) einkonzentriert und in flüssigen Stickstoff eingetropf.



**Abbildung 34: Analyse der Reinigung von tmTrpB2 W140H mittels SDS-PAGE** (12,5 % Polyacrylamid). **M:** lowrange Marker (Pharmacia); **P:** Pelletfraktion; **C:** Rohextrakt; **H:** Hitzeschritt; **Q:** vereinigte Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie.

Die Qualität des SDS-Gels (Abbildung 34) lässt keine Abschätzung der relativen Anteile des Proteins in der löslichen Fraktion (C) und der unlöslichen Pellet-Fraktion (P) zu. Es ist aber festzustellen, dass der Hitzeschritt (H) zu einer

signifikanten Anreicherung von tmTrpB2 W140H führt. Der Pool nach der Anionenaustauschchromatographie zeigt ein sehr sauberes Protein (Q). Die Gesamtausbeute aus 3 l Kultur betrug 14,4 mg reines tmTrpB2 W140H.

#### 4.1.14.2.2 Messung der enzymkinetischen Parameter von tmTrpB2 W140H

Der Aktivitätstest bei 80 °C erfolgte in analoger Weise wie in Kap. 4.1.13.2 beschrieben. Es wurden nur die enzymkinetischen Parameter in Bezug auf Indol untersucht, wobei unter sättigenden Konzentrationen von Serin gearbeitet wurde. In Tabelle 12 werden die ermittelten  $K_M^{\text{IND}}$ -,  $k_{\text{cat}}$ - und  $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{IND}}$ -Werte mit denen des Wildtyp tmTrpB2 Proteins verglichen.

**Tabelle 12: Enzymkinetische Parameter von tmTrpB2 und tmTrpB2 W140H bei 80 °C.**

	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_M^{\text{IND}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}/K_M^{\text{IND}}$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
tmTrpB2	0,46	<0,77 $\mu\text{M}$	>0,6
tmTrpB2 W140H	0,031	<0,6 $\mu\text{M}$	>0,05
Faktor <sup>a</sup>	14,8	1,3	12

**a:** Faktor = tmTrpB2/tmTrpB2 W140H; **Reaktionsbedingungen für tmTrpB2:** 100 mM Kaliumphosphat Puffer, pH 7,5 mit 180 mM KCl, 40  $\mu\text{M}$  Pyridoxal 5'-phosphat, 300 mM Serin und 45  $\mu\text{M}$  Indol. Enzymkonzentration: 21,6  $\mu\text{M}$ . Die Berechnung der enzymkinetischen Parameter erfolgte durch Fit der gesamten Umsatzkurve mit der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung (COSY). Daten für tmTrpB1 sind der Tabelle 9 entnommen.

Man sieht, dass durch den Austausch nicht wie erhofft eine Verbesserung der katalytischen Effizienz erzielt worden ist, sondern das Enzym im Gegenteil einen um den Faktor 15 schlechteren  $k_{\text{cat}}$ -Wert aufweist. Der extrem niedrige  $K_M$ -Wert für Indol wurde nicht signifikant verändert, soweit dies im Rahmen der Messgenauigkeit festgestellt werden konnte (vgl. 4.1.13.2.2).

#### 4.1.14.3 Diskussion: physiologische Bedeutung von tmTrpB2

Die Rolle von tmTrpB2 im Stoffwechsel von *T. maritima* konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht abschließend geklärt werden. Die physiologische Bedeutung der schwachen nachgewiesenen Tryptophanaseaktivität ist nicht klar, hier sind enzymkinetische Messungen bei 80 °C dringend geboten. TmTrpB2 könnte eventuell auch andere Reaktionen katalysieren, die in

dieser Arbeit nicht getestet wurden. Für eine solche Möglichkeit sprechen die für TrpB1 aus *E. coli* nachgewiesenen Nebenreaktionen, worunter  $\beta$ -Eliminierungsreaktionen wie z.B. die Spaltung von L-Serin in Pyruvat und Ammoniak fallen (Miles, 1991).

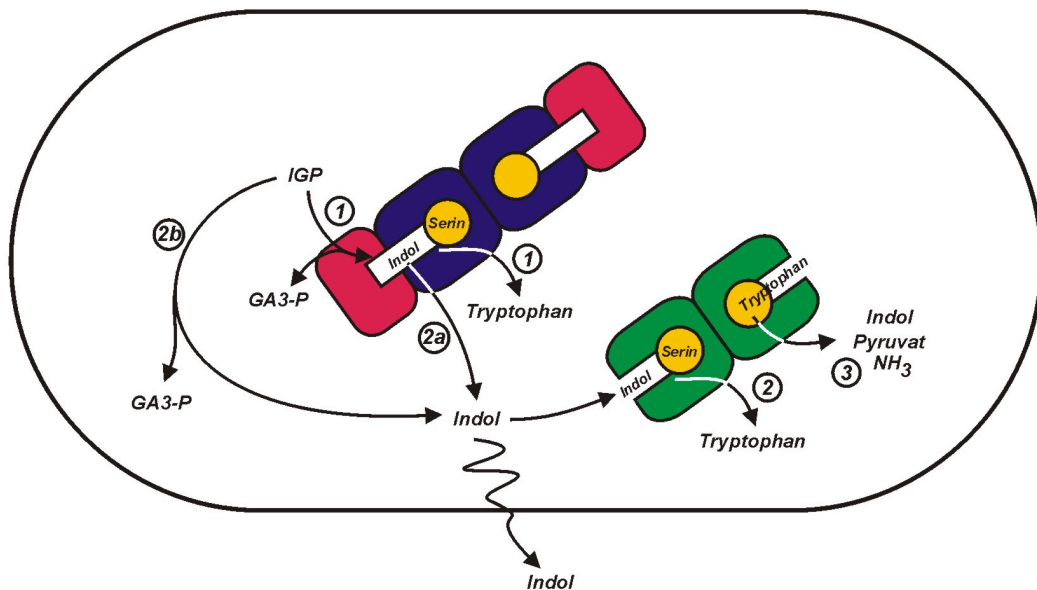
Deshalb muss bis auf weiteres die Annahme gelten, dass die wichtigste Rolle von tmTrpB2 in der Umsetzung von Indol und Serin zu Tryptophan besteht. Hier stellt sich aber die entscheidende Frage nach der Quelle des Indols im Stoffwechsel. Indol ist bisher nur als Produkt der TrpA-Reaktion bekannt und wird in den bisher untersuchten Enzymen aus *E. coli* und *S. typhimurium* im [(TrpA·TrpB)<sub>2</sub>]-Komplex zum aktiven Zentrum von TrpB durch einen hydrophoben Kanal „gechannelt“ (Creighton, 1970; Hyde *et al.*, 1988). TmTrpA assoziiert jedoch nur mit tmTrpB1 und nicht mit tmTrpB2, wie durch analytische Gelfiltration und Ultrazentrifugation (Kap. 4.1.10.2.2 und Kap. 4.1.11) sowie durch enzymkinetische Messungen (Kap. 4.1.13.1 und Kap. 4.1.13.2.2) gezeigt wurde. Zwar wurde von Anderson *et al.* (1991) und Leja *et al.* (1995) nachgewiesen, dass im [(ecTrpA·ecTrpB)<sub>2</sub>]-Komplex bei 25 °C nur Spuren ( $\leq 1\%$ ) des gebildeten Indols den Kanal verlassen. Jedoch bleibt die Möglichkeit, dass der Indol-Kanal im [(TrpA·TrpB)<sub>2</sub>]-Komplex bei 80 °C in größerem Maße undicht ist und entweichendes Indol von tmTrpB2 gebunden und zu Tryptophan umgesetzt wird. Es wurde gezeigt, dass der Aminosäureaustausch K87T in ecTrpB1 zum Entweichen von Indol aus dem Tunnel führt. Bei dieser Variante ist die Bindung von Serin an ecTrpB1 gestört, wodurch gebildetes Indol keinen Reaktionspartner vorfindet, akkumuliert und aus dem Tunnel diffundiert (Banik *et al.*, 1995). Weiterhin könnte IGP bei 80 °C zu einem gewissen Prozentsatz mit Wasser als katalysierendem Agens zu Glycerinaldehyd 3-phosphat und Indol zerfallen, welches von tmTrpB2 gebunden und umgesetzt würde. Andere mögliche Quellen für Indol in *T. maritima* scheiden nach dem momentanen Stand des Wissens aus. Da im Genom von *T. maritima* keine Tryptophanase kodiert ist, scheidet der Tryptophanabbau auf diesem Weg, der z.B. in *E. coli* die Hauptquelle von Indol darstellt (Wang *et al.*, 2001), vermutlich aus. Für die Funktion von tmTrpB2 als „Indolretter“ spricht sein extrem niedriger  $K_M^{\text{IND}}$ -Wert (Tabelle 10). Indol ist ein

sehr hydrophobes Molekül, das vor allem bei den hohen physiologischen Temperaturen von *T. maritima* sehr schnell durch die Cytoplasmamembran diffundieren und somit verloren gehen könnte. Für die „Indolrettungshypothese“ spricht auch, dass *trpB2*-Gene bisher nur bei Hyperthermophilen, nicht jedoch bei Mesophilen gefunden wurden (Abbildung 10).

Lässt sich eine plausible Hypothese für die Evolution von TrpB1 und TrpB2 entwickeln? Aus dem aus den Aminosäuresequenzen abgeleiteten Stammbaum geht hervor, dass die beiden Proteine separate phylogenetische Gruppen darstellen, die sich vermutlich schon früh in der Evolution nach einer Genduplikation unabhängig voneinander entwickelt haben (Abbildung 10). Eines der beiden Produkte dieser Duplikation (TrpB1) entwickelte durch Deletionen am N-Terminus und in der COMM-Domäne (Abbildung 13) die Fähigkeit zur Komplexbildung mit TrpA und des damit verbundenen Channelings von Indol. Das zweite Produkt (TrpB2) übernahm in hyperthermophilen Organismen die Rolle des „Indol-Rettungssystems“. In Mesophilen, bei deren physiologischen Temperaturen die Diffusion langsamer verläuft und die Gefahr des Indol-Verlusts über die Cytoplasmamembran deshalb geringer ist, ging das *trpB2*-Gen vermutlich aufgrund mangelnden Selektionsdrucks verloren. Dies könnte auch ein Hinweis dafür sein, dass hyperthermophile Organismen die stammesgeschichtlich älteren sind, wie es von Woese *et al.* (1990) und Stetter (1996) auf der Basis von 16SrRNA postuliert wurde.

Ein alternatives Szenario zieht mögliche andere durch TrpB2-Proteine katalysierte Reaktionen in Betracht. Die große Ähnlichkeit der aktiven Zentren von tmTrpB1 und tmTrpB2 (Abbildung 11, Abbildung 12) deutet darauf hin, dass es sich hier um ähnliche  $\beta$ -Substitutionsreaktionen handeln könnte. Bereits der gemeinsame Vorläufer von TrpB1 und TrpB2 könnte neben der Synthese von Tryptophan diese Reaktion(en) zusätzlich katalysiert haben. Nach der Aufspaltung könnte TrpB1 die Fähigkeit zur Assoziation mit TrpA entwickelt und die anderen Funktionen verloren haben. TrpB2 könnte diese Funktion weiter ausüben, ohne die Fähigkeit der Synthese von Tryptophan eingebüßt zu haben. Ein analoger Fall wurde kürzlich für das Enzympaar Homospermidin Synthase und Deoxyhypusin Synthase aus der Pflanze *Senecio vernalis* berichtet (Ober und Hartmann, 1999).

Hier wurde für die Pflanze ein Selektionsvorteil durch die Eröffnung eines sekundären Stoffwechselweges ermöglicht. Ob tmTrpB2 für *Thermotoga maritima* für die Tryptophanbiosynthese zwingend notwendig ist, kann bezweifelt werden. Jedoch könnte das Protein eine andere Funktion im Stoffwechsel spielen, die dem Organismus einen entscheidenden Vorteil für sein Überleben nahe dem Siedepunkt von Wasser gibt. Mögliche Funktionen von tmTrpB2 sind in Abbildung 35 skizziert.



**Abbildung 35: Mögliche Funktionen des TrpB2 Proteins in *Thermotoga maritima*.**

① Im  $[(tmTrpA\cdot tmTrpB1)]_2$ -Komplex wird IGP an TrpA in Indol und Glycerinaldehyd 3-phosphat gespalten. Das Indol gelangt durch einen hydrophoben Tunnel zum aktiven Zentrum von TrpB1, wo es mit Serin zu Tryptophan kondensiert. ②a Bei den hohen physiologischen Temperaturen von *T. maritima* könnte Indol aus dem Tunnel entweichen. ②b Indol könnte auch mit Wasser als katalysierendem Agens aus dem Zerfall von IGP bei hohen Temperaturen entstehen. ② Aus dem Tunnel diffundiertes bzw. durch IGP-Zerfall entstehendes Indol könnte durch TrpB2 „aufgefangen“ werden und mit Serin zu Tryptophan umgesetzt werden. Anderenfalls würde es über die Cytoplasmamembran aus der Zelle diffundieren. ③ TrpB2 könnte als Tryptophanase wirken oder andere, vor allem bei hohen Temperaturen vorteilhafte Reaktionen katalysieren.

#### **4.1.15 Ausblick**

Die physiologische Funktion von tmTrpB2 konnte bisher nicht geklärt werden. Als ein erster Ansatz zur Untersuchung dieser Frage ist ein Vergleich der Expressionsmuster von *tmtrpB1* und *tmtrpB2* in Abhängigkeit von unterschiedlichen Wachstumstemperaturen von *T. maritima* geplant. Besonders vielversprechend wäre die Untersuchung der Auswirkung von Deletionen des *tmtrpB1*- bzw. des *tmtrpB2*-Gens auf das Wachstum von *T. maritima*. Die Herstellung solcher Defizienzstämmen ist jedoch leider bisher aus technischen Gründen nicht möglich. Zur Untersuchung möglicher Funktionen außerhalb der Tryptophanbiosynthese sollen zunächst die Tryptophanaseaktivitäten von tmTrpB1 und tmTrpB2 bei 80 °C gemessen und verglichen werden. Weitere Untersuchungen *in vitro* sollen Aufschluss darüber geben, warum tmTrpB1 einen Komplex mit tmTrpA bildet, tmTrpB2 jedoch nicht. Zu diesem Zweck sollen der [(tmTrpA·tmTrpB1)<sub>2</sub>]-Komplex sowie die isolierten tmTrpB1- und tmTrpB2-Enzyme kristallisiert und ihre Röntgenstruktur aufgeklärt werden.

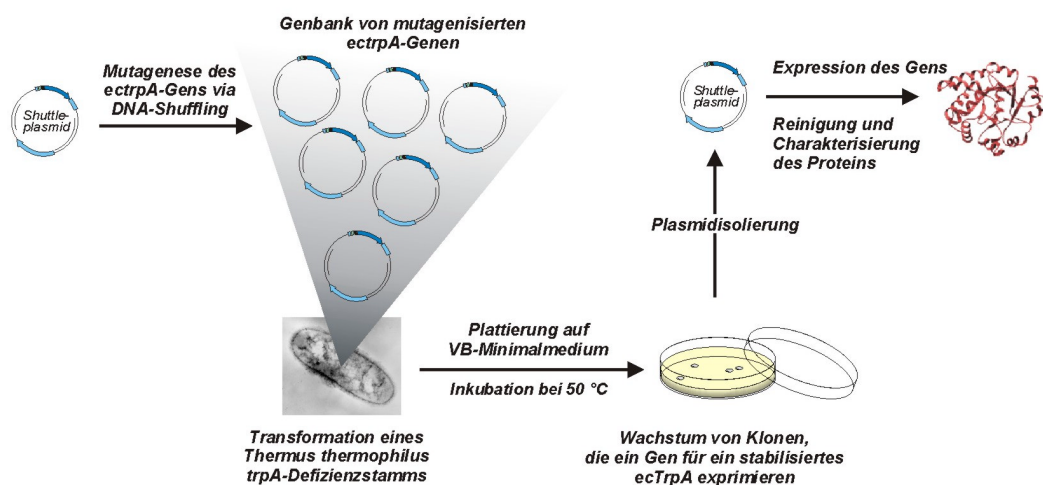


## 4.2 Stabilisierung von TrpA aus *E. coli*

Ein zentrales Problem der Biochemie ist die Aufklärung der strukturellen Grundlagen der Stabilität von Proteinen. Der Vergleich von thermolabilen Proteinen aus mesophilen Organismen mit thermostabilen Proteinen aus (hyper-)thermophilen Organismen sollte Einsichten in dieses Problem ermöglichen. Es fällt allerdings oft schwer, eindeutige Schlussfolgerungen aus solchen Vergleichen zu ziehen, da sich die Aminosäuresequenzen der verglichenen Proteine an sehr vielen Positionen unterscheiden und im Prinzip einige wenige zusätzliche elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen ausreichen, um ein Protein signifikant zu stabilisieren (Jaenicke und Böhm, 1998). Der Vergleich der Röntgenstrukturen einer Reihe von Paaren aus homologen thermolabilen und thermostabilen Proteinen legte den Schluss nahe, dass diese zusätzlichen Wechselwirkungen auf allen Ebenen auftreten können, beginnend von der Aminosäuresequenz über die Sekundär- und Tertiärstruktur bis hin zur Quartärstruktur oligomerer Proteine (Jaenicke und Böhm, 2001). Verschiedene thermostabile Proteine zeigten dabei im Vergleich zu ihren thermolabilen Gegenstücken unter anderem eine Reduktion der Anzahl thermolabiler Aminosäuren wie Glutamin und Asparagin, einen erhöhten Anteil an Prolinen in Loops, eine zusätzliche Anzahl von Wasserstoffbrücken, eine erhöhte Anzahl von Salzbrücken und Salzbrückenclustern, erhöhte Anteile an  $\alpha$ -Helices, die Reduktion der Zahl und Größe von Kavitäten im Proteininneren, die Verkürzung Lösungsmittel-exponierter Loops, eine höhere Packungsdichte der Aminosäuren, stärkere Bindung von Metallen und einen erhöhten Oligomerisierungszustand (Vielle und Zeikus, 2001; Sterner und Liebl, 2001). Der systematische Vergleich von dreidimensionalen Strukturen aus Proteindatenbanken (Szilagyi und Zavodsky, 2000; Kumar *et al.*, 2000) und von aus Genomsequenzierungen abgeleiteten Aminosäuresequenzen (Haney *et al.*, 1999; Cambillau und Claverie, 2000; Charkravarty und Varadarajan, 2000) führte zu dem Schluss, dass die Optimierung elektrostatischer Wechselwirkungen zur Stabilisierung sehr vieler (hyper-)thermophiler Proteine beiträgt (Pace *et al.*, 2000; Sanchez-Ruiz und Makhatadze, 2001). Darüber hinaus scheint sich aber die relative Bedeutung der

verschiedenen stabilisierenden Wechselwirkungen von Protein zu Protein zu unterscheiden. Dies macht es schwierig, Proteine durch „rationales Design“ zu stabilisieren und es gibt bisher auch nur wenige erfolgreiche Beispiele dafür (van den Burg *et al.*, 1998; Malakauskas und Mayo, 1998). Ein alternativer Ansatz zur Verbesserung der Thermostabilität ist die gerichtete molekulare Evolution (Arnold, 2001). Dabei wird der natürliche Evolutionsprozess imitiert, indem eine gewünschte Eigenschaft durch mehrere Runden von Zufallsmutagenese und Selektion (oder Screening) verbessert wird. Ein Vorteil dieser Methode im Vergleich zum rationalen Design besteht darin, dass eine genaue Kenntnis der dreidimensionalen Struktur und/oder des Katalysemechanismus zur gezielten Verbesserung enzymatischer Eigenschaften nicht notwendig ist. Neben der Veränderung der Substratspezifität von Enzymen (Petrounia und Arnold, 2000; Jürgens *et al.*, 2000), der Verbesserung ihrer katalytischen Aktivität (Wintrode *et al.*, 2000), der Erhöhung ihrer Stabilität in organischen Lösungsmitteln (Moore und Arnold, 1996), gelang durch gerichtete Evolution auch schon die Erhöhung der Thermostabilität von Enzymen (Wintrode und Arnold, 2000; Arnold *et al.*, 2001). Besonders geeignet zur Stabilisierung thermolabiler Enzyme mittels gerichteter Evolution ist das extrem thermophile Bakterium *Thermus thermophilus*, da es eine hohe natürliche Tendenz zur Aufnahme von Fremd-DNA aus dem Medium besitzt und genetisch manipuliert werden kann (Koyama *et al.*, 1986; Tamakoshi *et al.*, 1997). Diese Eigenschaften machten sich Akanuma *et al.* (1998) zunutze und integrierten das *bsleuB* Gen für die thermolabile Isopropylmalat Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* in das Genom eines *T. thermophilus* Stammes, dessen intrinsisches *leuB* Gen deletiert worden war. Nach Ausplattieren der Zellen auf Selektivmedium und schrittweiser Erhöhung der Inkubationstemperatur konnten *bsLeuB*-Varianten isoliert werden, deren Thermostabilität sich durch Spontanmutationen deutlich erhöht hatte. In der vorliegenden Arbeit sollte ein ähnlicher Ansatz zur Stabilisierung der  $\alpha$ -Untereinheit der Tryptophansynthase aus *E. coli* (*ecTrpA*) führen. Allerdings sollte hier das *ectrpA* Gen nicht in das *T. thermophilus* Genom integriert werden. Stattdessen sollte durch Zufallsmutagenese *in vitro* mittels DNA-Shuffling (Stemmer, 1994a, 1994b) ein *ectrpA*-Genrepertoire erzeugt und in ein *E. coli-T. thermophilus* Shuttle-

Plasmid kloniert werden. Mit dieser Genbank sollte ein *T. thermophilus trpA*-Defizienz Stamm transformiert und durch Inkubation bei hohen Temperaturen auf Tryptophan-freiem Medium auf stabilisierte ecTrpA-Proteine selektiert werden. Zur Klärung der strukturellen Grundlagen der Stabilisierung sollten die selektierten ecTrpA-Varianten anschließend in großen Mengen in *E. coli* hergestellt, gereinigt und *in vitro* charakterisiert werden (Abbildung 36). Hierzu wurde zunächst das Shuttleplasmid pYK109 (Koyama *et al.*, 1990), das sowohl in *E. coli* als auch in *T. thermophilus* replizierbar ist, verwendet.



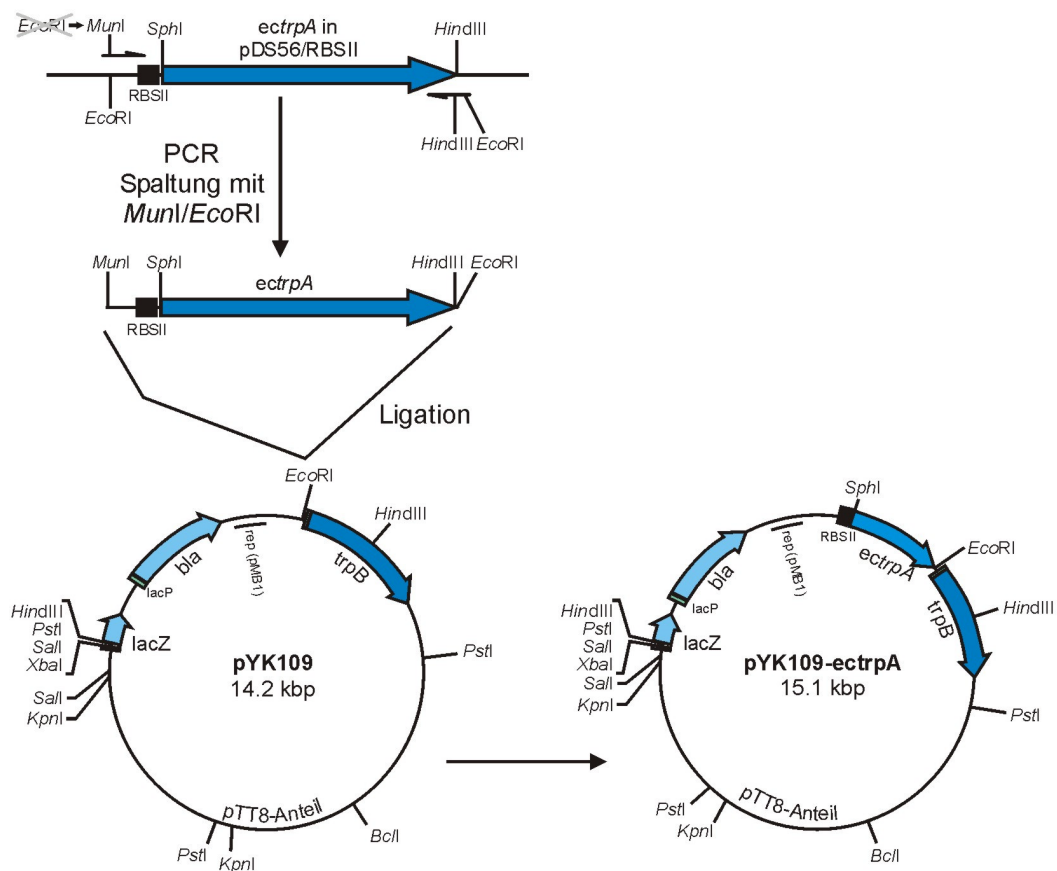
**Abbildung 36: Strategie zur Stabilisierung von ecTrpA durch gerichtete Evolution.**

Durch Zufallsmutagenese via DNA-Shuffling und Klonierung in ein *E. coli-T. thermophilus* Shuttleplasmid wird eine Genbank an *ectrpA*-Varianten erzeugt. Anschließend wird ein *T. thermophilus trpA*-Defizienzstammes mit der Genbank transformiert und auf Minimalmedium plattiert. Nach Inkubation bei 50 °C wachsen nur Klone mit solchen Genen, die für ein stabilisiertes ecTrpA-Protein kodieren. Diese Gene sollen in *E. coli* überexprimiert und das Proteinprodukt gereinigt und charakterisiert werden. Elektronenmikroskopische Aufnahme von *T. thermophilus* mit freundl. Genehmigung v. T. Hartsch, Göttingen Genomics Laboratory.

#### 4.2.1 Klonierung des *ectrpA* Gens in pYK109

Zur Klonierung des *trpA* Gens aus *Escherichia coli* in pYK109 wurde eine PCR-Reaktion mit den Primern 5' pDSEco-Mun und 3' pDSHindEco durchgeführt. Als Templat diente ein pDS56/RBSII-Vektor, in dem bereits das *ectrpA* Gen über die Restriktionsschnittstellen *SphI* und *HindIII* einkloniert war (Kap. 3.1.2.3). Mit Hilfe dieser PCR wurde ein Fragment amplifiziert, das die Ribosomenbindestelle des pDS56/RBSII enthielt und gleichzeitig eine *EcoRI*-Schnittstelle, die sich an der 5' Seite der Ribosomenbindestelle befindet, in eine *MunI*-Schnittstelle überführt. Weiterhin wurde am 3' Ende des Gens eine *EcoRI*-Schnittstelle eingeführt.

Das Amplifikationsprodukt wurde mit *EcoRI* und *MunI* gespalten und in die *EcoRI*-Schnittstelle von pYK109 kloniert (Abbildung 37). Hierdurch wird die Schnittstelle auf der *MunI* Seite zerstört. Die erhaltenen Klone wurden sequenziert (Primer 5' pYK109 und 3' pYK109), um die Orientierung des *ectrpA* Gens im Vektor festzustellen. Da das *ectrpA* Gen in diesem Konstrukt keinen eigenen Promotor besitzt, wurde für die weiteren Arbeiten ein Klon verwendet, bei dem seine Expressionsrichtung der des 5' liegenden Gens für die  $\beta$ -Laktamase (*bla*) entsprach (Abbildung 37).



**Abbildung 37: Klonierungsschema zur Erzeugung des Vektors pYK109-ectrpA.**

**RBSII:** synthetische Ribosomenbindungsstelle aus pDS56/RBSII; **lacZ:**  $\beta$ -Galaktosidasegen; **bla:**  $\beta$ -Laktamasegen; **lacP:** Lac-Promotor; **rep(pMB1):** Replikationsursprung für *E. coli*; **trpB:** *trpB*-Gen aus *Thermus T2*; **ectrpA:** Gen für TrpA aus *E. coli*.

In diesem Konstrukt erfolgt die Transkription von *ectrpA* in einer polycistronischen mRNA, ausgehend vom *lac*-Promotor, und seine Translation ausgehend von der aus pDS56/RBSII stammenden Ribosomenbindungsstelle.

In dieses Konstrukt (pYK109-ectrpA) wurde über die *SphI*- und *EcoRI* Schnittstellen ein 350 bp DNA-Fragment des Phagen  $\lambda$  (Position 39168 – 39418) kloniert. Der so erhaltene „Hilfs“-Vektor (pYK109AVC) sollte dazu benutzt werden, um bei der Klonierung von trpA-Varianten den Erfolg der Ligation über die Größe des Inserts abschätzen zu können.

#### **4.2.2 Klonierung des *tttrpA* Gens in pYK109**

Zur Klonierung des *trpA* Gens aus *Thermus thermophilus* wurde eine PCR-Reaktion mit den Primern 5' tTSaSphI und 3' tTSaEco und genomischer *T. thermophilus* DNA als Templat durchgeführt. Das erhaltene Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *SphI* und *EcoRI* gespalten und in pYK109AVC kloniert. Dieses Konstrukt, pYK109-tttrpA diente in Komplementationsexperimenten als Positivkontrolle.

#### **4.2.3 Komplementationstests**

Das für das Auffinden von thermostabilisierten ecTrpA-Varianten aufzubauende Selektionssystem musste folgenden Anforderungen genügen:

1. Es musste gewährleistet sein, dass die  $\alpha$ -Untereinheit der Tryptophansynthase aus *E. coli* (ecTrpA) einen funktionsfähigen Komplex mit der  $\beta$ -Untereinheit der Tryptophansynthase aus *T. thermophilus* (ttTrpB) bildet. Im nativen  $\alpha\beta\alpha$ -Tryptophansynthase Komplex wird das von der  $\alpha$ -Untereinheit gebildete hydrophobe Indol durch einen Tunnel zum aktiven Zentrum der  $\beta$ -Untereinheit transportiert und kommt somit nicht mit dem Lösungsmittel in Berührung (Hyde *et al.*, 1988). Wird kein Komplex zwischen ecTrpA und ttTrpB gebildet, droht Indol durch Diffusion über die Cytoplasmamembran verloren zu gehen.

Zur Überprüfung dieser Frage wurde ein *E. coli* *trpAB*-Defizienzstamm mit dem Konstrukt pYK109-ectrpA transformiert und auf VB-Minimalmedium ohne Tryptophan plattiert. Da auf dem Plasmid neben dem klonierten *ectrpA* Gen zusätzlich das *trpB* Gen aus *Thermus* T2 vorliegt (Abbildung 37), zeigt Koloniewachstum die Bildung einer funktionalen Tryptophan Synthase aus ecTrpA und ttTrpB an.

Tatsächlich zeigte sich nach 2-tägiger Inkubation bei 37 °C eine Komplementation der *trpAB* Defizienz. Eine Kontrolle, bei der der Defizienstamm mit dem Konstrukt pYK109-*ttrpA* transformiert und auf VB-Minimalmedium ohne Tryptophan bei 37 °C inkubiert wurde, erbrachte ebenfalls nach zwei Tagen Koloniewachstum. Kombiniert man TrpA und TrpB aus *E. coli* und *T. maritima*, dann bildet sich ebenfalls eine funktionsfähige Tryptophan Synthase (Hentzelt, 1999).

2. Wildtyp ecTrpA darf bei den zur Selektion in *Thermus thermophilus* angestrebten Temperaturen den *trpA* Phänotyp nicht komplementieren. Die niedrigste Temperatur, bei der *Thermus thermophilus* kultivierbar ist, liegt bei etwa 50 °C, die Obergrenze des Wachstums bei etwa 82 °C (Oshima und Imahori, 1974). Zur Überprüfung der genannten Voraussetzung wurde der *Thermus trpA* Defizienstamm mit dem Konstrukt pYK109-*ectrpA* transformiert und auf *Thermus* Minimalmedium (TMM) plattiert. Es zeigte sich weder bei Inkubation bei 50 °C noch bei Inkubation bei höheren Temperaturen eine Komplementation der Defizienz des *trpA* Phänotyps. Wurde der *T. thermophilus trpA* Defizienstamm hingegen mit dem Konstrukt pYK109-*ttrpA* transformiert, zeigte sich bei 50 °C eine Komplementation nach 3 – 4 Tagen, bei 60 °C nach 2 – 3 Tagen und bei 72 °C nach 1 - 2 Tagen Inkubation auf Minimalmedium. Dies lässt darauf schließen, dass das erstellte pYK109-Konstrukt (Abbildung 37) die Expression von *ttrpA* und damit auch *ectrpA* ermöglicht.

3. Die Transformationseffizienz von *T. thermophilus* muss hoch genug sein, um eine große Anzahl von ecTrpA-Varianten auf erhöhte Stabilität testen zu können. Generell wurden bei Verwendung von Plasmid-DNA, die aus *E. coli* isoliert worden war (pYK109-*ectrpA*), bei Einsatz von 1 µg DNA ca.  $5 \cdot 10^3$  -  $10^4$  Transformanten erhalten. Kam die DNA jedoch aus *Thermus thermophilus* (pYK109 von Y. Koyama), so konnten bis zu  $10^6$  Transformanten erreicht werden. Dies könnte an unterschiedlichen DNA-Methylierungssystemen in *E. coli* und *T. thermophilus* liegen. Für *T. thermophilus* liegen allerdings noch keine dahingehenden Untersuchungen in der Literatur vor.

#### **4.2.4 Klonierung eines starken *Thermus thermophilus* Promotors**

Trotz der Ergebnisse des Komplementationstests wurde 5'-seitig der *SphI*-Schnittstelle von pYK109 eine *Thermus*-spezifische Promotorsequenz eingeführt. Damit sollte eine erhöhte Expression der in pYK109 klonierten Gene erreicht werden und dies sollte zu einer größeren Produktion an ecTrpA-Protein in *T. thermophilus* führen, um auch schwach stabilisierte Varianten identifizieren zu können.

Zur Klonierung wurde das Promotorfragment P214 ausgewählt, das in einer systematischen Untersuchung die größte mRNA-Menge des *kat*-Gens erzeugte (Maseda und Hoshino, 1995). Mit Hilfe der Primer 5' pYK109promtth, der die Promotorsequenz und eine *MunI*-Schnittstelle für die Klonierung enthielt, und dem Primer 3' pYK109, der stromabwärts der *EcoRI* Schnittstelle des pYK109 bindet, wurde eine PCR durchgeführt. Dazu wurde der Vektor pYK109AVC als Templat verwendet. Das amplifizierte Fragment, welches neben dem *Thermus* Promotor auch die Ribosomenbindestelle aus pDS56/RBSII und das 350 bp lange  $\lambda$ -DNA Fragment enthält, wurde in die *EcoRI*-Site von pYK109 kloniert. Die Klonierung erwies sich jedoch als äußerst schwierig und nach Erhalt des gewünschten Konstrukts war es nicht mehr möglich, das  $\lambda$ -Fragment durch die Gene für ecTrpA oder ttTrpA zu ersetzen. Vielmehr wurde der Vektor instabil und nach Isolation aus *E. coli* schien der *Thermus* Anteil des Vektors verloren gegangen zu sein. An dieser Stelle musste auf weitere Klonierungen mit diesem Vektor verzichtet werden und es wurde auf ein neues, kleineres Shuttleplasmid übergegangen.

#### **4.2.5 Aufbau eines Selektionssystems mit dem Plasmid pMK18**

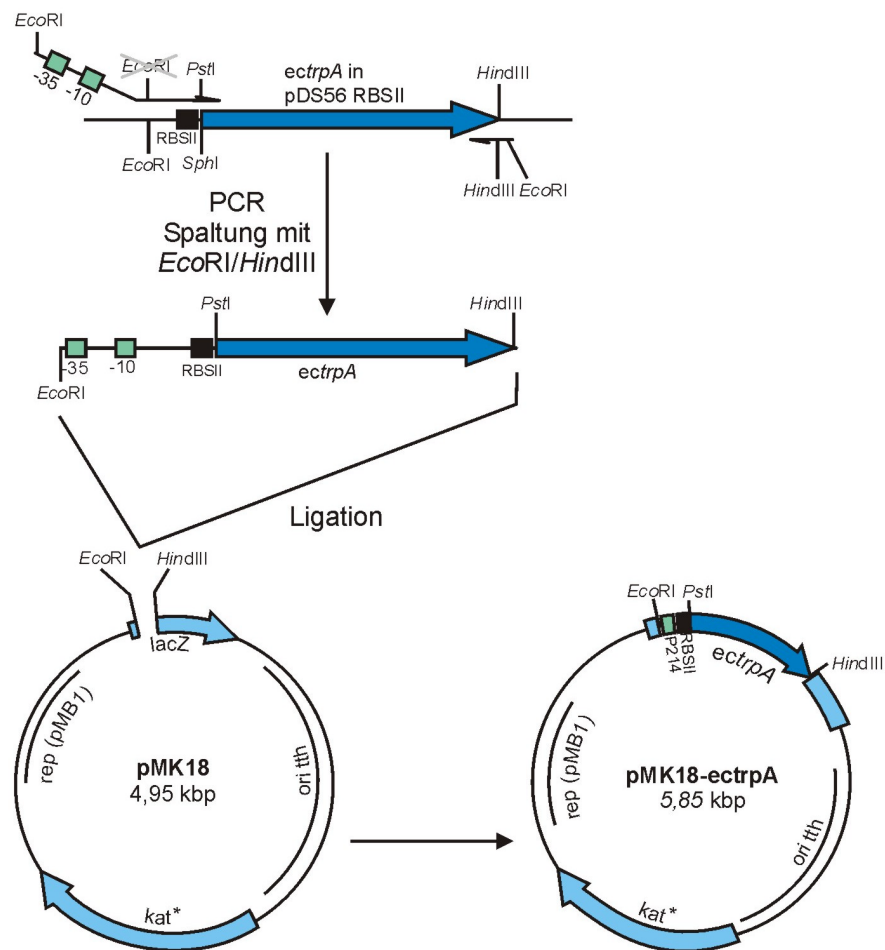
In de Grado *et al.* (1999) wird das Plasmid pMK18 beschrieben: Ein kleines 4,95 kbp *E. coli*-*T. thermophilus* Shuttleplasmid, das einen minimalen Replikationsursprung eines kryptischen *Thermus* Plasmids trägt (de Grado *et al.*, 1998) sowie den ColE1 ori aus pUC18. Als Selektionsmarker beinhaltet das Plasmid das Gen einer bis 70 °C stabilen Variante der Kanamycin Nukleotidyl Transferase (Liao *et al.*, 1986), das sowohl in *E. coli* als auch in *T. thermophilus* exprimiert wird und

eine Resistenz gegen Kanamycin (bis 30 µg/ml) vermittelt (Abbildung 7). Das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. J. Berenguer, Universität Madrid zur Verfügung gestellt und konnte in guter Ausbeute aus *E. coli* BMH71-18 Zellen isoliert werden.

Zur Erzeugung eines zur Selektion thermostabilisierter eTrpA-Varianten tauglichen pMK18 Plasmids wurde 5'-seitig des *ectrpA*-Gens ein *Thermus* Promotor kloniert (analog zu pYK109AV, Kap. 4.2.4).

Abbildung 38 zeigt das Klonierungsschema zur Konstruktion des Plasmids pMK18prom-*ectrpA*. Mittels PCR wurde mit dem Primerpaar 5' EcoRIpromtthRBSIIpStIeTsa und 3' pDSHindEco, sowie mit pDS-*etrpA* als Template ein 900 bp Fragment erzeugt. Dieses Fragment trägt am 5' Ende eine *EcoRI*-Schnittstelle, gefolgt vom *Thermus*-Promotorfragment P214, der RBS aus pDS56RBSII und einer *PstI*-Schnittstelle am Anfang des *ectrpA*-Gens. Am 3' Ende befindet sich eine *HindIII*-Schnittstelle, so dass das PCR-Produkt über *EcoRI/HindIII* kloniert werden konnte. Zur Vereinfachung der Klonierung von weiteren Genen der gleichen Größe wie das *ectrpA*-Gen wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *PstI* ein 367 bp *HindIII/PstI*-Fragment des *cat*-Gens kloniert. Der entstandene „Hilfs“-Vektor pMK18p-400 diente als Grundlage für die weiteren Klonierungen.





**Abbildung 38: Klonierungsschema zur Herstellung des Plasmids pMK18-ectrpA.**

**RBSII:** synthetische Ribosomenbindungsstelle aus pDS56/RBSII; **lacZ:**  $\beta$ -Galaktosidasegen; **kat\*:** Gen für stabilisierte Kanamycin Nukleotidyl Transferase; **rep(pMB1):** Replikationsursprung für *E. coli*; **ori tth:** Replikationsursprung für *T. thermophilus*; **grüne Boxen:** Promotorfragment 214 aus *T. thermophilus*. **ectrpA:** Gen für TrpA aus *E. coli*.

#### 4.2.6 Komplementationstests

Zur Überprüfung der Tauglichkeit des neuen Plasmidsystems wurden auch Komplementationstests in *Thermus thermophilus* durchgeführt (vgl. Kap. 4.2.3). Als Positivkontrolle für das Selektionssystem diente ttTrpA. Das *ttrpA*-Gen wurde mit Hilfe der Primer 5' tthTSaPstI und 3' tthTSaHindIII aus genomischer DNA amplifiziert, mit *PstI* und *HindIII* gespalten und in den ebenso gespaltenen Vektor pMK18p-400 ligiert.

Es zeigte sich wie erwartet eine Komplementation des *Thermus thermophilus trpA* Defizienzstamms durch das Konstrukt pMK18p-ttrpA nach 3-4-tägiger Inkubation bei 50 °C, während das Konstrukt pMK18p-ectrpA nicht in der Lage war, über

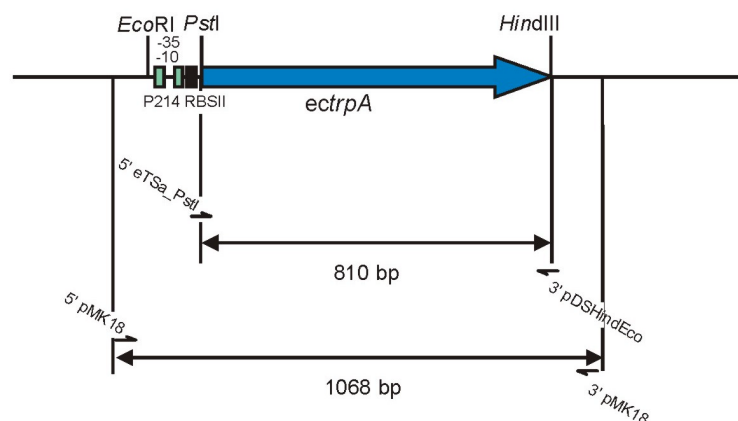
einen Zeitraum von 3 Wochen (bis zum Austrocknen der Platten) eine Komplementation herbeizuführen. Es wurden vergleichbare Transformationsraten wie mit den pYK109 Konstrukten erreicht (vgl. Kap. 4.2.3).

Die oben angeführten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das erstellte System für eine Selektion von stabilisierten Varianten des ecTrpA Proteins in *Thermus thermophilus* geeignet sein müsste, da die unter Kap. 4.2.3 aufgeführten Anforderungen erfüllt sind.

#### 4.2.7 Erzeugung eines Pools an mutagenisierten eTrpA Varianten.

Als Technik für die Zufallsmutagenese wurde in dieser Arbeit auf ein modifiziertes DNA-Shuffling nach Stemmer (1994a, 1994b) zurückgegriffen (Volkov und Arnold, 2000). Diese Methode schien besonders günstig für eine schrittweise Stabilisierung von ecTrpA Varianten zu sein, die *in vivo* in *Thermus thermophilus* selektiert werden sollten. DNA-Shuffling führt nämlich– ähnlich wie fehlerhafte PCR – Mutationen ein, von denen die vorteilhaften dann aber zusätzlich in weiteren Selektionsrunden miteinander kombiniert werden können. Das verwendete Protokoll ist in Kap. 3.2.2.11 zu finden.

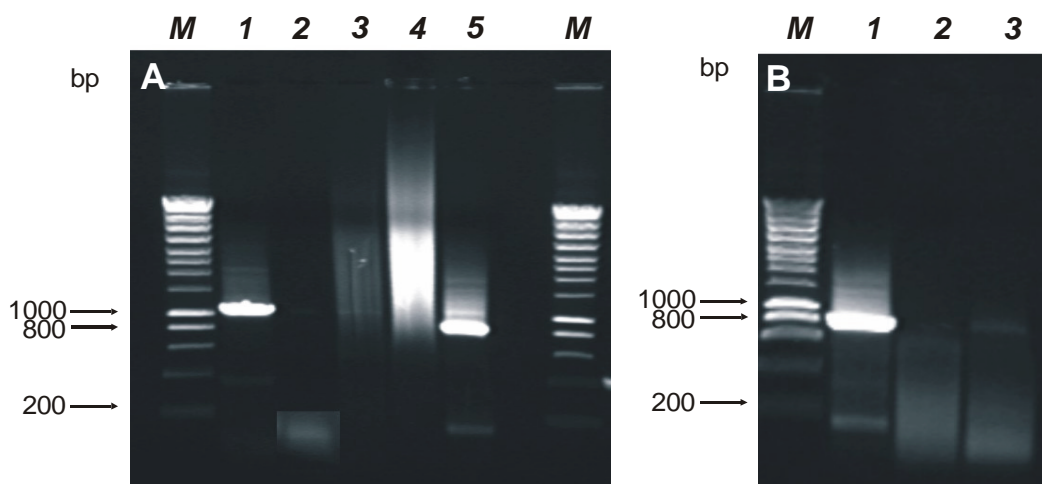
Als Ausgangsmaterial für das Shuffling diente das Plasmid pMK18p-ecTrpA. Für die erste PCR wurden die Primer 5' pMK18 und 3' pMK18 verwendet. Abbildung 39 zeigt die Lage dieser Primer im Vergleich zum plasmidständigen ecTrpA-Gen an.



**Abbildung 39: Schematische Darstellung der Hybridisierungsstellen der beim DNA-Shuffling verwendeten Primer in Bezug auf das ecTrpA-Gen im Plasmid pMK18-ecTrpA.**

Die Größen der aus der PCR-Reaktion resultierenden Fragmente sind angegeben. **ecTrpA**: Gen für TrpA aus *E. coli*; **RBSII**: synthetische Ribosomenbindungsstelle aus pDS56/RBSII; **P214**: Promotorfragment 214 aus *T. thermophilus*.

Abbildung 40A zeigt den Verlauf des DNA-Shufflings. Das 1068 bp lange Produkt der ersten PCR (Abbildung 40A, Spur 1) wurde dem limitierten DNaseI Verdau unterzogen. Die Dauer des Verdau wurde so gewählt, dass Fragmente zwischen 50 und 200 bp Länge erhalten wurden (Abbildung 40A, Spur 2). In der sich anschließenden Self primed PCR wurden die DNA-Fragmente wieder zu vollständigen *ectrpA*-Genen assembliert, die an unterschiedlichen Positionen Mutationen tragen. Das *ectrpA*-Genrepertoire ist als schwache Bande auf Höhe des Ursprungsfragments auszumachen (Abbildung 40A, Spur 3). In der finalen PCR wurde das Repertoire durch die innen liegenden Primer 5' eTsa\_PstI und 3' pDSHindEco effizient amplifiziert, um ausreichend Material für die anschließende Klonierung zu erhalten (Abbildung 40A, Spur 5). Die Verwendung von innenliegenden Primern („nested“ PCR, Volkov und Arnold, 2000) bei der finalen PCR hat sich als sehr vorteilhaft erwiesen, damit eine große Menge sauberen Produktes der gewünschten Größe erhalten wurde. Bei der (meist üblichen) Verwendung der außenliegenden Primer, die auch in der ersten PCR benutzt werden, wurde oftmals nur ein „Fragment-Schmier“ erhalten und die Ausbeute reichte für eine anschließende Klonierung nicht aus (Abbildung 40A, Spur 4).



**Abbildung 40: Überprüfung der durch DNA-Shuffling erhaltenen DNA-Fragmente via Agarosegelelektrophorese**

(1% Agarose). **Gel A:** **M:** smart ladder (Eurogentech); **1:** 1068 bp Produkt der ersten PCR; **2:** Fragmente aus dem DNaseI-Verdau (Spur ist im Bereich der Fragmente künstlich aufgeheilt); **3:** Produkt aus der Self primed PCR; **4:** Produkt aus der finalen PCR unter Verwendung der außenliegenden Primer; **5:** Produkt aus der finalen PCR unter Verwendung der innenliegenden Primer. **Gel B:** **M:** smart ladder; **1:** Produkt aus der finalen PCR unter Verwendung der innenliegenden Primer (vgl. Gel A, Spur 5); **2:** Kontrollreaktion ohne DNA-Templat; **3:** Kontrollreaktion mit Fragmenten aus dem DNaseI-Verdau als Templat.

In dem hier angewendeten Verfahren wurden die Produkte gewünschter Länge nach dem DNaseI-Partialverdau nicht aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Es bestand somit die Möglichkeit, dass geringe Anteile unverdauten und damit nicht-mutagenisierten *ectrpA*-Gens mitgeschleppt und im Weiteren effizient amplifiziert würden. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde eine PCR Reaktion mit den innenliegenden Primern durchgeführt, bei der als Templat das Produktgemisch des DNaseI-Verdau verwendet wurde. Das Produkt dieser PCR war eine kaum sichtbare Bande in Größe des *ectrpA*-Gens (Abbildung 40B, Spur 3). Die Produktbildung bei Verwendung der DNA aus der self-primed PCR als Templat ist ungleich stärker (Abbildung 40B, Spur 1). Ist kein Templat vorhanden, wird kein spezifisches Produkt erzeugt (Abbildung 40B, Spur 2). Das Ergebnis zeigt, dass die erzeugten Fragmente nach der DNaseI-Behandlung für die weitere Prozedur des DNA-Shufflings gut geeignet waren, da keine signifikante „Kontamination“ mit Wildtyp-*ectrpA* zu befürchten war.

#### **4.2.8 Herstellung einer Bank von *ectrpA*-Genvarianten in pMK18**

Zur Klonierung der mutagenisierten *ectrpA*-Varianten wurden der Vektor pMK18p-400 sowie das erhaltene PCR-Produkt aus der finalen PCR mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Hind*III gespalten und die Spaltprodukte über ein Agarosegel gereinigt. Für die anschließende Ligation wurden 400 ng pMK18 und 1000 ng PCR-Produkt mit 2 u Ligase in einem 20 µl Ansatz vereinigt. Um eine ausreichende Menge an Ligationsprodukt zu erhalten, wurden 5 parallele Ansätze durchgeführt. Damit wurden zunächst zur Erstellung einer „Primärbank“ jeweils 100 µl frisch hergestellte elektrokompente *E. coli* XL1-Zellen transformiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf eine 33 x 38 cm LB Agarplatte mit 30 µg/ml Kanamycin plattiert. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wuchsen ca.  $2 \cdot 10^5$  Kolonien heran. Durch eine parallele Transformation der XL1 blue Zellen mit pMK18p-*ectrpA* wurde eine Transformationseffizienz von ca.  $6,8 \cdot 10^8$  pro µg DNA ermittelt, d.h. alle korrekt ligierten Vektoren der *ectrpA*-Genbank müssten von einer Zelle aufgenommen worden sein. Von dieser Primärbank wurde von 20 Kolonien Plasmid-DNA isoliert und einer Restriktionsanalyse

mit *Pst*I und *Hind*III unterzogen. Es zeigte sich, dass 95 % aller Klone ein Insert richtiger Größe trugen. Die Größe der Bank wurde somit zu  $1,9 \cdot 10^5$  unabhängiger Klone abgeschätzt. Die plattierten Kolonien wurden von der Agarplatte abgeschabt und das Plasmidgemisch in präparativem Maßstab isoliert (Kap. 3.2.2.2).

#### **4.2.9 Ist die Größe der Bank ausreichend?**

Kuchner und Arnold (1997) beschreiben eine Formel, mit der sich die Anzahl an Kombinationen  $K$  bei Einführung von  $M$  Mutationen über  $N$  Positionen eines Gens berechnen lässt. Hierbei ist auch berücksichtigt, dass pro Position  $X$  Möglichkeiten für eine Veränderung der Sequenz gegeben sind:

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

**Gleichung 9: Berechnung der Größe einer Genbank.**

Nähere Erläuterungen s. Text.

Es schien günstig, nur einen Aminosäureaustausch pro *ecTrpA*-Variante zu erzeugen, da befürchtet wurde, dass zusätzliche Mutationen einen möglichen stabilisierenden Effekt eines Austauschs nivellieren könnten. Es musste daher eine entsprechende Mutationsrate angestrebt werden:

Die Wahrscheinlichkeit, durch Austausch einer Base an Position 1 eines Codons einen Aminosäureaustausch hervorzurufen, beträgt etwa 96 %, an Position 2 etwa 99 % und an Position 3 etwa 32%. Im Durchschnitt ergibt dies pro Einzelmutation in einem Codon also eine Wahrscheinlichkeit von etwa 75 %, dass ein Aminosäureaustausch hervorgerufen wird. Das bedeutet, dass mit 2 Nukleotidaustauschen pro Gen im Durchschnitt 1,5 Aminosäureaustausche pro Protein erzeugt werden.

Die Berechnung der möglichen Gen-Varianten ist bei drei Möglichkeiten des Austauschs eines Nukleotids (nämlich mit jeder der drei übrigen Basen) und zwei angestrebten Mutationen pro Gen folgendermaßen gegeben: Bei 807 bp (ohne Stop-Codon) für das *ectrpA*-Gen wären

$$K = 3^2 \cdot \left[ \frac{807!}{(807-2)! \cdot 2!} \right] = 2,9 \cdot 10^6$$

**Gleichung 10: Errechnung der Anzahl möglicher Varianten für das *etpA* Gen bei zwei Nukleotidaustauschen pro Gen.**

Nähere Erläuterungen s. Text.

Genvarianten gegeben. Dies bedeutet, dass die erzeugte Bank mit  $1,9 \cdot 10^5$  unabhängigen Klonen etwa 15-mal kleiner ist als die Anzahl an Genvarianten mit zwei Mutationen. Zudem sollte die Bank etwas überrepräsentiert sein, um mit einer hinreichenden Sicherheit alle Genvarianten unter den Klonen aufzufinden. Wird dies berücksichtigt, dann ergibt sich im vorliegenden Fall die anzustrebende Größe der Genbank *S* nach Moore *et al.* (1997) zu:

$$(1 - P)^S \leq 1 - \text{Konfidenz}$$

nach *S* aufgelöst:

$$\Leftrightarrow \log(1 - P)^S \leq \log(1 - \text{Konfidenz})$$

$$\Leftrightarrow S \cdot \log(1 - P) \leq (1 - \text{Konfidenz})$$

$$\Leftrightarrow S \geq \frac{\log(1 - \text{Konfidenz})}{\log(1 - P)}$$

**Gleichung 11: Errechnung der Mindestgröße der Genbank *S*, um mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit *P* alle Genvarianten der Selektion unterziehen zu können.**

Wobei *P* die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer bestimmten Varianten, also der Kehrwert der Anzahl der Kombinationen bei angenommener Gleichverteilung,  $1/K$  (aus Gleichung 9) ist.

Die Konfidenz ist die Sicherheit, mit der ein bestimmter Klon gefunden werden soll. Üblicherweise wird eine 95 %ige Sicherheit gewählt, also 0,95 in Gleichung 11 eingesetzt. Für das mutagenisierte *ectrpA* Gen ergibt sich also:

$$S \geq \frac{\log(1 - 0,95)}{\log\left(1 - \frac{1}{2,9 \cdot 10^6}\right)} \geq 8,7 \cdot 10^6,$$

**Gleichung 12: Berechnung der Mindestgröße der *ectrpA*-Genbank, um mit 95 %iger Sicherheit alle Genvarianten mit zwei Mutationen der Selektion unterziehen zu können.**

d.h. die Anzahl der Klone hätte mindestens diesen Betrag erreichen sollen. Da aber mit der Primärbank der Selektionsstamm, nämlich der *Thermus thermophilus* *trpA* Defizienzstamm transformiert werden sollte, reichte die tatsächliche Größe

der Bank mit  $1,9 \cdot 10^5$  aus. Hier ist nämlich der limitierende Faktor die Transformationseffizienz, die im Fall von *Thermus thermophilus* HB27 bei maximal  $10^4$  Transformanten bei Verwendung von 1  $\mu\text{g}$  aus *E. coli* stammender Plasmid DNA liegt (vgl. Kap. 4.2.3).

#### 4.2.10 Anzahl und Verteilung der Mutationen in der *ectrpa*-Genbank

Es war geplant, durch DNA-Shuffling 1 - 2 Mutationen pro Gen einzuführen. Zur Überprüfung der tatsächlichen Mutationsrate wurden 10 Klone der Primärbank vollständig sequenziert und mit der Wildtyp Sequenz von *ectrpa* verglichen. Es ergab sich folgendes Bild:

**Tabelle 13: Untersuchung der DNA-Sequenz von 10 Klonen der Primärbank.**

Nukleotidaustausche			
Transversionen	(9 Ereignisse)	Transitionen	(45 Ereignisse)
A $\rightarrow$ T	0	A $\rightarrow$ G	10
T $\rightarrow$ A	2	G $\rightarrow$ A	13
A $\rightarrow$ C	1	T $\rightarrow$ C	12
C $\rightarrow$ A	1	C $\rightarrow$ T	10
G $\rightarrow$ T	0		
T $\rightarrow$ G	2		
G $\rightarrow$ C	2		
C $\rightarrow$ G	1		
Frameshift	1		

Insgesamt wurden bei den 10 Klonen 54 Nukleotidaustausche festgestellt, d.h. im Durchschnitt pro Gen 5,4 Mutationen, wobei im Einzelfall zwischen 4 und 8 Mutationen auftraten. Deutlich ist eine Präferenz von Transitionereignissen (82%) gegenüber den Transversionsereignissen (18 %) auszumachen. Schaut man sich die Verteilung der Mutationen in den Sequenzen der 10 Klone an, so kann man eine leichte Präferenz der Mutationshäufigkeit im ersten und letzten Drittel des Gens ausmachen. Diese Präferenz ist jedoch nicht so stark ausgeprägt, als dass man bei der geringen Größe des Stichprobenumfanges von Signifikanz sprechen könnte. Die Mutationen führen zu durchschnittlich 3,3 Aminosäureaustauschen

pro Gen, im Einzelfall wurden zwischen 2 und 5 Austausche beobachtet. In Tabelle 14 sind Art und Häufigkeit der Aminosäureaustausche aufgeführt:

**Tabelle 14: Aminosäureaustausche von 10 Klonen der Primärbank**

Aminosäureaustausche			
A → V	3	P → S	1
A → G	1	P → L	3
C → STOP	1	Q → P	1
D → N	2	Q → STOP	1
F → L	1	Q → R	1
F → S	1	R → H	1
G → D	2	R → P	1
G → R	1	S → L	2
I → V	1	T → A	1
K → E	2	V → A	2
L → R	1	Y → H	1
N → D	1		

Die DNA- und Aminosäuresequenzen aller sequenzierten Klone finden sich im Anhang.

#### 4.2.11 Diskussion

Das DNA-Shuffling erwies sich als eine gute Methode, um eine Bank aus mutagenisierten *ectrpA* Genen herzustellen. Durch den Einsatz von innenliegenden Primern in der finalen PCR konnte dabei die Ausbeute an klonierbarem Fragment signifikant verbessert werden. Die Größe der in *E. coli* hergestellten Bank betrug zwar nur  $1,9 \cdot 10^5$  Klone. Limitierend für die spätere Selektion ist jedoch die relativ geringe Transformationseffizienz von *T. thermophilus*, weswegen die Herstellung einer größeren Bank die Erfolgsaussichten für das Experiment nicht vergrößert hätten.

Die Mutationsrate des DNA-Shufflings scheint mit 3,3 Aminosäureaustauschen pro 807 bp langem *ectrpA*-Gen etwas zu hoch zu liegen. Wünschenswert wären 1 bis 2 Austausche gewesen, um den Effekt stabilisierender Austausche nicht durch



destabilisierende Austausche im selben Protein ungewollt zu kompensieren (Arnold und Moore, 1997).

#### **4.2.12 Selektion in *Thermus thermophilus* von stabilisierten *ecTrpA*-Varianten**

Zur Selektion auf stabilisierte *ecTrpA*-Varianten wurde der *Thermus thermophilus* *trpA*-Defizienzstamm mit der *ectrpA*-Genbank transformiert. Dabei wurden in 40 parallel durchgeführten Transformationsansätzen jeweils 1 ml Zellen mit 1 µg Plasmid versetzt (Kap. 3.2.1.5). Nach der Transformationsprozedur wurden die Zellen dreimal in Minimalmedium gewaschen, um alle Nährstoffe des Transformationsmediums (TVM) zu entfernen und auf eine 33 x 38 cm Agarplatte mit *Thermus* Minimalmedium (TMM) ohne Tryptophan plattiert. Parallel dazu wurde zur Kontrolle der *T. thermophilus* *trpA*-Defizienzstamm mit ebenfalls 1 µg pMK18p-*trpA* transformiert, um eine Aussage über die theoretische Anzahl der Transformanten treffen zu können. Es zeigte sich nach 3-tägiger Inkubation bei 52 °C eine Komplementation der mit pMK18p-*trpA* transformierten Zellen, wobei ca. 5000 sichtbare Kolonien auftraten. Für die Bank ergab sich somit, auf die 40 Ansätze hochgerechnet, eine Anzahl von  $2 \cdot 10^5$  Transformanten, was der Größe der Primärbank entsprach. Jedoch konnte auch nach 6-wöchiger Inkubation bei 50 °C keine Kolonie auf der Selektionsplatte ausgemacht werden. Dies bedeutet, dass vermutlich kein Vertreter der *ectrpA*-Genbank für ein Protein kodiert, dessen Stabilität ausreicht, um die *trpA*-Defizienz des transformierten *T. thermophilus* Stammes bei 50 °C zu komplementieren.

#### **4.2.13 Diskussion**

Akanuma *et al.* (1998) beschrieben einen Ansatz zur Stabilisierung von Proteinen nach Integration des Gens für die thermolabile 3-isopropylmalat Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* in das *Thermus thermophilus* Genom. Dieser genetisch manipulierte Stamm wurde auf Minimalmedium plattiert und bei physiologischen Temperaturen von *T. thermophilus* inkubiert. Danach wurde auf spontane Mutationen im *bsleuB*-Gen gehofft, die zu einer Stabilisierung des Protein-

produkts und damit zur Komplementation führen sollten. Tatsächlich wurden nach 7-tägiger Inkubation bei 56 °C LeuB-Varianten erhalten, deren erhöhte Stabilität durch schrittweise Anhebung der Inkubationstemperatur bis auf 70 °C sukzessive weiter gesteigert wurde. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die Größe der Genbank nicht durch Ligations- und Transformationseffizienz, sondern nur durch die Anzahl an Zellen begrenzt wird, die plattiert werden können. Nachteil ist, dass keine Prämutagenese betrieben werden kann und somit auf Replikationsfehler gehofft werden muss. Schließlich können die Sequenzen der stabilisierten Varianten nur nach Isolierung von genomischer DNA, Amplifizierung des Gens und Klonierung erhalten werden.

Ein Ansatz, der dem in dieser Arbeit beschriebenen nahe kommt, wurde von Hoseki *et al.* (1999) beschrieben. Zur Stabilisierung der Kanamycin-Nukleotidyl-Transferase aus *Staphylococcus aureus* wurde das *sakat*-Gen durch DNA-Shuffling mutagenisiert und eine Genbank mit  $3,2 \cdot 10^5$ . Mit dieser Genbank wurde *T. thermophilus* HB27 transformiert, auf Platten mit Kanamycin plattiert und bei 64 °C inkubiert. In dieser ersten Runde wurden mehr als 400 Klone selektiert. Diese wurden in zwei weiteren Shuffling-Runden rekombiniert, wodurch eine Kanamycin-Nukleotidyl-Transferase mit 19 Aminosäureaustauschen selektiert werden konnte, die bis zur Wachstumsgrenze von *T. thermophilus* (82°C) stabil war. Das Beispiel zeigt, dass eine ähnlich große Genbank, wie sie für *ectrpA* erstellt worden ist, zu stabilisierten Varianten führen kann.

Beispiele aus der Literatur zeigen, dass unter Umständen sogar das Absuchen kleinerer Genbanken zum Auffinden stabilisierter Proteine ausreichte. Im Falle von Subtilisin E bzw. der p-Nitrobenzylesterase aus *Bacillus subtilis* sowie einer psychrophilen Subtilisin S41 Protease genügte dazu bereits das Screening von ca. 500 – 5000 Klonen (Zhao und Arnold, 1999; Giver *et al.*, 1998; Miyazaki *et al.*, 2000).

Eine zu kleine Größe der Genbank ist somit vermutlich nicht für die fehlgeschlagene Stabilisierung von *ecTrpA* verantwortlich. Die Ursache könnte eher in der unzureichenden Qualität der Bank liegen. Die Sequenzierung von 10 unselektierten Klonen ergab durchschnittlich 5,4 Basenaustausche pro Gen, was zu durchschnittlich 3,3 Austauschen pro Protein führte. Lim *et al.* (1992) führten

durch chemische Mutagenese in der N-terminalen Hälfte von ecTrpA an 49 verschiedenen Positionen Einzelaminosäureaustausche ein. Anschließend wurden die Aktivität und Stabilität von 29 dieser Varianten untersucht. Zwar hatten 40 % der Aminosäureaustausche keinen negativen Effekt auf die Stabilität des Proteins und einige erhöhten den Schmelzpunkt sogar beträchtlich. Jedoch wurde festgestellt, dass sämtliche Austausche in geordneten Sekundärstrukturelementen zu einer Abnahme der Stabilität führten. Da in ecTrpA 176 von 267 Aminosäuren (66 %) sich in  $\alpha$ -Helices bzw.  $\beta$ -Strängen befinden, beträgt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von ecTrpA-Varianten mit drei Aminosäureaustauschen, die alle in wenig geordneten Bereichen der Struktur liegen, nur 4 %. Es wäre deshalb günstiger gewesen, wenn es im Schnitt nur zu 1 bis 2 Aminosäureaustauschen gekommen wäre. Deshalb sollte in Zukunft im DNA-Shuffling eine Polymerase mit Proofreading Aktivität eingesetzt werden (Zhao und Arnold, 1997).

Betrachtet man den Schmelzpunkt von ecTrpA, der 59,5 °C beträgt (Lim *et al.*, 1992), dann hätte man erwarten können, dass das Wildtypprotein bei 50 °C zur Komplementation der *trpA*-Defizienz von *T. thermophilus* befähigt ist. Lim *et al.* (1991) fanden jedoch nach Expression der untersuchten *ectrpA*-Varianten bei 37 °C einen großen Anteil des Proteins in der unlöslichen Fraktion des Zellextraktes. Es wurde spekuliert, dass dies auf eine langsame Faltungsrates des Proteins in *E. coli* zurückzuführen ist, was zur Anreicherung aggregationsanfälliger Intermediate führen könnte. Eigene Untersuchungen bestätigten, dass die Expression von *ectrpA* bei 37 °C in *E. coli* zu unlöslichem Protein führt, während nach Expression bei 20 °C ecTrpA überwiegend in löslicher Form vorliegt. Daraus lässt sich folgern, dass ecTrpA in *T. thermophilus* bei 50 °C weitgehend in unlöslicher und damit inaktiver Form vorliegt und deshalb die *trpA*-Defizienz des *T. thermophilus* Defizienzstammes nicht komplementieren kann.

Für eine Komplementation in *Thermus* ist es unerlässlich, dass ecTrpA mit ttTrpB einen funktionalen Komplex bildet. Dies wurde in *E. coli* bei 37 °C über Komplementation eines *trpAB*-Defizienzstammes durch pYK109-*ectrpA* gezeigt (Kap. 4.2.3). Jedoch treten zwei Unsicherheiten auf. Zum einen kann die Interaktion zwischen ecTrpA und ttTrpB bei 50 °C stark gestört sein, so dass eine

Komplementation der *trpA*-Defizienz unmöglich wird. Insbesondere besteht die Gefahr, dass bei erhöhten Temperaturen an ecTrpA gebildetes Indol nicht an das aktive Zentrum von ttTrpB gelangt, sondern in Lösung freigesetzt wird und anschließend durch Diffusion über die Cytoplasmamembran verloren geht. Enzymkinetische Messungen bei 50 °C mit gereinigten ecTrpA und ttTrpB Proteinen könnten genauere Rückschlüsse über die Wechselwirkung im [(ecTrpA·ttTrpB)<sub>2</sub>]-Komplex ermöglichen. Der direkte Nachweis der Komplexbildung sollte am besten durch analytische Gelfiltration oder Ultrazentrifugation erbracht werden. Diese Techniken lassen sich jedoch in der Regel nur bis 40 °C anwenden, zur Untersuchung der Komplexbildung bei höheren Temperaturen würde sich deshalb am ehesten chemisches cross-linking eignen.

#### **4.2.14 Ausblick**

Alle Kontrollexperimente zeigen, dass in der vorliegenden Arbeit ein funktionsfähiges Selektionssystem zur Detektion stabilisierter ecTrpA-Varianten in *Thermus thermophilus* etabliert wurde. Dieses zeichnet sich aus durch eine einfache Handhabung mittels Standard-Klonierungstechniken in *E. coli* (Sambrook *et al.* 1989) und die Möglichkeit, erzeugte Genbanken mit ausreichender Effizienz in *T. thermophilus* einbringen zu können. Die Selektion bringt gegenüber Screeningverfahren einen enormen Zeitgewinn mit sich und stellt geringere Anforderungen an die technische Ausrüstung. Mögliche Gründe dafür, dass keine stabilisierten ecTrpA-Varianten identifiziert wurden, sind oben diskutiert worden. In jedem Fall scheint eine zu große Anforderung an das Selektionssystem gestellt worden zu sein, da neben einer Stabilisierung von ecTrpA auch eine funktionelle Interaktion mit ttTrpB sichergestellt sein musste. Es scheint erfolgversprechender, anstatt ecTrpA ein monomeres, thermolabiles Enzym zu stabilisieren. Durch das Genom-Sequenzierungsprojekt von *T. thermophilus* HB27 des Göttinger Genomanalyse Labors (G<sub>2</sub>L) wird die Konstruktion von entsprechenden Defizienzstämmen möglich werden. Bei Beginn dieser Arbeit stand lediglich der *trpA*-Defizienzstamm zur Verfügung

## 5 Literaturverzeichnis

- Akanuma, S., Yamagishi, A., Tanaka, N. und Oshima, T. (1998).** Serial increase in the thermal stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* by experimental evolution. *Protein Sci.* **7**: 698-705.
- Allen, M. J., Coutinho, P. M. und Ford, C. F. (1998).** Stabilization of *Aspergillus awamori* glucoamylase by proline substitution and combining stabilizing mutations. *Protein Eng.* **11**: 783-788.
- Anderson, K. S., Miles, E. W. und Johnson, K. A. (1991).** Serine modulates substrate channeling in tryptophan synthase. A novel intersubunit triggering mechanism. *J. Biol. Chem.* **266**: 8020-8033.
- Arnold, F. H. (2001).** Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* **409**: 253-257.
- Arnold, F. H. und Moore, J. C. (1997).** Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **58**: 1-14.
- Arnold, F. H., Wintrode, P. L., Miyazaki, K. und Gershenson, A. (2001).** How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 100-106.
- Banik, U., Zhu, D. M., Chock, P. B. und Miles, E. W. (1995).** The tryptophan synthase alpha 2 beta 2 complex: kinetic studies with a mutant enzyme (beta K87T) to provide evidence for allosteric activation by an aminoacrylate intermediate. *Biochemistry* **34**: 12704-12711.
- Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D. und Waley, S. G. (1975).** Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* **255**: 609-614.
- Beismann-Driemeyer, S. und Sterner, R. (2001).** Imidazole glycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima*. Quaternary structure, steady-state kinetics, and reaction mechanism of the bienzyme complex. *J. Biol. Chem.* **276**: 20387-20396.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248 – 254.
- Brzovic, P. S., Ngo, K. und Dunn, M. F. (1992).** Allosteric interactions coordinate catalytic activity between successive metabolic enzymes in the tryptophan synthase bienzyme complex. *Biochemistry* **31**: 3831-3839.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I., Haeuptle, M. T. und Dobberstein, B. (1987).** A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vitro* and *in vivo*. *Methods Enzymol.* **155**: 416 – 433.
- Cambillau, C. und Claverie, J. M. (2000).** Structural and genomic correlates of hyperthermostability. *J. Biol. Chem.* **275**: 32383-32386.
- Chakravarty, S. und Varadarajan, R. (2000).** Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. *FEBS Lett.* **470**: 65-69.

- 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. und Yanofski, C. (1966).** Association of the  $\alpha$  and  $\beta_2$  subunits of the tryptophan synthase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **241**: 980 – 990.
- Daniel, R. M. und Cowan, D. A. (2000).** Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 250 – 264.
- Darimont, B. und Sterner, R. (1994).** Sequence, assembly and evolution of a primordial ferredoxin from *Thermotoga maritima*. *EMBO J* **13**: 1772-1781.
- de Grado M., Castan P. und Berenguer J. (1999).** A high-transformation-efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus*. *Plasmid* **42**: 241 – 245.
- de Grado M., Lasa I. und Berenguer J. (1998).** Characterization of a plasmid replicative origin from an extreme thermophile. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**: 51-57
- Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127 – 6145.
- Eberhard, M. (1990).** A set of programs for analysis of kinetic and equilibrium data. *Comput. Appl. Biosci.* **6**: 213 – 221.
- Gershenson, A. und Arnold, F. H. (2000).** Enzyme stabilization by directed evolution. *Genet. Eng. (N Y)* **22**: 55-76.
- Giver, L., Gershenson, A., Freskgard, P. O. und Arnold, F. H. (1998).** Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12809-12813.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557 – 580.
- Haney, P. J., Stees, M. und Konisky, J. (1999).** Analysis of thermal stabilizing interactions in mesophilic and thermophilic adenylate kinases from the genus *Methanococcus*. *J. Biol. Chem.* **274**: 28453-28458.
- Henning, U., Helsinki, R., Chao, F. C. und Yanofski, C. (1962).** The A protein of the tryptophan synthase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **237**: 1523 – 1530.
- Hentzelt, S. (1999).** Thermostable tryptophan synthase from *Thermotoga maritima*: structure-function relationships of the multienzyme complex and its subunits. Inauguraldissertation der Universität zu Basel.
- Höcker, B., Jürgens, C., Wilmanns, M. und Sterner, R. (2001).** Stability, catalytic versatility and evolution of the (betaalpha)(8)-barrel fold. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 376-381.
- Hoseki, J., Yano, T., Koyama, Y., Kuramitsu, S und Kagamiyama, H. (1999).** Directed evolution of thermostable kanamycin-resistance gene: a convenient selection marker for *Thermus thermophilus*. *J Biochem (Tokyo)* **126**: 951-956.
- Huang, X., Holden, H. M. und Raushel, F. M. (2001).** Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 149 – 180.

- Huber, R. H., Langworthy, T. A., König, H., Thomm, M., Woese, C. R., Sleytr, U. B. und 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. und Davies, D. R. (1988).** Threedimensional structure of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **263**: 17857–17871.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23–28.
- Jaenicke, R. und Böhm, G. (2001).** Thermostability of proteins from *Thermotoga maritima*. *Methods Enzymol.* **334**: 438-469.
- Jaenicke, R. (2000).** Do ultrastable proteins from hyperthermophiles have high or low conformational rigidity? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 2962-2964
- Jaenicke, R. und Böhm, G. (1998).** The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**: 738-748.
- Jürgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M. und Sterner, R. (2000).** Directed evolution of a (beta alpha)<sub>8</sub>-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 9925-9930.
- Kawata, Y., Tsujimoto, N., Tani, S., Mizobata, T. und Tokushige, M. (1990).** Role of tryptophan 248 in the active site of tryptophanase from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**: 756-762.
- Kirschner, K., Lane, A. N. und Strasser, A. W. (1991).** Reciprocal communication between the lyase and synthase active sites of the tryptophan synthase bienzyme complex. *Biochemistry* **30**: 472-478.
- Kopetzki, E., Schumacher, G. und 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.
- Koyama, Y., Arikawa, Y. und Furukawa, K. (1990).** A plasmid vector for an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**: 97–101.
- Koyama, Y., Hoshino, T., Tomizuka, N. und Furukawa, K. (1986).** Genetic transformation of extreme thermophile *Thermus thermophilus* and other *Thermus* spp. *J. Bacteriol.* **166**: 338–340.
- Kuchner, O. und Arnold, F. H. (1997).** Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol.* **15**: 523-530.
- Kumar, S., Tsai, C. J. und Nussinov, R. (2000).** Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng.* **13**: 179-191.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lane, A. N. und Kirschner, K. (1983a).** The mechanism of binding of L-Serine to tryptophan synthase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **129**: 561–570.

- Lane, A. N. und Kirschner, K. (1983b).** The catalytic mechanism of tryptophan synthase from *Escherichia coli*: kinetics of the reaction of indole with the enzyme-L-serine complexes. *Eur. J. Biochem* **129**: 571 – 582.
- Lane, A. N. und Kirschner, K. (1991).** Mechanism of the physiological reaction catalyzed by tryptophan synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **30**: 479-484.
- Le Gouill, C., Parent, J-L., Rola-Pleszcynski, M. und Stankova, J. (1994).** Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Analyt. Biochem.* **219**: 164
- Leja, C. A., Woehl, E. U. und Dunn, M. F. (1995).** Allosteric linkages between beta-site covalent transformations and alpha-site activation and deactivation in the tryptophan synthase holoenzyme complex. *Biochemistry* **16**: 6552-6561
- Liao, H., McKenzie, T. und Hageman, R. (1986).** Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 576-580.
- Lim, W. K., Brouillette, C. und Hardman, J. K. (1992).** Thermal stabilities of mutant *Escherichia coli* tryptophan synthase alpha subunits. *Arch. Biochem. Biophys.* **292**: 34-41.
- Lim, W. K., Shin, H. J., Milton, D. L. und Hardman, J. K. (1991).** Relative activities and stabilities of mutant *Escherichia coli* tryptophan synthase alpha subunits. *J. Bacteriol.* **173**: 1886-1893.
- Malakauskas, S. M. und Mayo, S. L. (1998).** Design, structure and stability of a hyperthermophilic protein variant. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 470-475.
- Maseda, H. und Hoshino, T. (1995).** Screening and analysis of DNA fragments that show promoter activities in *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**: 127-134.
- Matchett, W. H. und DeMoss, J. A. (1975).** The subunit structure of tryptophan synthase from *Neurospora crassa*. *J Biol Chem.* **250**: 2941-2946.
- Merz, A., Knochel, T., Jansonius, J. N. und Kirschner, K. (1999).** The hyperthermostable indoleglycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima* is destabilized by mutational disruption of two solvent-exposed salt bridges. *J. Mol. Biol.* **288**: 753-763.
- Miles, E. W. (1991).** Structural basis for catalysis by tryptophan synthase. *Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol.* **64**: 93 – 173.
- Miles, E. W., McPhie, P. und Yutani, K. (1988).** Evidence that glutamic acid 49 of tryptophan synthase alpha subunit is a catalytic residue. Inactive mutant proteins substituted at position 49 bind ligands and transmit ligand-dependent to the beta subunit. *J. Biol. Chem.* **263**: 8611-8614.
- Miyazaki, K. und Arnold, F. H. (1999).** Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function. *J. Mol. Evol.* **49**: 716-720.
- Moore, J. C., Arnold, F. H. (1996).** Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nat. Biotechnol.* **14**: 458-467.



- Moore, J. C., Jin, H. M., Kuchner, O. und Arnold, F. H. (1997).** Strategies for the *in vitro* evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences. *J. Mol. Biol.* **272**: 336-347.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335 – 350.
- Nagata, S., Hyde, C. C. und 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.
- Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Nelson WC, Ketchum KA, McDonald L, Utterback TR, Malek JA, Linher KD, Garrett MM, Stewart AM, Cotton MD, Pratt MS, Phillips CA, Richardson D, Heidelberg J, Sutton GG, Fleischmann RD, Eisen JA, Fraser CM, et al. (1999).** Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**:323-329.
- Ober, D. und Hartmann, T. (1999).** Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14777-14782.
- Oshima T. und Imahori, K. (1974).** Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**: 102 – 111.
- Pace C. N., Alston, R. W., Shaw, K. L. (2000).** Charge-charge interactions influence the denatured state ensemble and contribute to protein stability. *Protein Sci.* **9**: 1395-1398.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. und Gray, T. (1995).** How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**: 2411 – 2423.
- Pace, N. R. (1997).** A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**: 734 – 740.
- Pappenberger, G., Schurig., H und 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.
- Petrounia, I. P. und Arnold, F. H. (2000).** Designed evolution of enzymatic properties. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 325-330.
- Priestle, J. P., Grutter, M. G., White, J. L., Vincent, M. G., Kania, M., Wilson, E., Jardetzky, T. S., Kirschner, K. und Jansonius, J. N. (1987).** Three-dimensional structure of the bifunctional enzyme N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase-indole-3-glycerol-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5690-5694.
- Rondard, P. und Bedouelle, H. (2000).** Mutational scanning of a hairpin loop in the tryptophan synthase beta-subunit implicated in allostery and substrate channeling. *Biol. Chem.* **381**: 1185-1193.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S. S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-Polymerase. *Science* **239**: 487 – 491.
- Sakamoto, T., Joern, J. M., Arisawa, A. und Arnold, F. H. (2001).** Laboratory evolution of toluene dioxygenase to accept 4-picoline as a substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3882-3887.
- Sambrook, J., Fritsch, E. E. und Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. *New York: Cold Spring Harbour.*
- Sanchez-Ruiz, J. M. und Makhatadze, G. I. (2001).** To charge or not to charge? *Trends Biotechnol.* **19**: 132-135.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chaindetermining inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463 – 5467.
- Schneider, T. R., Gerhardt, E., Lee, M., Liang, P. H., Anderson, K. S. und 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. und 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.
- Skrzynia, C., Binniger, D. M., Alspaugh, J. A. 2<sup>nd</sup> und Pukkila, P. J. (1989).** Molecular characterization of TRP1, a gene coding for tryptophan synthetase in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Gene* **81**: 73-82.
- Slatko, B. E. (1994).** Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Methods Mol. Biol.* **31**: 35 – 45.
- Stemmer, W. P. (1994a).** DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **25**: 10747-10751.
- Stemmer, W. P. (1994b).** Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-391.
- Sterner, R. und Liebl, W. (2001).** Thermophilic adaptation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **36**: 39-106.
- Sterner, R., Dahm, A., Darimont, B., Ivens, A., Liebl, W. und Kirschner, K. (1995).** (Beta alpha)8-barrel proteins of tryptophan biosynthesis in the hyperthermophile *Thermotoga maritima*. *EMBO J.* **14**: 4395 – 4404.
- Sterner, R., Kleeman, G. R., Szadkowski, H., Lustig, A., Hennig, M. und Kirschner, K. (1996).** Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer. *Protein Sci.* **5**: 2000 – 2008.
- Stetter, K. O. (1996).** Hyperthermophilic prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**: 149 – 158.
- Stüber, D., Matile, H. und Garotta, G. (1990).** System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, presentation of antibodies and structure-function analysis. *Orlando: Academic Press.*

- Studier, F. W. und 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. und Dubendorff, J. W. (1990).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60 – 89.
- Szilagyi, A. und Zavodszky, P. (2000).** Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure Fold. Des.* **8**: 493-504.
- Tamakoshi, M., Uchida, M., Tanabe, K., Fukuyama, S., Yamagishi, A. und Oshima, T. (1997).** A new *Thermus-Escherichia coli* shuttle integration vector system. *J. Bacteriol.* **179**: 4811-4814.
- Tang, X. F., Ezaki, S., Atomi, H. und Imanaka, T. (2000).** Biochemical analysis of a thermostable tryptophan synthase from a hyperthermophilic archaeon. *Eur. J. Biochem.* **267**: 6369-6377.
- Thoma, R., Hennig, M., Sterner, R. und Kirschner, K. (2000).** Structure and function of mutationally generated monomers of dimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from *Thermotoga maritima*. *Structure Fold. Des.* **8**: 265-276.
- Vallone, B., Miele, A. E., Vecchini, P. Chiancone, E. und Brunori, M. (1998).** Free energy of burying hydrophobic residues in the interface between protein subunits. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6103 – 6107.
- Van den Burg, B., Vriend, G., Veltman, O. R., Venema, G. und Eijsink, V. G. (1998).** Engineering an enzyme to resist boiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2056-2060.
- Vieille, C. und Zeikus, G. J. (2001).** Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 1-43.
- Vogel, H.J. und Bonner, D. M. (1956).** Acetylornitinase of *E. coli*: partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* **218**: 97 – 106.
- Volkov, A. A. und Arnold, F. H. (2000).** Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins. Section IV: Construction of hybrid molecules by DNA Shuffling and other methods. *Methods Enzymol.* **328**: 447 – 477.
- Wang, D., Ding, X. und Rather, P. N. (2001).** Indole can act as an extracellular signal in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 4210-4216.
- Weischet, W. O. und 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.
- Wierenga, R. K. (2001).** The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett.* **492**: 193-198.
- Wilmanns, M., Priestle, J. P., Niermann, T. und Jansonius JN. (1992).** Three-dimensional structure of the bifunctional enzyme phosphoribosylanthranilate isomerase: indoleglycerolphosphate synthase from *Escherichia coli* refined at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **223**: 477-507.
- Wintrode, P. L. und Arnold, F. H. (2000).** Temperature adaptation of enzymes: lessons from laboratory evolution. *Adv. Protein. Chem.* **55**: 161-225.

- Wintrode, P. L., Miyazaki, K. und Arnold, F. H. (2000).** Cold adaptation of a mesophilic subtilisin-like protease by laboratory evolution. *J. Biol. Chem.* **275**: 31635-31640.
- Woese, C. R., Kandler, O. und Wheelis, M. L. (1990).** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4576 – 4579.
- Wrba, A., Schweiger, A., Schultes, V., Jaenicke, R. und Zavodsky, P. (1990).** Extremely thermostable D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the eubacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* **29**: 7584-7592.
- Yamagata, Y., Ogasahara, K., Hioki, Y., Lee, S. J., Nakagawa, A., Nakamura, H., Ishida, M., Kuramitsu, S., und Yutani, K. (2000).** Entropic stabilization of the tryptophan synthase alpha-subunit from a hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. X-ray analysis and calorimetry. *J. Biol. Chem.* **276**: 1062-11071.
- Yanofski C. (1999).** Trp Operon. In “*The Encyclopedia of Molecular Biology*” (Thomas Creighton, Ed.) **Vol 4**: 2676 – 2689.
- Yutani, K., Ogasahara, K., Tsujita, T., Kanemoto, K., Matsumoto, M., Tanaka, S., Miyashita, T., Matsushiro, A., Sugino, Y. und 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.
- Zalkin, H. und Yanofski, C. (1982).** Yeast gene TRP5: structure, function, regulation. *J. Biol. Chem.* **257**: 1491-1500.
- Zhao, H. und Arnold, F. H. (1999).** Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Protein Eng.* **12**: 47-53.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

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

#### 6.1.1 Allgemeine Abkürzungen

---

A	Absorption, Adenosin
Å	Ångström ( $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$ )
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
$A_x$	Absorption bei der Wellenlänge x nm
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	löslicher Rohextrakt, Cytosin
ca.	circa
cm	Zentimeter
d	Schichtdicke
D	Dialysat
d. h .	das heißt
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminteraessigsäure
<i>et. al.</i>	und weitere (Autoren)
F	Verdünnungsfaktor
g	Gramm, Zentrifugalbeschleunigung
G	Guanosin
GAPDH	Glutamat Dehydrogenase
H	Überstand des Hitzeschritts
h	Stunde
IGP	Indol (3-yl) glyzerinphosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid
K	einkonzentriertes Protein, Kombinationen
Kana	Kanamycin
$k_{cat}$	Wechselzahl
$k_{cat}/K_M$	katalytische Effizienz
$K_M$	Michaelis-Konstante
KP	Kaliumphosphat Puffer
l	Liter

---

LB	Luria-Bertani (-Medium)
ln	natürlicher Logarithmus
log	decadischer Logarithmus
M	molar, Längenstandard, Anzahl Mutationen
mA	Milliampère
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPa	Megapascal
$M_R$	relatives Molekulargewicht
n	Anzahl der Nukleotide eines Primers
N	Positionen eines Gens
$NAD^+$	Nicotinamiddinukleotid
$NADH^+ + H^+$	reduziertes Nikotinamiddinukleotid
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
$OD_x$	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg, Anzahl zu erzeugender Klone
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV	Säulenvolumen
T	Temperatur, Thymidin
$T_A$	Annealing-Temperatur
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
$T_M$	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	Einheit
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VB	Vogel Bonner (-Medium)
vgl.	vergleiche
$v_{ini}$	Anfangsgeschwindigkeit
$v_{max}$	Maximalgeschwindigkeit
W	Watt

---

w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
X	Nukleotidposition, Anzahl der Möglichkeiten
z. B.	zum Beispiel
$\Omega$	Ohm
$\epsilon_x$	molarer Absorptionskoeffizient bei der Wellenlänge x
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar

---

### 6.1.2 Organismennamen

---

AERPE	<i>Aeropyrum pernix</i>
AQUAE	<i>Aquifex aeolicus</i>
ARCFU	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
BACST	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
BACSU	<i>Bacillus subtilis</i>
ECOLI	<i>Escherichia coli</i>
METJA	<i>Methanococcus janishii</i>
METTH	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
METTM	<i>Methanothermobacter marburgensis Stamm Marburg</i>
METVO	<i>Methanococcus voltae</i>
PYRAB	<i>Pyrococcus abyssii</i>
PYRHO	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
PYRKO	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
SALTY	<i>Salmonella typhimurium</i>
SULSO	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
THEMA	<i>Thermotoga maritima</i>
THETH	<i>Thermus thermophilus</i>

---

## 6.2 Steady-state enzymkinetische Parameter

**Tabelle 15: Steady-state enzymkinetische Parameter für die A-Reaktion der Tryptophan Synthase aus *T. maritima* bei verschiedenen Temperaturen**

Temp.		tmTrpA $\alpha$	tmTS $\alpha_2\beta_2$	Faktor $\alpha_2\beta_2/\alpha$	
30 °C	$k_{cat}$	(s <sup>-1</sup> )	0,0057	0,01	1,8
	$K_M$	(mM)	0,089	0,047	0,5
	$k_{cat}/K_M$	(mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0,064	0,21	3,3
40 °C	$k_{cat}$	(s <sup>-1</sup> )	0,015	0,05	3,3
	$K_M$	(mM)	0,19	0,063	0,3
	$k_{cat}/K_M$	(mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0,079	0,77	9,8
50 °C	$k_{cat}$	(s <sup>-1</sup> )	0,026	0,19	7,3
	$K_M$	(mM)	0,27	0,11	0,4
	$k_{cat}/K_M$	(mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0,096	1,76	18,4
60 °C	$k_{cat}$	(s <sup>-1</sup> )	0,052	0,52	10
	$K_M$	(mM)	0,65	0,11	0,2
	$k_{cat}/K_M$	(mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0,008	4,9	61,4
80 °C	$k_{cat}$	(s <sup>-1</sup> )	0,174	5,6	32,2
	$K_M$	(mM)	1,62	0,19	0,12
	(ex) $k_{cat}/K_M$	(mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0,107	28	262

**Reaktionsbedingungen:** 100 mM EPPS Puffer, pH 7,5 mit 180 mM KCl, 40  $\mu$ M PLP, 20 mM Arsenat, 6 mM NAD<sup>+</sup>; 50  $\mu$ g tmGAPDH. Für die Messung mit isoliertem tmTrpA wurden 7,66  $\mu$ M verwendet, für die Messung von (tmTrpA-tmTrpB)<sub>2</sub> 1,04  $\mu$ M aktive Zentren. Die Werte bei 80 °C wurden durch Extrapolation ermittelt.



**Tabelle 16: Steady-state enzymkinetische Parameter für die Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase aus *T. maritima* bei verschiedenen Temperaturen, gekoppelter TS-Test.**

Temperatur (°C)	$k_{\text{cat}}^{\text{IGP}}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{\text{M}}^{\text{IGP}}$ (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{IGP}}$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{cat}}^{\text{SER}}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{\text{M}}^{\text{SER}}$ (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{SER}}$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
30	0,11	0,01	10	0,105	0,876	0,12
35	0,17	0,013	14	-	-	-
40	0,26	0,007	35	0,21	0,446	0,47
45	0,34	0,009	30	-	-	-
50	0,52	0,005	95	0,46	0,379	1,32
55	0,70	0,007	100	-	-	-
60	-	-	-	1,16	0,165	7,04
60	1,10	0,013	90	1,14	0,390	2,92
80 ex	4,14	0,016	260	4,26	0,125	34

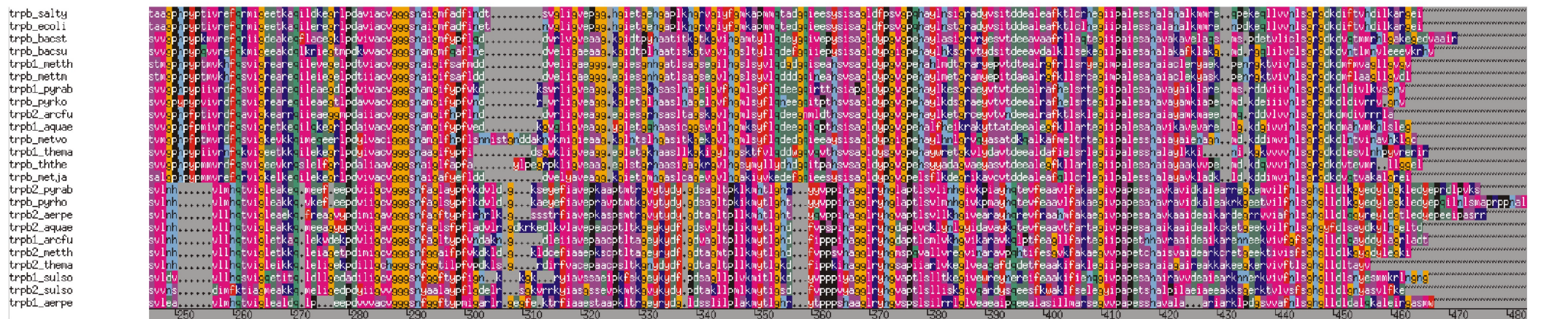
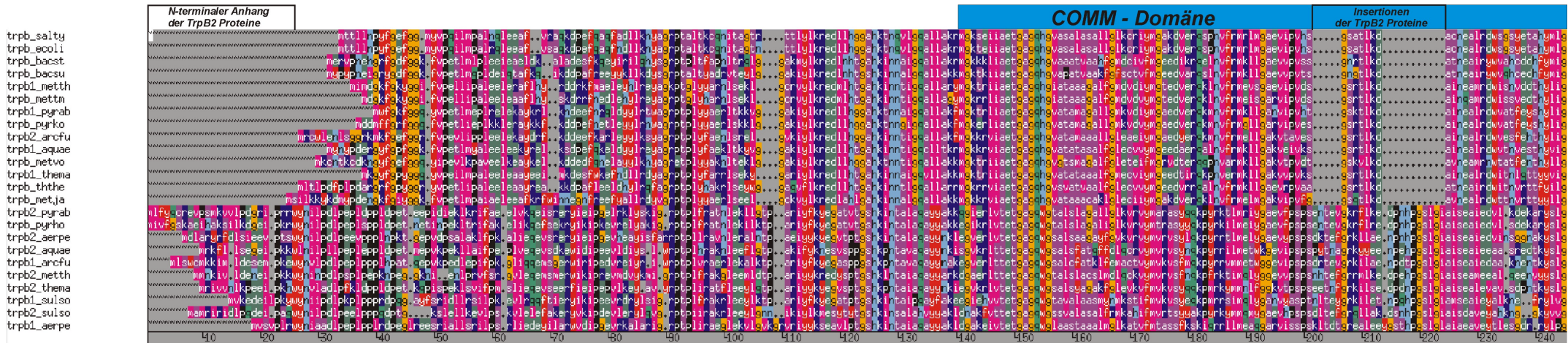
**Reaktionsbedingungen:** 100 mM EPPS-Puffer, pH 7,5 mit 180 mM KCl, 40 µM PLP, 6 mM NAD<sup>+</sup>, 20 mM Arsenat, 50 µg tmGAPDH. In der IGP-abhängigen Gesamtreaktion wurden 0,52 µM (tmTrpA-tmTrpB1)<sub>2</sub> (= 1,04 µM aktive Zentren von tmTrpA und tmTrpB1) verwendet, in der Serin-abhängigen Gesamteaktion 0,39 µM (= 0,79 µM aktive Zentren).

**Tabelle 17: Steady-state enzymkinetische Parameter für die Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase aus *T. maritima* bei verschiedenen Temperaturen, direkter TS-Test.**

Temperatur (°C)	$k_{\text{cat}}^{\text{IGP}}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{\text{M}}^{\text{IGP}}$ (µM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{IGP}}$ (µM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{cat}}^{\text{SER}}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{\text{M}}^{\text{SER}}$ (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{SER}}$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
30	-	-	-	0,23	1,192	0,19
40	-	-	-	0,26	0,685	0,39
50	-	-	-	0,84	0,993	0,85
60	1,09	0,035	30	1,35	0,825	1,61
80 ex	-	-	-	3,86	0,544	7,1

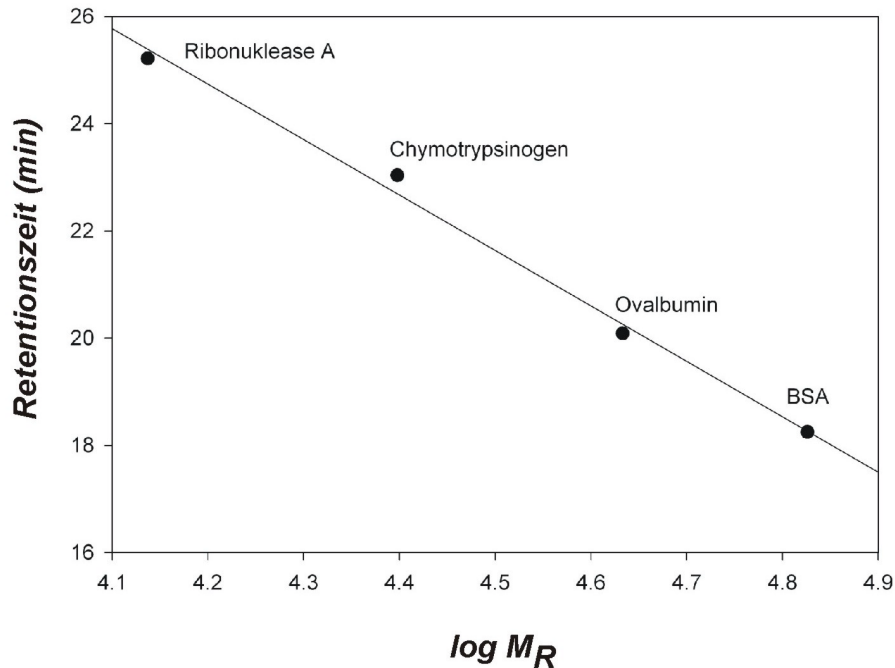
**Reaktionsbedingungen:** 100 mM EPPS-Puffer, pH 7,5 mit 180 mM KCl, 40 µM PLP. In der IGP-abhängigen Gesamtreaktion wurden 0,29 µM (tmTrpA-tmTrpB1)<sub>2</sub> (= 0,59 µM aktive Zentren von tmTrpA und tmTrpB1) verwendet, in der Serin-abhängigen Gesamteaktion 0,31 µM (= 0,82 µM aktive Zentren).

### 6.3 Alignment von TrpB-Sequenzen



Alignment erstellt mit der PILEUP Funktion des GCG Wisconsin Package

## 6.4 Kalibrierung der Superdex75-Gelfiltrationssäule



Gleichung der Regressionsgeraden:  

$$\log M_R = (\text{Retentionszeit} - 68,109) / -10,3298$$

**Abbildung 41: Kalibrierung der Superdex S75-Gelfiltrationssäule.**

Verschiedene Proteine wurden mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen und die Retentionszeiten bestimmt. Dargestellt ist die Auftragung des Logarithmus der Molekulargewichte ( $\log M_R$ ) gegen die Retentionszeit in min.

Protein	$M_R$	$\log(M_R)$	Retentionszeit (min)
BSA	67000	4,83	18,25
Ovalbumin	43000	4,63	20,09
Chymotrypsinogen	25000	4,40	23,04
Ribonuklease A	13700	4,14	25,22

Flussrate: 0,5 ml/min

## 6.5 DNA-Sequenzen der 10 sequenzierten Klone aus der pMK18p-ectrpA Genbank

	1				50
ectrpA_wt	atggaacgct	acgaatctct	gtttgccag	ttgaaggagc	gcaaagaagg
Genbank Klon1	ATGGAACGCT	ACGAATCTCT	GTTTGCCAG	TTGAAGGAGC	GCAAAGAAGG
Genbank Klon2	ATGGAACGCT	ACGAATCTCT	GTTTGCCAG	TTGAAGGAGC	GCAAAGAAGG
Genbank Klon3	ATGGAACGCT	ACGAATCTCT	GTTTGCCAG	TTGAAGGAGC	GCAAAGAAGG
Genbank Klon4	ATGGAACGCT	ACGAATCTCT	GTTTGCCAG	TTGAAGGAGC	GCAAAGAAGG
Genbank Klon5	ATGGAACGCT	ACGAATCTCT	GTTTGCCAG	TTGAAGGAGC	GCAAAGAAGG
Genbank Klon6	ATGGAACGCT	ACGAATCTCT	GTTTGCCAG	TTGAAGGAGC	GCAAAGAAGG
Genbank Klon7	ATGGAACGCT	ACGAATCTCT	GTTTGCCAG	TTGAAGGAGC	GCAAAGAAGG
Genbank Klon8	ATGGAACGCT	ACGAATCTCT	GTTTGCCAG	TTGAAGGAGC	GCAAAGAAGG
Genbank Klon9	ATGGAACGCT	ACGAATCTCT	GTTTGCCAG	TTGAAGGAGC	GCAAAGAAGG
Genbank Klon10	ATGGAACGCT	ACGAATCTCT	GTTTGCCAG	TTGAAGGAGC	GCAAAGAAGG
	51				100
ectrpA_wt	cgcatctggt	cctttcgta	cgctcgggta	tccgggcat	gagcagtc
Genbank Klon1	CGCATTTCGTT	CCTTTCGTA	CGCTCGGTA	TCCGGGCATT	GAGCAGTCAT
Genbank Klon2	CGCATTTCGTT	CCTTTCGTA	CGCTCGGTA	TCCGGGCATT	GAGCAGTCAT
Genbank Klon3	CGCATTTCGTT	CCTTTCGTA	CGCTCGGTA	TCCGGGCATT	GAGCAGTCAT
Genbank Klon4	CGCATTTCGTT	CCTTTCGTA	CGCTCGGTA	TCCGGGCATT	GAGCAGTCAT
Genbank Klon5	CGCATTTCGTT	CCTTTCGTA	CGCTCGGTA	TCCGGGCATT	GAGCAGTCAT
Genbank Klon6	CGCATTTCGTT	CCTTTCGTA	CGCTCGGTA	TCCGGGCATT	GAGCAGTCAT
Genbank Klon7	CGCATTTCGTT	CCTTTCGTA	CGCTCGGTA	TCCGGGCATT	GAGCAGTCAT
Genbank Klon8	CGCATTTCGTT	CCTTTCGTA	CGCTCGGTA	TCCGGGCATT	GAGCAGTCAT
Genbank Klon9	CGCATTTCGTT	CCTTTCGTA	CGCTCGGTA	TCCGGGCATT	GAGCAGTCAT
Genbank Klon10	CGCATTTCGTT	CCTTTCGTA	CGCTCGGTA	TCCGGGCATT	GAGCAGTCAT
	101				150
ectrpA_wt	tgaaaattat	cgatacgcta	attgaagccg	gtgctgacgc	gctggagtta
Genbank Klon1	TGAAAATTAT	CGATACGCTA	ATTGAAGCCG	GTGCTGACGC	GCTGGAGTTA
Genbank Klon2	TGAAAATTAT	CGATACGCTA	ATTGAAGCCG	GTGCTGACGC	GCTGGAGTTA
Genbank Klon3	TGAAAATTAT	CGATACGCTA	ATTGAAGCCG	GTGCTGACGC	GCTGGAGTTA
Genbank Klon4	TGAAAATTAT	CGATACGCTA	ATTGAAGCCG	GTGCTGACGC	GCTGGAGTTA
Genbank Klon5	TGAAAATTAT	CGATACGCTA	ATTGAAGCCG	GTGCTGACGC	GCTGGAGTTA
Genbank Klon6	TGAAAATTAT	CGATACGCTA	ATTGAAGCCG	GTGCTGACGC	GCTGGAGTTA
Genbank Klon7	TGAAAATTAT	CGATACGCTA	ATTGAAGCCG	GTGCTGACGC	GCTGGAGTTA
Genbank Klon8	TGAAAATTAT	CGATACGCTA	ATTGAAGCCG	GTGCTGACGC	GCTGGAGTTA
Genbank Klon9	TGAAAATTAT	CGATACGCTA	ATTGAAGCCG	GTGCTGACGC	GCTGGAGTTA
Genbank Klon10	TGAAAATTAT	CGATACGCTA	ATTGAAGCCG	GTGCTGACGC	GCTGGAGTTA
	151				200
ectrpA_wt	ggtatcccct	tctccgacc	actggcggat	ggcccagca	ttcaaaacgc
Genbank Klon1	GGTATCCCCT	TCTCCGACCC	ACTGGCGGAT	GGCCCGACGA	TTCAAAACGC
Genbank Klon2	GGTATCCCCT	TCTCCGACCC	ACTGGCGGAT	GGCCCGACGA	TTCAAAACGC
Genbank Klon3	GGTATCCCCT	TCTCCGACCC	ACTGGCGGAT	GGCCCGACGA	TTCAAAACGC
Genbank Klon4	GGTATCCCCT	TCTCCGACCC	ACTGGCGGAT	GGCCCGACGA	TTCAAAACGC
Genbank Klon5	GGTATCCCCT	TCTCCGACCC	ACTGGCGGAT	GGCCCGACGA	TTCAAAACGC
Genbank Klon6	GGTATCCCCT	TCTCCGACCC	ACTGGCGGAT	GGCCCGACGA	TTCAAAACGC
Genbank Klon7	GGTATCCCCT	TCTCCGACCC	ACTGGCGGAT	GGCCCGACGA	TTCAAAACGC
Genbank Klon8	GGTATCCCCT	TCTCCGACCC	ACTGGCGGAT	GGCCCGACGA	TTCAAAACGC
Genbank Klon9	GGTATCCCCT	TCTCCGACCC	ACTGGCGGAT	GGCCCGACGA	TTCAAAACGC
Genbank Klon10	GGTATCCCCT	TCTCCGACCC	ACTGGCGGAT	GGCCCGACGA	TTCAAAACGC
	201				250
ectrpA_wt	cactctgccc	gcctttgccc	caggtgtgac	tccggcacia	tgttttgaaa
Genbank Klon1	CACTCTGCCG	GCCTTTGCCG	CAGGTGTGAC	TCCGGCACAA	TGTTTTGAAA
Genbank Klon2	CACTCTGCCG	GCCTTTGCCG	CAGGTGTGAC	TCCGGCACAA	TGTTTTGAAA
Genbank Klon3	CACTCTGCCG	GCCTTTGCCG	CAGGTGTGAC	TCCGGCACAA	TGTTTTGAAA
Genbank Klon4	CACTCTGCCG	GCCTTTGCCG	CAGGTGTGAC	TCCGGCACAA	TGTTTTGAAA
Genbank Klon5	CACTCTGCCG	GCCTTTGCCG	CAGGTGTGAC	TCCGGCACAA	TGTTTTGAAA
Genbank Klon6	CACTCTGCCG	GCCTTTGCCG	CAGGTGTGAC	TCCGGCACAA	TGTTTTGAAA
Genbank Klon7	CACTCTGCCG	GCCTTTGCCG	CAGGTGTGAC	TCCGGCACAA	TGTTTTGAAA
Genbank Klon8	CACTCTGCCG	GCCTTTGCCG	CAGGTGTGAC	TCCGGCACAA	TGTTTTGAAA
Genbank Klon9	CACTCTGCCG	GCCTTTGCCG	CAGGTGTGAC	TCCGGCACAA	TGTTTTGAAA
Genbank Klon10	CACTCTGCCG	GCCTTTGCCG	CAGGTGTGAC	TCCGGCACAA	TGTTTTGAAA

		251			300	
	ectrpA_wt	tgctggcact	gattcgccag	aaacaccgca	ccattcccat	tgccctgttg
	Genbank Klon1	TGCTGGCACT	GATTCGCCAG	AAACACCCGA	CCATTCCCAT	TGGCCTGTTC
	Genbank Klon2	TGCTGGCACT	GATTCGCCAG	AAACACCCGA	CCATTCCCAT	TGGCCTGTTC
	Genbank Klon3	TGCTGGCACT	GATTCGCCAG	AAACACCCGA	CCATTCCCAT	TGGCCTGTTC
	Genbank Klon4	TGCTGGCACT	GATTCGCCAG	AAACACCCGA	CCATTCCCAT	TGGCCTGTTC
	Genbank Klon5	TGCTGGCACT	GATTCGCCAG	AAACACCCGA	CCATTCCCAT	TGGCCTGTTC
	Genbank Klon6	TGCTGGCACT	GATTCGCCAG	AAACACCCGA	CCATTCCCAT	TGGCCTGTTC
	Genbank Klon7	TGCTGGCACT	GATTCGCCAG	AAACACCCGA	CCATTCCCAT	TGGCCTGTTC
	Genbank Klon8	TGCTGGCACT	GATTCGCCAG	AAACACCCGA	CCATTCCCAT	TGGCCTGTTC
	Genbank Klon9	TGCTGGCACT	GATTCGCCAG	AAACACCCGA	CCATTCCCAT	TGGCCTGTTC
	Genbank Klon10	TGCTGGCACT	GATTCGCCAG	AAACACCCGA	CCATTCCCAT	TGGCCTGTTC
		301			350	
	ectrpA_wt	atgtatgcca	atctgggtgtt	taacaaaggc	attgatgagt	tttatgcccc
	Genbank Klon1	ATGTATGCCA	ATCTGGTGT	TAACAAAGGC	ATTGATGAGT	TTTATGCCCA
	Genbank Klon2	ATGTATGCCA	ATCTGGTGT	TAACAAAGGC	ATTGATGAGT	TTTATGCCCA
	Genbank Klon3	ATGTATGCCA	ATCTGGTGT	TAACAAAGGC	ATTGATGAGT	TTTATGCCCA
	Genbank Klon4	ATGTATGCCA	ATCTGGTGT	TAACAAAGGC	ATTGATGAGT	TTTATGCCCA
	Genbank Klon5	ATGTATGCCA	ATCTGGTGT	TAACAAAGGC	ATTGATGAGT	TTTATGCCCA
	Genbank Klon6	ATGTATGCCA	ATCTGGTGT	TAACAAAGGC	ATTGATGAGT	TTTATGCCCA
	Genbank Klon7	ATGTATGCCA	ATCTGGTGT	TAACAAAGGC	ATTGATGAGT	TTTATGCCCA
	Genbank Klon8	ATGTATGCCA	ATCTGGTGT	TAACAAAGGC	ATTGATGAGT	TTTATGCCCA
	Genbank Klon9	ATGTATGCCA	ATCTGGTGT	TAACAAAGGC	ATTGATGAGT	TTTATGCCCA
	Genbank Klon10	ATGTATGCCA	ATCTGGTGT	TAACAAAGGC	ATTGATGAGT	TTTATGCCCA
		351			400	
	ectrpA_wt	gtgcgaaaaa	gtcggcgtcg	attcgggtgct	ggttgccgat	gtgccagttg
	Genbank Klon1	GTGCGAAAAA	GTCGGCGTCG	ATTCGGTGTCT	GGTTGCCGAT	GTGCCAGTTG
	Genbank Klon2	GTGCGAAAAA	GTCGGCGTCG	ATTCGGTGTCT	GGTTGCCGAT	GTGCCAGTTG
	Genbank Klon3	GTGCGAAAAA	GTCGGCGTCG	ATTCGGTGTCT	GGTTGCCGAT	GTGCCAGTTG
	Genbank Klon4	GTGCGAAAAA	GTCGGCGTCG	ATTCGGTGTCT	GGTTGCCGAT	GTGCCAGTTG
	Genbank Klon5	GTGCGAAAAA	GTCGGCGTCG	ATTCGGTGTCT	GGTTGCCGAT	GTGCCAGTTG
	Genbank Klon6	GTGCGAAAAA	GTCGGCGTCG	ATTCGGTGTCT	GGTTGCCGAT	GTGCCAGTTG
	Genbank Klon7	GTGCGAAAAA	GTCGGCGTCG	ATTCGGTGTCT	GGTTGCCGAT	GTGCCAGTTG
	Genbank Klon8	GTGCGAAAAA	GTCGGCGTCG	ATTCGGTGTCT	GGTTGCCGAT	GTGCCAGTTG
	Genbank Klon9	GTGCGAAAAA	GTCGGCGTCG	ATTCGGTGTCT	GGTTGCCGAT	GTGCCAGTTG
	Genbank Klon10	GTGCGAAAAA	GTCGGCGTCG	ATTCGGTGTCT	GGTTGCCGAT	GTGCCAGTTG
		401			450	
	ectrpA_wt	aagagtccgc	gcccttccgc	caggccgcgt	tgcgtcataa	tgctgcacct
	Genbank Klon1	AAGAGTCCGC	GCCCTTCCGC	CAGGCCGCGT	TGCGTCATAA	TGTCGCACCT
	Genbank Klon2	AAGAGTCCGC	GCCCTTCCGC	CAGGCCGCGT	TGCGTCATAA	TGTCGCACCT
	Genbank Klon3	AAGAGTCCGC	GCCCTTCCGC	CAGGCCGCGT	TGCGTCATAA	TGTCGCACCT
	Genbank Klon4	AAGAGTCCGC	GCCCTTCCGC	CAGGCCGCGT	TGCGTCATAA	TGTCGCACCT
	Genbank Klon5	AAGAGTCCGC	GCCCTTCCGC	CAGGCCGCGT	TGCGTCATAA	TGTCGCACCT
	Genbank Klon6	AAGAGTCCGC	GCCCTTCCGC	CAGGCCGCGT	TGCGTCATAA	TGTCGCACCT
	Genbank Klon7	AAGAGTCCGC	GCCCTTCCGC	CAGGCCGCGT	TGCGTCATAA	TGTCGCACCT
	Genbank Klon8	AAGAGTCCGC	GCCCTTCCGC	CAGGCCGCGT	TGCGTCATAA	TGTCGCACCT
	Genbank Klon9	AAGAGTCCGC	GCCCTTCCGC	CAGGCCGCGT	TGCGTCATAA	TGTCGCACCT
	Genbank Klon10	AAGAGTCCGC	GCCCTTCCGC	CAGGCCGCGT	TGCGTCATAA	TGTCGCACCT
		451			500	
	ectrpA_wt	atcttcatct	gcccgcctaa	tgccgatgac	gacctgctgc	gccagatagc
	Genbank Klon1	ATCTTCATCT	GCCCGCCAAA	TGCCGATGAC	GACCTGCTGC	GCCAGATAGC
	Genbank Klon2	ATCTTCATCT	GCCCGCCAAA	TGCCGATGAC	GACCTGCTGC	GCCAGATAGC
	Genbank Klon3	ATCTTCATCT	GCCCGCCAAA	TGCCGATGAC	GACCTGCTGC	GCCAGATAGC
	Genbank Klon4	ATCTTCATCT	GCCCGCCAAA	TGCCGATGAC	GACCTGCTGC	GCCAGATAGC
	Genbank Klon5	ATCTTCATCT	GCCCGCCAAA	TGCCGATGAC	GACCTGCTGC	GCCAGATAGC
	Genbank Klon6	ATCTTCATCT	GCCCGCCAAA	TGCCGATGAC	GACCTGCTGC	GCCAGATAGC
	Genbank Klon7	ATCTTCATCT	GCCCGCCAAA	TGCCGATGAC	GACCTGCTGC	GCCAGATAGC
	Genbank Klon8	ATCTTCATCT	GCCCGCCAAA	TGCCGATGAC	GACCTGCTGC	GCCAGATAGC
	Genbank Klon9	ATCTTCATCT	GCCCGCCAAA	TGCCGATGAC	GACCTGCTGC	GCCAGATAGC
	Genbank Klon10	ATCTTCATCT	GCCCGCCAAA	TGCCGATGAC	GACCTGCTGC	GCCAGATAGC
		501			550	
	ectrpA_wt	ctcttacggt	cgtaggttaca	cctatttgct	gtcacgagca	ggcgtgaccg
	Genbank Klon1	CTCTTACGGT	CGTGGTTACA	CCTATTTGCT	GTCACGAGCA	GGCGTGACCG
	Genbank Klon2	CTCTTACGGT	CGTGGTTACA	CCTATTTGCT	GTCACGAGCA	GGCGTGACCG
	Genbank Klon3	CTCTTACGGT	CGTGGTTACA	CCTATTTGCT	GTCACGAGCA	GGCGTGACCG
	Genbank Klon4	CTCTTACGGT	CGTGGTTACA	CCTATTTGCT	GTCACGAGCA	GGCGTGACCG
	Genbank Klon5	CTCTTACGGT	CGTGGTTACA	CCTATTTGCT	GTCACGAGCA	GGCGTGACCG
	Genbank Klon6	CTCTTACGGT	CGTGGTTACA	CCTATTTGCT	GTCACGAGCA	GGCGTGACCG
	Genbank Klon7	CTCTTACGGT	CGTGGTTACA	CCTATTTGCT	GTCACGAGCA	GGCGTGACCG
	Genbank Klon8	CTCTTACGGT	CGTGGTTACA	CCTATTTGCT	GTCACGAGCA	GGCGTGACCG
	Genbank Klon9	CTCTTACGGT	CGTGGTTACA	CCTATTTGCT	GTCACGAGCA	GGCGTGACCG
	Genbank Klon10	CTCTTACGGT	CGTGGTTACA	CCTATTTGCT	GTCACGAGCA	GGCGTGACCG

```

551                                     600
    ectrpA_wt                          gcgcgagaaaa ccgcgccgcg ttacccctca atcatctggt tgcgaagctg
Genbank Klon1                        GCGCAGAAAA CCGCGCCGCG TTACCCCTCA ATCATCTGGT TGCGAAGCTG
Genbank Klon2                        GCGCAGAAAA CCGCGCCGCG TTACCCCTCA ATCATCTGGT TGCGAAGCTG
Genbank Klon3                        GCGCAGAAAA CCGCGCCGCG TTACCCCTCA ATCATCTGGT TGCGAAGCTG
Genbank Klon4                        GCGCAGAAAA CCGCGCCGCG TTACCCCTCA ATCATCTGGT TGCGAAGCTG
Genbank Klon5                        GCGCAGAAAA CCGCGCCGCG TTACCCCTCA ATCATCTGGT TGCGAAGCTG
Genbank Klon6                        GCGCAGAAAA CCGCGCCGCG TTACCCCTCA ATCATCTGGT TGCGAAGCTG
Genbank Klon7                        GCGCAGAAAA CCGCGCCGCG TTACCCCTCA ATCATCTGGT TGCGAAGCTG
Genbank Klon8                        GCGCAGAAAA CCGCGCCGCG TTACCCCTCA ATCATCTGGT TGCGAAGCTG
Genbank Klon9                        GCGCAGAAAA CCGCGCCGCG TTACCCCTCA ATCATCTGGT TGCGAAGCTG
Genbank Klon10                       GCGCAGAAAA CCGCGCCGCG TTACCCCTCA ATCATCTGGT TGCGAAGCTG

601                                     650
    ectrpA_wt                          aaagagtaca acgctgcacc tccattgcag ggatttggtta tttccgcccc
Genbank Klon1                        AAAGAGTACA ACGCTGCACC TCCATTGCAG GGATTTGGTA TTTCCGCCCC
Genbank Klon2                        AAAGAGTACA ACGCTGCACC TCCATTGCAG GGATTTGGTA TTTCCGCCCC
Genbank Klon3                        AAAGAGTACA ACGCTGCACC TCCATTGCAG GGATTTGGTA TTTCCGCCCC
Genbank Klon4                        AAAGAGTACA ACGCTGCACC TCCATTGCAG GGATTTGGTA TTTCCGCCCC
Genbank Klon5                        AAAGAGTACA ACGCTGCACC TCCATTGCAG GGATTTGGTA TTTCCGCCCC
Genbank Klon6                        AAAGAGTACA ACGCTGCACC TCCATTGCAG GGATTTGGTA TTTCCGCCCC
Genbank Klon7                        AAAGAGTACA ACGCTGCACC TCCATTGCAG GGATTTGGTA TTTCCGCCCC
Genbank Klon8                        AAAGAGTACA ACGCTGCACC TCCATTGCAG GGATTTGGTA TTTCCGCCCC
Genbank Klon9                        AAAGAGTACA ACGCTGCACC TCCATTGCAG GGATTTGGTA TTTCCGCCCC
Genbank Klon10                       AAAGAGTACA ACGCTGCACC TCCATTGCAG GGATTTGGTA TTTCCGCCCC

651                                     700
    ectrpA_wt                          ggatcaggta aaagcagcga ttgatgcagg agctgcgggc gcgatttctg
Genbank Klon1                        GGATCAGGTA AAAGCAGCGA TTGATGCAGG AGCTGCGGGC GCGATTTCTG
Genbank Klon2                        GGATCAGGTA AAAGCAGCGA TTGATGCAGG AGCTGCGGGC GCGATTTCTG
Genbank Klon3                        GGATCAGGTA AAAGCAGCGA TTGATGCAGG AGCTGCGGGC GCGATTTCTG
Genbank Klon4                        GGATCAGGTA AAAGCAGCGA TTGATGCAGG AGCTGCGGGC GCGATTTCTG
Genbank Klon5                        GGATCAGGTA AAAGCAGCGA TTGATGCAGG AGCTGCGGGC GCGATTTCTG
Genbank Klon6                        GGATCAGGTA AAAGCAGCGA TTGATGCAGG AGCTGCGGGC GCGATTTCTG
Genbank Klon7                        GGATCAGGTA AAAGCAGCGA TTGATGCAGG AGCTGCGGGC GCGATTTCTG
Genbank Klon8                        GGATCAGGTA AAAGCAGCGA TTGATGCAGG AGCTGCGGGC GCGATTTCTG
Genbank Klon9                        GGATCAGGTA AAAGCAGCGA TTGATGCAGG AGCTGCGGGC GCGATTTCTG
Genbank Klon10                       GGATCAGGTA AAAGCAGCGA TTGATGCAGG AGCTGCGGGC GCGATTTCTG

701                                     750
    ectrpA_wt                          gttcggccat tgttaaaatc atcgagcaac atattaatga gccagagaaa
Genbank Klon1                        GTTCGGCCAT TGTTAAAATC ATCGAGCAAC ATATTAATGA GCCAGAGAAA
Genbank Klon2                        GTTCGGCCAT TGTTAAAATC ATCGAGCAAC ATATTAATGA GCCAGAGAAA
Genbank Klon3                        GTTCGGCCAT TGTTAAAATC ATCGAGCAAC ATATTAATGA GCCAGAGAAA
Genbank Klon4                        GTTCGGCCAT TGTTAAAATC ATCGAGCAAC ATATTAATGA GCCAGAGAAA
Genbank Klon5                        GTTCGGCCAT TGTTAAAATC ATCGAGCAAC ATATTAATGA GCCAGAGAAA
Genbank Klon6                        GTTCGGCCAT TGTTAAAATC ATCGAGCAAC ATATTAATGA GCCAGAGAAA
Genbank Klon7                        GTTCGGCCAT TGTTAAAATC ATCGAGCAAC ATATTAATGA GCCAGAGAAA
Genbank Klon8                        GTTCGGCCAT TGTTAAAATC ATCGAGCAAC ATATTAATGA GCCAGAGAAA
Genbank Klon9                        GTTCGGCCAT TGTTAAAATC ATCGAGCAAC ATATTAATGA GCCAGAGAAA
Genbank Klon10                       GTTCGGCCAT TGTTAAAATC ATCGAGCAAC ATATTAATGA GCCAGAGAAA

751                                     800
    ectrpA_wt                          atgctggcgg cactgaaagt ttttgtacaa ccgatgaaa gggcgacgcg
Genbank Klon1                        ATGCTGGCGG CACTGAAAGT TTTTGTACAA CCGATGAAAG CGGCACGCG
Genbank Klon2                        ATGCTGGCGG CACTGAAAGT TTTTGTACAA CCGATGAAAG CGGCACGCG
Genbank Klon3                        ATGCTGGCGG CACTGAAAGT TTTTGTACAA CCGATGAAAG CGGCACGCG
Genbank Klon4                        ATGCTGGCGG CACTGAAAGT TTTTGTACAA CCGATGAAAG CGGCACGCG
Genbank Klon5                        ATGCTGGCGG CACTGAAAGT TTTTGTACAA CCGATGAAAG CGGCACGCG
Genbank Klon6                        ATGCTGGCGG CACTGAAAGT TTTTGTACAA CCGATGAAAG CGGCACGCG
Genbank Klon7                        ATGCTGGCGG CACTGAAAGT TTTTGTACAA CCGATGAAAG CGGCACGCG
Genbank Klon8                        ATGCTGGCGG CACTGAAAGT TTTTGTACAA CCGATGAAAG CGGCACGCG
Genbank Klon9                        ATGCTGGCGG CACTGAAAGT TTTTGTACAA CCGATGAAAG CGGCACGCG
Genbank Klon10                       ATGCTGGCGG CACTGAAAGT TTTTGTACAA CCGATGAAAG CGGCACGCG

801
    ectrpA_wt                          cagtttaa
Genbank Klon1                        CAGTTAA
Genbank Klon2                        CAGTTAA
Genbank Klon3                        CAGTTAA
Genbank Klon4                        CAGTTAA
Genbank Klon5                        CAGTTAA
Genbank Klon6                        CAGTTAA
Genbank Klon7                        CAGTTAA
Genbank Klon8                        CAGTTAA
Genbank Klon9                        CAGTTAA
Genbank Klon10                       CAGTTAA

```

Zusammenstellung erzeugt mit der PRETTY Funktion des GCG Wisconsin Package, Mutationen sind für jeden Klon in einer anderen Farbe markiert.

## 6.6 Aminosäure-Sequenzen der 10 sequenzierten Klone aus der pMK18p-ectrpa Genbank

	1				50
ecTrpA_wt	MERYESLFAQ	LKERKEGAFV	PFVTLGDPGI	EQSLKIIDTL	IEAGADALEL
Genbank Klon1	MERYESLFAQ	LKERKEGAFV	PFVTLG <b>N</b> PGI	EQSLKIIDTL	IEAGADALEL
Genbank Klon2	MERYESLFAQ	LKERKEGAFV	PFVTLGDP <b>G</b> I	EQSLKIIDTL	IEAGADALEL
Genbank Klon3	MERYESLFAQ	LKERKEGAFV	PFVTLGDPGI	EQSLKIIDTL	IEAGADALEL
Genbank Klon4	MERYESLFAQ	LKERKEGAFV	PFVTLGDPGI	EQSLKIIDTL	IEAGADALEL
Genbank Klon5	MERYESLFAQ	LKERKEGAFV	PFVTLGDPGI	EQSLKIIDTL	IEAGADALEL
Genbank Klon6	MERYESLFAQ	LKERKEGAFV	PFVTLGDPGI	EQSLKIIDTL	IEAGADALEL
Genbank Klon7	MERYESLFAQ	LKERKEGAFV	PFVTLGDPGI	EQSLKIIDTL	IEAGADALEL
Genbank Klon8	MERYESLFAQ	LKERKEGAFV	PFVTLGDPGI	EQSLKIIDTL	IEAGADALEL
Genbank Klon9	MERYESLFAQ	LKERKEGAFV	PFVTLGDPGI	EQSLKIIDTL	IEAGADALEL
Genbank Klon10	MERYESLFAQ	LKERKEGAFV	PFVTLGDPGI	EQSLKIIDTL	IEAGADALEL
	51				100
ecTrpA_wt	GIPFSDPLAD	GPTIQNATLR	AFAAGVTPAQ	CFEMLALIRQ	KHPTIPIGLL
Genbank Klon1	GIPFSDPLAD	GPTIQNATLR	AFAAGVTPAQ	CFEMLALIRQ	KHPTIP <b>I</b> IGLL
Genbank Klon2	GIPFSDPLAD	GPTIQNATLR	AFAAGVTPAQ	CFEMLALIRQ	KHPTIPIGLL
Genbank Klon3	GIPFSDPLAD	GPTIQNATLR	AFAAGVTPAQ	<b>S</b> FEMLALIRQ	KHPTIPIGLL
Genbank Klon4	GIPFSDPLAD	GPTIQNATLR	AFAAGVTPAQ	CFEMLALIRQ	KHPTIPIGLL
Genbank Klon5	GIPFSDPLAD	GPTIQNATLR	AFAAGVTPAQ	CFEMLALIRQ	KHPTIPIGLL
Genbank Klon6	GIPFSDPLAD	GPTIQNATLR	AFAAGVTPAQ	CFEMLALIRQ	KHPTIPIGLL
Genbank Klon7	GIPFSDPLAD	GPTIQNATLR	AFAAGVTPAQ	CFEMLALIRQ	KHPTIPIGLL
Genbank Klon8	GIPFSDPLAD	GPTIQNATLR	AFAAGVTPAQ	CFEMLALIRQ	KHPTIPIGLL
Genbank Klon9	GIPFSDPLAD	GPTIQNATLR	AFAAGVTPAQ	CFEMLALIRQ	KHPTIPIGLL
Genbank Klon10	GIPFSDPLAD	GPTIQNATLR	AFAAGVTPAQ	CFEMLALIRQ	KHPTIPIGLL
	101				150
ecTrpA_wt	MYANLVFNKG	IDEFYAQCEK	VGVDVSLVAD	VPVEESAPFR	QAALRHNVP
Genbank Klon1	MYANLVFNKG	IDEFYAQCEK	VGVDVSLVAD	VPVEESAPFR	QAALRHNVP
Genbank Klon2	MYANLVFNKG	IDEFYAQCEK	VGVDVSLVAD	VPVEESAPFR	QAALRHNVP
Genbank Klon3	MYANLVFNKG	IDEFYAQCEK	VGVDVSLVAD	VPVEESAPFR	QAALRHNVP
Genbank Klon4	MYANLVFNKG	IDEFYAQCEK	VGVDVSLVAD	VPVEESAPFR	QAALRHNVP
Genbank Klon5	MYANLVFNKG	IDEFYAQCEK	VGVDVSLVAD	VPVEESAPFR	QAALRHNVP
Genbank Klon6	MYANLVFNKG	IDEFYAQCEK	VGVDVSLVAD	VPVEESAPFR	QAALRHNVP
Genbank Klon7	MYANLVFNKG	IDEFYAQCEK	VGVDVSLVAD	VPVEESAPFR	QAALRHNVP
Genbank Klon8	MYANLVFNKG	IDEFYAQCEK	VGVDVSLVAD	VPVEESAPFR	QAALRHNVP
Genbank Klon9	MYANLVFNKG	IDEFYAQCEK	VGVDVSLVAD	VPVEESAPFR	QAALRHNVP
Genbank Klon10	MYANLVFNKG	IDEFYAQCEK	VGVDVSLVAD	VPVEESAPFR	QAALRHNVP
	151				200
ecTrpA_wt	IFICPPNADD	DLLRQIASYG	RGYTYLLSRA	GVTGAENRAA	LPLNHLVAKL
Genbank Klon1	IFICPPNADD	DLLRQIASYG	RGYTYLLSRA	GVTGAENRAA	LPLNHLVAKL
Genbank Klon2	IFICPPNADD	DLLRQIASYG	RGYTYLLSRA	GVTGAENRAA	LPLNHLVAKL
Genbank Klon3	IFICPPNADD	DLLRQIASYG	RGYTYLLSRA	GVTGAENRAA	LPLNHLVAKL
Genbank Klon4	IFICPPNADD	DLLRQIASYG	RGYTYLLSRA	GVTGAENRAA	LPLNHLVAKL
Genbank Klon5	IFICPPNADD	DLLRQIASYG	RGYTYLLSRA	GVTGAENRAA	LPLNHLVAKL
Genbank Klon6	IFICPPNADD	DLLRQIASYG	RGYTYLLSRA	GVTGAENRAA	LPLNHLVAKL
Genbank Klon7	IFICPPNADD	DLLRQIASYG	RGYTYLLSRA	GVTGAENRAA	LPLNHLVAKL
Genbank Klon8	IFICPPNADD	DLLRQIASYG	RGYTYLLSRA	GVTGAENRAA	LPLNHLVAKL
Genbank Klon9	IFICPPNADD	DLLRQIASYG	RGYTYLLSRA	GVTGAENRAA	LPLNHLVAKL
Genbank Klon10	IFICPPNADD	DLLRQIASYG	RGYTYLLSRA	GVTGAENRAA	LPLNHLVAKL
	201				250
ecTrpA_wt	KEYNAAPPLQ	GFGISAPDQV	KAADAGAAG	AISGSAIVKI	IEQHINEPEK
Genbank Klon1	KEYNAAPPLQ	GFGISAPDQV	KAADAGAAG	AISGSAIVKI	IEQHINEPEK
Genbank Klon2	KEYNAAPPLQ	GFGISAPDQV	KAADAGAAG	AISGSAIVKI	IEQHINEPEK
Genbank Klon3	KEYNAAPPLQ	GFGISAPDQV	KAADAGAAG	AISGSAIVKI	IEQHINEPEK
Genbank Klon4	KEYNAAPPLQ	GFGISAPDQV	KAADAGAAG	AISGSAIVKI	IEQHINEPEK
Genbank Klon5	KEYNAAPPLQ	GFGISAPDQV	KAADAGAAG	AISGSAIVKI	IEQHINEPEK
Genbank Klon6	KEYNAAPPLQ	GFGISAPDQV	KAADAGAAG	AISGSAIVKI	IEQHINEPEK
Genbank Klon7	KEYNAAPPLQ	GFGISAPDQV	KAADAGAAG	AISGSAIVKI	IEQHINEPEK
Genbank Klon8	KEYNAAPPLQ	GFGISAPDQV	KAADAGAAG	AISGSAIVKI	IEQHINEPEK
Genbank Klon9	KEYNAAPPLQ	GFGISAPDQV	KAADAGAAG	AISGSAIVKI	IEQHINEPEK
Genbank Klon10	KEYNAAPPLQ	GFGISAPDQV	KAADAGAAG	AISGSAIVKI	IEQHINEPEK
	251	269			
ecTrpA_wt	MLAALKVFVQ	PMKAATRS*		Austausche	
Genbank Klon1	MLAALKVFVQ	PMKAATRS*		4 AS / 5 Nuc	
Genbank Klon2	MLAALKVFVQ	PMKAATRS*		2 AS / 7 Nuc	
Genbank Klon3	MLAALKVFVQ	PMKAATRS*		5 AS / 5 Nuc	
Genbank Klon4	MLAALKVFVQ	PMKAATRS*		3 AS / 4 Nuc	
Genbank Klon5	MLAALKVFVQ	PMKAATRS*		3 AS / 5 Nuc	
Genbank Klon6	MLAALKVFVQ	PMKAATRS*		4 AS / 6 Nuc	
Genbank Klon7	MLAALKVFVQ	PMKAATRS*		3 AS / 5 Nuc	
Genbank Klon8	MLAALKVFVQ	PMKAATRS*		3 AS / 5 Nuc	
Genbank Klon9	MLAALKVFVQ	PMKAATRS*		4 AS / 6 Nuc	
Genbank Klon10	MLAALKVFVQ	PMKAATRS*		2 AS / 8 Nuc	

Zusammenstellung erzeugt mit der PRETTY Funktion des GCG Wisonsin Package.  
Mutationen sind für jeden Klon in einer anderen Farbe markiert.

## 6.7 Mögliche Aminosäureaustausche bei singulären Nukleotidaustauschen in einem Codon

nach von	GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	MET	PRO	PHE	THR	SER	CYS	ASN	GLN	TYR	TRP	HIS	ASP	GLU	LYS	ARG	*	
GLY										GGU GGC	GGU GGC				GGG		GGU GGC	GGA GGG			GGG	
ALA																	GCU GCC	GCA GCG				
VAL					GUU GUC GUA	GUU		GUU GUC									GUU GUC	GUA GUG				
LEU					CUU CUC CUA	UUG CUG		UUA UUG CUU CUG		UUA UUG			CUA CUG		UUG	CUU CUC					CUU CUC CUA CUG	UUA UUG
ILE								AUU AUC		AUU AUC		AUU AUC							AUA	AUA		
MET																						
PRO													CCA CCG			CCU CCC						
PHE																						
THR					ACU ACC ACA	ACG						ACU ACC							ACA ACG	ACA ACG		
SER	AGU AGC	UCU UCC UCA UCG		UCA UCG	AGU AGC		UCU UCC UCA UCG	UCU UCC UCA UCG		UCU UCC		UCU UCC	AGU AGC		UCU UCC	UCG					AGU AGC	UCA UCG
CYS																						
ASN																						
GLN																						
TYR																						
TRP																						
HIS																						
ASP																						
GLU																						
LYS					AAA	AAG																
ARG				CGU CGC CGA CGG	AGA	AGG	CGU CGC CGA CGG	AGA AGG	CGU CGC CGA AGG	CGU CGC	CGU CGC	CGA CGG	CGG AGG	CGU CGC	CGU CGC				AGA AGG		CGA AGA	

Abbildung 42: Mögliche Aminosäureaustausche, die durch singuläre Mutationen in einem Codon erzeugt werden können.

Die Grafik ist wie folgt zu lesen:

Austausch von „senkrecht“ nach „waagrecht“.

**Blaue Felder** zeigen möglichen Austausch an.

In Fällen, in denen nicht alle Codonen zu dem angezeigten Austausch führen, sind die möglichen Codonen aufgeführt, die zu dem Austausch führen können. Die übrigen Codonen der jeweiligen Aminosäure können dann nicht zu dem angezeigten Austausch führen.

**Weißer Felder** zeigen an, dass kein Austausch möglich ist.



## 7 Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Tryptophan Synthase aus *Thermotoga maritima* strukturell und funktionell untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Operon-ständigen Gene *tmtrpA* und *tmtrpB1* sowie das nur in Hyperthermophilen identifizierte, nicht Operon-ständige Gen *tmtrpB2* jeweils einzeln in *Escherichia coli* exprimiert, die Genprodukte gereinigt und charakterisiert. Sowohl tmTrpB1 als auch tmTrpB2 katalysieren die Synthese von Tryptophan bei 80 °C mit hoher Effizienz, wobei tmTrpB1 einen höheren  $k_{\text{cat}}$  und tmTrpB2 einen deutlich niedrigeren  $K_M$ -Wert für Indol aufweist. TmTrpB1, jedoch nicht tmTrpB2, bildet mit tmTrpA einen  $\alpha_2\beta_2$ -Komplex aus, in dem sich die beiden Enzyme wechselseitig aktivieren. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass tmTrpB2 bei den hohen physiologischen Temperaturen von *Thermotoga maritima* als Indol-Rettungsprotein fungiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Selektionssystem etabliert, mit dessen Hilfe das thermolabile TrpA Protein aus *E. coli* (ecTrpA) stabilisiert werden sollte. Zu diesem Zweck wurde ein *Thermus thermophilus trpA*-Defizienzstamm mit einer durch Zufallsmutagenese erstellten *ectrpA*-Genbank transformiert und bei hohen Temperaturen auf Tryptophan-freiem Minimalmedium inkubiert. Obwohl Kontrollversuche die Funktionstüchtigkeit des Selektionssystems zeigten, kam es zu keinem Koloniewachstum und damit zu keiner Isolierung stabilisierter ecTrpA-Varianten.

## 8 Abstract

The structure and function of the tryptophan synthase from *Thermotoga maritima* were investigated. To this end, the *tmtrpA* and *tmtrpB1* genes of the *trp* operon, as well as the *tmtrpB2* gene that is located outside the *trp* operon, were expressed individually in *Escherichia coli*, and the gene products were purified and characterised. Both tmTrpB1 and tmTrpB2 catalyse tryptophan biosynthesis at 80 °C with high efficiency, but tmTrpB1 has a higher  $k_{\text{cat}}$ -value and tmTrpB2 has a much lower  $K_{\text{M}}$ -value for indole. TmTrpB1, but not tmTrpB2, associates with tmTrpA to form a  $\alpha_2\beta_2$ -complex, in which the two enzymes are mutually activating each other. The results suggest that tmTrpB2 acts as an indole rescue protein at the physiological temperatures of *T. maritima*.

In the second part of the work a selection system was established in order to stabilize the thermolabile TrpA protein from *Escherichia coli* (ecTrpA). To this end, a *Thermus thermophilus trpA* deficiency strain was transformed with an *ectrpA* gene bank produced by random mutagenesis, and plated at elevated temperature on minimal medium without tryptophan. Although control experiments proved the functionality of the selection system, no colony growth was observed and therefore no stabilised ecTrpA variants could be isolated.

An dieser Stelle gilt mein Dank allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Großer Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Sterner für das in mich gesetzte Vertrauen und die Möglichkeit, sehr selbstständig an die Bearbeitung der interessanten Themenstellungen herangegangen sein zu können. Ich danke für die stete Bereitschaft zur Diskussion und die fachliche Unterstützung bei allen Projekten sowie die Ermöglichung von Teilnahmen an interessanten Tagungen und Weiterbildungen.

Herrn Prof. Dr. R. Krämer danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. H.-J. Fritz muss speziell gedankt werden: Die gute wissenschaftliche Ausbildung während meines Studiums und meiner Diplomarbeit (Dank hier an Dr. W. Kramer) am Inst. f. Mikrobiologie und Genetik half sicher beim Gelingen der vorliegenden Arbeit. Das gute Arbeitsklima in der Abteilung, die fast zwei Jahre Heimstatt unserer Arbeitsgruppe war, machte ein angenehmes Arbeiten möglich. Besonderer Dank gilt den „wandelnden Lexika der Molekularbiologie“ Dr. Wilfried Kramer und Dr. Harald Kolmar, die stets Rat und Hilfe in allen Fragen (zur Wissenschaft und zum Leben) geben konnten. Dank auch an Frau Marita Kalck, Olaf Waase und Rainer Merkl sowie allen Mitarbeitern der Abteilung, deren Nennung hier den Rahmen sprengen würde.

Für Sequenzierungsarbeiten in Göttingen und Köln danke ich den Mitarbeitern des Göttingen Genomics Laboratory (G<sub>2</sub>L) bzw. des Zentrums für Molekulare Medizin Köln.

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. Kirschner für die Überlassung von [(tmTrpA·tmTrpB1)<sub>2</sub>]-Komplex sowie IGP und die Hilfe bei Fragen zur Tryptophan Synthase. Herrn Ariel Lustig danke ich für die Durchführung der Ultrazentrifugationsläufe. Herrn Prof. W. Liebl einen Dank für die Bereitstellung von chromosomaler *Thermotoga maritima* DNA und Herrn Dr. Y. Koyama Dank für die Überlassung von *Thermus*-Stämmen und Plasmiden.

Dank an Prof. H.-W. Klein und seine Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme unserer Arbeitsgruppe in Köln. An dieser Stelle sei auch allen anderen Mitarbeitern der „kleinen Biochemie“ gedankt, die ein angenehmes Arbeitsklima im Gebäude schufen.

Mein besonderer Dank geht an meine Kolleginnen und Kollegen Steffen Schmidt, Catharina Jürgens (Dank für das Korrekturlesen!!!), Birte Höcker (vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit im Westfalenlabor), Martina Henn-Sax (vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit und Kurzweil im Göttinger Labor), Andreas Ivens (Dank dem einzigen weiteren Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe), Simona Cerrone (vielen Dank für die Unterstützung in der täglichen Laborarbeit und die Reinigung von Hilfsenzymen) sowie Vera Boege, Silke Allekotte, Michaela Haeger und Sonja Leopoldseder für das entgegengebrachte Vertrauen und das Gefühl, ein wichtiger Bestandteil der Arbeitsgruppe zu sein. Auch unseren Gastforschern Gavin Murphy und Satoshi Akanuma spreche ich an dieser Stelle meinen Dank aus.

Bettina Asch danke ich für ihre Liebe zu einem wortkargen Ostwestfalen und widme ihr die einzige Fußnote dieser Arbeit.

---

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

---

## 9 Lebenslauf



---

**Stefan Hettwer**, geboren am 21.01.1972 in Bad Driburg, Nordrhein-Westfalen

*Staatsangehörigkeit* deutsch

*Familienstand* ledig

### *Schulausbildung*

1978 – 1982 Katholische Grundschule in Höxter

1982 – 1991 König-Wilhelm-Gymnasium in Höxter

Juni 1991 Allgemeine Hochschulreife

April 1992 – März 1993 Grundwehrdienst

### *Hochschulausbildung*

1991 – 1998 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen

Mai 1997 Diplomprüfungen in Genetik (Hauptfach), Immunologie und Physikalischer Chemie

Mai 1997 – März 1998 Diplomarbeit bei Prof. Dr. H.-J. Fritz am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen, Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie. Thema der Arbeit: Nachweis eines putativen Maushomologen des neuen Mutatorgens YIR002c aus *S. cerevisiae* und Aufbau eines Two-Hybrid-Systems zur Detektion möglicher Interaktionspartner von YIR002c

April 1998 Diplom in Biologie

April 1998 – September 2001 Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation bei Prof. Dr. R. Sterner am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie der Universität Göttingen, seit Januar 2000 am Institut für Biochemie der Albertus-Magnus Universität zu Köln

---