

Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der  
Technischen Universität München

**Biochemische und strukturelle  
Charakterisierung von Enzymen der  
Riboflavin-, Catecholamin- und  
Folsäurebiosynthese sowie des  
Calvin-Zyklus**

Stefanie Echt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauff

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher  
2. Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl

Die Dissertation wurde am 22.03.2004 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 28.05.2004 angenommen.

---

Meinen Eltern

---

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2000 bis Dezember 2003 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher und in Kooperation mit der Bayer CropScience AG, Monheim, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. A. Bacher möchte ich herzlich für die engagierte Betreuung, wertvollen Ratschläge und das grosse Interesse am Fortschritt dieser Arbeit danken.

Besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. Markus Fischer für die Betreuung, Motivation und zahlreichen Ideen während der zurückliegenden Jahre.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Klaus Stenzel und Herrn Dr. Jörg Freigang, Bayer CropScience AG, für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und Unterstützung aus der Ferne.

All meinen Arbeitskolleginnen und Arbeitskollegen am Lehrstuhl, insbesondere meiner langjährigen Laborgenossin Frau Dr. Ilka Haase, möchte ich für das angenehme Arbeitsklima, für hilfreiche Diskussionen und die mir entgegengebrachte Freundschaft danken. Mein besonderer Dank an Sebastian Schwamb, Thomas Wojtulewicz und Rebecca Blom für ihre engagierte Unterstützung im Laboralltag

Ein herzlicher Dank gilt auch der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, insbesondere Herrn Dr. Stefan Gerhardt und Frau Stefanie Bauer. Die ausserordentlich erfolgreiche Zusammenarbeit mit Euch hat viel zu dieser Arbeit beigetragen.

Nicht zuletzt möchte ich den mir nahestehenden Menschen danken, die mir durch ihre Anteilnahme, ihren Zuspruch und ihre Freundschaft geholfen haben, so manche dunklen Momente zu überwinden und sich an den hellen umso mehr zu erfreuen, ganz besonders Susi, Till und natürlich `dem Doktor`.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern für ihr anhaltendes Vertrauen und liebevollen Rückhalt zu jeder Zeit.

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Transketolase aus <i>Zea mays</i></b> .....	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>GTP als Ausgangssubstanz verschiedener Coenzym-Biosythesewege</b> ..	<b>5</b>
1.2.1	Tetrahydrobiopterin.....	5
1.2.1.1	Biosynthese und Bedeutung als Cofaktor.....	5
1.2.1.2	Die Tyrosin-Hydroxylase aus <i>Drosophila melanogaster</i> .....	7
1.2.2	Folsäure.....	10
1.2.2.1	Biosynthese und Bedeutung als Cofaktor.....	10
1.2.2.2	Die GTP-Cyclohydrolase I aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	12
1.2.3	Riboflavin .....	14
1.2.3.1	Biosynthese und Bedeutung als Cofaktor.....	14
1.2.3.2	Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus <i>Candida albicans</i> .....	16
<b>1.3</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Chemikalien</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Mikroorganismenstämme</b> .....	<b>22</b>
2.3.1	Hefestämme .....	22
2.3.2	Bakterienstämme.....	22
<b>2.4</b>	<b>Expressionsvektoren</b> .....	<b>23</b>
2.4.1	pNCO113.....	23
2.4.2	Das pET-System.....	24
2.4.3	Hefeexpressionsvektoren .....	25
<b>2.5</b>	<b>Proteine und Nukleinsäuren</b> .....	<b>26</b>
<b>2.6</b>	<b>Nährmedien und Antibiotika</b> .....	<b>26</b>
<b>2.7</b>	<b>Säulenmaterialien</b> .....	<b>29</b>

---

<b>2.8</b>	<b>Puffer</b> .....	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b> .....	<b>31</b>
3.1.1	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation.....	31
3.1.1.1	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
3.1.1.2	Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen .....	32
3.1.2	Fermentation und Zellernte.....	33
3.1.2.1	Bakterienanzucht.....	33
3.1.2.2	Hefeanzucht.....	34
3.1.3	Stammhaltung.....	34
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>35</b>
3.2.1	Agarosegelelektrophorese.....	35
3.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	35
3.2.3	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	36
3.2.3.1	Direkte Reinigung .....	36
3.2.3.2	Reinigung aus Agarosegelen.....	36
3.2.4	Polymerasekettenreaktion .....	36
3.2.4.1	Standard-PCR .....	36
3.2.4.2	Gensynthese.....	38
3.2.4.3	PCR-Screening.....	38
3.2.4.4	Oligo-Annealing .....	38
3.2.5	DNA-Verdau mittels Restriktionsenzymen.....	39
3.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten .....	39
3.2.7	DNA-Sequenzierung.....	40
<b>3.3</b>	<b>Proteinpräparation und Analytik</b> .....	<b>40</b>
3.3.1	Zellaufschluss.....	40
3.3.2	SDS-Gelelektrophorese.....	41
3.3.3	Proteinreinigung .....	43
3.3.3.1	Reinigung der Transketolase aus <i>Zea mays</i> .....	46
3.3.3.2	Reinigung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus <i>Candida albicans</i> .....	47
3.3.3.3	Reinigung der GTP-Cylohydrolase I aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	48

3.3.3.4	Reinigung der Tyrosinhydroxylase aus <i>Drosophila melanogaster</i> ...	49
3.3.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	51
3.3.5	Pufferwechsel und Konzentrationserhöhung von Proteinlösungen .....	51
3.3.5.1	Dialyse .....	51
3.3.5.2	Ultrafiltration.....	52
3.3.6	N-terminale Aminosäuresequenzierung .....	52
3.3.7	Massenspektrometrie .....	53
3.3.8	Analytische Ultrazentrifugation .....	53
3.3.9	Westernblot Analyse.....	55
3.3.10	Thrombinspaltungen.....	57
3.3.11	Kinetische Untersuchungen.....	57
3.3.11.1	Bestimmung der Transketolase-Aktivität .....	58
3.3.11.2	Bestimmung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase-Aktivität .....	59
3.3.11.3	Bestimmung der GTP-Cyclohydrolase I Aktivität.....	60
3.3.11.4	Bestimmung der Tyrosinhydroxylase-Aktivität.....	60
3.3.12	Circulardichroismus-Spektroskopie .....	61
3.3.13	<sup>15</sup> N-NMR-Spektroskopie .....	62
3.3.14	Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse.....	62
3.3.14.1	Proteinkristallisation.....	62
3.3.14.2	Röntgenstrukturanalyse.....	63
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Die rekombinante Transketolase aus <i>Zea mays</i>.....</b>	<b>64</b>
4.1.1	Optimierung des Expressionskonstruktes pET32-Tkl7otp.....	64
4.1.2	Expression und Reinigung der ZMTK.....	64
4.1.3	Kinetische Charakterisierung der ZMTK.....	67
4.1.4	Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse .....	68
4.1.4.1	Kristallisation und Datensammlung .....	68
4.1.4.2	Strukturbeschreibung der ZMTK.....	69
4.1.5	Diskussion .....	73
<b>4.2</b>	<b>Die Tyrosinhydroxylase aus <i>Drosophila melanogaster</i> .....</b>	<b>76</b>
4.2.1	Konstruktion von THI und den Einzeldomänen .....	77
4.2.1.1	Klonierung der katalytischen TH-Domäne .....	78

4.2.1.2	Klonierung der beiden regulatorischen Domänen-Varianten.....	78
4.2.1.3	Klonierung von THI mit und ohne Tetramerisierungsdomäne .....	79
4.2.2	Expression der TH-Konstrukte.....	80
4.2.3	Reinigung der TH-Konstrukte .....	81
4.2.3.1	Reinigung von THI und THII .....	81
4.2.3.2	Reinigung der regulatorischen Domäne von THII.....	82
4.2.3.3	Reinigung der katalytischen TH-Domäne .....	83
4.2.3.4	Reinigungsversuche mit THI ohne Tetramerisierungsdomäne.....	83
4.2.4	Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der THI.....	84
4.2.5	Westernblot-Analysen.....	85
4.2.6	<sup>15</sup> N-NMR-Spektroskopie mit NII-TH.....	87
4.2.7	Kristallisationsexperimente .....	88
4.2.8	Diskussion .....	90
<b>4.3</b>	<b>Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus <i>Candida albicans</i></b> .....	<b>92</b>
4.3.1	Gensynthese und Klonierung des Wildtyp-Gens .....	92
4.3.2	Klonierung der Mutanten .....	94
4.3.3	Expression und Reinigung der CARib3-Konstrukte.....	95
4.3.4	Molekulargewicht und oligomerer Aufbau von CARib3 .....	97
4.3.5	Kinetische Charakterisierung der CARib3-Konstrukte.....	97
4.3.6	Konfiguration des Produktes der CARib3 .....	98
4.3.7	Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse .....	99
4.3.7.1	Kristallisation und Datensammlung .....	99
4.3.7.2	Strukturbeschreibung der CARib3.....	99
4.3.8	Diskussion .....	103
<b>4.4</b>	<b>Die GTP-Cyclohydrolase I aus <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	<b>107</b>
4.4.1	Versuche im rekombinanten Hefe-System .....	107
4.4.1.1	Klonierung eines induzierbaren Hefe-Expressionsvektors .....	107
4.4.1.2	Expression von His-ATGCHI in Hefe.....	108
4.4.1.3	Reinigung von His-ATGCHI.....	109
4.4.1.4	Kinetische Charakterisierung.....	111
4.4.2	Versuche im rekombinanten <i>E. coli</i> -System .....	112
4.4.2.1	Expression und Reinigung der Trx-ATGCHI.....	112
4.4.2.2	Klonierung, Expression und Reinigung der MBP-ATGCHI.....	113

4.4.2.3	Kinetische Charakterisierung.....	115
4.4.2.4	Bestimmung des nativen Molekulargewichtes.....	116
4.4.3	Kristallisationsversuche .....	116
4.4.4	Diskussion .....	116
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>134</b>
<b>7.1</b>	<b>Primersequenzen .....</b>	<b>134</b>
7.1.1	Transketolase .....	134
7.1.2	Tyrosinhydroxylase.....	134
7.1.3	3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase .....	135
7.1.4	GTP-Cyclohydrolase I.....	136



## Verwendete Abkürzungen:

AT:	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BSA:	Bovine serum albumin
CA:	<i>Candida albicans</i>
CD:	Circulardichroismus
DBPS:	3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase
DEAE:	Diethylaminoethyl
DOPA:	Dihydroxyphenylalanin
dNTPs:	Desoxyribonukleotid-triphosphate
DTT:	Dithiothreitol
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
GCH:	GTP-Cyclohydrolase
HIV:	Human Immunodeficiency Virus
HRP:	Horseradish Peroxidase
IgG:	Immunoglobulin G
IPTG:	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
Lusy:	Lumazinsynthase
NTA:	Nitrilotriaceticacid
OD <sub>280</sub> , OD <sub>600</sub> :	Optische Dichte bei 280 bzw. 600 nm
R5P	Ribose-5-phosphat
Ru5P	Ribulose-5-phosphat
SC:	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS:	Natriumdodecylsulfat
PCR:	Polymerasekettenreaktion
TAE:	Tris/Acetate/EDTA
TCA:	Trichloressigsäure
TEMED:	N, N, N, N'-Tetramethylethylendiamin
TH:	Tyrosinhydroxylase
TK:	Transketolase
TPP:	Thiaminpyrophosphat
Tris:	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Xu5P	Xylulose-5-phosphat
ZM:	<i>Zea mays</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Transketolase aus *Zea mays*

Transketolase (TK) katalysiert die reversible Übertragung einer C<sub>2</sub>-Einheit von Ketosephosphaten auf Aldosephosphate (Schenk *et al.*, 1998). In heterotrophen Organismen nimmt die TK eine essentielle Rolle im nicht-oxidativen Zweig des Pentosephosphate-Zyklus ein. Dieser Stoffwechselweg dient maßgeblich der wechselseitigen Umwandlung von Hexosen in Pentosen und stellt damit Grundbausteine für die Biosynthese von Nukleotiden, aromatischen Aminosäuren und verschiedenen Vitaminen bereit.

Im pflanzlichen Gewebe ist die TK als Enzym des Calvin-Zyklus an der Regeneration des primären CO<sub>2</sub>-Akzeptors Ribulose-1,5-bisphosphat und damit an der Assimilation von etwa 5 X 10<sup>11</sup> Tonnen Kohlenstoff pro Jahr beteiligt (Hess, 1999).

TKs benötigen Thiaminpyrophosphat (TPP) und zweiwertige Kationen, bevorzugt Mg<sup>2+</sup> (Heinrich *et al.*, 1972), als Cofaktoren (Abb. 1.1, Teil A). Der Reaktionsmechanismus beinhaltet die Abstraktion des Protons von C2 des TPP-Thiazoliumringes, welche zur Bildung eines Carbanions führt und damit die Basis für einen nukleophilen Angriff auf die C2 Ketogruppe des Donor-Ketosephosphates schafft (Kern *et al.*, 1996, Abb. 1.1, Teil B). Es folgt die Übertragung einer Dihydroxyethyl-Gruppe auf das C2-Atom des Thiazoliumringes. Die C<sub>2</sub>-Einheit wird dann in einer Umkehrung des Reaktionsablaufes auf ein Akzeptor-Aldosephosphat übertragen.

Die TK ist ein ubiquitäres, homodimeres Enzym mit Untereinheiten von 70 – 76 kDa und wurde bereits in einer Vielzahl von Organismen untersucht, dazu zählen u.a. *Escherichia coli* (Sprenger *et al.*, 1995), die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (De la Haba *et al.*, 1955) und *Candida utilis* (Kiely *et al.*, 1969), verschiedene Säuger (Phillippov *et al.*, 1980; Paoletti & Aldinucci, 1986) und Pflanzen. Die Sequenzen der TK aus Spinat (*Spinacia oleracea*, Teige *et al.*, 1998), Kartoffel (*Solanum tuberosum*, Teige *et al.*, 1996), Tabak (*Nicotiana tabacum*, Henkes *et al.*, 2001), Paprika (*Capsicum annum*, Bouvier *et al.*, 1998) und *Craterostigma plantagineum* (3 Gene, Bernaccia *et al.*, 1995) sind bekannt. Sequenzvergleiche

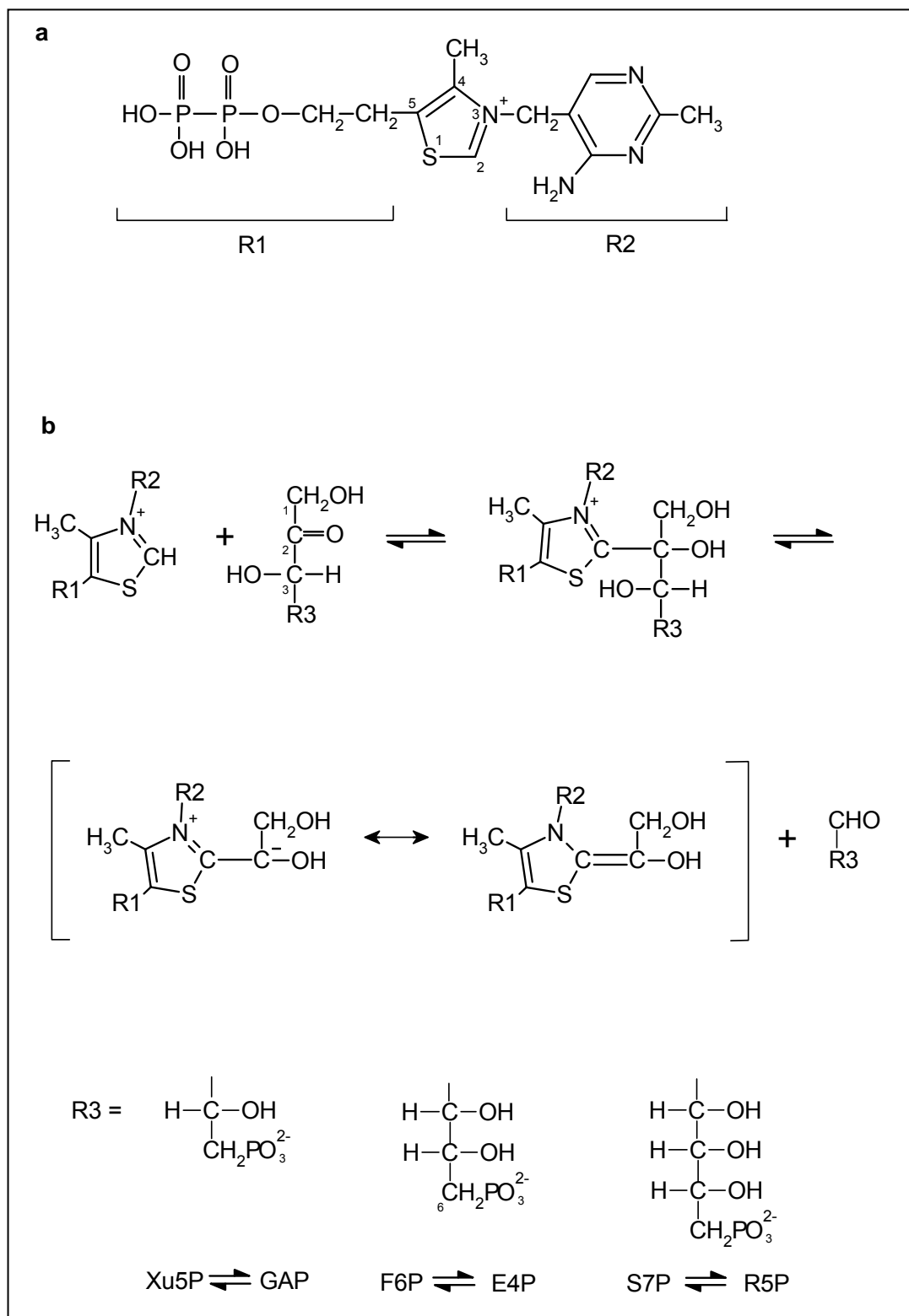


Abb. 1.1: Reaktionsmechanismus des Thiaminpyrophosphates bei der Transketolase-reaktion. Dargestellt ist der erste Teil der Reaktion, der zweite Teil entspricht der Rück-reaktion der gezeigten Schritte; **a**: Thiaminpyrophosphat; **b**: Schematischer Reaktionsablauf; **E4P**: Erythrose-4-phosphat; **F6P**: Fructose-6-phosphat; **GAP**: Glycerinaldehyd-3-phosphat; **R5P**: Ribose-5-phosphat; **S7P**: Sedoheptulose-7-phosphat; **Xu5P**: Xylulose-5-phosphat.

zeigen 85% bis 90% Homologie zwischen diesen Proteinen und dem Mais-Enzym (Busch, 1997). Während die TKs von Tieren, Bakterien und Pilzen im Cytosol lokalisiert sind, scheint die pflanzliche TK sowohl in photosynthetisch aktivem Gewebe wie auch in Sproß und Wurzel auf die Plastiden beschränkt zu sein (Schnarrenberger *et al.*, 1995; Debnam & Emes, 1999; Henkes *et al.*, 2001).

Vorläufige kristallographische Untersuchungen des *E. coli*-Enzyms liegen vor (Littlechild & Turner, 1995). Die Röntgenstruktur der Transketolase aus Hefe (*S. cerevisiae*) wurde bis zu einer Auflösung von 2.0 Å bestimmt und dabei der vermutete Aufbau als Homodimer mit einem Molekül TPP je Untereinheit bestätigt (Nikkola *et al.*, 1994). Weiterführende röntgenkristallographische Untersuchungen des Hefe-Enzyms durch gezielte Mutagenese und Cokristallisation des Wildtyp-Proteins mit Substrat oder TPP-Analogen führten zur Identifizierung einiger essentiell an der Katalyse beteiligter Aminosäurereste (König *et al.*, 1994; Wikner *et al.*, 1994; Nilsson *et al.*, 1997). Bisher konnte jedoch noch keine TK eines weiteren Organismus strukturell bestimmt werden, um die an der Hefe gewonnenen Erkenntnisse zu bestätigen.

Aufgrund ihrer Schlüsselrolle im Calvinzyklus stellt die Transketolase ein potentielles Zielprotein für die Entwicklung von Herbiziden dar. Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der Mais-TK ist dabei für rationales Drug-Design unerlässlich. Auch die Entwicklung entsprechend herbizidresistenter Maissorten könnte von diesen Informationen profitieren.

## 1.2 GTP als Ausgangssubstanz verschiedener Coenzym-Biosynthesewege

Enzyme bestehen oftmals aus einem Proteinanteil und einem niedermolekularen organischen Cofaktor, dem sogenannten Coenzym, der für die Katalyse unverzichtbar ist. Einige Coenzyme, wie Flavinadenindinukleotid (**FAD**) oder Tetrahydrofolsäure (**THF**), leiten sich von Vitaminen ab, die vom tierischen Körper nicht selbst hergestellt werden können und daher mit der Nahrung aufgenommen werden müssen. Im Gegensatz zu Tieren sind Pflanzen und viele Mikroorganismen in der Lage, die von ihnen benötigten Vitamine zu synthetisieren und fungieren damit als wichtige Nährstoffquellen. Zusätzlich stellen die entsprechenden Biosynthesewege attraktive Ziele für Antiinfektiva oder Herbizide dar, da das Problem der Toxizität gegenüber dem Menschen und höheren Tieren reduziert ist.

Neben seiner Funktion als Baustein der DNA stellt Guanosintriphosphat (**GTP**) die Ausgangssubstanz verschiedener Coenzym-Biosynthesewege dar. Die Umsetzung von GTP zu Dihydroneopterintriphosphat (**NH<sub>2</sub>TP**) bildet den gemeinsamen ersten Schritt sowohl der Tetrahydrobiopterin(**BH<sub>4</sub>**)-Biosynthese bei Säugern als auch der Folat-Biosynthese bei Pflanzen und Mikroorganismen. Bei diesen geht GTP außerdem zusammen mit Ribulose-5-phosphat (**Ru5P**) in die Riboflavin(**Vitamin B<sub>2</sub>**)-Biosynthese ein (Müller, 1988).

### 1.2.1 Tetrahydrobiopterin

#### 1.2.1.1 Biosynthese und Bedeutung als Cofaktor

GTP-Cyclohydrolase I (**GCHI**) katalysiert die Umsetzung von GTP (**1**) zu NH<sub>2</sub>TP (**2**) unter Freisetzung von Formiat (Abb. 1.2). Die komplexe Reaktion stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der BH<sub>4</sub>-Biosynthese bei Säugern dar. Die Regulation der intrazellulären BH<sub>4</sub>-Konzentration erfolgt hauptsächlich durch die GCHI-Aktivität, welche über Produkthemmung und durch das GTP-Cyclohydrolase I Feedbackregulatorprotein beeinflusst wird (Yoneyama *et al.*, 2001). NH<sub>2</sub>TP wird durch die Zn<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-abhängige 6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase (**PTPS**) in einer intramolekularen Redoxreaktion zu 6-Pyruvoyltetrahydropterin (**6PPH<sub>4</sub>**)

umgesetzt (**3**). Im abschließenden Schritt erfolgt die Reduktion zu BH<sub>4</sub> (**4**) durch die NADPH-abhängige Sepiapterin Reduktase (Masako *et al.*, 1966).

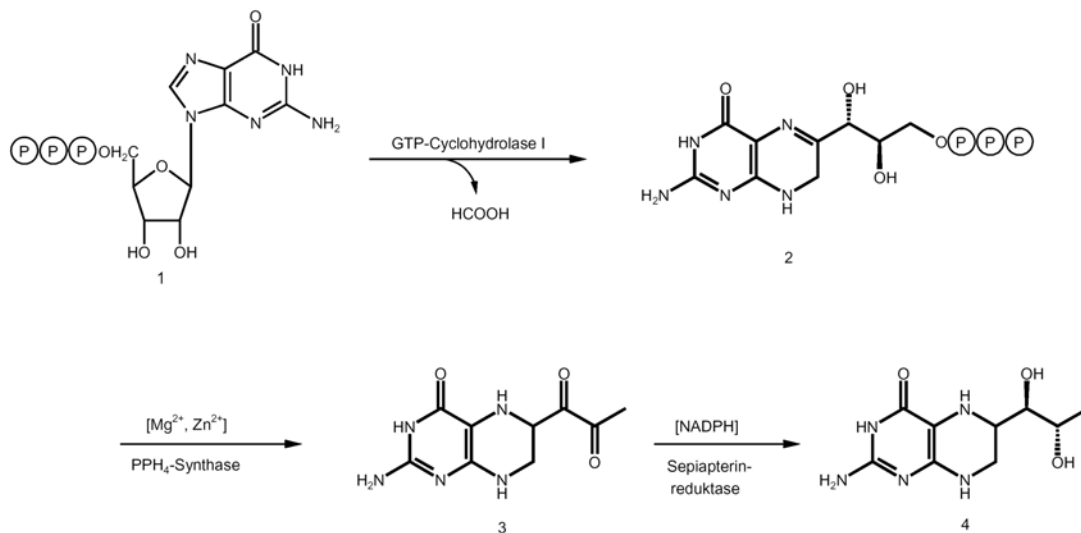


Abb. 1.2: Biosyntheseweg von Tetrahydrobiopterin. **1:** Guanosintriphosphat; **2:** Dihyroneopterintriphosphat; **3:** 6-Pyruvoyltetrahydrobiopterin; **4:** Tetrahydrobiopterin.

BH<sub>4</sub> ist im Organismus in zahlreiche Prozesse involviert. Neben einer Rolle bei der Zellproliferation (Tanaka *et al.*, 1998) und der Melanogenese (Schallreuther *et al.*, 1994) aktiviert BH<sub>4</sub> die NO-Synthase (Giovanelli *et al.*, 1991) und beeinflusst damit die NO-abhängige Erweiterung der Blutgefäße, die Blutplättchenaggregation und Aktivität von Makrophagen (Kwon *et al.*, 1989; Radomski *et al.*, 1990).

BH<sub>4</sub> dient im Stoffwechsel als Cofaktor bei zahlreichen Reaktionen, z.B. bei der Spaltung von Glycerinethern in Glycerin und Fettaldehyd als Cofaktor der Alkyl-glycerinmonooxygenase (Kaufman *et al.*, 1990). Zusammen mit Fe<sup>2+</sup> dient BH<sub>4</sub> als wasserstoffübertragender Cofaktor der Tryptophan-, Phenylalanin- und Tyrosin-Hydroxylasen (Kaufman & Fischer, 1962; Kaufman, 1967; Hufton *et al.*, 1995). Diese Monooxygenasen katalysieren nicht nur den oxidativen Abbau der aromatischen Aminosäuren in der Leber, sondern liefern auch die Grundbausteine wichtiger Botenstoffe. Aus Tryptophan entsteht nach Hydroxylierung und Decarboxylierung der Neurotransmitter Serotonin. Das Produkt der Phenylalanin-Hydroxylase ist Tyrosin, welches durch die Tyrosin-Hydroxylase zu Dihydroxyphenylalanin (**DOPA**) umgesetzt wird. DOPA ist Zwischenprodukt der Melanin-Bildung und der Biosynthese der Catecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin.

Störungen der Neurotransmitter-Biosynthese durch BH<sub>4</sub>-Mangel äußern sich in verschiedenen Krankheitsbildern wie beispielsweise der DOPA-responsiven Dystonie (Niederwieser *et al.*, 1984) und atypischer Phenylketonurie. Auch bei den neurologischen Erkrankungen Alzheimer, Parkinson, Autismus und Depression wird ein zu niedriger BH<sub>4</sub>-Spiegel als Ursache diskutiert (Thöny *et al.*, 2000).

### 1.2.1.2 Die Tyrosin-Hydroxylase aus *Drosophila melanogaster*

Tyrosin-Hydroxylase (**TH**) ist ein eukaryotisches Enzym und katalysiert den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Catecholamin-Biosynthese in Säugern (Nagatsu, 1991). Das Enzym setzt sich zusammen aus einer N-terminalen regulatorischen und einer C-terminalen katalytischen Domäne (Daubner *et al.*, 1993). Die letzten 20 – 30 Aminosäuren des C-Terminus bilden zudem einen Arm, der für die Bildung des Tetramers aus je zwei Dimeren zuständig ist (Vrana *et al.*, 1994).

TH hydroxyliert Tyrosin in Position 3 des aromatischen Ringes in Anwesenheit von Fe<sup>2+</sup>, BH<sub>4</sub> und molekularem Sauerstoff als Cosubstrat. Das resultierende DOPA wird durch Decarboxylierung in das Catecholamin Dopamin überführt. In Vertebraten wird die TH-Aktivität minutiös reguliert, dies beinhaltet sowohl Transkriptionskontrolle und alternatives RNA-Splicing, als auch direkte Modulation der Enzymaktivität über Catecholamin-Feedback-Regulation und Proteinkinase A (**PKA**)-vermittelte Phosphorylierung (Zigmound *et al.*, 1989; Hufton *et al.*, 1995; Kumer & Vrana, 1996). In Säugern wird die TH generell durch ein einziges Gen codiert, in Primaten sind jedoch mehrere durch alternatives Splicing entstandene Isoformen gefunden worden, je zwei bei Affen (Ichikawa *et al.*, 1990) und vier beim Menschen (Grima *et al.*, 1987).

Bei Insekten kennt man Dopamin einerseits als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (Lundell & Hirsh, 1994) und andererseits als Ausgangssubstanz der Biosynthese von Chinonen, die unabdingbar sind für die Pigmentierung und Aushärtung der Cuticula (Wright, 1987; Hopkins & Kramer, 1992; Wright, 1996). In *Drosophila melanogaster* wird die TH vom *pale*-Locus codiert (Budnik & White, 1987; Neckameyer & White, 1993). Mutationen dieses Genortes führen zu unpigmentierten Embryonen, die unfähig sind zu schlüpfen.

Auch in *D. melanogaster* liegt die TH in zwei Isoformen vor, die durch alternatives Spleißen aus demselben Primärtranskript hervorgehen (Birman *et al.*, 1994). Isoform I (THI) wird spezifisch in Nervengewebe exprimiert, während die Isoform II (THII) v.a. in der Hypodermis nachgewiesen wurde (Vié *et al.*, 1999). Beide Isoformen unterscheiden sich nur durch einen Einschub von 71 Aminosäuren in der regulatorischen Domäne von THII (Abb. 1.3). Diese Insertion bildet ein negativ geladenes Cluster, da sie nur ein Lysin aber insgesamt 23 saure Aminosäuren beinhaltet.

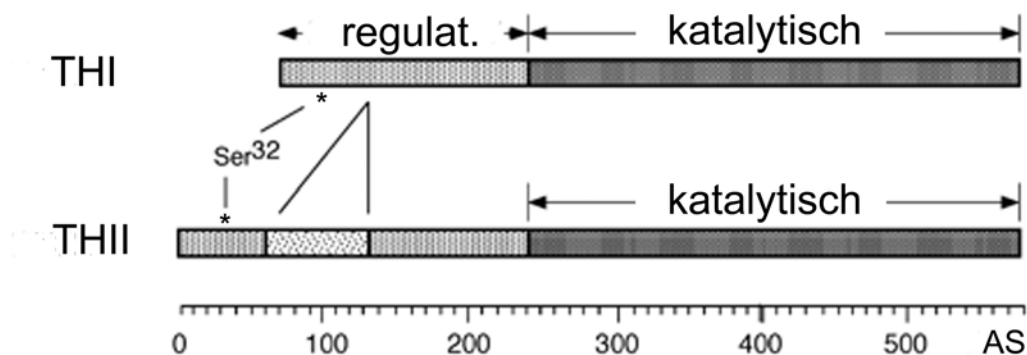


Abb. 1.3: Schematischer Aufbau der beiden Tyrosinhydroxylase-Isoformen in *D. melanogaster*. Der \* markiert die Position von Ser32, das spezifisch durch Proteinkinase A phosphoryliert werden kann (verändert nach Vié *et al.*, 1999).

Der in Vertebraten beobachtete Mechanismus der Feedback-Hemmung basiert auf der Bindung der Catecholamine an katalytisch inaktives  $\text{Fe}^{3+}$  im aktiven Zentrum der TH (Almas *et al.*, 1992). Phosphorylierung eines spezifischen Serinrestes der regulatorischen Domäne (Ser40 bei der Ratte, Kumer & Vrana, 1996) durch PKA wirkt dieser Hemmung entgegen. Dies legt nahe, daß sich die Phosphorylierungsstelle am N-Terminus in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum befinden muß.

Die hochkonservierte PKA-Erkennungssequenz wurde auch bei THI und THII aus *D. melanogaster* gefunden (Ser32, Vié *et al.*, 1999). Ein *in vitro* Vergleich der kinetischen und regulatorischen Eigenschaften beider Isoformen hat jedoch ergeben, daß die THII gegenüber der THI bereits in einem voraktivierten Zustand vorliegt. Während Phosphorylierung an Ser32 in Anwesenheit von Dopamin zu einer Aktivitätserhöhung beider Isoformen führt, wird die THI-Aktivität auch ohne Dopamin durch Phosphorylierung stimuliert. Dagegen kann die THII-Aktivität durch Phosphorylierung alleine nicht weiter erhöht werden. Möglicherweise stabilisiert also der saure Abschnitt THII in einer aktivierten Konformation.



Diese differentielle Regulation der beiden Isoformen ermöglicht zum einen die kurzfristige Synthese großer Mengen Dopamin in der Epidermis durch voraktivierte THII zum Aufbau einer neuen Cuticula, zum anderen jedoch auch eine präzisere Regulation der Dopamin-Biosynthese im zentralen Nervensystem, wo THI exprimiert wird.

Aufgrund ihrer essentiellen Rolle in der Dopamin-Biosynthese stellt die TH aus *D. melanogaster* ein potentiell Ziel für die Entwicklung von Insektiziden dar. Auf Aminosäureebene liegt die Sequenzidentität zwischen den katalytischen Domänen der Säuger und *D. melanogaster* TH bei 61%. Die Konservierung der regulatorischen Domänen ist mit 23% für THI jedoch deutlich niedriger (Vié *et al.*, 1999). Für die Insertion in der regulatorischen Domäne von THII ist keine homologe Sequenz einer Vertebraten-TH bekannt.

Die Röntgenstruktur der TH aus Ratte konnte in einer N-terminal verkürzten Form ohne regulatorische Domäne gelöst werden (Goodwill *et al.*, 1997; Goodwill *et al.*, 1998). Von der hochhomologen Phenylalanin-Hydroxylase sind ebenfalls Strukturen ohne N-terminale Domäne bzw. ohne Tetramerisierungsarm bekannt (Erlandsen *et al.*, 1998; Fusetti *et al.*, 1998; Erlandsen *et al.*, 2000). Die Röntgenstruktur einer vollständigen Aminosäuren-Hydroxylase liegt bislang nicht vor, könnte aber wertvolle Informationen bezüglich der komplexen Regulationsmodi dieser Enzyme und damit für die Entwicklung selektiver Inhibitoren liefern.

## 1.2.2 Folsäure

### 1.2.2.1 Biosynthese und Bedeutung als Cofaktor

Das Vitamin Folsäure (Pteroylglutaminsäure) ist die Stammsubstanz einer ganzen Reihe bekannter Derivate. Der Grundkörper besteht aus einem Pterinringsystem (2-Amino-4-hydroxy-6-methylpterin), p-Aminobenzoesäure und L-Glutaminsäure. Durch Reduktion und Konjugation mit bis zu sieben weiteren L-Glutamylresten entsteht die biologisch aktive Form, die Tetrahydrofolsäure (**THF**).

Die THF-Biosynthese (Abb. 1.4) beginnt analog zur BH<sub>4</sub>-Biosynthese mit der Umwandlung von GTP (**1**) zu NH<sub>2</sub>TP (**2**) durch GCHI (**a**). Zwei Phosphatereste des NH<sub>2</sub>TP werden durch die Dihydroneopterintriphosphat-Pyrophosphohydrolase (**b**) abgespalten. Der verbliebene Phosphatrest wird vermutlich durch unspezifische Phosphomonoesterasen (**c**) entfernt. 7,8-Dihydroneopterin (**7**) geht durch Abspaltung von Glycolaldehyd durch die 6-Hydroxymethyl-pterinaldolase (**d**) in den Pterin-Grundkörper des Folats, 6-Hydroxymethyl-dihydropterin (**8**) über. Die Seitenkette wird nun durch Pyrophosphorylierung aktiviert und anschließend durch die Dihydropteroat-Synthase (**e**) mit p-Aminobenzoesäure (**10**) konjugiert. Der Glutamylrest wird durch die Dihydrofolat-Synthetase (**g**) angefügt. Das gleiche Enzym katalysiert außerdem den sukzessiven Aufbau der Polyglutamat-Kette an den  $\gamma$ -Carboxylrest der Dihydrofolsäure (**13**). THF (**14**) entsteht aus DHF durch die Dihydrofolat-Reduktase (**h**). Die dabei erforderlichen Reduktionsäquivalente stammen von NADPH.

THF dient im Organismus als Cofaktor für die Übertragung und gegenseitige Umwandlung von C<sub>1</sub>-Einheiten verschiedener Oxidationsstufen. Diese C<sub>1</sub>-Einheiten werden im Stoffwechsel v.a. für die Biosynthese der Purinbasen und damit für den Aufbau der Nucleinsäuren benötigt. Auch die Umwandlung von dUMP zu dTMP durch die Thymidylat-Synthase geschieht durch die Übertragung der C<sub>1</sub>-Einheit von N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-Methylen-THF. Folsäure kommt damit eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation zu.

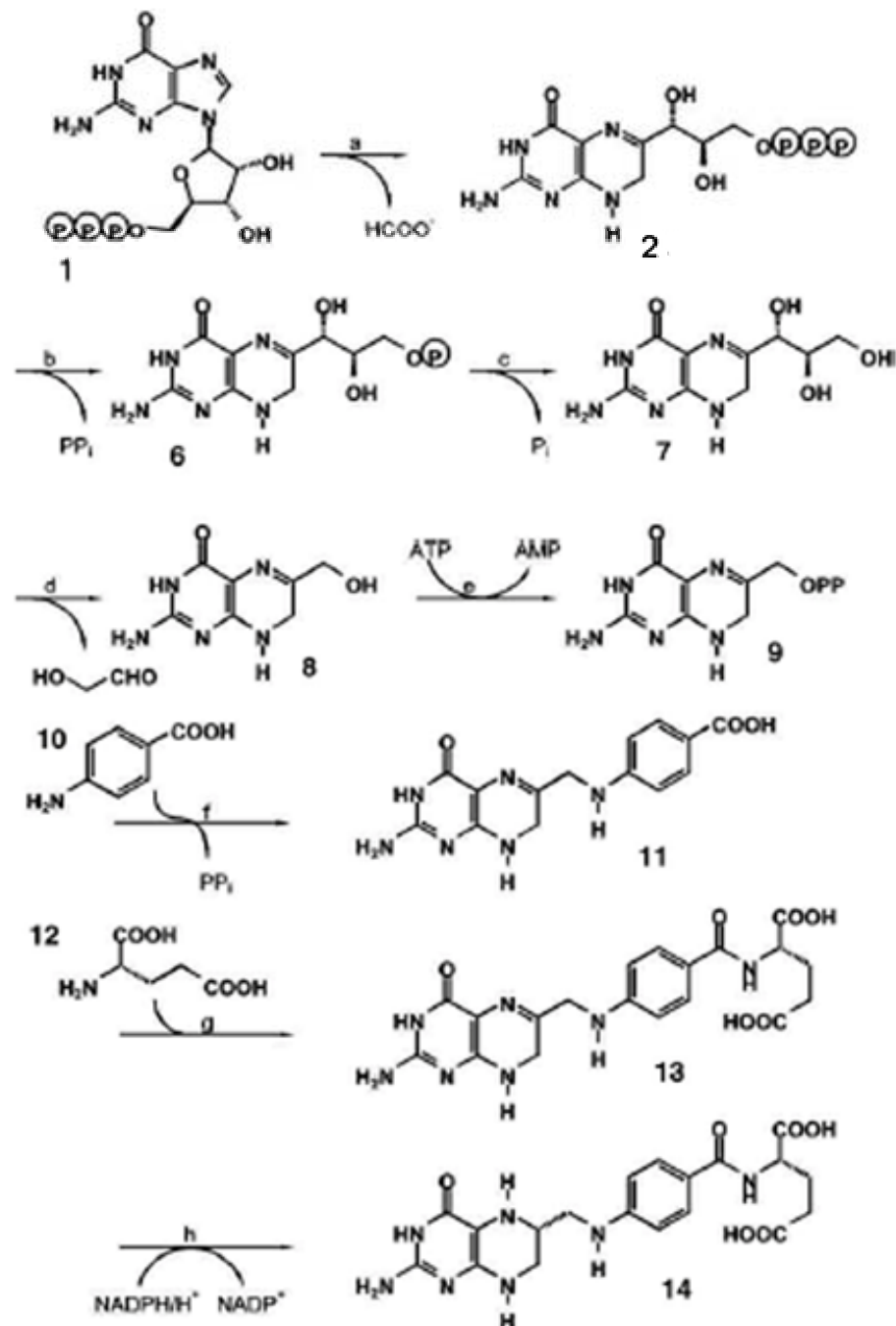


Abb. 1.4: Biosyntheseweg von Folsäure. 1: Guanosintriphsphat; 2: 7,8-Dihydroneopterintriphosphat; 6: 7,8-Dihydroneopterinphosphat; 7: Dihydroneopterin; 8: 6-Hydroxymethylpterin; 9: 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterindiphosphat; 10: p-Aminobenzoessäure; 11: Dihydropteroat; 12: Glutaminsäure; 13: Dihydrofolat; 14: Tetrahydrofolat; a: GTP-Cyclohydrolase I; b: Dihydroneopterintriphosphat-Pyrophosphohydrolase; c: Unspezifische Phosphomonoesterase; d: Dihydroneopterin-Aldolase; e: 6-Hydroxymethyl-dihydropterin-Pyrophosphokinase; f: Dihydropteroat-Synthase; g: Dihydrofolat Synthetase; h: Dihydrofolat-Reduktase.

Der Folsäure-Biosyntheseweg ist als „Drug-Target“ für antimikrobielle und anti-parasitäre Therapie gut untersucht. Die ersten synthetischen Breitband-Antibiotika waren Sulfonamide, deren Wirkungsweise über die Hemmung der Dihydropteroat-Synthase erfolgt (Roland *et al.*, 1979; Achari *et al.*, 1997; Skold, 2000). Trimethoprim wirkt durch Hemmung der DHFR Aktivität gegen eine Vielzahl von pathogenen Bakterien (Singer *et al.*, 1966; Schweitzer *et al.*, 1990; Skold, 2001).

#### **1.2.2.2 Die GTP-Cyclohydrolase I aus *Arabidopsis thaliana***

GCHIs aus Bakterien (Yim & Brown, 1976) und Säugern (Hatakeyama *et al.*, 1989; Bracher *et al.*, 1999; Auerbach *et al.*, 2000) sind hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften intensiv charakterisiert worden. Alle untersuchten Orthologe wiesen eine Länge von  $235 \pm 15$  Aminosäuren und eine molekulare Masse von  $26 \pm 2$  kDa je Untereinheit auf.

Mutagenese-Studien (Bracher *et al.*, 1999) sowie die Aufklärung der Röntgenstrukturen der Enzyme aus *E. coli* (Nar *et al.*, 1995) und Mensch (Auerbach *et al.*, 2000) führten zur Identifizierung einiger essentiell an der Katalyse und Substratbindung beteiligter Aminosäurereste (Abb. 1.5). Beide Proteine bilden toroidförmige Homodecamere mit insgesamt zehn aktiven Zentren, welche von jeweils drei aufeinandertreffenden Untereinheiten gebildet werden. Jedes aktive Zentrum beherbergt ein katalytisch essentielles Zinkion, das über zwei Cystein- und einen Histidinrest komplexiert wird (Auerbach *et al.*, 2000).

Pflanzen stellen die Hauptquelle der vom Menschen durch die Nahrung aufgenommenen Folate dar. Aus diesem Grund ist das Verständnis der pflanzlichen Folat-Biosynthese von besonderem Interesse für biotechnologische Ansätze zur Aufwertung der menschlichen Folatversorgung durch Nahrungspflanzen. Dem Eingangsschritt der Folat-Biosynthese gilt dabei besonderes Augenmerk, da hier die Kontrollstelle für den Durchsatz dieses Stoffwechselweges vermutet wird (Yoneyama *et al.*, 2001).

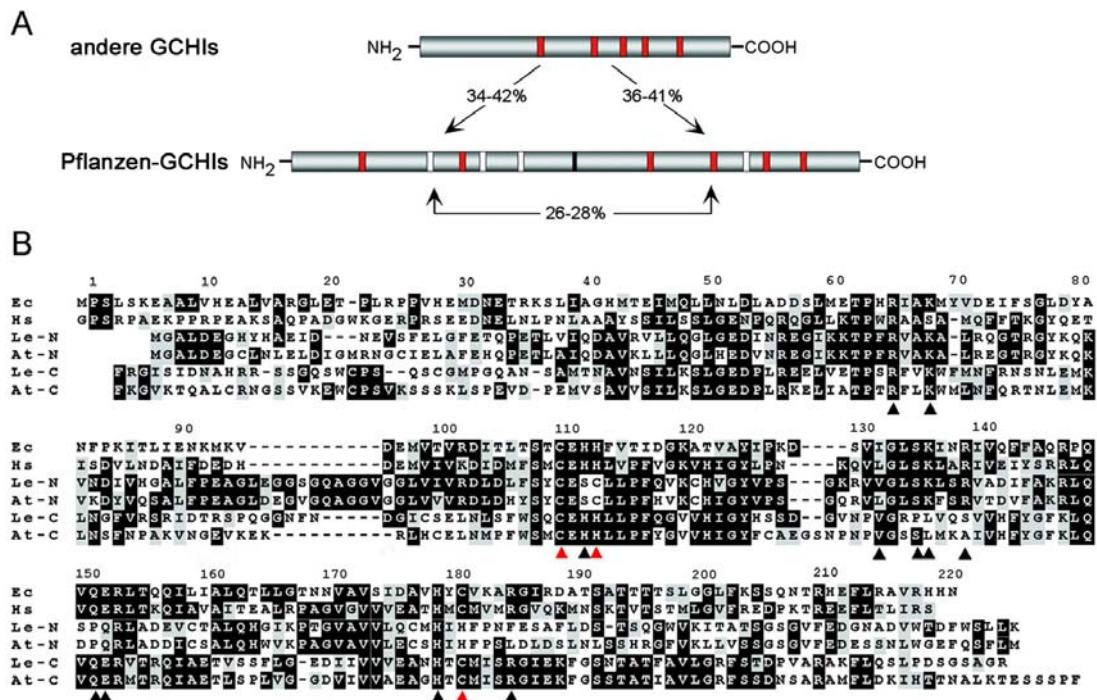


Abb 1.5: Primärstruktur pflanzlicher GTP-Cyclohydrolasen (GCHI) (verändert nach Basset *et al.*, 2002).

**A:** Schematische Darstellung der Tandem-Domänenstruktur der GCHI. Die Prozentangaben weisen auf die Sequenzidentitäten der einzelnen Domänen zu anderen GCHIs eukaryotischen Ursprungs bzw. untereinander hin. Rote Balken markieren konservierte Reste des aktiven Zentrums, weiße Balken markieren diejenigen Reste, die in den pflanzlichen Sequenzen nicht konserviert vorliegen. **B:** Alignment der Aminosäure-Sequenzen der GCHI aus *E. coli* (Ec, GenBank Accession No. P27511), Mensch (Hs, CAB77392) und der jeweiligen N- bzw. C-terminalen Domäne aus Tomate (Le, AY069920) und *Arabidopsis thaliana* (At, AF489530). Die Nummerierung ist bezogen auf das *E. coli*-Enzym, die ersten 30 Reste der humanen Sequenz wurden weggelassen. Schwarz: identische Reste; grau: ähnliche Reste; Dreieck: konservierte Reste des aktiven Zentrums bei *E. coli* und Mensch, rote Farbe weist auf die Beteiligung an der Zink-Bindung hin.

Im Gegensatz zu den mikrobiellen und Säuger-Enzymen sind pflanzliche GCHIs bisher relativ wenig untersucht worden. Die native Spinat-GCHI konnte gereinigt und partiell charakterisiert werden (Sohta *et al.*, 1997), allerdings lag die ermittelte spezifische Aktivität mit  $10,4 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  etwa um den Faktor 1000 unter den typischerweise bei GCHIs anderer Quellen gefundenen Werten. Die Klonierung der entsprechenden Gene aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*) und *Arabidopsis thaliana* zeigte, daß beide Gene für Polypeptide von etwa 51 kDa codieren (Basset *et al.*, 2002). Eine Untereinheit besteht demnach aus einem Tandem von GCHI-Domänen (Abb 1.5). Ein Sequenzvergleich auf der Ebene der Primärstruktur ergab, daß keine der beiden Domänen einen vollständigen Satz der für die Katalyse als

notwendig erachteten Aminosäuren aufweist, wobei die Domänen sich jedoch gegenseitig ergänzen könnten.

Dieser Umstand wirft unmittelbar die Frage nach der Quartärstruktur der pflanzlichen GCHI auf. Die bislang vorliegenden Daten wurden mittels Größenausschlusschromatographie ermittelt und weisen auf ein Homodimer hin (Basset *et al.*, 2002). Zur endgültigen Klärung dieser Frage wären röntgenkristallographische Daten einer pflanzlichen GCHI von großem Wert.

### 1.2.3 Riboflavin

#### 1.2.3.1 Biosynthese und Bedeutung als Cofaktor

Die Biosynthese von Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) geht von zwei verschiedenen Primärmetaboliten, GTP und Ru5P, aus (Abb 1.6). Die GTP-Cyclohydrolase II (**GCHII**) katalysiert die Umsetzung von GTP zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat (**15**) (Foor & Brown, 1975; 1980). Es folgt eine Sequenz von Desaminierung und Reduktion, deren Reihenfolge abhängt vom jeweiligen Organismus. Bei Prokaryoten wird zuerst der Pyrimidinring an Position 2 desaminiert und dann die Ribosylseitenkette reduziert (Burrows, 1978), bei Hefen ist die Reaktionsreihenfolge umgekehrt (Bacher & Lingens, 1970; Nielsen & Bacher, 1981). Erst vor einigen Jahren wurden in den Bakterien *E. coli* und *B. subtilis* bifunktionelle Enzyme gefunden, die eine N-terminale Desaminase (**II**)- und eine C-terminale Reduktase (**III**)-Domäne besitzen (Richter *et al.*, 1997). Es resultiert 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat (**18**), welches erst nach Dephosphorylierung zu 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**19**, **ARP**) weiter umgesetzt werden kann. Eine spezifische Phosphatase ist bis heute jedoch noch unbekannt.

An dieser Stelle der Riboflavin-Biosynthese treffen sich die jeweils vom GTP bzw. Ru5P herführenden Zweige. Das Enzym 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase (**V**, **DBPS**) katalysiert die Umsetzung von Ru5P (**23**) zu L-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**20**, **DBP**) und Formiat (Neuberger & Bacher, 1986; Volk & Bacher, 1988; 1990; Volk & Bacher, 1991).

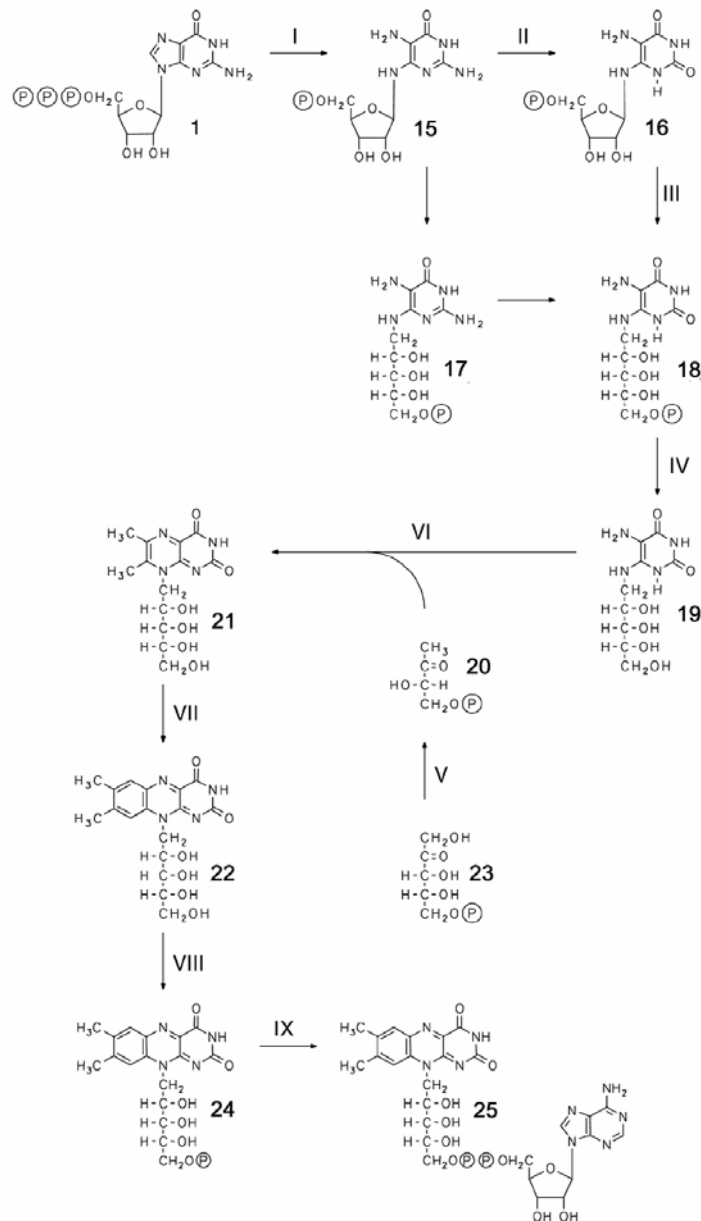


Abb 1.6: Riboflavinbiosynthese mit Folgereaktionen zu FMN und FAD.

**I:** Cyclohydrolase **II:** Desaminase; **III:** Reduktase; **IV:** Phosphatase; **V:** 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase; **VI:** 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase; **VII:** Riboflavin Synthase; **VIII:** Flavokinase; **IX:** FAD-Synthetase.

**1:** GTP; **15:** 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat; **16:** 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat; **17:** 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat; **18:** 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat; **19:** 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion; **20:** 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat; **21:** 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin; **22:** Riboflavin; **23:** Ribulose-5-phosphat; **24:** FMN; **25:** FAD.

DBP und ARP werden von der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase (**VI, Lusy**) zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (**21**) kondensiert (Neuberger & Bacher, 1986; Kis & Bacher, 1995). Im letzten Schritt katalysiert die Riboflavin Synthase (**VII**) die Umsetzung von zwei Molekülen Lumazin zu je einem Molekül Riboflavin (**22**) und ARP. Letzteres wird in den Biosyntheseweg zurückgeführt (Plaut, 1960; 1963; Wacker *et al.*, 1964; Harvey & Plaut, 1966). In der Bilanz werden für den Aufbau des Xylenringes des Riboflavins demnach zwei Moleküle DBP und ein Molekül GTP verbraucht.

Die biologisch aktiven Cofaktoren Flavinmononukleotid (**24, FMN**) und Flavinadenindinukleotid (**25, FAD**) entstehen aus Riboflavin durch Phosphorylierung der Seitenkette durch die Riboflavinkinase (**VIII**) bzw. eine weitere Umsetzung mit ATP durch die FAD-Synthetase (**IX**) (Bacher, 1991).

Bifunktionelle Flavokinasen/FAD-Synthetasen konnten in den Eubakterien *C. ammoniagenes* und *E. coli* gefunden werden (Kamino *et al.*, 1985; Manstein *et al.*, 1986, Kitatsujiji *et al.*, 1993; Hagihara *et al.*, 1995; Nakagawa *et al.*, 1995).

Die beiden Eingangsenzyme der Riboflavin-Biosynthese, die GCHII und DBPS, sind in verschiedenen Organismen als monofunktionelle Polypeptide beschrieben worden, so z. B. in *E. coli* (Richter *et al.*, 1992), *Candida guilliermondii* (Volk & Bacher, 1990), und *Methanococcus jannaschii* (Fischer *et al.*, 2002). In Pflanzen (Herz *et al.*, 2000) und *Bacillus subtilis* (Richter *et al.*, 1993) hat man beide Enzymfunktionen in einem bifunktionellen Polypeptid mit zwei getrennten Domänen gefunden.

#### **1.2.3.2 Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *Candida albicans***

Die Natur und Herkunft von 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat als Intermediat der Riboflavin-Biosynthese war lange Zeit unbekannt und Thema intensiver Forschung (Bacher *et al.*, 1983; Volk & Bacher, 1988; 1990; Volk & Bacher, 1991). Nach der Klonierung und Charakterisierung der DBPS aus *E. coli* (Richter *et al.*, 1992) konnten in jüngster Zeit die Röntgenstrukturen der DBPS aus *E. coli* (Liao *et al.*, 2001), *Magnaporthe grisea* (Liao *et al.*, 2002) und *Methanococcus jannaschii* (Steinbacher *et al.*, 2003) gelöst werden. Das Enzym aus *M. jannaschii* wurde



intensiv durch gerichtete Mutagenese untersucht (Fischer *et al.*, 2002), was zur Identifizierung und Charakterisierung zahlreicher essentieller Aminosäurereste des aktiven Zentrums führte. Auf Basis dieser Daten wurde folgender Reaktionsmechanismus vorgeschlagen.

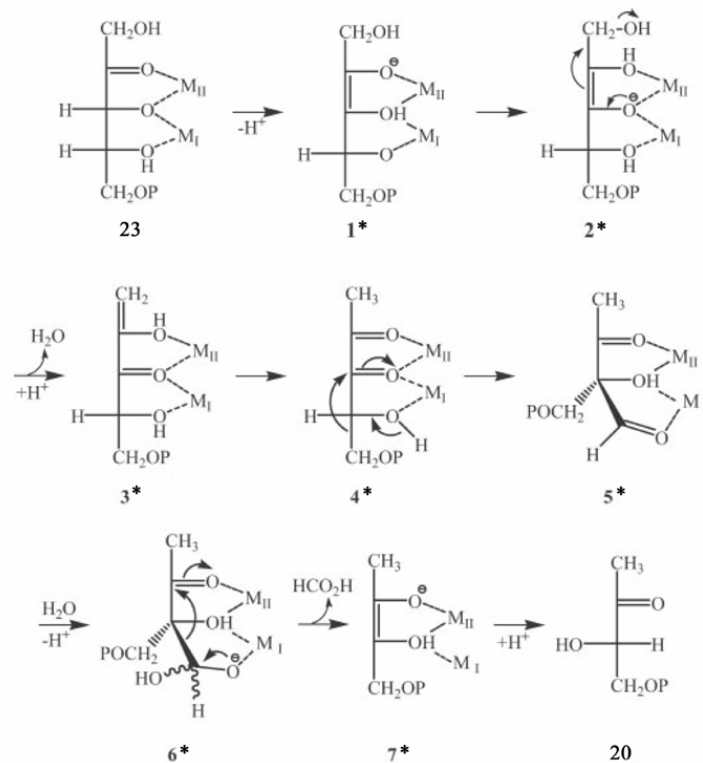


Abb. 1.7: Postulierter Reaktionsmechanismus der DBPS (verändert nach Steinbacher *et al.*, 2003)

Den Eingangsschritt bildet die Enolisierung von Ru5P (**23**) (Abb. 1.7). Das Endiol (**1\***) entsteht nach Abstraktion des Protons, vermutlich vermittelt durch das absolut essentielle und hochkonservierte Glu185 (*M. jannaschii*). Aufgrund der Koordination des Carbonylsauerstoffes von C2 an Metall II ergibt sich die *cis*-Konformation des 2,3-Endiols. Im nächsten Schritt erfolgt Dehydratisierung an C1 und Verschiebung des Protons zwischen O2 und O3. Dafür muß die OH-Gruppe an C1 protoniert und als Wasser abgespalten werden. Als Protonenrelais kommen jeweils die Reste Cys55 und His147 in Betracht, unterstützt durch die stabilisierende Koordination der Sauerstoff-Atome von C2 und C3 an die Metalle I und II. Das resultierende Endiol (**3\***) tautomerisiert zu dem 2,3-Diketon (**4\***), wobei die C2-OH-Gruppe deprotoniert wird, während C1 ein Proton aus dem Lösungsmittel erhält (Volk &

Bacher, 1988). In der folgenden sigmatropen Umlagerung der Phosphomethylen-Gruppe (Volk & Bacher, 1988) zu Intermediat **5\*** wird die C4-OH-Gruppe deprotoniert, während der C3-Sauerstoff ein Proton erhält. Ermöglicht wird diese Umlagerung vermutlich durch den elektronenziehenden Charakter der Carbonylgruppe an C2 und die kompakte Geometrie des Substrates durch die Koordination von O2, O3 und O4 an die beiden Metalle. Im anschließenden Schritt wird die von C4 gebildete Formylgruppe nach Hydratisierung als Formiat abgespalten. Das zunächst gebildete Aldehydhydrat **6\*** könnte durch Koordination an Metall I stabilisiert werden. Nach dem Austritt des Formiates entsteht das Endiol **7\***, welches durch Keto-Enol-Tautomerisierung in DBP (**20**) übergeht.

*Candida albicans* ist ein bedeutender Verursacher von Pilzkrankungen beim Menschen. Obgleich die Hefe ein natürlicher Bestandteil der den Menschen besiedelnden Flora ist, kann es bei Patienten mit eingeschränkter Immunabwehr zu teilweise schweren systemischen Infektionen führen. Besonders durch das Auftreten von HIV hat sich dieses Problem in den letzten Jahrzehnten verschärft.

Über die Biosynthese von Riboflavin in *C. albicans* ist derzeit praktisch nichts bekannt. Da der Mensch Riboflavin über die Nahrung aufnimmt, stellt dieser Vitamin-Biosyntheseweg jedoch ein attraktives Target für die Entwicklung antimikrobieller Wirkstoffe dar, zumal zahlreiche pathogene Mikroorganismen wie z. B. *Salmonella* nicht in der Lage sind, Riboflavin aus dem Medium aufzunehmen.

### 1.3 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Enzyme verschiedener essentieller Stoffwechselwege biochemisch und strukturell charakterisiert werden, um die gewonnenen Erkenntnisse für die Entwicklung neuer Inhibitoren im Sinne rationalen Drug-Designs nutzbar zu machen.

Vorrangiges Ziel der Arbeit war es, in Kooperation mit Kristallographen die Röntgenstruktur der **Transketolase aus *Zea mays*** aufzuklären. Hierzu war es erforderlich, die Kristallisationseigenschaften des Enzyms durch gezielte Modifikation mit Hilfe molekularbiologischer Methoden zu verbessern.

Weiterhin sollte die Tauglichkeit der **Tyrosinhydroxylase aus *Drosophila melanogaster*** für die Röntgenstrukturanalyse untersucht werden. Dazu sollten beide Isoformen des Enzyms sowie deren Einzeldomänen rekombinant exprimiert, gereinigt und damit Kristallisationsversuchen zugänglich gemacht werden.

Die **GTP-Cyclohydrolase I aus *Arabidopsis thaliana*** war biochemischen und strukturellen Untersuchungen kaum zugänglich, da das Protein in *Escherichia coli* nur unlöslich exprimiert wurde. Dieses Problem sollte durch die Verbesserung des Expressionssystems behoben werden, um eine Basis für weitergehende Charakterisierungen z.B. mittels Mutagenese und Kristallographie zu schaffen.

Ein weiteres Ziel lag darin, die **3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *Candida albicans*** biochemisch und röntgenkristallographisch zu charakterisieren. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollten zusammen mit Informationen aus der Mutationsanalyse einen tieferen Einblick in den Reaktionsmechanismus des Enzyms liefern.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

#### **Agarosegelapparatur:**

Elektrophoresekammer Appligene 210 (Appligene, Heidelberg)

#### **Brutschrank:**

B5060 EK-CO (Heraeus, Hanau)

#### **FPLC-Anlagen:**

LKB-GP10 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

ÄKTA*explorer* mit Unicorn Software 3.1 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

#### **Hochdrucksterilisator:**

Sanoclav CV 2/1600 (Kelomat Haushaltsgeräte, Traun, Österreich)

#### **HPLC:**

Pumpe: KNAUER WellChrom Maxi-Star K-1000 V1400 Version 0296 (Berlin)

Säule: Hypersil-ODS-5 $\mu$  250x4,6mm ID SN: 812031R (Schambeck SFB GmbH, Bad Honnef)

Detektor: Gynkotec Fluorescence Spectromonitor RF-530

Schreiber: Spectra-Physics SP 4270 Integrator (Darmstadt)

#### **pH-Meter:**

E 603 mit Standard-Glaselektrode (Deutsche Metrohm, Filderstadt)

#### **Kühlzentrifugen:**

Sorval RC 5B Plus mit den Rotoren GS-3 und SS-34 (Du Pont Instruments, Bad Homburg)

Multi-Funktions-Zentrifuge BR4i mit den Rotoren S40 und AB 2.14 (Jouan, Unterhaching)

#### **Photodokumentation:**

Video Copy Processor P68E (Mitsubishi, Ratingen)

#### **Photometer:**

Novaspec II 2000 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

UV-VIS-Spektralphotometer Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Quarzküvetten (Helma, Mühlheim, Baden)

**PCR-Maschine:**

Biometra Tgradient (Whatman, Maidstone, Kent, UK )

**Schüttelinkubator:**

Certomat HK (B. Braun International, Melsungen)

**SDS-Gel Apparatur:**

Mighty Small SE 250 (Hoefer Scientific Instr., San Francisco, USA)

**Spannungsquellen:**

für Agarosegele: LKB GPS 20/400 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

für SDS-Gele: Power Pac 1000 (BioRad, München)

**Thermoblock:**

Teche DRI-Block DB-2A (Gesellschaft für Laborgeräte mbH, Wertheim)

**Tischzentrifuge:**

Micro Fuge Lite (Beckman, Fullerton, USA)

**Ultraschallgerät:**

Sonifier 250 (Branson SONIC Power Company, Dunbury, Connecticut, USA)

**Ultrazentrifuge:**

Analytische Ultrazentrifuge XL1 mit integriertem Scanning UV/VIS System und Raleigh Interferenz System (Beckman, Fullerton, USA)

**Wasserbad:**

D1 (Haake, Karlsruhe)

**Zellaufschlußmaschine:**

BasicZ (Constant Systems, Warwick, England)

## 2.2 Chemikalien

Standard-Chemikalien wurde von den folgenden Firmen bezogen:

Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen)

- DNA-Marker 100 bp Marker (peqlab Biotech, Erlangen)
- DNA-Reinigungskits Plasmidisolierungskit I, II, Cycle Pure und Gel Extraction (peqlab Biotech, Erlangen)
- dNTPs (peqlab Biotech, Erlangen und Bionline GmbH, Berlin)
- SDS-Marker Dalton Mark VII-L (Sigma, Deisenhofen)

## 2.3 Mikroorganismenstämme

### 2.3.1 Hefestämme

Folgender Hefestamm (Tab. 2.1) wurde für die Überexpression rekombinanten Proteins verwendet.

Stamm	Genotyp	Quelle/Literatur
INVSc1	<i>MAT<math>\alpha</math>/a, his3-<math>\Delta</math>1/his3_<math>\Delta</math>1, leu2/leu2, trp1-289/trp-289, ura3-52/ura3-52</i>	Invitrogen

Tab. 2.1: Verwendeter Hefestamm

### 2.3.2 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme (Tab. 2.2) wurden für die Subklonierung von Plasmiden sowie für die Überexpression rekombinanten Proteins verwendet.

Stamm	Genotyp	Quelle/Literatur
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F', proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10(tet<sup>r</sup>)]</i>	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)
M15[pREP4]	<i>lac, ara, gal, mtl, recA<sup>+</sup>, uvr<sup>+</sup>, [pREP4: lacI, kan<sup>r</sup>]</i>	(Zamenhof & Villarejo, 1972)
BL21(DE3)	<i>F<sup>-</sup>, ompT, hsdS<sub>B</sub>, (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, dcm (DE3)</i>	Novagen
BL21 <i>trxB</i> (DE3)	<i>F<sup>-</sup>, ompT, hsdS<sub>B</sub>, (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, dcm <i>trxB15::kan</i> (DE3)</i>	Novagen
BL21[pRep4-Cat-Lys-K128MΔ <i>lacI</i> ]	<i>F<sup>-</sup>, ompT, hsdS<sub>B</sub>, (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, dcm (DE3), [pRep4-Cat-Lys-K128MΔ<i>lacI</i>, kan<sup>r</sup>]</i>	Dr. Markus Fischer
Rosetta-gami (DE3)	<i>ahpC<sup>*</sup> Δara-leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvull phoR araD139 galE galK rpsL ΔmalF3 F' [lac<sup>+</sup>(lacI<sup>q</sup>)pro] gor522 ::Tn10 (Tc<sup>R</sup>) <i>trxB::kan</i> (DE3) pRARE<sup>2</sup> (Cm<sup>R</sup>)</i>	Novagen

Tab. 2.2: Verwendete Bakterienstämme

## 2.4 Expressionsvektoren

### 2.4.1 pNCO113

Als Expressionsvektor für *E. coli* wurde das Plasmid pNCO113 aus der pDS-Familie eingesetzt. Es leitet sich von den Plasmiden pDS56/RBSII und pDS781/RBSII-DHFRS (Stüber *et al.*, 1990) ab und liegt in der Zelle in mittlerer Kopienzahl vor.

Neben den Standardstrukturelementen wie Replikationsursprung (*ori*), T5-Promotor, ribosomaler Bindungsstelle (welche aus der Shine-Dalgarno-Sequenz zusammen mit dem ATG-Start-Codon gebildet wird), Polylinker, zwei Transkriptionsterminatoren und β-Lactamasegen besitzt der Vektor noch zwei *lac*-Operatoren, die eine Regulation des starken T5-Phagenpromotors erlauben.

Hierzu wird der pNCO113 zusammen mit dem pREP4-Vektor im Expressionsstamm *E. coli* M15 eingesetzt, der über zusätzliche Kopien des *lacI*-Gens verfügt und so die Zelle zur konstitutiven Expression des *lac*-Repressors befähigt. Über das *neo*-Gen, welches die Neomycinphosphotransferase II codiert, vermittelt das Plasmid pREP4 außerdem eine Kanamycinresistenz.

#### 2.4.2 Das pET-System

Das pET-System („*plasmid for Expression by T7 RNA Polymerase*“) wurde entwickelt für die effiziente Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*. Ermöglicht wird dies durch ein Zusammenspiel DE3-lysogener Expressionsstämme und den Vektoren der pET-Serie (Chamberlin *et al.*, 1970).

Der DE3-Bakteriophage ist stabil ins Genom spezieller Wirtsstämme (2.3.2) integriert und beinhaltet das *lacI*-Gen und die T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promoters. In Anwesenheit des *lacI*-Repressors wird die Transkription der T7 RNA-Polymerase unterdrückt. Durch Zugabe eines Induktors wie Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (**IPTG**), kann sie gezielt induziert werden. Die T7 RNA-Polymerase erkennt keine *E. coli*- Promotoren, so daß es nicht zu unbeabsichtigter Expression von *E. coli* eigenen Genen kommt.

Die Vektoren der pET-Serie ermöglichen die Klonierung eines Gens hinter den spezifischen  $\Phi$ 10-Promoters des Bakteriophagen T7. Dieser wird von T7 RNA-Polymerase, nicht jedoch von der *E. coli*-RNA-Polymerase erkannt. Zur Produktion rekombinanter Proteine wird ein pET-Plasmid mit dem entsprechenden Insert in einen DE3-lysogenen Wirtsstamm transformiert. Durch Zugabe von IPTG kann zum gewünschten Zeitpunkt die Expression von T7 RNA-Polymerase induziert werden. Diese kann nun das klonierte Gen unter der Kontrolle des  $\Phi$ 10-Promoters transkribieren.

Die pET-Vektoren (Tab. 2.3) wurden vor allem mit Blick auf effizientere Reinigung und bessere Löslichkeit der rekombinanten Proteine vielfach weiterentwickelt. Die Mehrheit der Verbesserungen stellen Fusionen mit sogenannten *Tags*. Bei diesen handelt es sich um Erkennungssequenzen, die verschiedene Möglichkeiten der Identifizierung, Reinigung und Lokalisierung des exprimierten Proteins bieten.



Plasmid	Wesentliche Eigenschaften	Quelle
pET3a	<i>amp</i> <sup>R</sup> , T7-Promotor	Novagen
pET14b	<i>amp</i> <sup>R</sup> , T7-Promotor, N-terminaler His•Tag, Thrombinschnittstelle	Novagen
pET32a(+)	<i>amp</i> <sup>R</sup> , T7/lac-Promotor, N-terminaler His•Tag und Trx•Tag, Thrombin- und Enterokinaseschnittstelle,	Novagen

Tab. 2.3: Verwendete pET-Vektoren

Durch die Verwendung von Thioredoxin-Reduktase defizienten Wirtsstämmen wie BL21*trxB* (DE3) kann außerdem die Bildung von Disulfidbrücken im bakteriellen Cytoplasma ermöglicht werden (Derman *et al.*, 1993). Thioredoxin-Reduktase verhindert über einen bisher nicht vollständig verstandenen Mechanismus die Bildung von Disulfidbrücken. Der Stamm Rosetta-gami (DE3) verfügt zusätzlich über eine Deletion der Glutathion-Reduktase, was die Bildung von Disulfid-Brücken, v.a. in Verbindung mit dem pET32-Vektor, nochmals erleichtern kann.

### 2.4.3 Hefeexpressionsvektoren

Folgende Vektoren (Tab. 2.4) wurden für die Überexpression rekombinanten Proteins in *S. cerevisiae* verwendet.

Plasmid	Wesentliche Eigenschaften	Quelle/Literatur
pYES2	<i>amp</i> <sup>R</sup> , <i>URA3</i> , <i>GAL1</i> -Promotor	Invitrogen
pVT103-U	<i>amp</i> <sup>R</sup> , <i>URA3</i> , <i>ADH1</i> -Promotor	Vernet <i>et al.</i> , 1987

Tab. 2.4: Verwendete Hefe-Expressionsvektoren

## 2.5 Proteine und Nukleinsäuren

- $\alpha$ -Tyrosinhydroxylase, monoklonaler Antikörper aus Maus (Chemicon, Temecula, CA, USA)
- $\alpha$ -Penta-His, monoklonaler Antikörper aus Maus (Qiagen, Hilden)
- $\alpha$ -Maus Antikörper-HRP-Konjugat (ImmunoResearch, Burlingame, CA, USA)
- BSA (New England Biolabs, Schwalbach)
- Lysozym (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Phosphoriboisomerase (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Thrombin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Triosephosphatisomerase (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Schwalbach)
- Taq-Polymerase (Eurogentec, Seraign, Belgien)
- DyNAzyme EXT DNA-Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland)
- Alkalische Phosphatase, Shrimp (Roche)
- T4 DNA-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach)
- Lyticase (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Genomische DNA von *Candida albicans* (ATCC No. 10231D)
- Oligonukleotide (Thermo Electron GmbH, Ulm)

## 2.6 Nährmedien und Antibiotika

Für die Herstellung von Nährmedien wurde entionisiertes Wasser verwendet. Alle Medien wurden nach dem Autoklavieren bei 4 °C gelagert.

### Medien zur Anzucht von *E. coli*

Luria-Bertani-Medium (LB):	Pepton	10 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1L
	Für Platten: Agar	20 g

Minimalmedium für <sup>15</sup> N-Anzucht:	Vitamin-Mix (250x)	4 mL
	50% Glucose-Lösung	10 mL
	Spurenelemente-Mix (1000x)	1 mL
	1 M MgSO <sub>4</sub>	2 mL
	50 mM CaCl <sub>2</sub>	4 mL
	<sup>15</sup> N-Ammoniumchlorid	1-2 g
	M9-Salz-Mix (10x)	100 mL
	steriles H <sub>2</sub> O	ad 1L

<sup>15</sup>N-Ammoniumchlorid wurde unmittelbar vor der Zugabe in 10 mL H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert.

*M9-Salz-Mix (10x):*

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	16,65 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,82 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,88 g
H <sub>2</sub> O	ad 1L

Die Lösung wurde autoklaviert. Der pH-Wert sollte bei 6,8 liegen.

*Vitamin-Mix (250x):*

Pyridoxamin-HCl	20 mg
Thiamin	40 mg
Riboflavin	20 mg
p-Aminobenzoesäure	20 mg
Ca-Pantothenat	20 mg
Biotin	20 mg
Folsäure	10 mg
Nicotinsäureamid	15 mg
Cyanocobalamin (1:100 Verreibung in Mannit)	100 mg
H <sub>2</sub> O	ad 1L

Unter Erwärmen lösen und dann sterilfiltrieren. 50 mL Aliquots wurden bei -20 °C eingefroren und nach dem Auftauen bei 4 °C gelagert.

*M9-Spurenelemente-Mix (1000x):*

EDTA • H <sub>4</sub>	50 g
FeSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	8,5 g
MnCl <sub>2</sub> • 4 H <sub>2</sub> O	13,5 g
ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	0,9 g
CuCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	0,2 g
NiO <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	0,2 g
CoO <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	0,1 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 g
H <sub>2</sub> O	ad 1L

Der pH wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt und die Lösung anschließend autoklaviert.

Antibiotika wurden in den angegebenen Konzentrationen kurz vor Gebrauch im abgekühlten Medium gelöst:

Ampicillin	170 mg/L
Chloramphenicol	15 mg/L
Kanamycin	15 mg/L
Tetracyclin	12,5 mg/L

SOC-Medium:	2% Pepton
	0,5% Hefe-Extrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM MgSO <sub>4</sub>
	20 mM Glucose

Das Medium wurde autoklaviert und danach bei 4 °C gelagert.

**Medien zur Anzucht von *S. cerevisiae*:**

YPD:	Pepton	10 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	Glucose	20 g
	1 M NaOH	1 mL
	H <sub>2</sub> O	ad 1L
	Für Platten: Agar	20 g

---

URA-Selektionsmedium: (reprimierend)	Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)	6,7 g
	Supplement-Aminosäuren-Mix (ohne Uracil)	2 g
	Glucose	20 g
	1 M NaOH	1 mL
	H <sub>2</sub> O	ad 1L
	Für Platten: Agar	20 g
URA-Selektionsmedium: (nicht reprimierend)	Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)	6,7 g
	Supplement-Aminosäuren-Mix (ohne Uracil)	2 g
	Glycerin	50 mL
	Glucose	2 g
	1 M NaOH	1 mL
	H <sub>2</sub> O	ad 1L
URA-Selektionsmedium: (zur Induktion)	Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)	6,7 g
	Supplement-Aminosäuren-Mix (ohne Uracil)	2 g
	20% Galaktose (sterilfiltriert)	100 mL
	1 M NaOH	1 mL
	H <sub>2</sub> O	ad 1L

## 2.7 Säulenmaterialien

Q-Sepharose-Fast-Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

DEAE Cellulose DE-52 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Hydroxyapatit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Phenyl Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

BD TALON (Clontech, Palo Alto, CA, USA)

*Fertig bezogene Säulen:*

HiLoad Superdex 200pg 26/60 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

HiLoad Superdex 75pg 16/60 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

HiLoad Superdex 75pg 26/60 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Q10, 10030 (BioRad, München)

CHT5-I, 10380 (BioRad, München)

Hypersil 5  $\mu$  C18 (ODS) (Phenomenex, Aschaffenburg)

## **2.8 Puffer**

Der pH-Wert der Puffer wurde bei Raumtemperatur mit einer Standardglaselektrode eingestellt. Alle Puffer enthielten 0,02 % Natriumazid. Die detaillierten Pufferzusammensetzungen sind in den betreffenden Kapiteln aufgeführt.

### 3 Methoden

#### 3.1 Mikrobiologische Methoden

##### 3.1.1 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

###### 3.1.1.1 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurde die Methode nach Hanahan (Hanahan, 1983) verwendet. Mit dieser Methode konnten Transformationsraten von  $10^6$  bis  $10^7$  Kolonien pro  $\mu\text{g}$  supercoiled Plasmid-DNA erreicht werden.

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden 200 mL LB-Medium (mit Antibiotika-zusätzen je nach Zelltyp) mit 2 mL einer bei 28 °C gewachsenen Übernachtskultur angeimpft und mit 2 mL einer 2 M  $\text{Mg}^{2+}$ -Lösung (Endkonzentration: 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgSO}_4$ ) versetzt. Bei 37 °C im Schüttelinkubator (200 U/min) bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,4$  bebrütet. Um das Zellwachstum zu stoppen, wurde die Kultur 15 min auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (2300 U/min, 30 min, 4 °C). Der Rückstand wurde in 100 mL eiskaltem RF1-Puffer aufgenommen. Nach weiteren 15 min Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert (2300 U/min, 30 min, 4 °C), das Pellet in 10 mL eiskaltem RF2-Puffer suspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden in Kryo-Gefäße zu 0,8 mL portioniert und zur Langzeitlagerung sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

**RF1-Puffer:**

- 100 mM RbCl
- 50 mM  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
- 30 mM K-Acetat
- 10 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 15 % (w/v) Glycerin
- pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert

<b>RF2-Puffer:</b>	10 mM MOPS
	10 mM RbCl
	75 mM CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O
	15 % (w/v) Glycerin
	pH 6,3 mit Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert

Für die Transformation wurde der gesamte Ligationsansatz (3.2.6), oder 1 µL Plasmid (3.2.2) mit 200 µL chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Um die Zellwände für den Vektor durchlässig zu machen, wurde der Ansatz für 90 s im Wasserbad auf 42 °C erwärmt. Zur Regeneration der Zellwände wurde sofort wieder auf Eis abgekühlt (2 min). Nach Zugabe von 800 µL SOC-Medium (2.6) erfolgte die phänotypische Expression für 30 min bei 37 °C. Je 20 µL bzw. 200 µL des Ansatzes wurden auf Selektionsplatten (2.6) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Bei Verwendung kompetent bezogener Zellen (Novagen) wurden nur 20 µL Zellen pro Ansatz verwendet. Die Inkubationsdauer auf Eis nach DNA-Zugabe verkürzte sich auf 5 min, der anschließende Hitzeschock auf 45 s. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurden 80 µL SOC-Medium zugegeben und 30 min bei 37 °C geschüttelt. 50 µL des Ansatzes wurden auf eine Selektionsplatte ausgestrichen.

### **3.1.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen**

Das Pellet einer über Nacht in YPD-Medium gewachsenen Hefe-Kultur (3.1.2.2) wurde in 50 mL frischem YPD-Medium resuspendiert (resultierende OD<sub>600nm</sub> = 0,4) und für weitere 3-4 h bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur 5 min bei 1000 g pelletiert und anschließend in 10 mL 1x TE-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 2 mL 1x Lithium-Acetat, 0,5x TE resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Je 100 µL der kompetenten Zellen wurden mit 1 µg der zu transformierenden DNA versetzt und mit 700 µL 1x TE, 1x Lithium-Acetat, 40% PEG 3350 gut vermischt. Nach 30 min bei 30 °C wurden 88 µL Dimethylsulfoxid zugegeben und ein 7 minütiger Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt. Nun wurden die Zellen für einige Sekunden bei Raumtemperatur pelletiert, in 100 µL 1x TE resuspendiert und auf



eine Selektionsplatte ausplattiert. Die weitere Inkubation erfolgte bei 30 °C. Erste Kolonien erschienen nach 1-3 Tagen.

**1x TE-Puffer:**                    10 mM Tris/HCl  
    1 mM EDTA  
    pH 7.5

**1x Li-Acetat :**                    100 mM Li-Acetat pH 7.5

### **3.1.2 Fermentation und Zellernte**

#### **3.1.2.1 Bakterienanzucht**

Die Fermentation aller *E. coli*-Stämme erfolgte in Schüttelkolben unter Verwendung von LB-Medium (2.6). Antibiotika wurden in der für den jeweiligen Stamm benötigten Anzahl und Konzentration verwendet.

Vorkulturen wurden direkt von Platte oder aus Glycerinkultur in 25 mL Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C in 100 mL-Erlenmeyerkolben geschüttelt. Die Hauptkultur wurde 1:100 in 500 mL Medium in 2 L-Erlenmeyerkolben inokuliert. Die Fermentation erfolgte für XL1-Stämme bei 37 °C über Nacht.

Bei induktionsabhängigen Kulturen (M15, pET-Wirtsstämme) wurde die Kultur bis zum Erreichen einer  $OD_{600nm} = 0,6$  bei 37 °C geschüttelt (150 rpm). Die Induktion erfolgte mit steriler IPTG-Lösung in einer Endkonzentration von 1mM. Je nach Bakterienstamm und Expressionskonstrukt wurde die Induktionsphase für 3-16 h bei Temperaturen von 37°, 20° oder 18 °C unter Schütteln fortgeführt. Testexpressionskulturen wurden in einem Volumen von 25-50 mL Medium unter ansonsten identischen Bedingungen durchgeführt.

Für die Anzucht mit <sup>15</sup>N-markiertem Ammoniumchlorid wurde das unter (2.6) beschriebene Medium verwendet.

### 3.1.2.2 Hefeanzucht

#### *Nicht-induzierte Kulturen*

20-50 mL URA-Selektionsmedium (reprimierend, 2.6) wurden von Platte oder aus Glycerinkultur in einem 100 mL-Erlenmeyerkölbchen angeimpft und bei 30 °C unter Schütteln bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert. Für die Herstellung kompetenter Zellen (3.1.1.2) wurde YPD-Medium (2.6) verwendet.

#### *Galaktose-induzierte Kulturen*

Für Testexpressionskulturen wurden 50 mL URA-Selektionsmedium (nicht reprimierend, 2.6) angeimpft und beim Erreichen der gewünschten  $OD_{600nm}$  mit 5 mL 20% Galaktoselösung induziert. Die Kulturen wurden für weitere 48 h bei 30 °C geschüttelt und in regelmäßigen Abständen 5 mL-Proben entnommen. Die entsprechenden Pellets wurden bis zur weiteren Analyse bei –20 °C gelagert.

Für die Hauptkultur wurden je 750 mL URA-Selektionsmedium in 2 L-Erlenmeyerkolben mit 25 mL stationärer Vorkultur inokuliert und bis zum Erreichen der stationären Phase bei 30 °C geschüttelt. Dann wurde mit je 80 mL 20% Galaktoselösung induziert und weitere 36 - 48 h kultiviert.

Für die Fermentation im Fermenter wurden 11 L URA-Selektionsmedium (nicht reprimierend) mit 200 mL stationärer Vorkultur inokuliert und bei einer Sauerstoffzufuhr von 3 L/h und einer Rührgeschwindigkeit von 500 rpm bei 30 °C bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert. Die Induktion erfolgte mit 1,2 L 20% Galaktoselösung für weitere 36 h.

### 3.1.3 Stammhaltung

Für kurzzeitige Lagerung von 1 –2 Wochen wurden sowohl Bakterien als auch Hefen auf Selektionsplatten bei 4 °C gelagert. Für Langzeitlagerung wurden 2 mL einer stationären Kultur des betreffenden Klones pelletiert, die Zellen in 1 mL Vollmedium (2.6) mit 50% Glycerin resuspendiert und bei –80 °C gelagert.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung von DNA unterschiedlicher Grösse wurde eine Gelelektrophorese in 1 bis 3 % Agarosegelen durchgeführt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf 60 °C in den Gelträger gegossen. Durch die Agarose geliert die Lösung beim Abkühlen und der Träger mit dem Gel kann in die Elektrophoresekammer eingesetzt werden. Nach Überschichten des Gels mit TAE-Puffer wurden die Proben (1:10 mit Probenpuffer versetzt) in die Taschen pipettiert und das Gel bei 150 V entwickelt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte, nach 15 minütiger Inkubation in Ethidiumbromidlösung (0,1 %) unter Lichtausschluss, durch Betrachtung im UV-Licht bei 323 nm.

**TAE-Puffer:**                    40 mM Tris  
    2 mM EDTA  
    pH 8,2 mit Essigsäure eingestellt

**Probenpuffer:**                50 % (v/v) Glycerin  
    0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
    0,25 % (w/v) Xylencyanol  
    in TAE-Puffer gelöst

### 3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden die E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kits I und II (2.2) nach Herstellerangaben verwendet. Für die Gewinnung von bis zu 25 µg DNA wurden 5 mL Übernachtskultur und der Kit I eingesetzt. Die Elution der reinen DNA erfolgte in 50 µL sterilem Wasser.

Für DNA-Mengen bis 75 µg wurde der Kit II und 10 mL Übernachtskultur verwendet. Das Elutionsvolumen betrug 60 – 80 µL.

### **3.2.3 Reinigung von DNA-Fragmenten**

#### **3.2.3.1 Direkte Reinigung**

PCR-Fragmente (3.2.4) vor und nach der Restriktion (3.2.5) bzw. linearisierte Plasmid-DNA wurden nach Herstellerangaben mithilfe des E.Z.N.A. Cycle-Pure Kits (2.2) von Primern, dNTPs, Enzymen, etc. gereinigt. Je nach weiterer Anwendung der gereinigten DNA wurde in 20 – 80 µL sterilem Wasser eluiert.

#### **3.2.3.2 Reinigung aus Agarosegelen**

Zur Reinigung eines bestimmten DNA-Fragmentes aus einem Gemisch wurde die Probe mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.1) aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und die gewünschte Bande auf einem UV-Leuchttisch mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die weitere Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (2.2). Das Elutionsvolumen betrug je nach weiterer Verwendung der DNA 20 – 80 µL.

### **3.2.4 Polymerasekettenreaktion**

Die von Mullis & Faloona 1987 entwickelte Methode zur Vervielfältigung von DNA wurde zur Amplifikation, Gentotalsynthese und Mutagenese der Ziel-DNA und zur Analyse von Bakterienklonen verwendet.

#### **3.2.4.1 Standard-PCR**

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1985) können innerhalb kurzer Zeit definierte DNA-Abschnitte *in vitro* enzymatisch exponentiell amplifiziert werden. Für die PCR-Reaktion werden zwei komplementäre Oligonukleotide (Primer) benötigt, die die zu amplifizierende Sequenz auf der DNA-Matrize einschließen. Dadurch sind thermostabile DNA-Polymerasen wie z. B. *Taq*, *Pwo*

und Deep Vent in der Lage, aus diesen Primern unter dNTP Verbrauch doppelsträngige DNA neu zu synthetisieren, die um das  $10^6$  bis  $10^7$ fache gegenüber der Ausgangskonzentration an Matrizen-DNA angereichert ist.

Für einen präparativen PCR-Ansatz (100  $\mu$ L) wurden 10 ng Matrizen-DNA, je 100 pmol Primer und 1 U thermostabile DNA-Polymerase in Anwesenheit von 1,5 mM  $MgCl_2$  eingesetzt.

Für einstufige PCR-Versuche wurde Taq eingesetzt, bei mehrstufigen PCR-Amplifikationen (wie z. B. Gensynthese) wurde für alle Schritte bis auf den letzten EXT eingesetzt, um die Mutationsrate möglichst gering zu halten.

Ein Standard-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

- 10  $\mu$ L Pufferkonzentrat 10 fach
- 8  $\mu$ L dNTP`s (je 200  $\mu$ M)
- 1  $\mu$ L Primer 1 (100 pmol)
- 1  $\mu$ L Primer 2 (100 pmol)
- 1  $\mu$ L Matrize (10ng)
- 1  $\mu$ L thermostabile DNA-Polymerase
- 78  $\mu$ L Wasser

**Pufferkonzentrat:** 750 mM Tris/HCl, pH 9,0  
 200 mM  $(NH_4)_2SO_4$   
 0,1 % (w/v) Tween 20  
 15 mM  $MgCl_2$

Die Polymerasekettenreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

Schritt:	1	2	3	4	5	6
Temp. :	95 °C	95 °C	48 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Dauer:	5 min	30 s	45 s	x s*	2 min	$\infty$
25 – 30 Wiederholungen						

\*Die Dauer von Schritt 4 richtete sich nach der Länge der zu erwartenden Fragmentlänge wobei gilt: 1000 bp benötigen 1 min Polymerisationsdauer

### 3.2.4.2 Gensynthese

Bei der Gensynthese wird eine synthetische Doppelstrang-DNA aus zwei sich überlappenden Primern in einem Standard-PCR-Ansatz ohne zusätzliche Matrizen-DNA erzeugt. Dieses Fragment wird dann beidseitig in aufeinander folgenden PCR-Amplifikationen durch weitere Primerpaare verlängert, bis das gewünschte Gen aufgebaut ist.

Für die letzte PCR wurde Taq-Polymerase bei einer Zyklenanzahl von 25 eingesetzt. Alle vorherigen Amplifikationen wurden mit EXT-Polymerase und nur 20 Zyklen durchgeführt. Die jeweils resultierenden Amplifikaten wurden mittels Gel-Extraktion (3.2.3.2) gereinigt, in 30 µL Wasser eluiert und hiervon 2 µL als Matrize für die folgende PCR eingesetzt.

### 3.2.4.3 PCR-Screening

Zur schnellen Analyse von Transformanden wurden über Nacht angewachsene Transformationskolonien mit einem sterilen Zahnstocher angepickt und das un-aufgeschlossene Zellmaterial in 30 µL Standard-PCR-Ansatz (3.2.4.1) ohne Matrize resuspendiert. Die PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Durch mehrmaliges Anstechen einer frischen Selektionsplatte mit den verwendeten Zahnstochern wurden Subkulturen der analysierten Klone angelegt.

### 3.2.4.4 Oligo-Annealing

Oligo-Annealing wurde angewandt, wenn eine Mutation in einen kurzen DNA-Abschnitt von ca. 50 bp eingeführt werden sollte. Die Oligos wurden so entworfen, daß sie nach dem Annealing eine doppelsträngige DNA bilden, die dem gewünschten Bereich nach Restriktion entspricht. Ein Standard-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

10 µL Pufferkonzentrat 10 fach  
1 µL Primer 1 (100 pmol)  
1 µL Primer 2 (100 pmol)  
82 µL H<sub>2</sub>O

Das Oligo-Annealing wurde wie folgt durchgeführt:

<b>Schritt:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Temp. :	95 °C	70 °C	50 °C	30 °C	4 °C
Dauer:	3 min	30 s	30 s	30 s	∞

Für Ligationen wurden 5 µL des Annealing-Ansatzes als Insert verwendet.

### 3.2.5 DNA-Verdau mittels Restriktionsenzymen

Die Restriktion präparativer DNA-Mengen (20 – 50 µg) wurde in Abhängigkeit vom Ausgangsvolumen der DNA-Lösung in einem Gesamtvolumen von 60 -120 µL durchgeführt. Dazu wurden der DNA-Lösung 10 units der Restriktionsendonuklease pro µg DNA und die adäquate Menge des Reaktionspuffers (10-fach Konzentrat) zupipettiert. Das fehlende Volumen wurde mit sterilem Wasser ergänzt. Die Inkubationszeit betrug zwischen 3 und 16 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (in der Regel 37 °C).

### 3.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die enzymatische Verknüpfung des Inserts mit dem Expressionsvektor durch Bildung von Phosphorsäurediesterbrücken zwischen 3'-Hydroxylgruppen und 5'-Phosphatgruppen erfolgte mit Hilfe der T<sub>4</sub>-Ligase. Dazu wurde der verdaute Vektor mit der zwei- bis fünffachen Menge an verdaulichem Insert in einem Gesamtvolumen von 17 µL vermischt. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 50 °C und Abkühlen auf Eis (5 min), wurde der Ansatz mit 2 µL T<sub>4</sub>-Puffer (10-fach Konzentrat) und 1 µL T<sub>4</sub>-Ligase komplettiert und entweder für 16 h bei 4 °C oder 1 h bei 16 °C inkubiert.

**T<sub>4</sub>-Puffer 10-fach Konzentrat:** 500 mM Tris/HCl, pH 7,5  
 100 mM MgCl<sub>2</sub>  
 100 mM DTT  
 10 mM ATP  
 250 µg/mL BSA

### 3.2.7 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierung erfolgte durch den Custom-DNA-Sequenzierung-Service der Firmen MWG Biotech (Ebersberg) oder GATC Biotech AG (Konstanz). 20 – 30 µL der Plasmid-DNA-Lösung (3.2.2) sowie ein Aliquot des gewünschten Primers wurden entsprechend den Firmenvorgaben vorbereitet und bei Raumtemperatur verschickt. Die Sequenzanalyse erfolgte gemäss der Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

## 3.3 Proteinpräparation und Analytik

### 3.3.1 Zellaufschluss

Rohextraktvolumina über 5 mL wurden entweder in einer Zellaufschlußmaschine (Bakterien und Hefen) oder mittels Ultraschall (nur Bakterien) hergestellt. Für kleinere Volumina wurde im Falle von Bakterienzellen ebenfalls Ultraschall verwendet, während für Hefezellen Glasperlen verwendet wurden.

Die jeweils resultierenden Lysate wurden 20 min bei 4 °C mit  $rcf = 20\,000\,g$  zentrifugiert und die Überstände (Rohextrakt) weiterverwendet. Eine Probe des Pellets wurde in 1x SDS-Probenpuffer gelöst und bis zur Analyse mittels SDS-PAGE bei 4 °C gelagert

#### *Präparativer Ultraschallaufschluß*

Das Zellpellet wurde in 10 mL Aufschlußpuffer je Gramm feuchter Zellmasse aufgenommen und in 50 mL Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde unter Eiskühlung in vier Intervallen von je 30 s mit 1 min Pausen sonifiziert (1,5 cm Tellersonde, Stärke 4).

#### *Analytischer Ultraschallaufschluß*

Zellpellets von bis zu 50 mL stationärer Kultur wurden in 1,5 mL Aufschlußpuffer resuspendiert und in 2 mL Eppendorfgefäße überführt. Die Suspension wurde mit 3 x 8 Pulsen (80%) mit je 30 s Pause sonifiziert.



### Zellaufschlußmaschine

Der Aufschluß erfolgte in einer Zellaufschlußmaschine mittels Prallstrahlverfahren. Dabei wird die Suspension mittels Hochdruckpumpe auf Drücke bis zu 2,5 kbar verdichtet und dann durch eine Düse entspannt. Nach dem Durchtritt durch die Düse wird die Suspension im Freistrah auf eine Prallplatte geführt, wo sie mit hoher Geschwindigkeit auftrifft. Die Beanspruchung der Zellen erfolgt sowohl durch Kavitationen im Bereich der Düse als auch durch das Auftreffen auf der Prallplatte. Der Aufschluß erfolgte mit einem Druck von 2,5 kbar für Hefezellen bzw. 1,8 kbar für Bakterienzellen. Vorhandene genomische DNA wurde vor einem eventuellen zweiten Durchlauf durch 3 x 20 s Ultraschall (1,5 cm Tellersonde, Stärke 4) zerkleinert.

### *Glasperlenaufschluß*

Das Zellpellet wurde zunächst in 500 µL Aufschlußpuffer gewaschen und dann für 5 min bei 4 °C und 1500 g wieder pelletiert. Nun wurden die Zellen in dem für eine OD<sub>600</sub> von 50 erforderlichen Volumen Aufschlußpuffer resuspendiert. Das Volumen wurde bei bekannter OD<sub>600</sub> der Kultur zum Zeitpunkt der Ernte mit Hilfe folgender Gleichung (Gl. 3.1) ermittelt:

$$V_{\text{Res}} = \frac{(\text{Ernte OD}_{600}/\text{ml}) \cdot V_{\text{E}}}{50 \text{ OD}_{600}/\text{ml}} \quad \text{Gl. 3.1}$$

$V_{\text{Res}}$  = benötigtes Volumen Aufschlußpuffer [mL]

$V_{\text{E}}$  = Volumen der Kultur zum Erntezeitpunkt [mL]

Nun wurde das gleiche Volumen an Glasperlen zugesetzt und 4\*30 s mit je 30 s Pause gevortext.

### **3.3.2 SDS-Gelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte nach der Methode von Lämmli (Laemmli, 1970) Es wurden in Abhängigkeit zur erwarteten Größe des interessierenden Proteins Trenngele von 10 – 16 % und 3 % Sammelgele verwendet.

<b>Acrylamidlösung:</b>	40 % (w/v) Acrylamid / N,N`-Methylen-bis-acrylamid-Lösung (Acrylamid : N,N`-Methylen-bis-acrylamid = 29 : 1)
<b>APS-Lösung:</b>	10 % (w/v)
<b>Trenngelpuffer (4-fach):</b>	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
<b>Sammelgelpuffer (2-fach):</b>	0,25 M Tris/HCl, pH 6,3 0,2 % (w/v) SDS
<b>Laufpuffer:</b>	25 mM Tris/HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
<b>Probenpuffer:</b>	100 mM Tris/HCl, pH 6,8 20 % (w/v) Glycerin 4 % SDS 4 % Mercaptoethanol 0,05 % Bromphenolblau
<b>Färbelösung:</b>	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Eisessig 0,2 % (w/v) Coomassie Blue R250
<b>Entfärbelösung:</b>	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Eisessig

Als Marker diente der SDS-Marker Dalton Mark VII-L von Sigma (Deisenhofen), der folgende Banden auf dem SDS-Gel zeigt (Abb. 3.1):

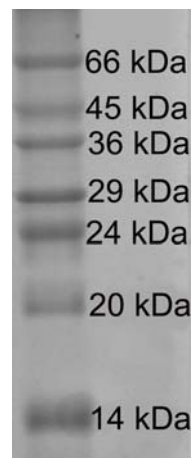


Abb 3.1: SDS-Marker auf 16 % SDS-Gel.

### 3.3.3 Proteinreinigung

Alle säulenchromatographischen Reinigungsschritte wurden entweder in einem auf 4 °C temperierten Raum an einer Piccolo-Anlage oder dem Äkta Explorer System (2.1) bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die jeweiligen Säulenmaterialien wurden entsprechend der Herstellerempfehlungen vorbereitet und verwendet. Puffer wurden vor der Verwendung filtriert und entgast. Proteinhaltige Fraktionen wurden während des Laufes anhand der  $OD_{280nm}$  ermittelt und in definierten Fraktionen aufgefangen.

#### **Immobilisierte Metallaffinitäts-Chromatographie (IMAC)**

Chelating Sepharose Fast Flow wurde nach Herstellerangaben in einen Säulenkörper mit dem gewünschten Volumen gefüllt, mit  $NiSO_4$  beladen und mit 5 Säulenvolumen (**SV**) entionisiertem Wasser gespült. Nun wurde die Säule im gewünschten Startpuffer äquilibriert. Grundsätzlich kam dabei weder EDTA noch DTT zur Anwendung.

Nach dem Auftragen der Probe wurden nicht bindende Proteine durch Waschen mit 5 SV Startpuffer entfernt. Ein optionaler weiterer Waschschrift (3 SV) wurde mit 2 – 5 mM Imidazol in Startpuffer durchgeführt. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte über 3 SV durch Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 200 mM. Anschließend wurde die Säule mit 1 SV 1 M Imidazol gewaschen.

Bei Verwendung des *Gravity-Flow-Verfahrens* für kleinere Probenvolumina oder zur Testung verschiedener Metall-Liganden wurde das Säulenmaterial (Chelating Sepharose Fast Flow oder BD Talon) in ein oben offenes Tropfsäulchen gefüllt, mit dem entsprechenden Kation beladen, gewaschen und anschließend im Startpuffer äquilibriert. Nach dem Applizieren und vollständigen Einsickern der Probe wurde die Säule mit 5 x 1 SV Startpuffer gewaschen. Optional wurde ein zusätzlicher Waschschrift von 3 x 1 SV 5 mM Imidazol durchgeführt. Die Elution des Zielproteins erfolgte mit 3 SV 200 mM Imidazol. Die verwendeten Puffer wurden während der gesamten Reinigung auf Eis gekühlt.

### **Inonenaustausch-Chromatographie**

#### *Q-Sepharose Fast Flow*

Eine Q-Sepharose Fast Flow-Säule (2.7) mit 50 mL SV wurde in Aufschlußpuffer äquilibriert. Nach Auftragen der Probe mit einer Flußgeschwindigkeit von 3 mL/min wurde solange mit Aufschlußpuffer gewaschen, bis die OD<sub>280nm</sub> wieder die Grundlinie erreicht hatte. Nun wurde die Säule, wenn nicht anders angegeben, durch einen Gradienten von 0 – 100% Elutionspuffer über 10 SV entwickelt, wobei Fraktionen von 10 mL gesammelt wurden. Zur Regeneration der Säule wurde mit 1 SV Elutionspuffer gespült.

#### *DE52*

Eine DE52-Säule (2.7) mit 20 oder 38 mL SV wurde mit einer Flußrate von 1 mL/min und Fraktionen von 3 mL ansonsten jedoch analog zu Q-Sepharose-FF betrieben.

#### *Q10*

Die Q10-Säule (2.7) wurde mit einer Flußrate von 3 mL/min und Fraktionen von 3 mL ansonsten jedoch analog zu Q-Sepharose-FF betrieben.

### **Hydrophobe Interaktionschromatographie**

Eine Phenylsepharose-Säule (2.7) mit 20 mL SV wurde in Startpuffer äquilibriert. Nach Auftragen der Probe mit einer Flußgeschwindigkeit von 4 mL/min wurde solange mit Startpuffer gewaschen, bis die OD<sub>280nm</sub> wieder die Grundlinie erreicht hatte. Nun wurde die Säule durch einen Gradienten mit Elutionspuffer über 5 SV entwickelt, wobei Fraktionen von 3 mL gesammelt wurden. Zur Regeneration der

Säule wurde zunächst mit 2 SV Elutionspuffer, anschließend mit 2 SV 20% Isopropanol gespült.

### **Hydroxy-Apatit-Chromatographie**

Die HA-Säule (2.7) mit 5 mL SV wurde in 30 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,0 äquilibriert. Nach Auftragen der Probe mit einer Flußgeschwindigkeit von 1 mL/min wurde solange mit demselben Puffer gewaschen, bis die  $OD_{280nm}$  wieder die Grundlinie erreicht hatte. Nun wurde die Säule durch einen Gradienten von 0–100% 1 M K-Phosphat-Puffer pH 7,0 über 10 SV entwickelt, wobei Fraktionen von 3 mL gesammelt wurden. Zur Regeneration der Säule wurde mit 1 SV 1 M K-Phosphat-Puffer pH 7,0 gefolgt von 2 SV 30 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,0 gespült.

### **Hitze-fällung**

Je 4 mal 100  $\mu$ L Proteinlösung ( $0,9 \text{ mg mL}^{-1}$ ) wurden in PCR-Caps gefüllt und diese bei 42°, 50°, 60° und 69 °C für 15 min in einer PCR-Maschine inkubiert. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 20 000 g und 4 °C zentrifugiert. Die resultierenden Pellets bzw. Überstände wurden mittels SDS-PAGE und gegebenenfalls Aktivitätstest analysiert.

### **Ausschlußchromatographie (Gelfiltration)**

Für die Ausschlußchromatographie wurden je nach zu trennendem Größenbereich eine Superdex 200 oder Superdex 75 26/60 (2.7) verwendet. Die Säule wurde in mindestens 1 SV des jeweiligen Laufpuffers äquilibriert. Das maximale Probenauftragsvolumen betrug 5 mL. Die Elution erfolgte isokratisch mit 360 mL Laufpuffer und einer Flußrate von 3 mL/min. Fraktionen von 3 mL wurden ab einem Elutionsvolumen von 100 mL gesammelt.

Bei kleineren Proteinmengen wurde eine Superdex 75 16/60 verwendet. Die Flußrate betrug 1 mL/min. Fraktionen von 1 mL wurden ab einem Elutionsvolumen von 30 mL gesammelt.

### **Entsalzung**

63 mL Sephadex-25 wurden in einen Säulenkörper ( $2,9 \times 9 \text{ cm}^2$ ) gefüllt und im gewünschten Zielpuffer äquilibriert. Die zu entsalzende Proteinlösung wurde bei einer Flußrate von 10 mL/min in 10 mL-Aliquots aufgetragen. Die Protein- bzw.

Salzelution wurde über die OD<sub>280</sub> bzw. Leitfähigkeitsanzeige kontrolliert und entsprechend fraktioniert.

### **Ammoniumsulfat-Fällung**

Die Proteinlösung wurde unter Eiskühlung gerührt und das gewünschte Volumen kalt gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde noch mindestens weitere 15 min auf Eis gerührt. Die Suspension wurde anschließend bei 4 °C, 20 000 g, 20 min zentrifugiert. Je nach Probe wurde entweder mit dem Pellet oder dem Überstand weitergearbeitet.

Formel zu Berechnung des Volumens kalt gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (Gl. 3.2):

$$V_{AS} = \frac{V_P \cdot (C_X \cdot C_P)}{1 - C_X} \quad \text{Gl. 3.2}$$

$V_{AS}$  = benötigtes Volumen kalt gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung [mL]

$V_P$  = Volumen der Proteinlösung [mL]

$C_X$  = Zielkonzentration Ammoniumsulfat

$C_P$  = Ausgangskonzentration Ammoniumsulfat

#### **3.3.3.1 Reinigung der Transketolase aus *Zea mays***

1 g Zellmasse des Klons BL21*trxB* (DE3) pET32-ZMTK-Tb wurde in TK-Aufschlußpuffer sonifiziert. Der Rohextrakt (3.3.1) wurde bei Raumtemperatur mit einer Flußrate von 3mL/min auf eine mit TK-Aufschlußpuffer äquilibrierte 16 mL-Ni-Chelating Sepharose-Säule aufgetragen. Nach dem Auswaschen nicht bindender Proteine erfolgte die Elution des Proteins durch Erhöhung des Anteils des Elutionspuffers auf 20%. Anschließend wurde die Säule mit 1 SV TK-Elutionspuffer gewaschen.

TK-haltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE ermittelt, vereint und nach Bestimmung der Proteinkonzentration (3.3.5.2) präparativ mit 2 units Thrombin/mg Protein bei Raumtemperatur verdaut (3.3.10). Die Lösung wurde anschließend in

einer 50 mL-Amiconzelle (50 kDa-Membran) auf ein Volumen  $\leq 5$  mL eingengt (3.3.5) und durch Gelfiltration an Superdex 200 fraktioniert.

TK-Aufschlußpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5  
200 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
50  $\mu$ M Thiaminpyrophosphat

TK-Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5  
200 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
50  $\mu$ M Thiaminpyrophosphat  
1 M Imidazol

TK-Gelfiltrationspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5  
150 mM NaCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
50  $\mu$ M Thiaminpyrophosphat

### **3.3.3.2 Reinigung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *Candida albicans***

Der Rohextrakt (3.3.1) von 5 g Zellen des jeweiligen Klons wurde mit demselben Volumen kalt gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung unter langsamen Zutropfen gemischt. Nach vollständiger Zugabe wurde die Lösung für weitere 10 min auf Eis gerührt und anschließend für 20 min bei 4 °C und 20 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Phenylsepharose-Säule aufgetragen und mit einem Gradient von 0 – 100% Elutionspuffer über 5 SV entwickelt. Die gewünschten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (3.3.2) ermittelt, vereint und auf ein Volumen  $\leq 5$  mL eingengt (3.3.5). Die Probe wurde anschließend durch Gelfiltration an Superdex 75 fraktioniert.

CARib3-Aufschluß- und Elutionspuffer: 30 mM K-Phosphat pH 7.0  
2 mM DTT

CARib3-Startpuffer: 30 mM K-Phosphat pH 7.0  
2 M Ammoniumsulfat  
2 mM DTT

CARib3-Gelfiltrationspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5  
150 mM NaCl

### 3.3.3.3 Reinigung der GTP-Cylohydrolase I aus *Arabidopsis thaliana*

#### *Reinigung der ATGCHI mit His<sub>6</sub>-Tag aus Hefe*

Der Rohextrakt von 20 – 100 g Hefezellpellet (3.3.1) wurde mittels immobilisierter Metallaffinitäts-Chromatographie im *Gravity-Flow*-Verfahren an 5 mL BD Talon gereinigt. Das Eluat wurde bei Bedarf auf ein Volumen von  $\leq 5$  mL eingeeengt und über Gelfiltration an S200 fraktioniert.

Hefe-Aufschlußpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5  
200 mM NaCl  
5 % Glycerin (v/v)  
Complete-EDTA frei

Cyclo-Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5  
200 mM NaCl  
5 % Glycerin (v/v)  
200 mM Imidazol

Cyclo-Gelfiltrationspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5  
200 mM NaCl



*Reinigung des Thioredoxin-Fusionsproteins*

Der Rohextrakt von 5 g Zellen des Klons Rosetta-gami (DE3) pET32-AT-CycHI wurden an 5 mL BD Talon gereinigt. Es wurden dieselben Puffer verwendet, wie für die Reinigung der ATGCHI mit His<sub>6</sub>-Tag aus Hefe, allerdings wurde kein Proteinase-Inhibitor Complete-EDTA frei verwendet.

*Reinigung des MBP-Fusionsproteins*

Der Rohextrakt (3.3.1) von 3 g Zellen des Klons M15 [pRep4] pNCO-MBP-H<sub>6</sub>-AT-CycHI wurde an 15 mL Amylose-Harz (2.7) im *Gravity-Flow*-Verfahren gereinigt. Nach dem Auftragen der Probe wurde mit 5 SV MBP-Aufschlußpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 3 SV MBP-Elutionspuffer. Das Eluat wurde mit 5 U Thrombin pro mg Protein bei 4 °C über Nacht verdaut (3.3.10). Anschließend wurde die Lösung auf ein Volumen von 5 mL konzentriert (3.3.5.2) und durch Gelfiltration an S200 fraktioniert.

MBP-Aufschlußpuffer:      20 mM Tris/HCl pH 7,5  
                                 200 mM NaCl  
                                 10 mM DTT

MBP-Elutionspuffer:      20 mM Tris/HCl pH 7,5  
                                 200 mM NaCl  
                                 50 mM Maltose  
                                 10 mM DTT

**3.3.3.4    Reinigung der Tyrosinhydroxylase aus *Drosophila melanogaster****Reinigung der regulatorischen Domäne von THII*

Der Rohextrakt (3.3.1) von 5 g Zellpellet des Klons BL21 pET3-Nterm-THII wurde auf eine in TH-Aufschlußpuffer äquilibrierte Q-Sepharose FF-Säule aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0 – 50% TH-Elutionspuffer über 5 SV eluiert. TH-haltige Fraktionen wurden mit dem gewünschten Volumen kalt gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (Endkonzentration 34%, Gl. 3.2) versetzt und für 15 min auf Eis gerührt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 20 000 g wurde

das Pellet in 5 mL TH-Aufschlußpuffer gelöst und durch Gelfiltration an Superdex S75 fraktioniert.

*Reinigung nach Vié (Vié et al., 1999)*

Der Rohextrakt (3.3.1) von 5 – 10 g Zellmasse wurde auf eine in TH-Aufschlußpuffer äquilibrierte DE52-Säule aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0 – 50% TH-Elutionspuffer über 5 SV eluiert. Die vereinten Fraktionen wurden mit kalt gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (Endkonzentration 38%, Gl. 3.2) versetzt und 15 min auf Eis gerührt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 20 000 g wurde das Pellet in 50 mL TH-Aufschlußpuffer gelöst und auf eine Q10-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte wiederum mit einem linearen Gradienten von TH-Elutionspuffer.

*Reinigung ohne Ammoniumsulfat-Fällung*

Der Rohextrakt (3.3.1) von 5 – 10 g Zellmasse wurde auf eine in TH-Aufschlußpuffer äquilibrierte Q-Sepharose FF-Säule aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0 – 50% TH-Elutionspuffer über 5 SV eluiert. Die vereinten Fraktionen wurden über eine Sephadex-25-Säule entsalzt und auf eine DE52-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte wiederum mit einem linearen Gradienten von 0 – 50% TH-Elutionspuffer. Die vereinten Fraktionen wurden in einer Rührzelle auf ein Volumen von  $\leq 5$  mL eingengt und durch Gelfiltration an S200 fraktioniert.

TH-Aufschlußpuffer:        50 mM Tris/HCl pH 7,5  
                                  5 % Glycerin (v/v)  
                                  0,1 mM EDTA  
                                  0,5 mM DTT

TH-Elutionspuffer:        50 mM Tris/HCl pH 7,5  
                                  5 % Glycerin (v/v)  
                                  0,1 mM EDTA  
                                  0,5 mM DTT  
                                  1 M NaCl

TH-Gelfiltrationspuffer:     50 mM Tris/HCl pH 7,5  
                                  5 % Glycerin (v/v)  
                                  0,1 mM EDTA  
                                  0,5 mM DTT  
                                  150 mM NaCl

### **3.3.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Für die Konzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) wurde für jede Messreihe eine Eichgerade mit BSA aufgestellt. Dazu wurden je 1 µL einer BSA-Lösung der Konzentration 1, 2, 3 bzw. 4 mg/mL mit 1000 µL verdünntem Bradfordreagenz (fünffach Konzentrat, BioRad, München) versetzt. Von der zu bestimmende Proteinlösung wurden je nach zu erwartender Proteinkonzentration 1 – 5 µL auf 1000 µL Bradfordreagenz eingesetzt. Die Ansätze wurden nach fünfminütiger Inkubation unter Lichtausschluss bei 595 nm vermessen.

### **3.3.5 Pufferwechsel und Konzentrationserhöhung von Proteinlösungen**

#### **3.3.5.1 Dialyse**

Zur Dialyse von Proteinlösung wurden Dialyseschläuche mit einer Ausschlußgröße von 1 kDa verwendet. Der Dialysepuffer wurde vor Beginn der Dialyse auf 4 °C heruntergekühlt.

Für Probenvolumina unter 1 mL wurden QuixSep Micro Dialyzer (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe) verwendet. Hierbei wird die Probe in die Kammer eines knopfförmigen Schwimmers pipettiert. Die Öffnung der Kammer wird durch eine darüber befestigte Dialysemembran verschlossen. Der QuixSep Micro Dialyzer wurde mit der Öffnung nach unten in den Dialysepuffer gegeben und mindestens 1 h unter leichtem Rühren darin belassen.

Für größere Probenvolumina wurde ein Schlauchabschnitt der benötigten Länge an einem Ende verknotet und zusätzlich mit einer Klemme verschlossen. Durch das offene Ende wurde die Probe mit Hilfe einer Pipette möglichst luftblasenfrei

eingefüllt. Das Schlauchende wurde mit einer Klemme verschlossen und der Schlauch an einem Schwimmer befestigt in den Dialysepuffer überführt. Nach einer Stunde wurde der Dialysepuffer erneuert und die Dialyse über Nacht fortgesetzt.

### **3.3.5.2 Ultrafiltration**

Die Konzentrierung von Proteinlösungen erfolgte durch Ultrafiltration in Amicon-Rührzellen (Millipore) mit Ultrafiltermembranen entsprechender Ausschlußgröße (Pall Gelman Laboratory, USA). Die Rührzellen wurden an einem Stickstoffanschluß bei 4 °C betrieben.

Für Volumina unter 1 mL wurden Nanokonzentratoren (Pall Gelman Laboratory, USA) verwendet. Die Proben wurden bei 4 °C bei 1500 g in Intervallen von 10 min zentrifugiert, bis das gewünschte Zielvolumen erreicht war.

Zum Pufferwechsel wurde das Retentat mit dem gewünschten Zielpuffer aufgefüllt und erneut eingengt. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, um einen vollständigen Austausch des Puffers zu gewährleisten.

### **3.3.6 N-terminale Aminosäuresequenzierung**

Nach der Methode des Edman-Abbaus (Edman, 1975) werden die N-terminalen Aminosäuren Schritt für Schritt unter Reaktion mit Phenylisothiocyanat als Phenylthiohydantoin-Derivate abgespalten und können über HPLC identifiziert werden.

Zur Sequenzanalyse gereinigter Proteine wurden 50 - 100 pmol Protein auf eine mit 10 µL Methanol aktivierte ProSorb PVDF Membran (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA) pipettiert und unter Spülen mit 700 µL Wasser fixiert. Die Sequenzierung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Köhler am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der TU München durchgeführt.

Proben der Tyrosinhydroxylase wurden von Fr. Simone Greven, Labor Dr. Mayer-Fligge/Dr. Immler, ZF-ZA Strukturforschung, Bayer AG, Leverkusen sequenziert. Die Proteinproben für die Sequenzierung wurden in Form eines Coomassie gefärbten Blots (3.3.9) auf einer PVDF-Membran verschickt und die entsprechenden Banden vor Ort ausgeschnitten.

### 3.3.7 Massenspektrometrie

Die Ermittlung des Molekulargewichts (pro Untereinheit) von gereinigtem Protein wurde an einem Quadrupol Ionenspray-Massenspektrometer API365 freundlicherweise von Frau Sylvia Koernen am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Es wurden 100 µg Protein eingesetzt. Die Eichung der m/z-Skala erfolgte mit Ammonium-Addukten von Polypropylenglykol-Oligomeren. Aus den m/z-Peaks aller erzeugten Molekülionen mit multipler Ladung wurden die durchschnittlichen Molekularmassen ermittelt (Covey *et al.*, 1988; Mann, 1995).

### 3.3.8 Analytische Ultrazentrifugation

Zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten bzw. der molaren Masse verschiedener Proteinproben wurde das Enzym zunächst gegen Vergleichspuffer dialysiert (3.3.5.1). Die Messzellen bestanden aus Doppelkammern mit einem Aluminiummittelstück und Saphirfenstern. Die Zentrifugationsläufe wurden in der Optima XL-A Analytical Ultrazentrifuge von Beckman mit integrierten optischen Systemen (Scanning UV/VIS Absorbance und Raleigh Interference) durchgeführt. Die Steuerung erfolgte über einen Computer, der mit der XL-A Analytical Data Analysis Software, Version 2.01, ausgestattet war.

Zur Bestimmung des *Sedimentationskoeffizienten* wurde die dialysierte Probe mit einer OD<sub>280</sub> von etwa 1 in die eine Kammer und der Dialysepuffer als Referenz in die zweite Kammer gefüllt. Die Zentrifugation wurde bei 20 °C mit einer Geschwindigkeit von 59000 rpm durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Ultrascan Version 5.0 for UNIX mit der Fitmethode von van Holde und Weischet (van Holde & Weischet, 1978). Die Methode entfernt den störenden Beitrag der Diffusion von den Daten und führt zu einem Mittelwert von Sedimentationskoeffizientenscharen.

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts (*Sedimentationsgleichgewichtsanalyse*) wurden die dialysierte Proben mit Dialysepuffer auf eine OD<sub>280</sub> von 0,3 verdünnt und 120 µL in der Messzelle mit 15 µL Öl (Fluorochemical FC43, Beckman) unterschichtet. Als Referenz diente 150 µL Dialysepuffer. Die Zentrifugation wurden bei 4 °C über etwa 72 h (bis zur Einstellung des Gleichgewichts) bei einer Geschwindigkeit von 8000 - 13000 rpm je nach vermuteter

Quartärstruktur durchgeführt. Für die Auswertung wurde das Programm Origin single (Origin v 3.78) der Software XLA-Data Analysis (Beckman) verwendet. Das benötigte partielle spezifische Volumen  $v_4$  bei 4 °C wurde näherungsweise aus den partiellen spezifischen Volumina  $v_{25}$  der Aminosäuren (Cohn & Edsall, 1943) und einer Temperaturkorrektur  $T_{\text{corr}}$  (Laue *et al.*, 1992) berechnet:

$$v_4 = v_{25} + T_{\text{corr}} = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i \cdot V_i}{\sum_i N_i \cdot M_i} + \frac{277,16 - 298,16}{2352,9} \quad \text{Gl. 3.3}$$

mit:

$N_i$  = Anzahl der Aminosäure  $i$

$M_i$  = Molekulargewicht der Aminosäure  $i$

$V_i$  = partielles spezifisches Teilvolumen der Aminosäure  $i$

Die benötigte Dichte der Pufferlösung  $p_{b,4}$  bei 4 °C wurde nach (Laue *et al.*, 1992), aus den einzelnen Pufferkomponenten und einem Temperaturkorrekturfaktor  $p_4$  berechnet:

$$p_{b,4} = \frac{(0,998234 + \sum \Delta p_{ci}) \cdot p_4}{0,998234} \quad \text{Gl. 3.4}$$

mit:

$\Delta p_{ci}$  = Dichteinkrement der Pufferkomponente  $i$  mit der molaren Konzentration  $c_i$ , errechnet sich aus:

$$\Delta p_{ci} = (A_i + B_i c_i^{0,5} + C_i c_i + D_i c_i^2 + E_i c_i^3 + F_i c_i^4) - 0,998234$$

$A_i - F_i$  = Parameter, vgl. (Laue *et al.*, 1992)

und:

$$p_4 = 1,000028 \cdot 10^{-3} \cdot \left[ \frac{999,83952 + 16,945176 \cdot T}{1 + (16,879850 \cdot 10^{-3} \cdot T)} - \frac{(7,9870401 \cdot 10^{-3} \cdot T^2) + (46,170461 \cdot 10^{-6} \cdot T^3)}{1 + (16,879850 \cdot 10^{-3} \cdot T)} - \frac{(105,56302 \cdot 10^{-3} \cdot T^2) - (280,54253 \cdot 10^{-12} \cdot T^5)}{1 + (16,879850 \cdot 10^{-3} \cdot T)} \right] \quad \text{Gl. 3.5}$$

Durch Bestimmung der Absorption ( $A$ ,  $A_0$ ) in Abhängigkeit vom Radius ( $r$ ,  $r_0$ ) im Sedimentationsgleichgewicht kann so mit Hilfe der Gleichung 3.6 das Molekulargewicht  $M$  ermittelt werden:

$$A = A_0 \cdot e^{[(H \cdot M \cdot (r^2 - r_0^2))] + E}$$

$$\Rightarrow M = \frac{\ln(A - E) - \ln(A_0)}{H \cdot (r^2 - r_0^2)} \quad \text{Gl. 3.6}$$

mit:

$$H = \frac{(1 - v \cdot \rho) \cdot \omega^2}{2 \cdot R \cdot T} \quad \text{Gl. 3.7}$$

E = konstante Abweichung durch nichtsedimentierende Substanzen

R = Gaskonstante = 8,3144 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>

ω = Winkelgeschwindigkeit

Tabelle 3.1 fasst die für die einzelnen Proben jeweils verwendeten Parameter für die Sedimentationsgleichgewichtsläufe zusammen.

Protein	Vergleichspuffer	V <sub>25</sub>	Geschwindigkeit [rpm]
CARib3 (4.3.4)	1	0,7394	13000
TbCyclo (4.4.2.4)	2	0,7395	8000
THI (4.2.4)	3	0,7337	8000

Tab. 3.1: Verschiedene Parameter der Ultrazentrifugationsanalyse.

Vergleichspuffer 1: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 300 mM KCl; 2: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 200 mM NaCl; 3: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT

### 3.3.9 Westernblot-Analyse

#### SDS-PAGE:

10–15 µg der Proteinproben wurden standardmäßig in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (3.3.2). Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Gel nicht gefärbt, sondern auf eine vorbereitete PVDF-Membran geblottet.

#### Vorbereitung der PVDF-Membran:

Die PVDF-Membran wurde auf die benötigte Größe (= Gelgröße) zugeschnitten, wobei jede Berührung mit proteinbehafteten Oberflächen vermieden wurde. Nun wurde die Membran zunächst 5 min in Methanol, danach weitere 5 min in 1:1 Methanol-Semi-dry-Puffer (s. 2.7.4) vorgequollen. Bis zum Gebrauch wurde die Membran in 100% Semi-dry-Puffer äquilibriert. Zeitgleich wurden 4 Lagen auf

Membrangröße zugeschnittenes Whatman-Chromatographiepapier ebenfalls in Semi-dry-Puffer getränkt.

*Aufbau und Betrieb der Elektrobloiting-Apparatur:*

Auf die Plattenanode der Apparatur wurden zwei Lagen vorgequollenes Chromatographiepapier geschichtet, darauf folgte die vorbereitete PVDF-Membran. Als nächstes wurde das SDS-Gel auf die Membran gelegt. Zur Abdeckung folgten zwei weitere Lagen Chromatographiepapier. Beim Zusammenbau wurde darauf geachtet, daß keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten eingeschlossen wurden. Die Apparatur wurde mit der Plattenkathode abgedeckt und an eine Spannungsquelle angeschlossen. Der Transfer wurde in 1 h bei 0,75 A/cm<sup>2</sup> Gelfläche durchgeführt.

*Detektion der Zielproteine:*

Die PVDF-Membran wurde in ein frisches 50 mL Falconröhrchen transferiert und für 2 h in Antikörper-Waschpuffer mit 3% Milchpulver unter ständigem Rollen inkubiert. Danach wurde die Lösung ausgetauscht gegen 5 mL Antikörper-Waschpuffer mit 1% Milchpulver und dem zielproteinspezifischen Antikörper (i. d. R. 1:1000 verdünnt). Nach Rollen über Nacht bei Raumtemperatur wurde die Membran dreimal für 5 min in 5 mL Waschpuffer gewaschen. Zur Detektion des ersten Antikörpers wurde dieser mit einem IgG-HRP-Konjugat (1:1000 in Waschpuffer mit 1% Milchpulver) durch einstündiges Rollen gekoppelt. Nach dreimaligem Waschen in 5 mL Waschpuffer erfolgte die Färbungsreaktion durch die enzymatische Oxidation von 3,3'-Diaminobenzidin (6 mg in 10 mL Waschpuffer) mit Hilfe von 10 µL 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einem unlöslichen braunen Produkt.

**Semy-dry-Puffer:**            48 mM Tris  
                                      39 mM Glycin  
                                      0,0037% SDS  
                                      20% Methanol

**Waschpuffer:**                20 mM Tris/HCl, pH 7,4  
                                      150 mM NaCl  
                                      3mM KCl  
                                      0,05 % Tween 20



### 3.3.10 Thrombinspaltungen

#### *Analytische Thrombinspaltung*

Zur Bestimmung der für das jeweilige Protein optimalen Spaltungsbedingungen wurden Aliquots der Proteinlösung mit jeweils 1, 2 und 5 units Thrombin/mg Protein und CaCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 2,5 mM versetzt. Es wurde auch eine Kontrolle ohne Thrombin mitgeführt. Die Ansätze wurden über Nacht bei verschiedenen Temperaturen (meist 4, 16 und 22 °C) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben mittels SDS-PAGE und gegebenenfalls mittels Aktivitätstest analysiert.

#### *Präparative Thrombinspaltung*

Die Bedingungen der präparativen Thrombinspaltung orientierten sich an den durch Voranalysen bestimmten Parametern. Die Proteinlösung wurde mit der benötigten Menge Thrombin und 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> versetzt und über Nacht in einem 50 mL Falcon Röhrchen inkubiert. Eventuell auftretendes Präzipitat wurde vor der weiteren Verwendung der Probe durch 20 minütige Zentrifugation bei 4 °C, 20 000 g entfernt.

### 3.3.11 Kinetische Untersuchungen

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der untersuchten Enzyme wurden die Anfangsgeschwindigkeiten bei mindestens acht verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Die Daten wurden mit der Origin 6.0G Professional-Software zur Berechnung der maximalen Geschwindigkeit  $v_{\max}$  und der Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  laut nachstehender Gleichung (Gl. 3.8) ausgewertet.

$$v = \frac{[S] \cdot v_{\max}}{[S] + K_M} \quad \text{Gl. 3.8}$$

[S] = Substratkonzentration [ $\mu$ M]

v = Reaktionsgeschwindigkeit [U/mg]

$v_{\max}$  = maximale Reaktionsgeschwindigkeit [U/mg]

$K_M$  = Michaelis-Menten-Konstante [ $\mu$ M]

### 3.3.11.1 Bestimmung der Transketolase-Aktivität

Transketolase setzt die beiden Substrate D-Ribose-5-phosphat und D-Xylulose-5-phosphat zu D-Sedoheptulose-7-phosphat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (**GAP**) um. Das Reaktionsprodukt GAP wird durch Triosephosphatisomerase in einer Gleichgewichtsreaktion zu Dihydroxyacetonphosphat (**DHAP**) umgesetzt. DHAP wird unter Oxidation von NADH durch Glycerinphosphat-Dehydrogenase zu Glycerin-3-phosphat reduziert. Die Abnahme der Konzentration an NADH wird photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340 \text{ nm}$  verfolgt. 1 unit (U) wird definiert durch die Erzeugung von 1  $\mu\text{mol}$  GAP pro min. Der Assay setzt sich wie folgt zusammen:

- 10 mM Tris/HCl pH 7,5
- 4 mM  $\text{MgCl}_2$
- 100  $\mu\text{M}$  Thiaminpyrophosphat
- 500  $\mu\text{M}$  NADH
- 2 mM D-Ribose-5-phosphat
- 2 mM D-Xylulose-5-phosphat
- 8 U Triosephosphat-Isomerase
- 8 U Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase
- 5 - 20  $\mu\text{L}$  Probe
- Gesamtvolumen 200  $\mu\text{L}$

Die Komponenten wurden bei Raumtemperatur in einer Quartz-Küvette zusammenpipettiert und kurz gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Zuckerphosphate gestartet. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgt über die nachstehende Formel (Gl.3.9) für den linearen Bereich der Kurve mit  $\varepsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ :

$$A_{\text{spez}} = \frac{\Delta E \cdot V}{\Delta t \cdot \varepsilon \cdot d [\text{Protein}] V_{\text{Probe}}} \quad \text{Gl. 3.9}$$

mit:

$A_{\text{spez}}$ :	$[\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}]$	spezifische Aktivität
$\varepsilon$ :	$[\text{l}/(\text{mol} \cdot \text{cm})]$	spezifischer molarer Extinktionskoeffizient
$d$ :	$[\text{cm}]$	Schichtdicke der Lösung in der Küvette
$\Delta E$ :	$[\ ]$	Änderung der Extinktion
$\Delta t$ :	$[\text{min}]$	Zeitintervall in der die Extinktionsänderung stattfindet
$V$ :	$[\text{mL}]$	Küvettenvolumen
$[\text{Protein}]$ :	$[\text{mg}/\text{mL}]$	Proteinkonzentration der eingesetzten Probe
$V_{\text{Probe}}$ :	$[\text{mL}]$	Volumen der eingesetzten Probe

### 3.3.11.2 Bestimmung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase-Aktivität

Die DBPS-Aktivität wurde in einem gekoppelten Test mit Phosphoriboisomerase und 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase (Lusy) bestimmt. Dabei erzeugt zunächst die Phosphoriboisomerase Ribulose-5-phosphat (Ru5P) aus Ribose-5-Phosphat. DBPS setzt Ru5P um zu Formiat und 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat (DBP). Dieses wird von der Lusy mit 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (**Lumazin**), Phosphat und Wasser umgesetzt. Die Zunahme der Lumazin-Konzentration wird bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 410 \text{ nm}$  erfaßt. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgt über Gleichung 3.9 mit  $\varepsilon = 12 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . 1 U wird definiert durch die Erzeugung von 1 nmol Lumazin pro min.

Ein Ansatz setzt sich zusammen aus je 100  $\mu\text{L}$  Mix A und 100  $\mu\text{L}$  Mix B. Mix A wurde zunächst 5 min bei 37 °C inkubiert um Ru5P zu erzeugen. Mix B wurde in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von Mix A gestartet:

Mix A (100  $\mu\text{L}$ ):      50 mM Tris/HCl pH 7,5  
                               10 mM MgCl<sub>2</sub>  
                               10 mM D-Ribose-5-phosphat  
                               1,25 U Phosphoriboisomerase  
                               50  $\mu\text{g}$  Lusy

Mix B (100  $\mu\text{L}$ ):      50 mM Tris/HCl pH 7,5  
                               10 mM MgCl<sub>2</sub>  
                               0,75 mM 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion  
                               1-10  $\mu\text{g}$  DBPS

#### *Herstellung des Substrates 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion*

0,1-0,2 mmol (MW = 306 g/mol) 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**NRP**) wurden in einem 50 mL Rundkolben mit 10 mL Wasser und ca. 40 mg Palladium/Aktivkohle versetzt und 12 h hydriert. Nach Entfernung des Katalysators durch Filtration wurde die Konzentration des Produktes 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion und des eventuell nicht umgesetzten Eduktes in der

Lösung photometrisch bei pH 1,0 (0,1 n HCl) bestimmt. Die Lagerung erfolgte nach Zugabe von DTT (80 mM) unter Lichtausschluss bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Extinktionskoeffizienten bei pH = 1,0:

$\varepsilon(\text{NRP})_{323\text{ nm}}$ :  $14200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Cresswell *et al.*, 1960)

$\varepsilon(\text{ARP})_{268\text{ nm}}$ :  $24500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Plaut, 1971)

### 3.3.11.3 Bestimmung der GTP-Cyclohydrolase I Aktivität

GTP-Cyclohydrolase I katalysiert die Umsetzung von GTP zu Dihydroneopterin-triphosphat ( $\text{NH}_2\text{TP}$ ). Die Zunahme der  $\text{NH}_2\text{TP}$ -Konzentration wurde photometrisch in Quartz-Küvetten mit 1 cm Schichtdicke bei  $\lambda = 330\text{ nm}$  verfolgt. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgt über Gleichung 3.9 mit  $\varepsilon = 6300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . 1 U wird definiert durch die Erzeugung von 1 nmol  $\text{NH}_2\text{TP}$  pro min.

Ein Ansatz setzt sich zusammen aus:

50 mM Tris/HCl pH 7,5  
150 mM NaCl  
500  $\mu\text{M}$  GTP  
10 – 100  $\mu\text{g}$  GTP-Cyclohydrolase I  
Gesamtvolumen 200  $\mu\text{L}$

### 3.3.11.4 Bestimmung der Tyrosinhydroxylase-Aktivität

Die Tyrosinhydroxylase setzt L-Tyrosin zu L-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) um. Der Cofaktor Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) wird dabei zu Dihydrobiopterin oxidiert. Die entstandene DOPA-Menge kann fluorimetrisch mittels HPLC bestimmt werden (Excitation  $\lambda = 282\text{ nm}$ , Emission  $\lambda = 320\text{ nm}$ ). 1 U wird definiert durch die Erzeugung von 1  $\mu\text{mol}$  DOPA pro min.

Ein Meßansatz setzt sich wie folgt zusammen:

50 mM HEPES pH 7.0  
100  $\mu$ M  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$   
500  $\mu$ M  $\text{BH}_4$   
200  $\mu$ M L-Tyrosin  
1 Unit/ $\mu$ L Katalase  
0,5 mg/mL Tyrosinhydroxylase

Die Reaktion wurde durch Zugabe von  $\text{BH}_4$  gestartet. In Intervallen wurden Proben von 100  $\mu$ L entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ L 20% TCA gestoppt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 10 000 g (RT) wurden 20  $\mu$ L des Überstandes auf eine Hypersil 5  $\mu$  C18 (ODS) Säule (250 X 4,60 mm; 2.7) injiziert. Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 0.8 mL/min mit 20 mM Na-Acetat pH 4,25 (Essigsäure), 8,5% Methanol, 3% Acetonitril. Unter diesen Bedingungen wurde der DOPA-Peak nach etwa 4,5 min, der Tyrosin-Peak nach 5,5 min eluiert. Die Ermittlung der Produktmenge erfolgt mit Hilfe geeigneter DOPA-Standards.

Die 1 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ -Stammlösung wurde in 5 mM HCl hergestellt und aliquotiert bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Einmal aufgetaute Stammlösung wurde nicht wiederverwendet. L-Tyrosin wurde zunächst in einem kleinen Volumen 1 M HCl gelöst und dann mit 50 mM HEPES pH 7.0 zu einer Endkonzentration von 5 mM verdünnt. Die  $\text{BH}_4$ -Stammlösung (5 mM) wurde immer frisch mit einer Lösung aus 10 mM HCl und 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol in 50 mM HEPES pH 7.0 hergestellt.

### 3.3.12 Circular dichroismus-Spektroskopie

Die Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) misst Unterschiede in der Absorption der rechts- bzw. links-zirkular polarisierten Komponente von linear polarisiertem Licht.

In einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L wurden 20 units DBPS aus *C. albicans* und 10 units Phosphoriboisomerase in 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  und 20 mM Ribose-5-phosphat für 3 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Ein Vergleichsansatz ohne Ribose-5-phosphat wurde mitgeführt. Beide Ansätze wurden zur Abtrennung der

Proteinkomponenten mittels Mikrokonzentratoren (Ausschlußvolumen 3 kDa) ultrafiltriert (3.3.5.2). Die Filtrate wurden bis zur Messung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Messungen erfolgten mit einem Spektropolarimeter JASCO J-715 in Quarzküvetten mit einem 10 mm Lichtweg bei  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Wellenlängenbereich von 220 – 350 nm.

### 3.3.13 $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie

Das zweidimensionale [ $^1\text{H}^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum wurde mit einem Avance DRX 500 Spektrometer von Bruker Instruments mit inversem Triple-Resonanz-Probenkopf bei 500,13 MHz ( $^1\text{H}$ ) gemessen. Es wurden 5 mm NMR-Röhrchen verwendet. Die Messung erfolgte bei 300 K. Die Datensammlung und –prozessierung erfolgte mit Standard-Bruker-Software (inviprtprif3 pulse program, XWIN-NMR Version 3.0) unter folgenden Parametern: Die TPPI-Methode wurde in der indirekten Dimension mit folgenden Einstellungen benutzt: Relaxationsverzögerung 2 s; Meßdauer 51,25 ms; Time-domain, F2, 1024 ( $^1\text{H}$ ) und F1, 201 ( $^{15}\text{N}$ ); Sweep-Weite, F2, 7002,8 Hz, F1, 1520,5 Hz; Anzahl der Scans, 64 pro Inkrement; vor der Fourier-Transformation wurden die Daten mit Nullen auf 2k aufgefüllt und mit „shifted sine bell functions“ in F1 bzw. Gauss-Funktion in F2 multipliziert.  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebungen wurden bezogen auf externes Natrium-3-trimethylsilylpropionat.

Die Datenanalyse wurde mit der Aurelia-Software Version 2.8.11 ausgeführt.

### 3.3.14 Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse

#### 3.3.14.1 Proteinkristallisation

##### *Eingangsscreening*

Die Kristallisationsansätze erfolgten nach der Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen („sitting drop“). Es wurden entweder 24 well Cryschem-Platten (Hampton Research, 300  $\mu\text{L}$  Reservoirvolumen) oder 96 well Platten (CrystalClear Strips von Hampton Research oder Proteinkristallographieplatten von Corning mit je 80  $\mu\text{L}$  Reservoirvolumen) verwendet. Dabei wurden jeweils 2  $\mu\text{L}$  Proteinlösung mit 2  $\mu\text{L}$  des Kristallisationspuffers vermischt und gegen die Reservoirlösung

äquiliibriert. Es wurden die Kristallisations-Screens von Hampton Research verwendet bzw. die entsprechenden Grid-Screens nach Rezepten von Hampton Research hergestellt.

#### *Feinscreening*

Zur Optimierung der im Eingangsscreening gefundenen Kristallisationsbedingungen wurden verschiedene Parameter verändert. Von der Kristallisationslösung wurden Verdünnungsreihen angelegt und die Zugabe von Additiven wurde getestet. Weiterhin wurden die Tropfengröße und das Volumenverhältnis des Fällungsmittels zur Proteinlösung im Tropfen variiert.

#### **3.3.14.2 Röntgenstrukturanalyse**

Die Bestimmung der Quartärstruktur mittels Röntgendiffraktion erfolgte am Max-Planck-Institut für Biochemie in der Abteilung für Strukturforschung, Prof. Robert Huber.

Die Datensätze wurden mit einer Rigaku RU-200 Drehanode bei 50 mA und 100 kV mit  $\lambda$  (CuK $_{\alpha}$ ) = 1,542 Å. auf einem MARResearch345 image plate Detector aufgenommen. Die Kristallstrukturen wurden mit der Methode des „Molekularen Ersatzes“ gelöst (Hoppe, 1957b; a; Rossmann & Blow, 1962; Huber, 1965) und anschliessend verfeinert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Transketolase aus *Zea mays*

#### 4.1.1 Optimierung des Expressionskonstruktes pET32-Tkl7otp

Ausgangspunkt der Arbeiten war das von Dr. Marco Busch (Bayer CropScience, Monheim) zur Verfügung gestellte Expressionskonstrukt pET32-Tkl7otp (Gerhardt *et al.*, 2003). Dieser Vektor leitet sich ab von pET32a(+) und codiert für ein Fusionsprotein (**Trx-Tkl7**) von 838 Aminosäuren bestehend aus einer 14 kDa-Thioredoxindomäne (**Trx**) gefolgt von einem His<sub>6</sub>-Tag, einer Thrombinschnittstelle, einem S-Tag, einer Enterokinaseschnittstelle und schließlich der maturierten TK aus Mais beginnend mit Ala55. Nach Abspaltung des Trx mit Thrombin verbleiben am N-Terminus der TK 34 Aminosäuren des S-Tags bzw. der Enterokinaseschnittstelle (**TKI7**).

Zur Optimierung des Expressionskonstruktes diente pET32-Tkl7-otp als erste Matrize in einer Serie von drei PCRs (3.2.4.1) mit dem Forward-Primer ZMTK-Thrombin-*Xba*I-vo und den Reversed-Primern ZMTK-Thrombin-1, ZMTK-Thrombin-2 und ZMTK-Thrombin-*A*h*l*I-3 (Primersequenzen im Anhang 7.1.1). Das resultierende 566 bp-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *A*h*l*I geschnitten (3.2.5) und in den ebenso geschnittenen pET32-Tkl7-otp ligiert (3.2.6). Das resultierende Plasmid pET32-ZMTK-Tb (GenBank-Eintrag AY148193) codiert für ein Fusionsprotein (**Trx-ZMTK**) bestehend aus Trx, His<sub>6</sub>-Tag, Thrombinschnittstelle und TK beginnend mit Ala56. Nach Thrombinspaltung verbleibt nur eine Aminosäure (Gly) aus der Thrombinerkennungssequenz (LeuValProArgGly) am N-Terminus des Enzyms (**ZMTK**).

#### 4.1.2 Expression und Reinigung der ZMTK

Nach dem Überprüfen der korrekten DNA-Sequenz (3.2.7) wurde das Plasmid pET32-ZMTK-Tb in BL21*trxB* (DE3) transformiert (3.1.1.1). Die Testexpression (3.1.2.1) einiger Klone mit einer Induktionsdauer von 16 h bei 18 °C zeigte ein sehr hohes Expressionsniveau bei guter Löslichkeit des Proteins (Abb. 4.1).



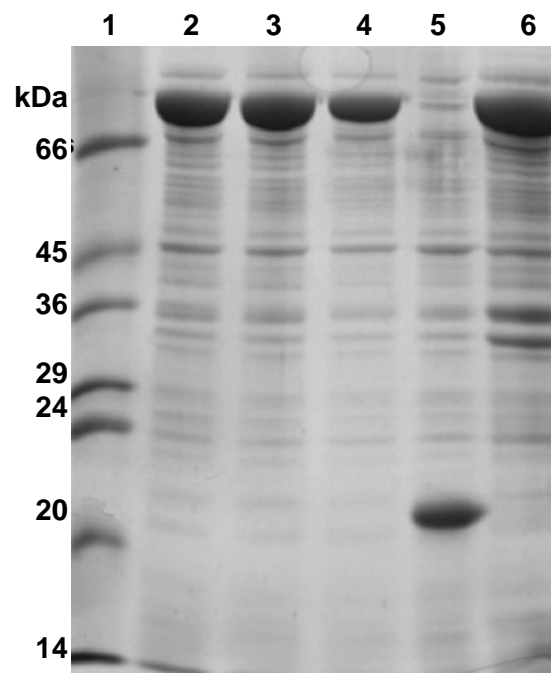


Abb. 4.1: Löslichkeitstest verschiedener BI21trxB (DE3) pET32-ZMTK-Tb-Klone. Bahn 1: Größenstandard; 2 – 4: Rohextrakte der Klone BI21trxB (DE3) pET32-ZMTK-Tb-1, 2 und 3; 5: Rohextrakt eines Kontrollklones BI21trxB (DE3) pET32a (+); 6: unlösliche Fraktion des Klons BI21trxB (DE3) pET32-ZMTK-Tb-1.

Um die Zugänglichkeit der Thrombinschnittstelle zu testen und unspezifische Spaltung innerhalb der ZMTK auszuschließen, wurde eine Thrombinspaltung im analytischen Maßstab mit den Rohextrakten eines Trx-ZMTK-TB-Klones und eines Trx-Tkl7-Klones durchgeführt (3.3.10). Dabei wurden je 2 und 5 U Thrombin pro mg Protein bei 4° bzw. 22 °C getestet. Bei 4 °C war die Spaltung von Trx-Tkl7 mit beiden Thrombinkonzentrationen vollständig, während bei Trx-ZMTK noch ein Anteil ungeschnittenen Fusionsproteins vorlag (Abb. 4.2). Dies weist auf eine schlechtere Zugänglichkeit der Thrombinschnittstelle aufgrund ihrer Verschiebung an den N-Terminus der ZMTK hin. Bei 22 °C waren beide Fusionsproteine vollständig gespalten (nicht dargestellt).

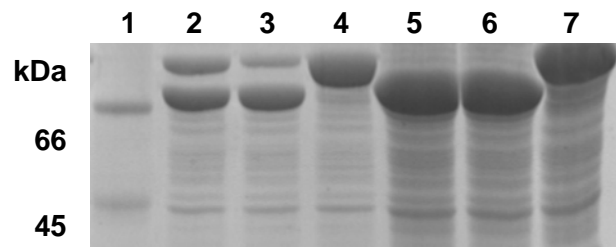


Abb. 4.2: Analytischer Thrombinverdau von Trx-ZMTK-TB und Trx-Tkl7 bei 4 °C über Nacht. Bahn 1: SDS-Größenstandard; 2 – 4: Rohextrakt mit Trx-ZMTK-Tb, 2: 2 U Thrombin/mg, 3: 5 U Thrombin/mg, 4: Kontrolle ohne Thrombin; 5 – 7: Rohextrakt mit Trx-Tkl7, 5: 2 U Thrombin/mg, 6: 5 U Thrombin/mg, 7: Kontrolle ohne Thrombin.

Trx-ZMTK konnte mittels Ni-Affinitäts-Chromatographie effizient aus dem Rohextrakt gereinigt werden (3.3.3.1). Nach präparativer Thrombinspaltung (3.3.10) wurde das freie Trx durch Gelfiltration entfernt. Die ZMTK lag nun in für Kristallisationsexperimente ausreichend reiner Form vor (Abb. 4.3).

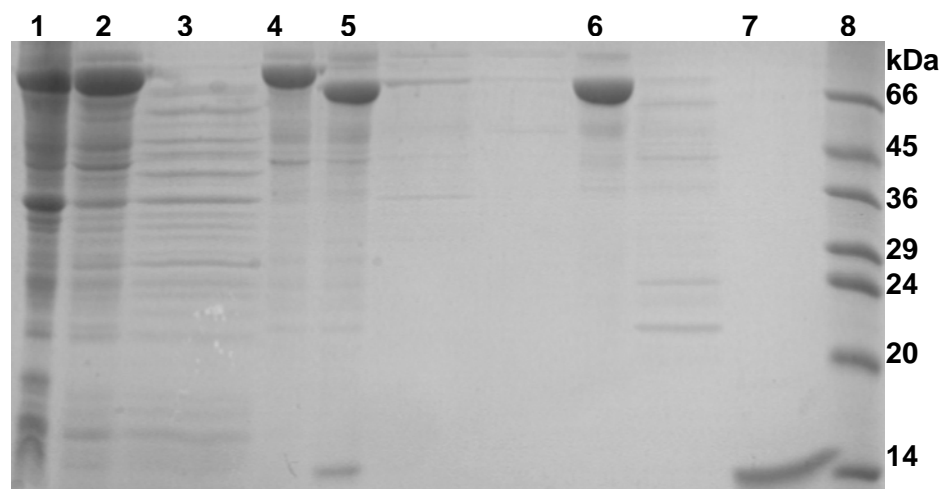


Abb 4.3: Reinigung rekombinanter ZMTK. Bahn 1: unlösliche Fraktion; 2: Rohextrakt; 3: Durchlauf der Ni-Säule; 4: Eluat der Ni-Säule; 5: nach Thrombinverdau; 6: gepoolte TK-Fractionen nach S200; 7: gepoolte Trx-Fractionen nach S200; 8: SDS-Größenstandard.

Die Enzymaktivität der ZMTK wurde über die verschiedenen Reinigungsstufen verfolgt. Tabelle 4.1 faßt die entsprechenden Daten einer typischen Reinigung zusammen.

Fraktion	$A_{\text{ges}}$ $\mu\text{mol min}^{-1}$	$\text{Protein}_{\text{ges}}$ mg	$A_{\text{spez}}$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Anreicherung -fach	Ausbeute %
Rohextrakt	438	73	6,0	1	100
Ni <sup>2+</sup> -Affinität	388	38	10,2	1,7	89
S200	380	15	25,3	4,2	87

Tab 4.1: Reinigung rekombinanter ZMTK.

**Protein<sub>ges</sub>**: Gesamtproteinmenge der Fraktion; **A<sub>spez</sub>**: spezifische Aktivität der Fraktion; **A<sub>ges</sub>**: Gesamtaktivität der Fraktion; die Berechnung der Anreicherung erfolgte auf Basis der  $A_{\text{spez}}$ -Werte, die der Ausbeute auf Basis der Gesamtaktivitäten der Fraktionen.

Edmansequenzierung (3.3.6) ergab die zu erwartende Aminosäurenabfolge GAVETLQGKA. Die Elektrospray-Massenspektrometrie (3.3.7) bestätigte die errechnete Molekularmasse von 72 993 mit einem Ergebnis von 72 994,8.

#### 4.1.3 Kinetische Charakterisierung der ZMTK

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für die beiden Substrate Ribose-5-phosphat und Xylulose-5-phosphat wurde die Konzentration jeweils eines Substrates variiert und der Test ansonsten wie unter (3.3.11.1) beschrieben durchgeführt.

Die  $K_M$ -Werte betragen 581  $\mu\text{M}$  für R5P bzw. 403  $\mu\text{M}$  für Xu5P. Abb. 4.4 zeigt exemplarisch den Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die jeweiligen Ribose-5-phosphat-Konzentrationen.

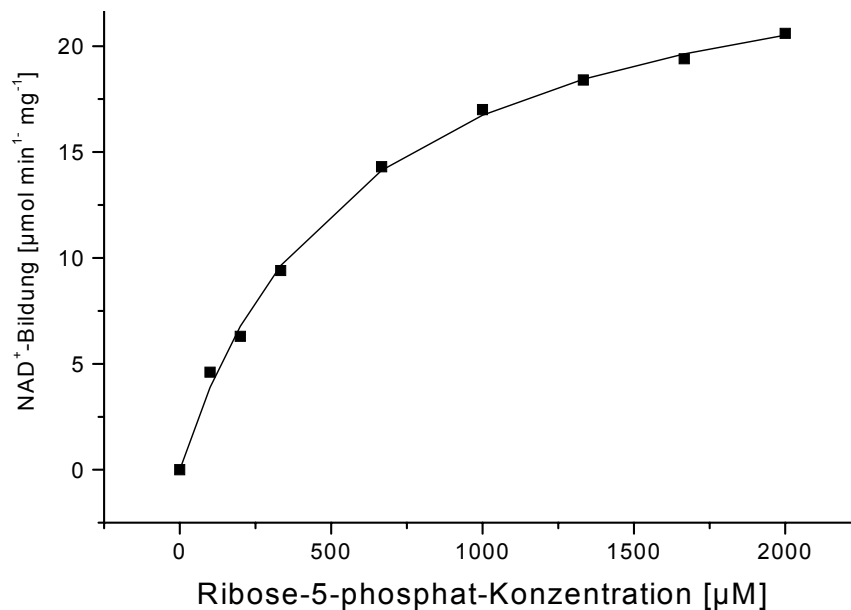


Abb. 4.4: Kinetische Charakterisierung der ZMTK: Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration

#### 4.1.4 Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse

##### 4.1.4.1 Kristallisation und Datensammlung

Die Kristallisation der ZMTK im Komplex mit  $\text{Mg}^{2+}$  und Thiaminpyrophosphat (**TPP**) erfolgte unter den schon von der TKI7 bekannten Bedingungen (Echt, 2000). Die Proteinlösung wurde in einer Amicon-Rührzelle auf  $12 - 15 \text{ mg mL}^{-1}$  konzentriert und in  $10 \text{ mM Tris/HCl pH } 7,5$ ,  $2 \text{ mM MgCl}_2$ ,  $50 \mu\text{M TPP}$  umgepuffert.  $2 \mu\text{L}$  dieser Lösung wurden mit  $2 \mu\text{L}$  Reservoirlösung ( $13\% \text{ PEG } 3350$ ,  $130 \text{ mM Ammoniumacetat}$ ) und  $0,5 \mu\text{L}$  Spermin gemischt. Der Tropfen wurde bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  gegen  $400 \mu\text{L}$  Reservoirlösung äquilibriert (3.3.14.1). Kristalle erschienen innerhalb von  $1 - 2$  Tagen und wuchsen zu einer Größe von  $500 \times 200 \times 200 \mu\text{m}^3$ .

Die röntgenkristallographische Messung und Datenauswertung wurde freundlicherweise von Dr. Stefan Gerhardt, Abteilung Strukturforschung, am MPI für Biochemie, Martinsried, durchgeführt (3.3.14.2). Es konnte eine Auflösung von  $2,3 \text{ \AA}$  erreicht werden. Die Koordinaten wurden als Eintrag 1ITZ in der RCSB-Proteindatenbank hinterlegt.

#### 4.1.4.2 Strukturbeschreibung der ZMTK

Eine Untereinheit der ZMTK besteht aus 675 Aminosäuren sowie je einem Molekül  $Mg^{2+}$  und TPP. Das endgültige Modell der asymmetrischen Einheit umfaßt ein TK-Dimer mit je einem  $Mg^{2+}$  und TPP in jedem der beiden aktiven Zentren (Abb. 4.5) sowie ein Monomer, das über eine zweizählige kristallographische Symmetrieachse wiederum ein Dimer bildet. Die ersten 10 N-terminalen Aminosäuren sind in der Elektronendichte nicht definiert, was auf eine hohe Flexibilität dieses Abschnittes hindeutet.

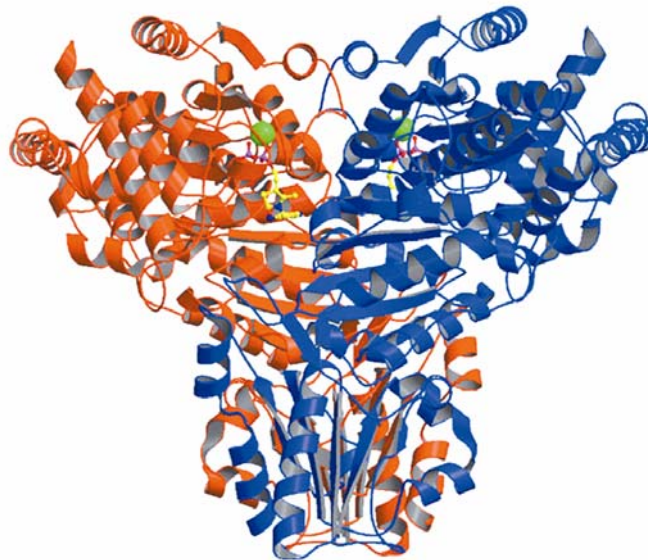


Abb. 4.5: ZMTK-Dimer mit gebundenem TPP und  $Mg^{2+}$ .  
TPP: gelb; Pyrophosphat-Teil des TPP: magenta;  $Mg^{2+}$ : grün; Untereinheiten: rot bzw. blau.

##### *Grundsätzlicher Aufbau*

Die Struktur einer TK-Untereinheit ist in drei untereinander sehr ähnlichen  $\alpha/\beta$ -gefalteten Domänen organisiert (Lindquist *et al.*, 1992; Nikkola *et al.*, 1994, Abb. 4.6). Bei der ZMTK erstreckt sich die N-terminale Domäne von Aminosäure 1 – 332. Sie wird aufgebaut durch ein fünfsträngiges paralleles  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta_1\beta_2\beta_3\beta_5\beta_4$ ), das von beiden Seiten von  $\alpha$ -Helices ( $\alpha_1$  bis  $\alpha_{11}$ ) eingebettet ist. Diese Domäne wird auch **PP-Domäne** genannt, da sie die Bindungstasche des Cofaktor-Pyrophosphatrestes enthält (Muller *et al.*, 1993).

Die mittlere Domäne von Rest 333 – 542 besteht aus den  $\alpha$ -Helices  $\alpha_{12}$  -  $\alpha_{18}$ , die ein paralleles sechsträngiges  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta_8\beta_7\beta_9\beta_{10}\beta_{12}\beta_{11}$ ) umgeben. Aufgrund ihrer hydrophoben Bindungstasche für den Pyrimidinring des TPP wird diese Domäne auch als **Pyr-Domäne** bezeichnet (Muller *et al.*, 1993). Das aktive TK-Dimer wird durch Wechselwirkungen der PP-Domäne einer Untereinheit mit der Pyr-Domäne der jeweils anderen Untereinheit und mit dem Cofaktor gebildet. Beide Domänen können mit einer *r.m.s.*-Abweichung von 1,68 Å für 92  $C_\alpha$ -Atome überlagert werden.

Die C-terminale Domäne ab Aminosäure 543 bildet ein gemischtes zentrales  $\beta$ -Faltblatt mit vier parallelen ( $\beta_{16}\beta_{17}\beta_{15}\beta_{18}$ ) und dem antiparallelen Strang  $\beta_{14}$ . Kein Rest dieser Domäne ist an der Dimerisierung oder Katalyse beteiligt.



Abb. 4.6: Domänenarrangement einer ZMTK-Untereinheit. N-terminale PP-Domäne rot, Pyr-Domäne blau, C-terminale Domäne grün, TPP gelb;  $Mg^{2+}$  magenta.

### Architektur des aktiven Zentrums und Cofaktorbinding

Ein aktives Zentrum wird gebildet durch die Bindung des Cofaktors TPP durch die PP-Domäne der einen Untereinheit (A) und die Pyr-Domäne der jeweils anderen Untereinheit (B') (Abb. 4.7). Es ergibt sich dadurch ein tiefer Spalt von etwa 19 Å Länge und einer Breite von 7 Å im Inneren bzw. 17 Å am Eingang. Das TPP wird fast vollständig vom Solvens abgeschirmt, nur das katalytisch wichtige C2-Atom des Thiazoliumringes (Kern *et al.*, 1996) und die benachbarte 4'-Aminogruppe sind zugänglich.

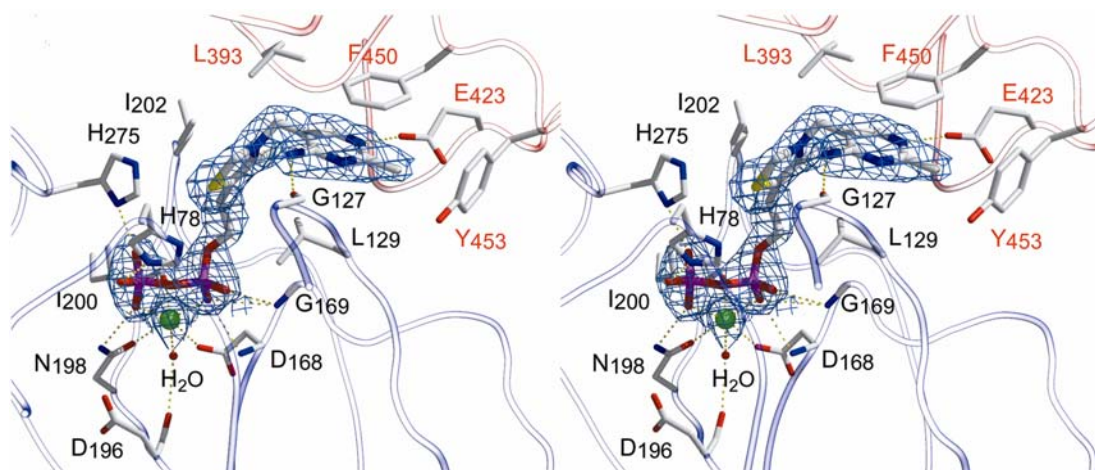


Abb. 4.7: Stereoabbildung des aktiven Zentrums der ZMTK mit gebundenem TPP und  $Mg^{2+}$ . Aminosäurereste der Pyr-Domäne: rot; Reste der benachbarten PP-Domäne: blau;  $Mg^{2+}$ : grün; die  $2F_o - F_c$  Elektronendichtekarte des TPP-Cofaktors ist bei  $1,2 \sigma$  konturiert.

Die Pyrophosphateinheit wird durch Koordination an  $Mg^{2+}$ , H-Brücken zu den Resten H75, H272 und N198 sowie Wechselwirkungen mit den Hauptketten N-Atomen der Reste D168 und G169 gebunden. Das  $Mg^{2+}$ -Ion selbst ist sechsfach in quadratisch pyramidaler Geometrie koordiniert, wobei zwei Koordinationsstellen auf O-Atome der Phosphatgruppen des Pyrophosphates entfallen. Außerdem involviert sind die Seitenketten O-Atome von D168 und N198 sowie das Hauptketten O-Atom von I200. Die sechste Koordinationsstelle wird durch ein Wassermolekül besetzt, welches durch eine H-Brücke zum Hauptketten N-Atom von D196 stabilisiert wird.

Der Pyrimidinring liegt in einer hydrophoben Bindungstasche geformt von den aromatischen Aminosäuren Y443', F447', F448', F450' und Y453' sowie dem

aliphatischen V449'. In dieser Tasche wird der Pyrimidinring durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Resten L393', F450' und Y453' sowie einer H-Brücke von N1' zu E423' fixiert.

#### Akzeptorsubstratbindung

Da die Versuche zur Cokristallisation oder Soaking der ZMTK mit Substraten (Fructose 6-phosphat, R5P, Xu5P) erfolglos blieben, wurde das Akzeptorsubstrat Erythrose 4-phosphat (**E4P**) in das aktive Zentrum der ZMTK modelliert. Dabei zeigte sich, daß der Aldehyd-Sauerstoff des Substrates in zur Ausbildung von H-Brücken ausreichender Nähe zu den konservierten Resten H38 und H275 lokalisiert ist. Die Phosphatgruppe des Substrates könnte über H-Brücken mit den Resten S395, R533 und H474 am Eingang des aktiven Zentrums interagieren (Abb. 4.8).

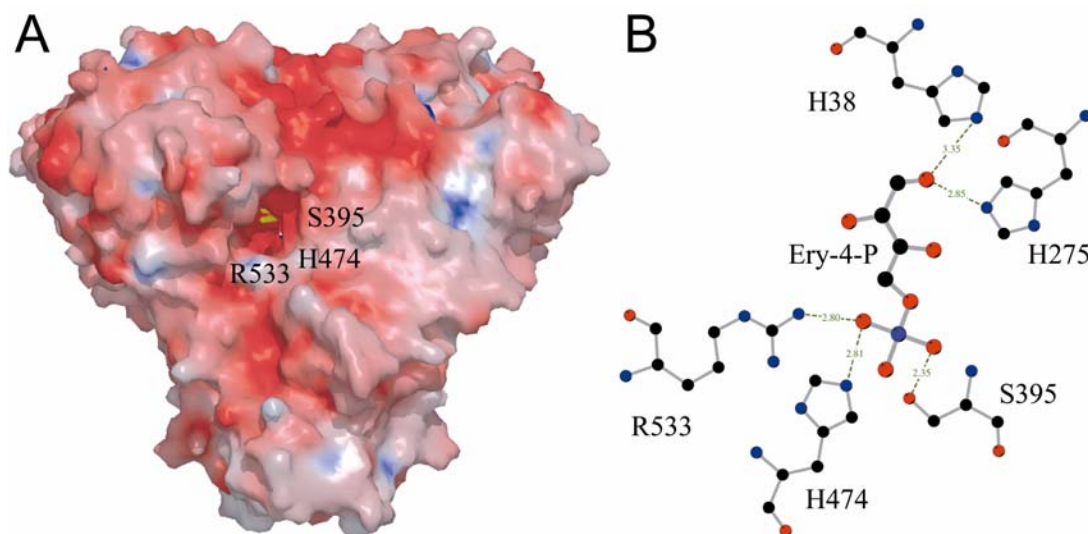


Abb. 4.8: Modell der Substratbindung der ZMTK.

**A:** Oberflächendarstellung des ZMTK-Dimers; **B:** H-Brücken-Distanzen [Å] des gemodelten Akzeptorsubstrate Erythrose 4-phosphat zu verschiedenen Resten des aktiven Zentrums.



#### 4.1.5 Diskussion

##### *Expression, Reinigung und Kristallisation der ZMTK*

Das von dem Expressionsvektor pET32-TK17-otp codierte Fusionsprotein konnte exprimiert, gereinigt und in zwei Kristallformen kristallisiert werden, jedoch nur, wenn die Proteinlösung zum Zeitpunkt des Kristallisationsexperimentes 10 – 25 Tage alt war (Echt, 2000). Von einem Kristall der Form II wurde ein Datensatz für die Röntgenstrukturanalyse aufgenommen. Dieser konnte jedoch nicht ausgewertet werden, da die Kristalle offensichtlich verzwillingt waren.

Edmansequenzierung eines TK17-Kristalles ergab, daß die ersten 36 Aminosäuren des Proteins durch spontane Defragmentieren verloren gegangen waren, wodurch eine um zwei Aminosäuren verkürzte TK entstanden war. Um Heterogenität der Kristallisationslösung durch Defragmentierung auszuschließen und die Kristallisation mit frischer Proteinlösung zu ermöglichen, wurde der Tag-Bereich neu gestaltet und die Thrombinschnittstelle direkt an den N-Terminus der maturierten TK verlegt. Die optimierte ZMTK ohne überflüssige Aminosäuren am N-Terminus konnte gereinigt werden und kristallisierte im Gegensatz zu TK17 als frische Lösung innerhalb von 2 – 3 Tagen.

Die spezifische Aktivität der ZMTK unterscheidet sich mit  $25,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  nur unwesentlich von dem Wert der Tk17 mit  $23,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  (Echt, 2000) und liegt damit im selben Bereich wie die mit  $30$  bzw.  $12 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  angegebenen Werte für rekombinante Paprika-TK (Bouvier *et al.*, 1998) bzw. native Spinat-TK (Teige *et al.*, 1998). Auch die  $K_M$ -Werte für R5P bewegen sich mit  $581 \mu\text{M}$  für die ZMTK und  $750 \mu\text{M}$  sowie  $330 \mu\text{M}$  für die Enzyme aus Paprika und Spinat im selben Rahmen. Für das Substrat Xu5P ergab sich mit  $403 \mu\text{M}$  ein vier-fünffach höherer Wert als er für die Paprika- bzw. Spinat-TK berichtet wurde ( $95 \mu\text{M}$  bzw.  $67 \mu\text{M}$ ).

##### *Kristallstruktur der ZMTK*

Die TK aus *Saccharomyces cerevisiae* (**SCTK**) wurde hinsichtlich ihrer mechanistischen Eigenschaften sehr intensiv mittels Röntgenstrukturanalyse und Mutagenese untersucht (Nilsson *et al.*, 1993; Nikkola *et al.*, 1994; Wikner *et al.*, 1995; Nilsson *et al.*, 1997; Wikner *et al.*, 1997; Schneider & Lindqvist, 1998). ZMTK und SCTK zeigen eine Sequenzidentität von 53 %. Diese Ähnlichkeit zeigt sich auch auf der Ebene der Röntgenstrukturen. Die monomeren Untereinheiten können mit

einer *r.m.s.*-Abweichung von 0,91 Å für 638 C $\alpha$ -Atome überlagert werden (Abb. 4.9).

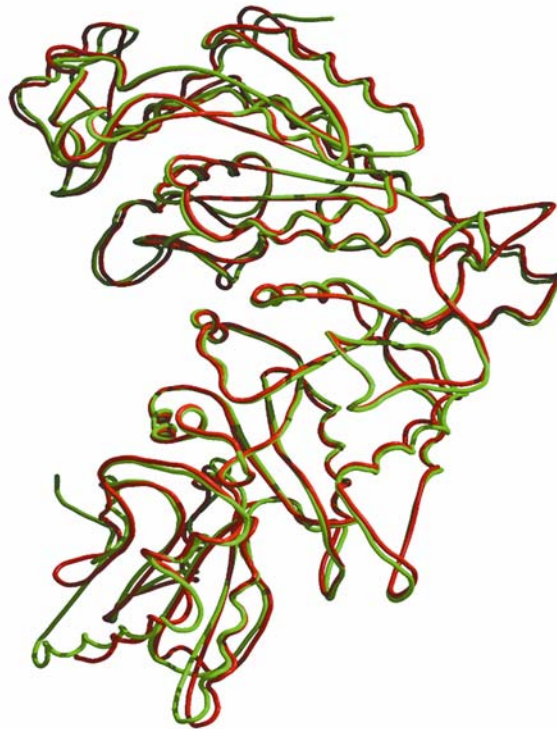


Abb. 4.9: Überlagerung des C $\alpha$ -Gerüsts der ZMTK und der SCTK. Rot: ZMTK; grün: SCTK .

Aminosäuren der SCTK, die an der Bindung des Cofaktors bzw. der Substrate beteiligt sind, wurden identifiziert und charakterisiert. Besonders wichtig sind hierbei die konservierten Reste H30 und H263, die sich in H-Brücken-Entfernung zur Aldehydgruppe des Akzeptorsubstrates E4P befinden (Nilsson *et al.*, 1997). Die Phosphatgruppe des Substrates wird fixiert durch die ebenfalls streng konservierten Reste R528, R359 und H469, die sich am Eingang des Substratkanals befinden. Ein Modell der ZMTK-Struktur im Komplex mit E4P bestätigt diese Konformation grundsätzlich. Die Reste H38 und H275 konnten als H-Brückenpartner der E4P-Aldehydgruppe identifiziert werden, während der Phosphatrest in einer Bindungsstelle aus den konservierten Resten S395, R533 und H474 zu liegen kommt.

Die Bedeutung der Phosphatbindungsstelle liegt zum einen in der Unterscheidung zwischen phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Zuckern. Letztere werden nur mit sehr geringer Affinität als TK-Substrate akzeptiert (Schenk *et al.*, 1998). Desweiteren ist die Architektur des Substratkanals und insbesondere die Lage von R533 (R528 bei SCTK) verantwortlich für die erstaunliche Tatsache, daß TKs eine große Anzahl phosphorylierter Zucker mit Kettenlängen von 3 – 7 C-Atomen umsetzen können. R533 kann aufgrund seiner beweglichen Seitenkette Lageänderungen des Substratphosphatrestes ausgleichen und somit die korrekte Positionierung des Substratmoleküls im aktiven Zentrum gewährleisten (Nilsson *et al.*, 1997).

#### 4.2 Die Tyrosinhydroxylase aus *Drosophila melanogaster*

Das Gen der THII aus *D. melanogaster* (TrEMBL Accession No. Q24000 ) wurde im Labor von Dr. Eva Franken, Bayer CropScience, kloniert und in Form der Expressionskonstrukte pET3-THII (THII ohne Tag), pET14-THII (THII mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag) und pET32-THII (THII mit N-terminaler Trx-Domäne und His<sub>6</sub>Tag; s.a. 2.4.2) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle drei Konstrukte wurden auf DNA-Ebene vollständig sequenziert. Dabei zeigte sich, daß die Sequenz der Klone an insgesamt 15 Stellen von der in der Datenbank publizierte Gensequenz abweicht; bis auf einen (D151E) sind jedoch alle Basenaustausche konserviert. Tab. 4.2 listet die Unterschiede beider DNA-Sequenzen auf. Da die gleichen Abweichungen bei drei von einander unabhängig amplifizierte Klone auftreten, kann von einem neuen Allel des TH-Gens ausgegangen werden.

Base	Q24000	Eigene Sequenz	Aminosäuren -austausch
453	T	A	D151E
663	C	T	-
712	T	C	-
753	A	G	-
759	T	C	-
831	A	T	-
852	A	G	-
858	C	T	-
867	A	C	-
942	G	C	-
986	C	T	-
1098	C	G	-
1137	T	C	-
1215	G	C	-
1458	C	T	-

Tab. 4.2: Basen- und Aminosäurenaustausche der klonierten THII-Sequenz gegen über dem Datenbankeintrag Q24000

Bei Kristallisationsversuchen können überzählige Aminosäuren aus Tag-Sequenzen aufgrund ihrer höheren Flexibilität hinderlich sein. Daher bildete das Plasmid pET3-THII, das für THII ohne Tags codiert, die Grundlage aller weiteren TH-Konstrukte dieser Arbeit.

#### **4.2.1 Konstruktion von TH I und den Einzeldomänen**

Alle bisher bekannten Röntgenstrukturen aromatischer Aminosäure-Hydroxylasen basieren auf Deletionskonstrukten. So ist die Struktur der Phenylalanin-Hydroxylase aus Mensch bekannt als Tetramer der katalytischen Domänen (Fusetti *et al.*, 1998) bzw. als Monomer ohne C-terminalen Tetramerisierungsarm (Kobe *et al.*, 1999). Auch die katalytische Domäne der Tyrosinhydroxylase aus Ratte konnte als Tetramer kristallisiert und die Röntgenstruktur gelöst werden (Goodwill *et al.*, 1997).

In Anlehnung an diese Arbeiten wurden verschiedene Domänenkonstrukte der TH I und II kloniert. Die Domänengrenzen wurden anhand von Sequenzvergleichen mit der bekannten Ratten-TH-Struktur (Goodwill *et al.*, 1997) bzw. Deletionsstudien desselben Enzyms (Daubner *et al.*, 1993; Vrana *et al.*, 1994) definiert.

Abb. 4.10 zeigt einen Überblick aller im Rahmen dieser Arbeit klonierten TH-Konstrukte. Primersequenzen sind im Anhang angegeben (7.1.2). Die Identität aller Konstrukte wurde durch DNA-Sequenzierung (3.2.7) bestätigt.

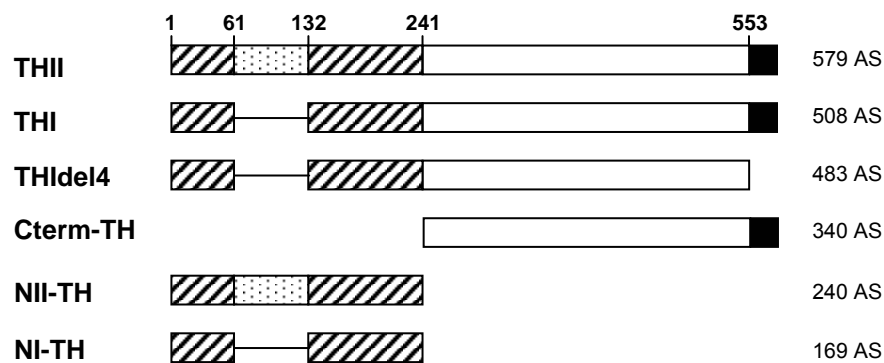


Abb. 4.10: Übersicht der klonierten TH-Konstrukte  
 Zahlen oberhalb bezeichnen die jeweilige Aminosäure an Domänengrenzen bezogen auf die Nummerierung der THII. Zahlen hinter den Balken geben die jeweilige Anzahl an Aminosäuren (AS) des betreffenden Konstruktes an. **Schraffiert**: regulatorische Domäne; **gepunktet**: THII-spezifische Insertion; **weiß**: katalytische Domäne; **schwarz**: Tetramerisierungsarm. Weitere Abkürzungen siehe Text.

#### 4.2.1.1 Klonierung der katalytischen TH-Domäne

Die katalytische Domäne der TH aus *D. melanogaster* (**Cterm-TH**) wurde wie unter 3.2 beschrieben mit den Primern DMTH-Cter-NdeI-vo und DMTH-BamHI-hi mittels PCR aus pET3-THII amplifiziert und das 1046 bp-Fragment nach Verdau mit *NdeI* und *BamHI* in den ebenso geschnittenen Vektor pET3-THII ligiert. Es resultierte das Plasmid pET3-Cterm-TH. Die codierte Sequenz entspricht den Aminosäuren 241 – 579 bezogen auf die Nummerierung von THII. Zusätzlich wurde ein Startmethionin angefügt.

#### 4.2.1.2 Klonierung der beiden regulatorischen Domänen-Varianten

Die regulatorische Domäne (Aminosäure 1 – 240) von THII (**NII-TH**) wurde wie unter 3.2 beschrieben mit den Primern DMTH-Nter-lang-NdeI-vo und DMTH-Nter-lang-BamHI-hi mittels PCR aus pET3-THII amplifiziert und das 746 bp-Fragment nach Verdau mit *NdeI* und *BamHI* in den ebenso geschnittenen Vektor pET3-THII ligiert. Es resultierte das Plasmid pET3-Nterm-THII.

Die 71 Aminosäuren lange Insertion der NII-TH erstreckt sich von Aminosäure 61 bis 131 der THII-Sequenz. Zur Klonierung der 169 Aminosäuren umfassenden

regulatorischen Domäne von THI (**NI-TH**) ohne den sauren Abschnitt wurde der Forward-Primer DMTH-delta71aa-XhoI-vo so definiert, daß er den ersten 9 Codons vor der Insertion (in diesem Bereich liegt eine XhoI-Schnittstelle) gefolgt von den nächsten 8 Codons dahinter entspricht. Da der Primer zwei etwa gleich große Genbereiche erkennt, war ungewollte Hybridisierung mit dem Bereich vor der Insertion zu befürchten. Aus diesem Grunde wurde das Plasmid pET3-THII mit dem Restriktionsenzym HpaI verdaut (3.2.5). HpaI schneidet u.a. 12 bzw. 800 bp nach Ende der Insertion. Außerdem sind 15 weitere Fragmente zu erwarten, die jedoch alle deutlich kleiner als das gewünschte 788 bp-Fragment sind. Der Restriktionsansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese fraktioniert und die gesuchte Bande extrahiert (3.2.3.2). Das 5'-Ende des 788 bp-Fragments überlappt mit 12 Basen mit dem 3'-Ende des Primers DMTH-delta71aa-XhoI-vo und kann demnach als Matrize in einer PCR (3.2.4.1) mit dem Reversed-Primer DMTH-Nterm-lang-BamHI-hi dienen. Das amplifizierte 377 bp-Fragment wurde mit *XhoI* und *BamHI* geschnitten (3.2.5) und in den ebenso restringierten Vektor pET3-THII ligiert (3.2.6). Es resultierte das Plasmid pET3-Nterm-THI.

#### 4.2.1.3 Klonierung von THI mit und ohne Tetramerisierungsdomäne

Zur Klonierung der 509 Aminosäuren umfassenden THI wurden die ersten 661 bp der NI-TH-Domäne mit den Enzymen *NdeI* und *Bsu36I* aus dem Vektor pET3-Nterm-THI ausgeschnitten (3.2.3.2) und in den ebenso verdauten Vektor pET3-THII ligiert (3.2.6). Es resultierte das Plasmid pET3-THI.

Zur Deletion der für die Tetramerisierung mutmaßlich nötigen 26 C-terminalen Aminosäuren der THI wurde der Bereich von Aminosäure 441 – 483 vollsynthetisch aus den Oligonukleotid-Paaren TH-deltetra-1/2 und TH-deltetra-3/4 aufgebaut (3.2.4.2). Das resultierende 167 bp-Fragment wurde wie unter 3.2 beschrieben mit den Restriktionsenzymen *XcmI* und *BamHI* verdaut und in den ebenso geschnittenen Vektor pET3-THI ligiert. Es resultierte das Plasmid pET3-THI-del4

#### 4.2.2 Expression der TH-Konstrukte

Erste Expressionsversuche wurden mit den Expressionskonstrukten pET3-THII, pET14-THII und pET32-THII in den pET-Wirtsstämmen BL21 *trxB* (DE3) und AD494 (DE3) durchgeführt (3.1.2.1). Die Testexpressionen ergaben eine gute Überexpression löslichen Enzyms bei allen drei Konstrukten mit einer Induktionsphase bei 18 °C über Nacht.

Abb. 4.11 zeigt den Rohextrakt eines BL21 (DE3) pET3-THII-Klones. THII läuft im SDS-Gel mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 80 kDa bei einem theoretischen Molekulargewicht von 66 kDa. Dieser Effekt beruht vermutlich auf einer verminderten Bindung des SDS im Bereich des sauren Loops (Vié *et al*, 1999) und tritt auch bei NII-TH auf (vgl. Abb. 4.13, Kap. 4.2.3.2).

Die Induktion bei 37 °C führte zur Bildung von Inclusion bodies sowohl bei pET3-THII als auch bei den getaggten Konstrukten. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden alle weiteren TH-Konstrukte (4.2.1) bei 18 °C exprimiert.

Das Expressionsverhalten sämtlicher TH-Expressionskonstrukte war sehr instabil. Kulturen, die aus Glycerinkultur (3.1.3) oder von über sieben Tage alten Transformationsplatten angeimpft wurden, zeigten keine oder nur minimale Expression. Außerdem konnte beobachtet werden, daß das Expressionsniveau der Hauptkultur niedrig ausfiel, wenn bereits in der Vorkultur eine hohe (unlösliche) Expression auftrat. Um die nicht induzierte Expression in der Vorkultur zu verhindern, wurden

Expressionskulturen nach anfänglicher Verwendung von BL21 (DE3) später vornehmlich mit dem Stamm BL21 (DE3) [pRep4-Cat-Lys-K128MΔlacI] (2.3.2) durchgeführt.

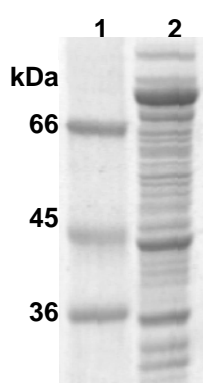


Abb. 4.11: Expression der THII  
Bahn 1: SDS-Größenstandard; 2: Rohextrakt des Klons BL21 (DE3) pET3THII



### 4.2.3 Reinigung der TH-Konstrukte

Das in der Literatur (Vié *et al.*, 1999, 3.3.3.4) beschriebene Reinigungsprotokoll für THI und THII beinhaltet zunächst Ionenaustauschchromatographie an einem schwachen Anionenaustauscher gefolgt von Ammoniumsulfat-Fällung. Das resultierende Pellet wird in Aufschlußpuffer solubilisiert und über einen starken Anionenaustauscher fraktioniert. Dieses Protokoll führt zwar zu einer starken Anreicherung beider Isoformen, jedoch nicht zu einer für Kristallisationsexperimente wünschenswerten Homogenität (Vié *et al.*, 1999). Zudem kann sich die Ammoniumsulfat-Fällung negativ auf die Reproduzierbarkeit von Kristallisationsexperimenten auswirken, da u.U. das Ammoniumsulfat nicht vollständig aus der Proteinpräparation entfernt wird.

#### 4.2.3.1 Reinigung von THI und THII

Sowohl THI als auch THII wurden zunächst in Anlehnung an das Protokoll von Vié *et al.*, 1999 (3.3.3.4) gereinigt. Es zeigte sich jedoch, daß sich das Pellet nach Ammoniumsulfat-Fällung nicht vollständig solubilisieren ließ, so daß hohe Ausbeuteverluste auftraten.

Für beide Proteine wurde daher in der Folge eine Reinigungsprozedur ohne Ammoniumsulfat-Fällung angewandt (3.3.3.4). Der Rohextrakt wurde an Q-Sepharose FF fraktioniert. Nach Entsalzung wurde weiter über DE52 gereinigt und im letzten Schritt eine Gelfiltration über S200 angeschlossen. Abb. 4.12 zeigt exemplarisch den Reinigungserfolg für THI.

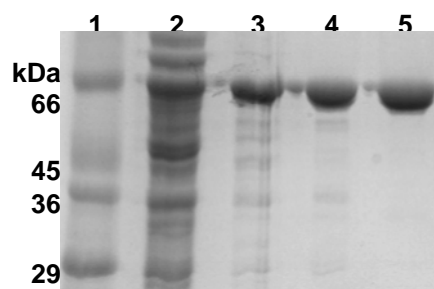


Abb. 4.12: Reinigung rekombinanter THI.  
Bahn 1: SDS-Größenstandard; 2: Rohextrakt; 3: nach Q-Sepharose; 4: nach DE52; 5: nach Gelfiltration.

Edman-Abbau (3.3.6) ergab für beide Isoformen den erwarteten N-Terminus von MMAVAAAQKN. LC-MS (3.3.7) bestätigte die theoretischen Molekulargewichte von THI (57,875 kDa) und THII (66,010 kDa) mit Messwerten von 57,889 bzw. 66,021 kDa.

Die spezifischen Aktivitäten der gereinigten Enzyme wurden wie unter 3.3.11.4 beschrieben ermittelt und betragen  $140 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  für THI bzw.  $450 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  für THII. Aliquots beider Enzyme wurden jeweils bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und die spezifischen Aktivitäten an den darauffolgenden Tagen bestimmt. Dabei zeigte sich, daß bei beiden Enzyme innerhalb von je 24 h ein Aktivitätsverlust von 50 % auftritt.

Aliquots, die bei  $-20^{\circ}$  bzw.  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden, zeigten nach dem Auftauen keinerlei Aktivität mehr. Dies änderte sich auch nicht durch den Zusatz von Glycerin in Konzentrationen bis 50 % vor dem Einfrieren.

#### 4.2.3.2 Reinigung der regulatorischen Domäne von THII

NII-TH wurde wie unter (3.3.3.4) beschrieben über Q-Sepharose FF, Ammoniumsulfat-Fällung und Gelfiltration gereinigt.

Das Protein läuft im SDS-Gel (Abb. 4.13) mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 36 kDa im Gegensatz zum theoretischen Molekulargewicht von 26,849 kDa und dem durch LC-MS gemessenen Wert von 26,876 kDa. Dieser Effekt tritt auch bei THII auf (vgl. Abb. 4.11, Kap. 4.2.2 und Vié *et al.*, 1999). Edman-Abbau ergab die erwartete Sequenz von MMAVAAAQKNRE.

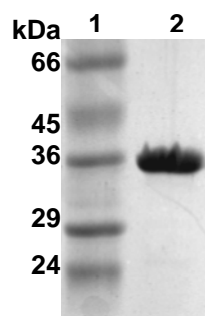


Abb. 4.13: Reinigung rekombinanter NII-TH.  
Bahn 1: SDS-Größenstandard; 2: NII-TH nach Gelfiltration

#### 4.2.3.3 Reinigung der katalytischen TH-Domäne

Cterm-TH wurde wie unter (3.3.3.4) beschrieben über Q-Sepharose FF, DE52 und Gelfiltration gereinigt. Die spezifische Aktivität des gereinigten Proteins betrug  $345 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Abb. 4.14 zeigt das Protein nach Gelfiltration. Edman-Sequenzierung bestätigte den erwarteten N-Terminus mit der Sequenz MKAPWFPKHA. Das theoretische Molekulargewicht von 39,295 kDa konnte durch LC-MS mit einem Wert von 39,296 kDa bestätigt werden.

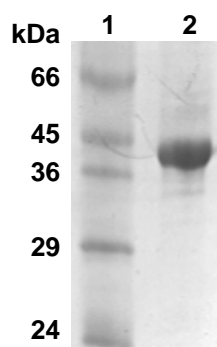


Abb. 4.14: Reinigung rekombinanter Cterm-TH.  
Bahn 1: SDS-Größenstandard; 2: Cterm-TH nach Gelfiltration

#### 4.2.3.4 Reinigungsversuche mit THI ohne Tetramerisierungsdomäne

THI ohne Tetramerisierungsdomäne (**THIdel4**) zeigte in Reinigungsversuchen eine sehr hohe Aggregationsneigung. Bei Aufschlußvolumina (3.3.1) über 10 mL befand sich der größte Teil des Proteins nach Zentrifugation im unlöslichen Pellet. Beim Ultraschallaufschluß mit Volumina unter 10 mL blieb der Großteil der THIdel4 zunächst in der löslichen Fraktion, nach Inkubation über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  trat jedoch Trübung auf (Abb. 4.15). Nach erneuter Zentrifugation befand sich THIdel4 wiederum im unlöslichen Pellet. Der Überstand zeigte keine TH-Aktivität mehr, während die spezifische Aktivität des frischen Rohextraktes noch  $38 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  betragen hatte.

Die Zugabe von 1 % Triton-X-100 konnte die Aggregation der THIdel4 unter diesen Bedingungen verhindert werden, die Anwesenheit von Triton-X-100 ist jedoch für spätere Kristallisationsversuche ungünstig.

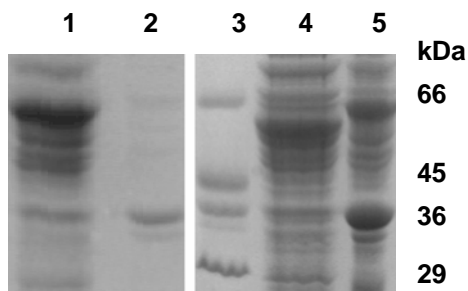


Abb. 4.15: Löslichkeit der THIdel4 in verschiedenen Proben.

Bahn 1: frischer Rohextrakt; 2: unlösliche Fraktion; 3: SDS-Größenstandard; 4: zentrifugierter Rohextrakt nach 16 h bei 4 °C; 5: unlösliche Fraktion nach 16 h bei 4° C

Für einen Reinigungsversuch wurde frischer Rohextrakt über Q-Sepharose FF fraktioniert (3.3.3.4), es konnte jedoch weder im Durchlauf noch in den Fraktionen TH-Aktivität festgestellt werden. Da THIdel4 aufgrund seiner Aggregationsneigung offensichtlich ungeeignet für Kristallisationsexperimente ist, wurde auf weitere Reinigungsversuche verzichtet.

#### 4.2.4 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der THI

Zur Bestätigung der erwarteten tetrameren Quartärstruktur wurde analytische Ultrazentrifugation mit THI durchgeführt (3.3.8, Abb. 4.16). Die Gleichgewichtssedimentationsanalyse ergab ein Molekulargewicht von 239 kDa, was bei einer theoretischen Monomermasse von 57,875 auf ein Homotetramer hindeutet.

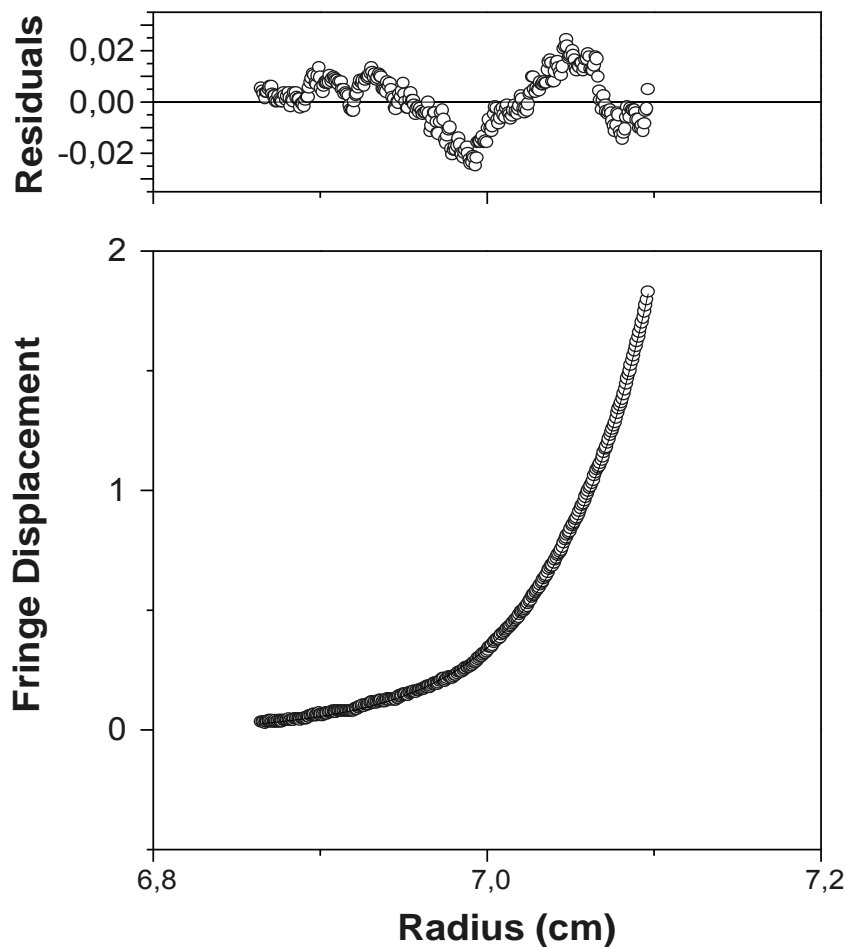


Abb. 4.16: Gleichgewichtssedimentationsanalyse von TH1

#### 4.2.5 Westernblot-Analysen

Für Westernblot-Analysen (3.3.9) der TH-Konstrukte wurde ein monoklonaler Antikörper (2.4.4) der Firma Chemicon gegen ein Epitop im N-Terminus der TH aus Ratte eingesetzt (Herstellerangaben). Die Westernblots dienen v.a. der Identifizierung der gesuchten Proteinbande während der Reinigung der enzymatisch nicht nachweisbaren NII-TH. Beste Resultate ergaben sich bei einer Verdünnung des  $\alpha$ -Tyrosinhydroxylase-Antikörpers von 1:10 000. Die Detektion erfolgte mit einem  $\alpha$ -Maus-Antikörper-HRP-Konjugat (2.4.4) in der Verdünnung 1:1000.

Abb. 4.17 zeigt die Westernblotmembran eines 12% Gels mit Proben der Gesamtpoteine je eines NI-TH-, NII-TH- bzw. Cterm-TH-exprimierenden Klones sowie

einer Probe gereinigter THII nach zwei Wochen Inkubation bei 4 °C. Der Molekulargewichtsstandard ist im Gegensatz zur Abbildung im Originalblot deutlich zu erkennen und wurde entsprechend ergänzt.

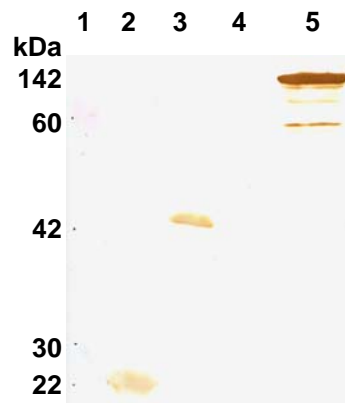


Abb. 4.17: Westernblot-Analyse verschiedener TH-Konstrukte.

Bahn 1: Westernblot-Größenstandard; 2: Rohextrakt von BL21 (DE3) pET3-Nterm-THI; 3: Rohextrakt von BL21 (DE3) pET3-Nterm-THII; 4: Rohextrakt von BL21 (DE3) pET3-Cterm-TH; 5: teilgereinigte THII.

In den Bahnen 2 (NI-TH) und 3 (NII-TH) ist jeweils eine einzelne Bande detektiert worden. Im Vergleich zum Westernblot-Molekulargewichtsstandard entspricht die Laufweite der Bande NII-TH etwa der Laufweite gereinigte NII-TH im SDS-Gel (vgl. 4.12). Die NI-TH-Bande läuft knapp über der 22 kDa-Markerbande. Dies korreliert gut mit der Laufweite dieses Proteins im SDS-Gel zwischen der 21- und 24 kDa-Markerbande (nicht dargestellt). In Bahn 4 (Cterm-TH) wurde keine Bande detektiert, was für die Spezifität des verwendeten Antikörpers im Bezug auf den N-Terminus der TH spricht. THII läuft im SDS-Gel mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 80 kDa (vgl. 4.2.2), was mit der Laufweite der obersten Bande in Bahn 5 korreliert. Bei den darunter liegenden Banden dürfte es sich um Abbauprodukte handeln.

#### 4.2.6 $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie mit NII-TH

Der Klon BL21 (DE3) pET3-Nterm-THII wurde wie unter (3.1.2.1) beschrieben mit  $^{15}\text{N}$ -markiertem Ammoniumchlorid als einziger Stickstoffquelle kultiviert. Das markierte Protein wurde gereinigt (4.2.3.2) und für NMR-Messungen eingesetzt. Dafür wurde die Proteinlösung in 20 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 umgepuffert und eingengt (3.3.5). 470  $\mu\text{L}$  der Lösung mit einer Proteinkonzentration von  $9,5 \text{ mg mL}^{-1}$  wurden mit 10% (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$  versetzt und wie unter (3.3.13) angegeben vermessen.

Das NMR-Spektrum in Abb. 4.18 zeigt neben wenigen scharfen Peaks Bereiche mit hohen Linienbreiten, die eine detaillierte Auswertung und Signalzuordnung erschweren. Das Vorhandensein von schärferen Signalen könnte darauf hindeuten, daß NII-TH zwar teilweise gefaltet vorliegt, es müssen jedoch auch ungefaltete bzw. hochflexible Bereiche vorliegen. Eine weitere Strukturanalyse der NII-TH ist mit dieser Methode daher schwierig.

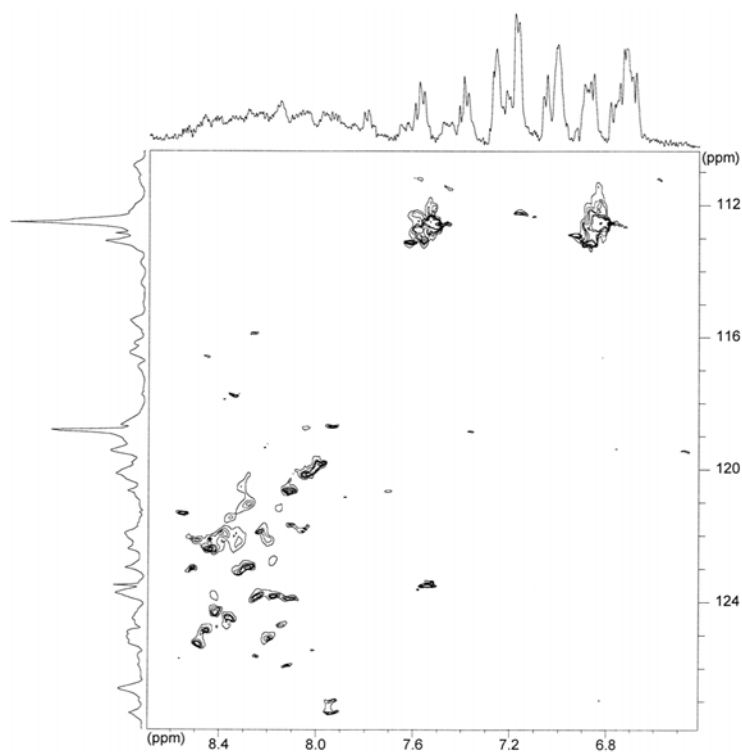


Abb. 4.18: Zweidimensionales  $[^1\text{H}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum des Proteins NII-TH

#### 4.2.7 Kristallisationsexperimente

##### THI

Für die Kristallisationsexperimente (3.3.14.1) wurde nur Protein verwendet, das ohne Ammoniumsulfat-Fällung gereinigt worden war. Die Proteinkonzentration lag zwischen 8 und 12 mg mL<sup>-1</sup>. Zunächst wurde ein Initial-Screening mit CS1+2 sowie PEG/Ion-Screen durchgeführt (3.3.14.1). Die Proteinkonzentration betrug 6,9 mg mL<sup>-1</sup> und es wurde jeweils ein Set Platten mit Apoprotein, mit 200 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, mit 200 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> und Dopamin sowie mit 200 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, BH<sub>4</sub> und 3-Jod-Tyrosin angesetzt. Über Nacht erschienen Mikrokristalle bei folgenden Ansätzen (Tab. 4.3):

Bedingung	Apoprotein	THI mit 200 µM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	THI mit 200 µM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> und Dopamin
CS1-7	+	-	-
CS1-25	+++	-	-
CS1-29	+	++	-
CS1-36	+	+	++
CS2-32	-	-	+
CS2-38	-	+	-
CS2-48	+	-	+
PEG/Ion-30	+	-	-
PEG/Ion-40	++	-	-
PEG/Ion-42	++	+	-
PEG/Ion-46	+	-	-
PEG/Ion-47	++	+	-

Tab. 4.3: Übersicht der gefundenen initialen Kristallisationsbedingungen der THI.

-: keine Mikrokristalle; +: sehr viele winzige Mikrokristalle; ++: viele (>10) Mikrokristalle bis ca. 20 µm; +++: wenige (<10) Mikrokristalle bis ca. 50 µm.

Unter Zusatz von 200 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, BH<sub>4</sub> und 3-Jod-Tyrosin erschienen keine Mikrokristalle und die Präzipitationsneigung der Ansätze war deutlich erhöht. Für alle Bedingungen mit ++ oder +++ wurden Verfeinerungen durchgeführt (3.3.14.1). Die Bedingungen CS1-25, -29, PEG/Ion-46 und -47 mit Apoprotein ließen sich durch Verdünnung der Reservoirlösung leicht verbessern, die Kristalle blieben jedoch weiterhin zu klein für die Röntgenstrukturanalyse.



Mit weiteren Proteinchargen wurde versucht mittels Containerless Crystallisation und Additiv-Screening größere Kristalle zu züchten. Die Kristallisationsfähigkeit der Proteinlösung läßt innerhalb weniger Tage stark nach, so daß mit jeder neuen Charge maximal ein Verfeinerungsschritt ausprobiert werden konnte. Die chargenabhängig stark schwankende Reproduzierbarkeit erschwerte dies zusätzlich.

### *THII*

Mit Protein ( $9,7 \text{ mg mL}^{-1}$ ) aus einer Reinigung nach Vié *et al*, 1999 (3.3.3.4) wurde ein Initial-Screening (3.3.14.1) mit den Screens CS1+2 sowie PEG/Ion-, AS- und NaCl-Screen durchgeführt. Es wurde je ein Set von Platten unter Zusatz von  $1 \text{ mM}$   $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{BH}_4$  und 3-Jod-Tyrosin bzw.  $0,8 \text{ mM}$   $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  und Dopamin pipettiert. Bei der Bedingung CS2-38 ( $0,1 \text{ M}$  HEPES pH 7,5, 20% PEG 20 000) erschienen Mikrokristalle bei Zusatz von  $0,8 \text{ mM}$   $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  und Dopamin. Verfeinerungsversuche mit dieser Proteincharge führten jedoch zu keiner Verbesserung.

Die Mikrokristalle konnten mit keiner weiteren Proteincharge, egal nach welcher Reinigungsmethode, reproduziert werden. Auch wiederholte Kristallisationsversuche mit Apoprotein führten nicht zum Erfolg.

### *Katalytische TH-Domäne und regulatorische Domäne von THII*

Mit beiden Proteinen wurde ein Initial-Screening mit den Screens CS1+2 durchgeführt. Mit NII-TH wurden außerdem die NaCl-, PEG 6000- und PEG/Ion-Screens pipettiert. Die Proteinkonzentration betrug dabei  $9,5 \text{ mg mL}^{-1}$  für NII-TH bzw.  $9,0 \text{ mg mL}^{-1}$  für Cterm-TH. Keiner der Ansätze ergab einen Ansatzpunkt für Verfeinerungen. Die katalytische Domäne scheint für Kristallisationsversuche grundsätzlich ungeeignet, da sämtliche Ansätze präzipitiert waren.

#### 4.2.8 Diskussion

Die DNA-Sequenzanalyse des klonierten Gens für THII ergab insgesamt 15 Basenaustausche im Vergleich zu der aus der Datenbank bekannten Sequenz. Nur einer davon führt allerdings zu einem konservativen Aminosäureaustausch, D151E. Da die aufgetretenen Abweichungen alle in drei voneinander unabhängig amplifizierten Klonen auftreten, kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei der vorliegenden Sequenz um ein neues Allel des TH-Gens handelt. Alle weiteren Konstrukte wurden daher basierend auf dieser Sequenz kloniert.

Beide Isoformen der TH aus *D. melanogaster* wurden exprimiert und gereinigt mit dem Ziel, mittels Proteinkristallisation die Röntgenstrukturen aufzuklären. Die spezifischen Aktivitäten der gereinigten Enzyme liegen mit 140 bzw. 450 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> im gleichen Bereich wie die von Vié *et al.*, 1999, angegebenen Werte von 165,2 bzw. 384,3 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> für THI bzw. THII.

Kristallisationsversuche ergaben Mikrokristalle von THII, die sich jedoch auch nach mehrfachen Reinigungsversuchen nicht reproduzieren ließen. Sehr ähnliche Mikrokristalle ergaben sich auch mit THI. Die Reproduzierbarkeit war auch hier schwierig, da chargenabhängig sehr große Unterschiede der Kristallisationsfähigkeit auftraten. Erschwert wurde die Optimierung der bekannten Kristallisationsbedingungen zudem durch den zeitabhängigen raschen Verlust der Kristallisationsfähigkeit des Proteins. Bereits drei Tage nach der Präparation konnte oft nur noch ein Mikrokristallregen erzeugt werden, während das frische Protein unter gleichen Bedingungen noch Kristalle bis knapp 50 µm hervorgebracht hatte. Der rasche Alterungsprozess von THI und THII zeigt sich auch in dem beobachteten Aktivitätsverlust von 50% pro Tag bei Lagerung bei 4 °C.

Oftmals stabilisiert der Zusatz von Liganden ein Protein in einer bestimmten Konformation, verhindert damit Mikroheterogenität durch das gleichzeitige Vorliegen mehrerer Proteinkonformationen und verbessert damit das Kristallisationsverhalten. Für die humane TH wurde zudem berichtet, daß die Anwesenheit von Catecholaminen das Enzym stabilisiert (Almas *et al.*, 1992). Daher wurden Kristallisationsversuche parallel mit Apoenzym sowie unter Zusatz von Liganden wie Fe<sup>2+</sup> und Dopamin durchgeführt. Zumindest für THI zeigten sich dabei die besten Ergebnisse jedoch für das Apoenzym.

Aufgrund des rapiden Alterungsprozesses der THI könnten Ansatzpunkte für eine erfolgreiche Kristallisation in der Optimierung, d.h. Verkürzung, der Reinigungsstrategie oder in einer Modifikation der Oberflächeneigenschaften des Enzyms durch Proteinengineering liegen.

Bislang ist keine vollständige Struktur einer aromatischen Aminosäurehydroxylase bekannt. Die Phenylalaninhydroxylase aus Mensch konnte nur ohne regulatorische Domäne als Tetramer der katalytischen Domäne (Fusetti *et al.*, 1998) bzw. als Monomer ohne C-terminalen Tetramerisierungsarm (Kobe *et al.*, 1999) kristallisiert werden. Auch die Tyrosinhydroxylase aus Ratte wurde nur als Tetramer der katalytischen Domäne kristallisiert (Goodwill *et al.*, 1997). Möglicherweise läßt die Scharnierregion zwischen katalytischer und regulatorischer Domäne mehrere Konformationen des Enzyms zu und behindert durch diese Heterogenität eine geordnete Kristallisation.

Um dieser Möglichkeit Rechnung zu tragen, wurde die katalytische TH-Domäne konstruiert, exprimiert und gereinigt. Die spezifische Aktivität des Enzyms lag bei  $345 \text{ nmL min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , so daß von einer ordnungsgemäßen Faltung des Proteins auszugehen ist. Kristallisationsversuche mit Cterm-TH erbrachten jedoch kein Ergebnis, da es in der Mehrzahl der Ansätze sehr rasch zu Präzipitation kam.

Dem sauren Cluster in der regulatorischen Domäne von THII kommt besonderes Interesse zu, da zu dieser Sequenz keine Entsprechung in den Datenbanken vorliegen und es nahe liegt, daß sie die Ursache für die unterschiedlichen Regulations-eigenschaften von THI und THII ist (Vié *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurden die regulatorischen Domänen beider Isoformen kloniert und exprimiert.  $^{15}\text{N}$ -markierte NII-TH wurde NMR-spektroskopisch vermessen. Es zeigte sich dabei, daß neben gefalteten auch ungefaltete bzw. sehr flexible Bereiche im Protein vorliegen müssen, so daß keine genauere Strukturbestimmung vorgenommen werden konnte. Aus der Röntgenstruktur der Phenylalaninhydroxylase (Kobe *et al.*, 1999) weiß man, daß regulatorische und katalytische Domäne eng assoziiert sind. Die Regulation mittels PKA-abhängiger Phosphorylierung setzt zudem massive Interaktionen beider Domänen – zumindest in Teilabschnitten – voraus. Daher ist es nicht überraschend, daß die NII-TH-Domäne alleine nicht ihre native Faltung beibehält bzw. möglicherweise in unterschiedlichsten Konformationen vorliegt.

### 4.3 Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *Candida albicans*

#### 4.3.1 Gensynthese und Klonierung des Wildtyp-Gens

Die Sequenz des Gens der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *C. albicans* (**CARib3**) wurde dem Datenbankeintrag orf6.2440 (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>) entnommen. Eine Sequenzanalyse ergab eine hohe Anzahl Codons, die schlecht in *E. coli* exprimiert werden. Zur Optimierung der Sequenz wurden insgesamt 53 der 204 Codons entsprechend der *E. coli*-Codonpräferenz ersetzt. Außerdem wurden 14 singuläre Schnittstellen eingefügt, um zielgerichtete Mutagenese zu erleichtern. In einer Folge von sechs PCR-Amplifikationen wurde das optimierte Gen aus den Oligonukleotidpaaren CARB3-1/-2, CARB3-3/-4, CARB3-5/-6, CARB3-7/-8, CARB3-9/-10, CARB3-11/-12 und CARB3-13/-14 (Oligonukleotidsequenzen im Anhang 7.1.3) synthetisiert (3.2.4.2). Abb. 4.19 zeigt einen Vergleich beider Sequenzen sowie die Anordnung der verwendeten Oligonukleotide.

Das synthetische 661 bp-Fragment wurde mit *EcoRI* und *HindIII* geschnitten (3.2.5) und in den Vektor pNCO113 ligiert (3.2.6) (pNCO-CARib3-syn). Die Sequenz des synthetischen Gens wurde unter der Accession No. AY504626 in der Datenbank hinterlegt. Parallel wurde die Wildtyp-Nukleotidsequenz mit den Primern CAR3-WT-Rbs-*EcoRI* und CAR3-WT-BamHI-hi aus genomischer DNA von *C. albicans* amplifiziert (3.2.4.1) und analog zum synthetischen Gen in pNCO113 ligiert (pNCO-CARib3-WT).

Die DNA-Sequenzierung (3.2.7) beider Konstrukte ergab, daß die amplifizierte Wildtyp-Sequenz gegenüber orf6.2440 fünf Basenabweichungen aufweist. Nur eine davon führt allerdings zu einem Aminosäureaustausch (Q183R). Diese Abweichungen traten bei allen drei sequenzierten pNCO-CARib3-WT-Klonen auf. Zudem ergab ein Aminosäuresequenzvergleich der bekannten DBPS-Sequenzen, daß der entsprechende Rest nicht konserviert vorliegt. Daher kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei der hier klonierten Wildtypsequenz um ein neues Allel handelt. Tab. 4.4 fasst die festgestellten Abweichungen zusammen.

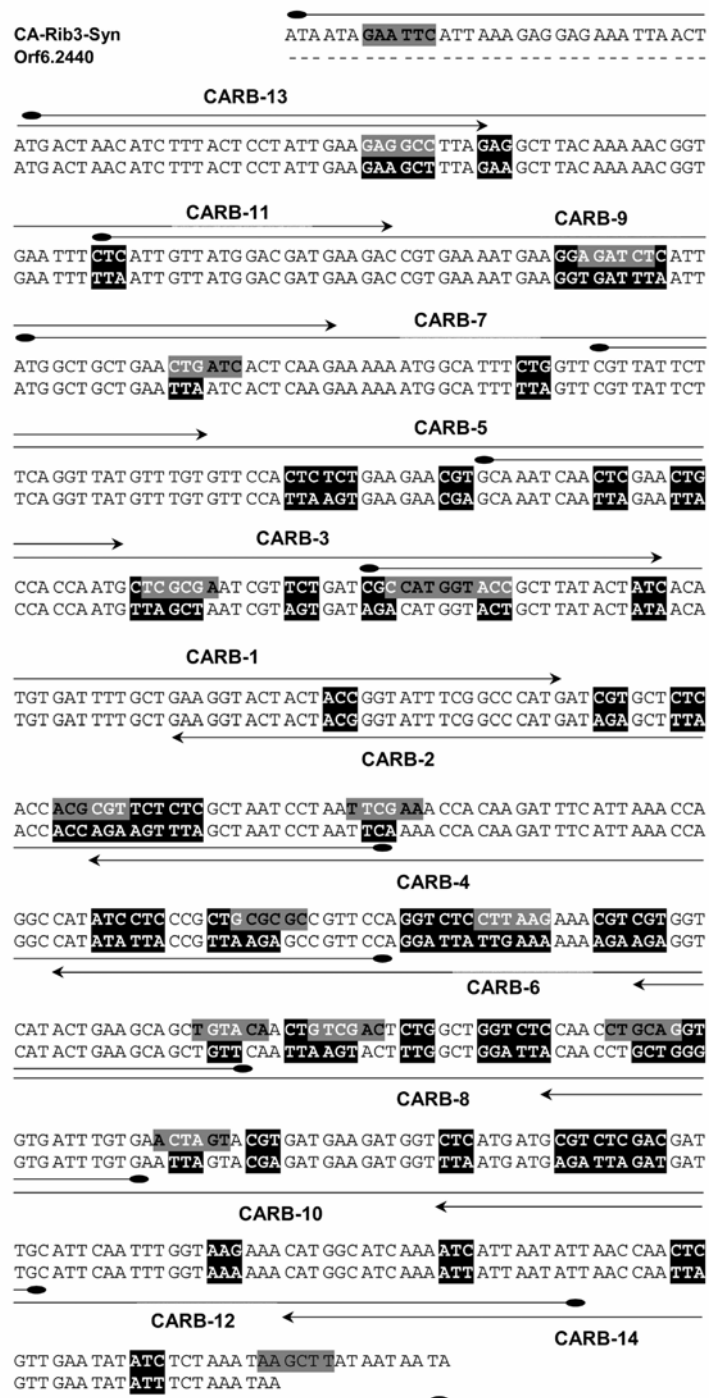


Abb. 4.19: Sequenzvergleich der Codon-optimierten Gensequenz der DBPS aus *C. albicans* mit dem Datenbankeintrag orf6.2440. Veränderte Codons sind schwarz, neu eingefügte singuläre Restriktionsschnittstellen sind grau hinterlegt.

Base	orf6.2440	Wildtyp-Sequenz	Aminosäurenaustausch
414	C	T	-
426	G	A	-
477	A	T	-
480	T	A	-
581	A	G	Q181R

Tab. 4.4: Basen- und Aminosäurenaustausche der klonierten Wildtyp-Sequenz gegen über dem Datenbankeintrag orf.2440

### 4.3.2 Klonierung der Mutanten

Die DBPS aus *M. jannaschii* wurde mittels Röntgenstrukturanalyse (Steinbacher *et al.*, 2003) und zielgerichteter Mutagenese detailliert untersucht (Fischer *et al.*, 2002). Anhand von Struktur- bzw. Sequenzvergleichen mit den orthologen DBPS aus *M. grisea* und *E.coli* (Liao *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2002) konnten zwei Reste (Y87 und D92) des aktiven Zentrums von CARib3 bestimmt werden, von denen noch keine entsprechenden Mutanten bekannt sind (siehe auch Diskussion). Zur weiteren Charakterisierung der CARib3 wurden die Mutanten C59A und E166A in Anlehnung an homologe Mutanten der DBPS aus *M. jannaschii* (Fischer *et al.*, 2002) entworfen. Primersequenzen sind im Anhang aufgeführt (7.1.3). Alle mutierten pNCO-CARib3-syn-Konstrukte wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft (3.2.7).

#### C59A

Der Vektor pNCO-CARib3-syn diente als Matrize in einer PCR-Amplifikation (3.2.4.1) mit dem Primerpaar CARB-14/CA-Rib3-C59A-BclI-vo. CA-Rib3-C59A-BclI-vo enthält die gewünschte Mutation sowie die Detektionsschnittstellen *Sna*BI. Das resultierende PCR-Fragment wurde mit *Bcl*I und *Age*I geschnitten (3.2.5) und in den entsprechend verdauten Vektor pNCO-CARib3-syn ligiert (3.2.6). Es ergab sich daraus das Plasmid pNCO-CARib3-C59A (Accession No. AY549492).

#### Y87A und D92A

Zur Klonierung der Konstrukte pNCO-CARib3-Y87A und pNCO-CARib3-D92A wurde je Mutante ein überlappendes Oligonukleotidpaar definiert, das die ge-

wünschte Mutation sowie die Detektionsschnittstelle *Pml* enthält (Y87A-1/-2 und D92A-1/-2). Es wurden PCR-Amplifikationen (3.2.4.1) mit pNCO-CARib3-syn als Matrize und den Primerpaaren CARB-13/Y87A-2 bzw. D92A-2 (Teilstück A) und CARB-14/Y87A-1 bzw. D92A-1 (Teilstück B) durchgeführt. Die beiden Teilstücke A und B jedes Gens wurden in einer abschließenden PCR mit den Primern CARB-13/-14 als Matrize eingesetzt und die resultierenden 661 bp-Fragmente analog zur Konstruktion von pNCO-CARib3-syn in pNCO113 ligiert (4.3.1). Es resultierten die Plasmide pNCO-CARib3-Y87A (Accession No. AY549495) bzw. pNCO-CARib3-D92A (Accession No. AY549494).

#### *E166A*

Zur Klonierung von pNCO-CARib3-E166A wurde das überlappende Oligonukleotidpaar E166A-1/-2 definiert, das die gewünschte Mutation enthält und die in pNCO-CARib3-syn vorhandene *PstI*-Schnittstelle deletiert. Die Oligonukleotide wurden hybridisiert (3.2.4.4) und in den mit *SalI* und *SpeI* geschnittenen (3.2.5) Vektor pNCO-CARib3-syn ligiert (Accession No. AY549493).

### **4.3.3 Expression und Reinigung der CARib3-Konstrukte**

Alle pNCO-CARib3-Konstrukte mit Ausnahme von pNCO-CARib3-D92A wurden im *E. coli*-Stamm XL1-Blue exprimiert. Die Anzucht (3.1.2.1) erfolgte in LB-Medium bei 37 °C über Nacht. CARib3-D92A exprimierte unter diesen Bedingungen in unlöslicher Form. Durch Transformation (3.1.1.1) in M15 [pRep4] und Induktion bei 20 °C über Nacht konnte das Protein jedoch löslich exprimiert werden. Alle Konstrukte auf Basis von pNCO-CARib3-syn zeigten dabei ein ähnlich hohes Expressionsniveau. Ein Vergleich der Expressionsraten von pNCO-CARib3-syn und pNCO-CARib3-WT mittels SDS-PAGE (3.3.2) ergab ein um etwa das dreifache erhöhtes Expressionsniveau des optimierten Gens (Abb. 4.20). Die Relation der spezifischen DBPS-Aktivität in Rohextrakten beider Konstrukte bestätigt dieses Ergebnis mit Werten von 70 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> für XL1 pNCO-CARib3-syn und 21 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> für XL1 pNCO-CARib3-WT.

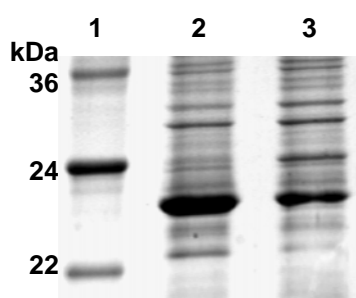


Abb. 4.16: Vergleich des Expressionsniveaus von XL1 pNCO-Carib3-syn und XL1 pNCO-CARib3-WT. Bahn 1: SDS-Größenstandard; 2: Rohextrakt des Klons XL1 pNCO-CARib3-syn; 3: Rohextrakt des Klons XL1 pNCO-CARib3-WT

Die Reinigung von CARib3 (aus XL1 pNCO-CARib3-syn) sowie der Mutanten erfolgte mittels Ammoniumsulfatfällung gefolgt von hydrophober Interaktionschromatographie und Gelfiltration (3.3.3.2). Abb. 4.21 zeigt exemplarisch den Reinigungserfolg für CARib3.

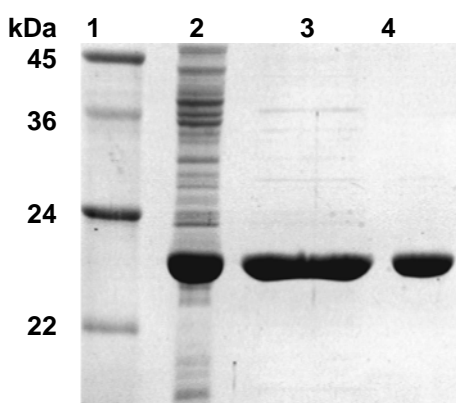


Abb 4.21: Reinigung rekombinanter CARib3. Bahn 1: SDS-Größenstandard; 2: Rohextrakt; 3: nach Phenylsepharose; 4: nach Gelfiltration

Die Enzymaktivität wurde über die verschiedenen Reinigungsstufen verfolgt (3.3.11.2). Die entsprechenden Werte einer typischen Reinigung von CARib3 sind in Tab. 4.5 zusammengefaßt.

Fraktion	$A_{\text{ges}}$ $\text{nmol min}^{-1}$	Protein <sub>ges</sub> mg	$A_{\text{spez}}$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Anreicherung -fach	Ausbeute %
Rohextrakt	33600	448	75,0	1	100
AS-Fällung	48810	224	217,9	2,9	-
PS-Säule	17564	53	331,4	4,4	52,3
Superdex 75	10800	30	360,0	4,8	32,1

Tab. 4.5: Reinigung rekombinanter CARib3.

**Protein<sub>ges</sub>**: Gesamtproteinmenge der Fraktion; **A<sub>spez</sub>**: spezifische Aktivität der Fraktion; **A<sub>ges</sub>**: Gesamtaktivität der Fraktion; die Berechnung der Anreicherung erfolgte auf Basis der  $A_{\text{spez}}$ -Werte, die der Ausbeute auf Basis der Gesamtaktivitäten der Fraktionen.



#### 4.3.4 Molekulargewicht und oligomerer Aufbau von CARib3

Elektrospray-MS (3.3.7) ergab für jedes der fünf Proteine jeweils einen Hauptpeak und einen Nebenpeak mit einer um etwa 131 höheren relativen molekularen Masse, was auf die partielle Abspaltung des Startmethionins schließen läßt. Edman-Sequenzierung der N-Termini (3.3.6) bestätigte diese Beobachtung mit der Sequenz (M)TNIFT. Tabelle 4.6 faßt die Ergebnisse der Elektrospray-MS zusammen.

Protein	MW ohne Met [Da]	Hauptpeak [Da]	MW mit Met [Da]	Nebenpeak [Da]
CARib3	22527	22530	22658	22663
CARib3-C59A	22494	22496	22626	22627
CARib3-Y87A	22434	22435	22566	22567
CARib3-D92A	22483	22484	22614	22614
CARib3-E166A	22469	22470	22600	22601

Tab. 4.6: Übersicht der errechneten Molekulargewichte und experimentellen Elektrospray-MS-Werte von CARib3 und deren Mutanten.

**MW**: Molekulargewicht; **Met**: Startmethionin.

Zur Klärung der Quartärstruktur wurde analytische Ultrazentrifugation mit CARib3 durchgeführt (3.3.8). Die Gleichgewichtsedimentationsanalyse ergab ein Molekulargewicht von 40 900 Da, was auf ein Homodimer hindeutet. Die Geschwindigkeits-sedimentationsanalyse erbrachte einen Sedimentationskoeffizient von 3,0 S.

#### 4.3.5 Kinetische Charakterisierung der CARib3-Konstrukte

Bei den Mutanten CARib3-D92A und CARib3-E166A konnte photometrisch keine meßbare Restaktivität festgestellt werden. Für CARib3, CARib3-C59A und CARib3-Y87A wurde zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für Ribulose-5-phosphat die Konzentration des Substrates variiert und der Test ansonsten wie unter (3.3.11.2) beschrieben durchgeführt. Die jeweiligen  $v_{max}$ - und  $K_M$ -Werte sind in Tab. 4.7 dargestellt.

Protein	$v_{\max}$ [nmol mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [μM]	Restaktivität [%]
CARib3	331,9	37	100
CARib3-C59A	232,1	536	70
CARib3-Y87A	6,7	117	2
CARib3-D92A	-	-	0
CARib3-E166A	-	-	0

Tab. 4.7: Vergleich der  $v_{\max}$ - und  $K_M$ -Werte von CARib3 und Mutanten

#### 4.3.6 Konfiguration des Produktes der CARib3

Da bekannt ist, daß beide Enantiomere von DBP als Substrat der Lusy aus *Bacillus subtilis* dienen können (Kis *et al.*, 1995), wurde die Konfiguration des enzymatisch von CARib3 erzeugten DBP mittels CD-Spektroskopie (3.3.12) bestimmt. Der Vergleich des in Abb. 4.22 gezeigten CD-Spektrums mit Referenzspektren von synthetisch hergestelltem D-DBP und enzymatisch von *Candida guilliermondii* hergestelltem L-DBP (Volk & Bacher, 1990) bestätigt, daß das Enzymprodukt der CARib3 die L-Konfiguration besitzt.

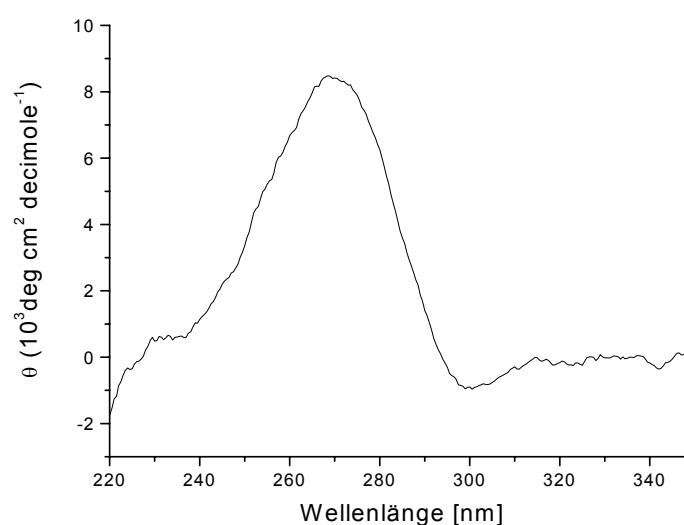


Abb. 4.22: CD-Spektrum des Enzymproduktes L-DBP von CARib3.

### 4.3.7 Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse

#### 4.3.7.1 Kristallisation und Datensammlung

Zur Kristallisation von CARib3 wurde die Proteinlösung in einer Amicon-Rührzelle auf  $17 - 34 \text{ mg mL}^{-1}$  konzentriert und in  $50 \text{ mM Tris/HCl pH } 7.5$  umgepuffert (3.3.5.2).  $3 \text{ }\mu\text{L}$  dieser Lösung wurden mit  $1-2 \text{ }\mu\text{L}$  Reservoirlösung ( $18 \text{ \% PEG } 8000$ ,  $90 \text{ mM MES/NaOH pH } 6.0$ ) gemischt und bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  über  $400 \text{ }\mu\text{L}$  der selben Lösung äquilibriert (3.3.14.1). Für Cokristallisationsexperimente wurde die Proteinlösung mit  $5 \text{ mM EDTA}$  versetzt ansonsten analog kristallisiert. Kristalle wurden bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  für  $5 \text{ min}$  in  $2 \text{ mM Ru5P}$ -Lösung gesoakt.

Die röntgenkristallographische Messung und Datenauswertung wurde freundlicherweise von Frau Stefanie Bauer, Abteilung Strukturforschung, am MPI für Biochemie, Martinsried, durchgeführt (3.3.14.2). Die Struktur von CARib3 ohne Ligand wurde mit Hilfe von molekularem Ersatz anhand der *E. coli*-Struktur (PDB-ID: 1G57) gelöst. Es konnte eine Auflösung von  $1,6 \text{ \AA}$  erreicht werden. Die Kristalle gehörten zur Raumgruppe  $P1$  mit Zellkonstanten von  $a = 40,4 \text{ \AA}$ ,  $b = 48,1 \text{ \AA}$ ,  $c = 59,8 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 66,2^\circ$ ,  $\beta = 71,9^\circ$  and  $\gamma = 89,8^\circ$  und einem Dimer in der asymmetrischen Einheit. Der Matthews-Koeffizient betrug  $2,2 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  mit einem Solventgehalt von  $44\%$ .

Die CARib3-Ru5P-Komplexstruktur wurde bei einer Auflösung von  $1,7 \text{ \AA}$  mit molekularem Ersatz anhand des ligandenfreien Datensatzes gelöst. Die Kristalle gehörten ebenfalls zur Raumgruppe  $P1$  mit Zellkonstanten von  $a = 40,2 \text{ \AA}$ ,  $b = 47,9 \text{ \AA}$ ,  $c = 59,8 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 113,5^\circ$ ,  $\beta = 107,7^\circ$  und  $\gamma = 89,9^\circ$ .

#### 4.3.7.2 Strukturbeschreibung der CARib3

Ein CARib3-Monomer besteht aus  $203$  Aminosäuren (ohne Startmethionin, vgl. 4.3.4), das endgültige Modell der asymmetrischen Einheit der ligandenfreien Struktur enthält ein Dimer mit  $390$  Resten. Es wurde keine Elektronendichte der ersten beiden N-terminalen Aminosäuren sowie der Reste  $78 - 83$  gefunden.

Die asymmetrische Einheit der Komplex-Struktur enthält ebenfalls ein Dimer bestehend aus  $387$  Resten sowie einem Molekül Ru5P je Monomer.

### Grundsätzlicher Aufbau

Die Röntgenstruktur zeigt CARib3 als Homodimer (Abb. 4.23), wie schon die DBPS aus *E. coli*, *M. grisea* und *M. jannaschii* (Liao *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2002; Steinbacher *et al.*, 2003). Wie die Daten der analytischen Ultrazentrifugation bestätigen, entspricht dies der Konformation des Enzyms in Lösung. Die Interaktion der beiden Monomere beruht hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen im Bereich des Dimer-Interface.

Der allgemeine Aufbau der CARib3-Struktur (Abb. 4.23) gleicht dem  $\alpha$ + $\beta$ -Prinzip der bekannten Strukturen. Das  $C\alpha$ -Gerüst des CARib3-Monomers kann jeweils mit *r.m.s.*-Abweichungen von 0,86 Å (*M. grisea*, 188  $C\alpha$ -Atome), 1,22 Å (*M. jannaschii*, 168  $C\alpha$ -Atome) und 1,03 Å (*E. coli*, 186  $C\alpha$ -Atome) überlagert werden.

Jedes Monomer besteht aus sieben  $\alpha$ -Helices, die ein zentrales gemischtes achtsträngiges  $\beta$ -Faltblatt umgeben. Dieses ist in sich um beinahe 180° gedreht. Die Verbindungen des gemischten Faltblattes sind relativ ungewöhnlich und beinhalten drei Überkreuzungen, die jeweils die C-terminalen Enden von  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 und  $\beta$ 7 mit den N-terminalen Enden von  $\beta$ 3,  $\beta$ 4 und  $\beta$ 8 verbinden. Jede dieser Überkreuzungen weist eine einzelne  $\alpha$ -Helix von zwei bis drei Umdrehungen auf, die sich alle auf der gleichen Seite des Faltblattes befinden.

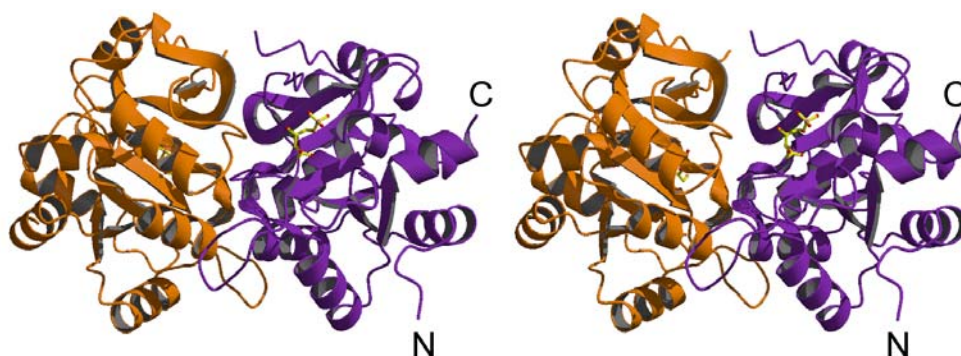


Abb. 4.23: Stereoansicht des CARib3-Dimers. Die Untereinheiten sind violett bzw. orange gefärbt, der Ligand Ribulose-5-phosphat ist als gelbes Ball-and-Stick-Modell gezeigt.

Zwischen dem C-terminalen Ende von  $\beta 4$  und dem N-terminalen Ende von  $\beta 5$  befindet sich ein Abschnitt von insgesamt sechs Resten (Aminosäuren 78 – 83), für die keine Elektronendichte vorhanden ist. Dieser Bereich liegt in den bekannten Strukturen von *M. jannaschii* und *M. grisea* mit und ohne Liganden jeweils in einer geschlossenen bzw. offenen Konformation vor, was als Hinweis auf eine Rolle bei der Zugangskontrolle zum aktiven Zentrum gedeutet wurde (Liao *et al.*, 2002; Steinbacher *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu ist der saure Loop von D25 bis D34 sowohl in der nativen wie auch der Komplex-Struktur gut in der Elektronendichte definiert und zeigt jeweils die gleiche Konformation (Abb. 4.26).

#### *Architektur des aktiven Zentrums*

Die beiden aktiven Zentren der CARib3 befinden sich im Dimer-Interface und werden jeweils hauptsächlich von den Resten eines Monomers gebildet. Diese entstammen v.a. dem zentralen  $\beta$ -Faltblatt und dem N-Terminus der  $\alpha$ -Helix von R142 bis T146, welche den zentralen Rest H145 beiträgt. Der saure Loop von D25 bis D34 sowie E166 und Y87 sind weitere wichtige Reste des aktiven Zentrums. Die Reste T99 und H128 werden durch das jeweils andere Monomer beigetragen (Abb. 4.24)

#### *Ligandenbindung*

Die Konformation des aktiven Zentrums mit gebundenem Ru5P unterscheidet sich nicht von derjenigen der nativen Struktur. Aufgrund der fehlenden Metallionen liegt vermutlich ein unphysiologischer Bindungsmodus für Ru5P vor, der sich von dem bei der Komplexstruktur des *M. jannaschii*-Enzyms beobachteten unterscheidet. Beiden Strukturen gemeinsam ist die Phosphatbindetasche der Reste R142 und T146 (R150 und T154 bei *M. grisea* bzw. R161 und T165 bei *M. jannaschii*).

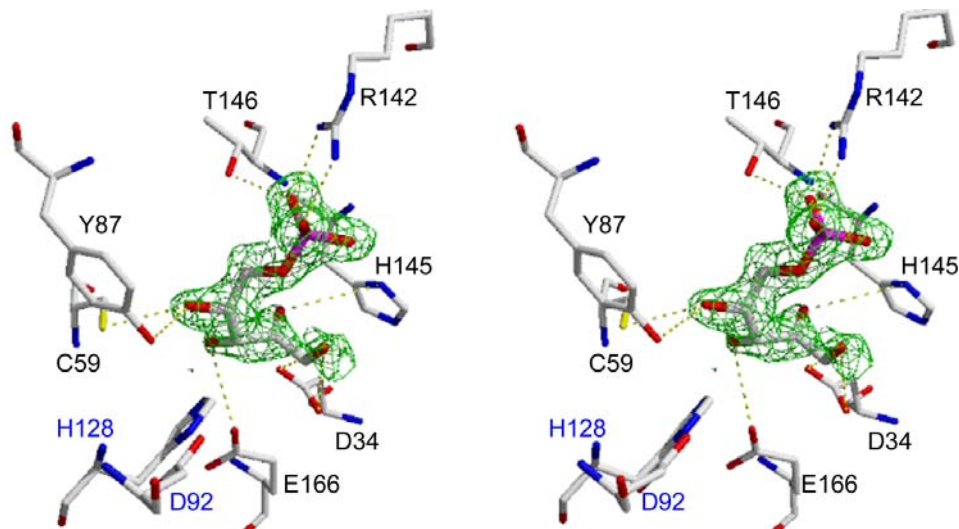


Abb. 4.24: Stereoansicht des aktiven Zentrums der CARib3 mit gebundenem Substrat Ribulose-5-phosphat. Die  $2F_o-F_c$  Elektronendichtekarte des Liganden ist bei  $1,0 \sigma$  konturiert.

Der Ribulose-Teil des Substrates wird durch zahlreiche H-Brücken mit konservierten Resten des aktiven Zentrums gebunden. Die C1-OH-Gruppe und das C2-O-Atom sind über H-Brücken mit H145 verbunden. Eine weitere Verbindung des C2-Sauerstoffs besteht zu D34, das gleichzeitig auch mit der C3-OH-Gruppe verbunden ist. Diese bildet eine zweite H-Brücke mit E166. Die OH-Gruppe an C4 ist schließlich durch H-Brücken mit Y87 und C59 verbunden.

Im Gegensatz dazu bildet der Cysteinrest in der Struktur von *M. jannaschii* eine H-Brücke zur C1-OH-Gruppe, während das Aspartat die Verbindung mit C4-OH macht. Das Histidin bildet dort gleichfalls eine H-Brücke mit dem C2-Sauerstoff, interagiert jedoch nicht mit C1-OH. Y94 des *M. grisea*-Enzyms ist mit dem C2-Sauerstoff verbunden. Die einzige Gemeinsamkeit der Substratbindung beider Strukturen neben der Phosphatbindetasche liegt in der H-Brücke des E zur C3-OH-Gruppe.

#### 4.3.8 Diskussion

##### *Expression, Reinigung und Mutagenese von CARib3*

Das Gen der CARib3 wurde aus genomischer DNA kloniert und parallel vollsynthetisch unter Optimierung der Codonbelegung für die Expression in *E. coli* hergestellt. Ein Expressionsvergleich beider Sequenzen bestätigte den Erfolg dieser Strategie durch ein etwa dreifach höheres Expressionsniveau des optimierten Gens gegenüber der Wildtyp-Sequenz bei vergleichbarer Enzymaktivität. Zugleich ergab die DNA-Sequenzanalyse, daß ein neues Allel des CARib3-Gens kloniert worden war, da die DNA-Sequenz an insgesamt fünf Positionen von dem bekannten Datenbankeintrag orf6.2440 abweicht. Eine dieser Abweichungen führt zum Aminosäureaustausch Q181R. Wie eine Datenbankrecherche ergab, liegt der betreffende Rest in anderen DBPS nicht konserviert vor.

CARib3 wurde gereinigt und mittels analytischer Ultrazentrifugation und kinetischer Untersuchung charakterisiert. Das Protein liegt mit einem nativen Molekulargewicht von 41 kDa ebenso als Homodimer vor, wie die entsprechenden Orthologen aus *E. coli* (Richter *et al.*, 1999) und *M. jannaschii* (Fischer *et al.*, 2002). Auch die spezifischen Aktivitäten der drei Enzyme liegen mit 332, 152 und 174 nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> in derselben Größenordnung.

Zur näheren Charakterisierung des aktiven Zentrums wurden die Mutanten CARib3-C59A, CARib3-Y87A, CARib3-D92A und CARib3-E166A kloniert, exprimiert und gereinigt. Die zu C59 und E166 homologen Reste der DBPS aus *M. jannaschii* (C55 und E185) wurden bereits durch Mutagenese untersucht (Fischer *et al.*, 2002). Austausch des Cysteins durch Serin oder Glycin führte zu Mutanten mit relativ hoher Restaktivität (44 bzw. 19%) und deutlich erhöhten K<sub>M</sub>-Werten. Diese Beobachtungen werden durch CARib3-C59A mit 70% der Wildtyp-Aktivität und um den Faktor 14 erhöhtem K<sub>M</sub>-Wert bestätigt. Die Mutante CARib3-E166A ist wie die vergleichbaren E185-Mutanten inaktiv.

Ein Sequenz- und Strukturvergleichen der vorliegenden Röntgenstrukturen der DBPS aus *E. coli*, *M. grisea* und *M. jannaschii* zeigte für das letztgenannte eine kleine Abweichung in der Architektur des aktiven Zentrums. Bei *M. jannaschii* ist H147 über eine H-Brücke mit N106 stabilisiert, während bei *M. grisea* H136 eine

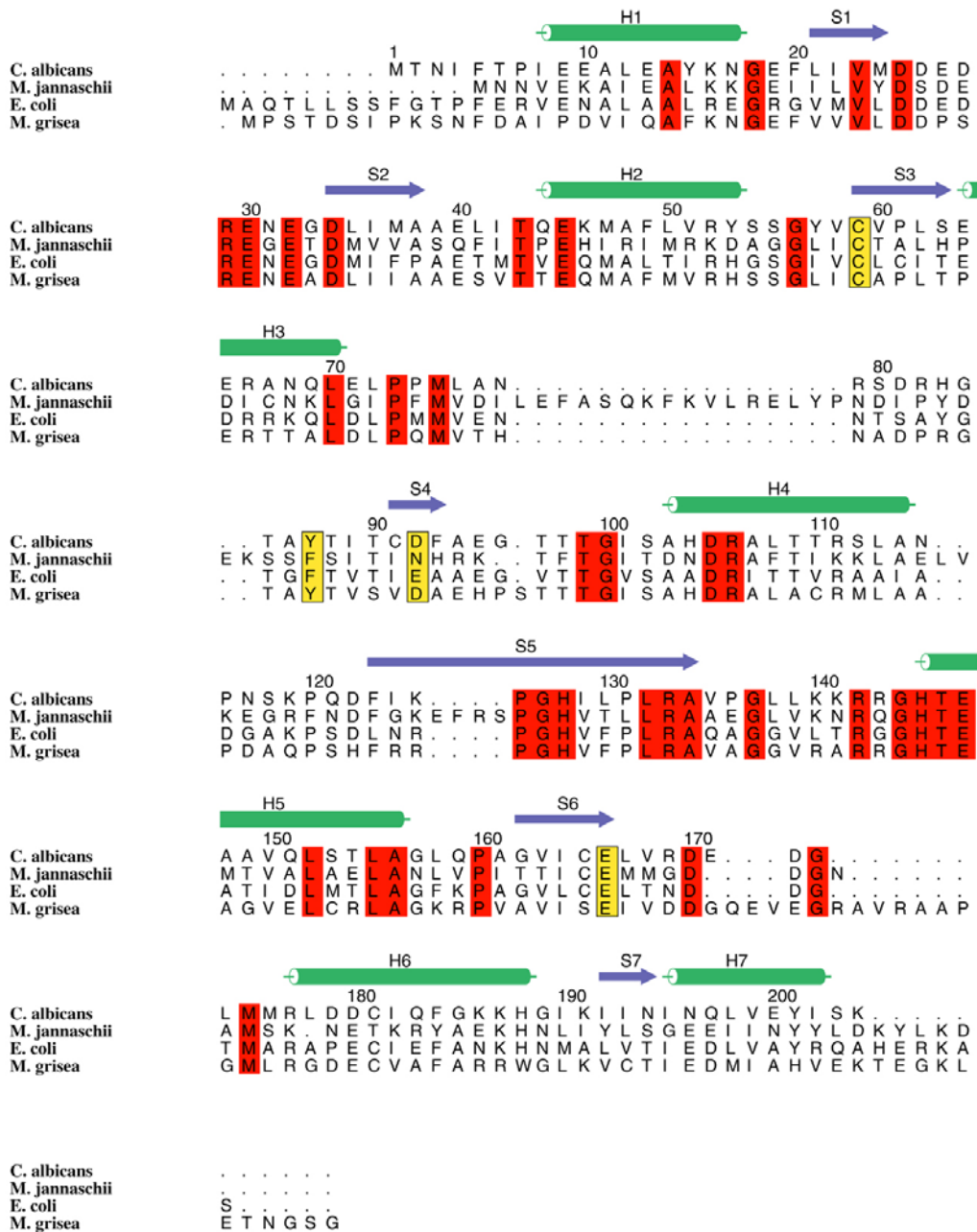


Abb. 4.25: Sequenz-Alignment aller DBPS mit bekannter Röntgenstruktur. Konservierte Aminosäuren sind rot hinterlegt. Im Rahmen dieser Arbeit mutierte Reste bei CARib3 sind gelb markiert. Über den Sequenzen ist die Sekundärstruktur von CARib3 angegeben.

Dyade mit D99 bildet. Der betreffende Rest ist bei Archaeen durch Asparagin, bei allen übrigen Organismen durch Glutamat oder Aspartat vertreten.

Ein weiterer nicht streng konservierter Rest des aktiven Zentrums ist Y94 (*M. grisea*), das auch durch Phenylalanin ersetzt werden kann. Bei *M. jannaschii* tritt



F101, bei *E. coli* F95 als Homolog zu Y94 auf (Abb. 4.25). Obgleich Y94 eine H-Brücke zum C2-Sauerstoff des Liganden bildet, wurde seine Interaktion mit dem Substrat oder Intermediaten aufgrund seiner Ersetzbarkeit durch Phenylalanin als nicht essentiell eingestuft. Dem entgegengesetzt zeigt die entsprechende Mutante CARib3-Y87A jedoch nur 2% Restaktivität.

D92 bildet im aktiven Zentrum von CARib3 eine Dyade mit H128. Dieser Rest entspricht H147 bei *M. jannaschii* und kann mit 12% Restaktivität gegen Serin ausgetauscht werden. Überraschenderweise erwies sich die Mutante CARib3-D92A dagegen als gänzlich inaktiv. Zudem zeigte das Protein eine hohe Aggregationsneigung, die sich in erhöhter Präzipitationsneigung bei Kristallisationsversuchen und unlöslicher Expression bei 37 °C äußerte. Offensichtlich führt die Mutation D92A zu einer Destabilisierung des Proteins, die nicht nur das aktive Zentrum betrifft.

#### *Kristallstruktur von CARib3*

Neben der Struktur des nativen Enzyms konnte auch eine Komplex-Struktur mit dem Substrat Ru5P in Abwesenheit des katalytisch notwendigen  $Mg^{2+}$  erhalten werden. Aufgrund des fehlenden Metalls ergab sich ein Bindemodus, der von dem in anderen Komplex-Strukturen beobachteten abweicht. Die Struktur bestätigt jedoch die Beobachtung von Kelly *et al.* 2001, daß das Metall zur Substratbindung nicht benötigt wird.

Der saure Loop von D25 bis D34 ist sowohl in der nativen wie auch in der Komplexstruktur gut in der Elektronendichte definiert und zeigt jeweils die gleich offene Konformation (Abb. 4.26, flapI).

Im Gegensatz dazu konnte der saure Loop in den vorliegenden DBPS-Strukturen von *M. grisea* und *M. jannaschii* in Abwesenheit von Substrat bzw. Metallionen in verschiedenen offenen, größtenteils ungeordneten Zuständen beobachtet werden. Erst in Anwesenheit sowohl eines Liganden als auch der Metallionen, ergab sich eine wohlgeordnete geschlossene Konformation für diesen Bereich. Dabei erfolgt direkte Interaktion beider Metallionen mit dem sauren Loop über die Reste E26 (*M. jannaschii*) bzw. E37 (*M. grisea*) (Steinbacher *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2002). Dies legt den Schluß nahe, daß die Stabilisierung des geschlossenen Zustandes durch die Metallbindung vermittelt wird. Die Anwesenheit von Ru5P alleine genügt offenbar nicht zur Bildung der geschlossenen Konformation.

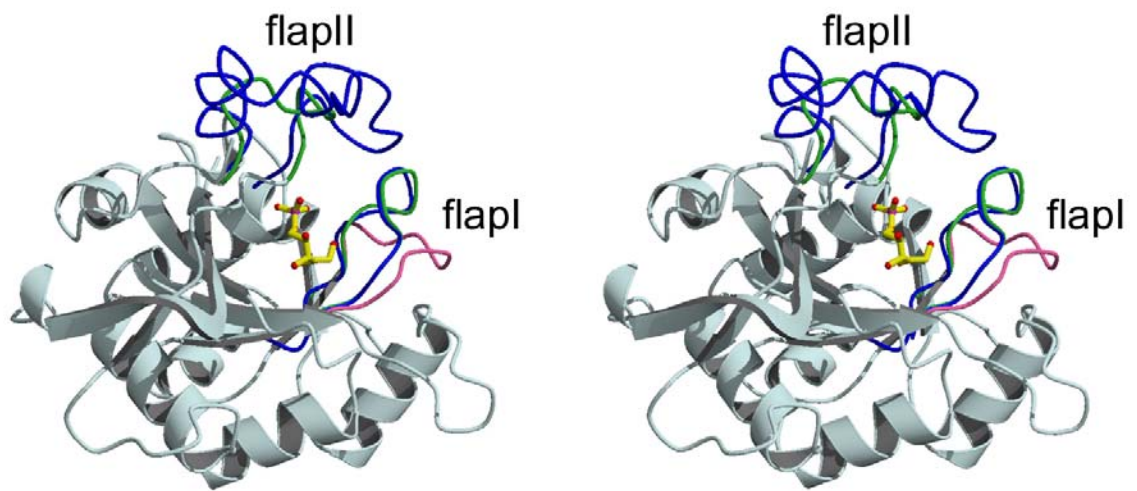


Abb. 4.26: Partielle Überlagerung der Komplexstrukturen der DBPS von *M. grisea*, *M. jannaschii* und *C. albicans*

Es ist jeweils nur eine der Untereinheiten des DBPS-Dimers dargestellt. Das gezeigte Ru5P (gelb) stammt aus der *C. albicans*-Struktur (grau). Abweichende Loop-Regionen sind farblich hervorgehoben: *M. grisea*: grün; *M. jannaschii*: blau; *C. albicans*: pink.

## 4.4 Die GTP-Cyclohydrolase I aus *Arabidopsis thaliana*

### 4.4.1 Versuche im rekombinanten Hefe-System

#### 4.4.1.1 Klonierung eines induzierbaren Hefe-Expressionsvektors

ATGCHI konnte bislang nicht löslich in Bakterien exprimiert werden, in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert das Enzym jedoch löslich und in enzymatisch aktiver Form (Basset et al. und persönliche Mitteilung von Dr. Markus Fischer). Der Hefe-Expressionsvektor pVT103-AT-CycHI ermöglicht eine konstitutive Expression der ATGCHI auf Basis des ADH1-Promotors (Vernet *et al.*, 1987). Das rekombinante Expressionsniveau ist jedoch sehr gering (Basset *et al.*, 2002) und erschwert damit die Reinigung ausreichender Mengen von ATGCHI für Kristallisationsexperimente. Um das Expressionsniveau zu verbessern und die Reinigung des rekombinanten Proteins zu erleichtern wurde ATGCHI mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag versehen und in den Galaktose-induzierbaren Hefe-Expressionsvektor pYES2 (2.4.3) kloniert. Als Matrize diente das Plasmid pNCO-AT-CyHI (Accession No. AF489530), das von Dr. Markus Fischer, Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie III, kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Ein DNA-Fragment von 1470 bp wurde in einer Serie von drei aufeinanderfolgenden PCR-Amplifikationen (3.2.4.1) mit dem Reversed-Primer (Primersequenzen siehe Anhang 7.1.4) AT-Cyc-EcoRI-hi und den Forward-Primern AT-Cyc-Tb-vo, AT-Cyc-His-vo und AT-Cyc-KpnI-vo erzeugt und mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *EcoRI* verdaut (3.2.5). Das resultierende Insert wurde in den auf gleiche Weise restringierten Vektor pYES2 ligiert (3.2.6).

Das erhaltene Plasmid pYES-HisCyclo wurde mittels DNA-Sequenzierung (3.2.7) überprüft. Es codiert für ein 479 Aminosäuren (52,87 kDa) umfassendes Protein aus einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag gefolgt von einer Thrombinerkennungssequenz und der ATGCHI ohne Startmethionin (**His-ATGCHI**).

#### 4.4.1.2 Expression von His-ATGCHI in Hefe

Die Vektoren pYES2, pYES-HisCyclo und pVT103-AT-CyHI wurden wie unter (3.1.1.2) beschrieben in den Hefe-Stamm INVSc1 (2.3.1) transformiert. Es wurden Testkulturen mit je zwei Klonen der Stämme INVSc1 pYES2 und INVSc1 pVT103-AT-CyHI sowie drei Klonen des Stammes INVSc1 pYES-HisCyclo durchgeführt (3.1.2.2). Die INVSc1 pVT103-AT-CyHI-Klone wurden aufgrund ihres konstitutiven Expressionssystems unter nicht-induzierten Bedingungen kultiviert, mit den übrigen Klonen wurden induzierte Kulturen durchgeführt. Nach Induktion über Nacht waren alle Kulturen bis auf die der beiden INVSc1 pYES2-Klone gelb verfärbt.

Nach der Ernte wurde deutlich, daß die Zellpellets aller Klone jeweils gleich gefärbt waren, während die Medium-Überstände der INVSc1 pYES-HisCyclo und pVT103-AT-CyHI-Klone im Vergleich zu INVSc1 pYES2 deutlich gelb verfärbt waren.

Die Zellpellets des Kontrollklons und der drei INVSc1 pYES-HisCyclo wurden aufgeschlossen (3.3.1) und je 20 µg Protein der Rohextrakte für die Westernblot-Analyse eingesetzt (3.3.9). Als Positivkontrolle wurden zusätzlich 10 µg eines His<sub>6</sub>-getaggtten Referenzproteins (59 kDa) aufgetragen. Zum Nachweis des N-terminalen His<sub>6</sub>-Tags der His-ATGCHI wurde ein α-Penta•His-Antikörper (2.4.4) in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit 1:1000 verdünntem α-Maus Antikörper-HRP-Konjugat (2.4.4).



Abb. 4.27: Westernblot-Analyse von Rohextrakten verschiedener His-ATGCHI-exprimierender Hefeklone.

Bahn 1: Westernblot-Größenstandard; 2: 59 kDa-Referenzprotein mit His<sub>6</sub>-Tag; 3: Rohextrakt des Klons INVSc1 pYES2; 4 – 6: Rohextrakte der Klone INVSc1 pYES-HisCyclo-1, -2 und -3.

Auf der Membran (Abb. 4.27) ist neben der Bande des Referenzproteins in Bahn 2 jeweils eine Einzelbande in den Bahnen 4 bis 6 zu erkennen, welche den Klonen INVSc1 pYES-HisCyclo-1, -2 und -3 entsprechen. In Bahn 3 mit dem Kontrollklon INVSc1 pYES2 ist keine Bande zu erkennen. Im Vergleich zum Westernblot-Größenstandard (Bahn 1) und dem 59 kDa-Referenzprotein korreliert die Laufweite der Banden in den Bahnen 4 bis 6 gut mit dem erwarteten Molekulargewicht der His-ATGCHI von knapp 53 kDa.

Gemessen an der Stärke der drei Banden, scheint das Expressionsniveau von Klon 3 am höchsten gewesen zu sein. Daher wurde dieser Klon für alle weiteren Kulturen (3.1.2.2) ausgewählt.

#### 4.4.1.3 Reinigung von His-ATGCHI

His-ATGCHI wurde zunächst wie unter (3.3.3.3) beschrieben durch Affinitätschromatographie an Talon aus Hefe-Rohextrakt gereinigt. Wie die Analyse des Talon-Eluates im SDS-Gel (Abb. 4.28, Bahn 10) zeigt, lag das Protein danach bis auf eine Hauptverunreinigungsbande schon weitgehend sauber vor. Die spezifische Aktivität der Probe betrug  $6,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Es konnten durchschnittlich 7 mg teilgereinigte His-ATGCHI aus 10 g Hefe-Zellpellet isoliert werden.

Zur weiteren Reinigung der His-ATGCHI wurden verschiedene Methoden ausprobiert (3.3.3). Neben Hitzefällung, die bei der Reinigung nativer GCHI aus Spinat zur Anwendung kam (Sohta *et al.*, 1997), wurden Ammoniumsulfat-Fällung und Säulenchromatographie an Hydroxyapatit sowie Q10 durchgeführt. Keine der genannten Methoden führte zu einer Erhöhung der Reinheit, da das Protein entweder irreversibel denaturierte oder mögliche Reinigungseffekte durch das Auftreten von Abbaubanden überlagert wurden. Abb. 4.28 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Säulenchromatographie an Q10.

GCHI-Aktivität konnte in den Fraktionen 7, 8 und 9 (Bahnen 4, 5 und 6) nachgewiesen werden. Im Vergleich zur ursprünglich aufgetragenen Probe (Bahn 10) hat sich die Intensität der His-ATGCHI-Bande in Bezug auf die übrigen Verunreinigungen deutlich vermindert.

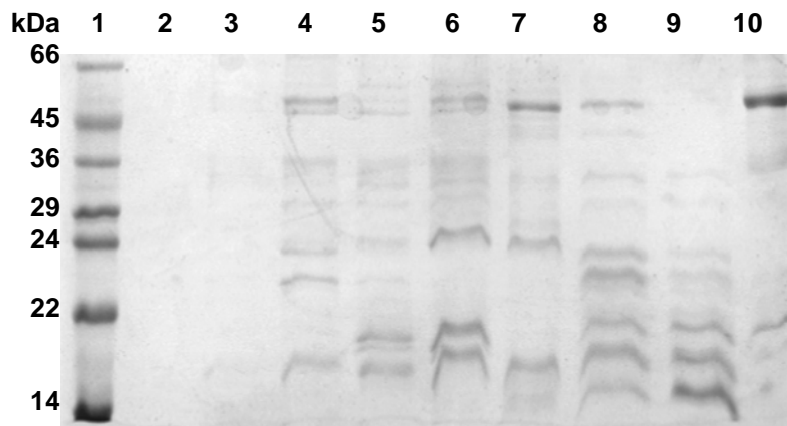


Abb. 4.28: Verschiedene Fraktionen der Reinigung rekombinanter His-ATGCHI an Q10  
Bahn 1: SDS-Größenstandard; 2 – 9: Fraktionen der Q-Sepharose, 2: Fr. 5, 3: Fr. 6, 4: Fr. 7, 5: Fr. 8, 6: Fr. 9, 7: Fr. 10, 8: Fr. 11, 9: Fr. 12; 10: His-ATGCHI nach Talon.

Einzig mit Gelfiltration an S200 (3.3.3) konnte die Sauberkeit des Talon-Eluates weiter erhöht werden (vgl. Abb. 4.29 Teil A). Das Enzym eluierte nach einem Volumen von 191,1 mL, was einem apparenten Molekulargewicht von 100 kDa entspricht. Die spezifische GCHI-Aktivität der Probe stieg von  $6,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  im Talon-Eluat auf  $8,6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  nach der Gelfiltration. Die Aktivität des Rohextraktes war so gering, daß keine verlässlichen Messungen durchgeführt werden konnten.

Wie schon durch die vorangegangenen Reinigungsversuche zu vermuten, war das Enzym ausnehmend instabil und zerfiel innerhalb weniger Tage. Abb. 4.27 Teil B zeigt die vereinten Fraktionen der Gelfiltration nach 5 Tagen bei  $4^\circ\text{C}$ . GCHI-Aktivität war noch meßbar, die Werte schwankten allerdings bei mehrfacher Wiederholung der Messung zwischen  $5,3$  und  $10,9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

Frisches Protein konnte bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert werden und zeigte nach einmaligem Auftauen keinen Aktivitätsverlust und keine Defragmentierung (nicht dargestellt).

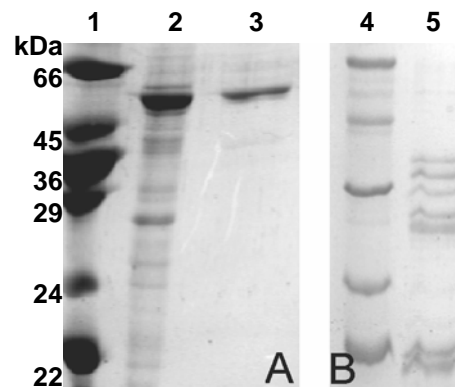


Abb. 4.29: Proben gereinigter His-ATGCHI nach Gelfiltration

**Teil A:** Fraktionen der Gelfiltration direkt nach der Reinigung; **Teil B:** vereinte Fraktionen der Gelfiltration nach 5 Tagen bei 4 °C. Bahn 1 und 4: SDS-Größenstandard; 2: His-ATGCHI nach Talon; 3: nach Gelfiltration; 5: Probe aus Bahn 3 nach 5 Tagen Inkubation bei 4 °C.

#### 4.4.1.4 Kinetische Charakterisierung

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für GTP wurde die Substratkonzentration variiert und der Test ansonsten wie unter (3.3.11.3) beschrieben mit frisch präpariertem Enzym durchgeführt. Der  $K_M$ -Wert beträgt 9,3  $\mu\text{M}$ ,  $v_{\text{max}} = 6,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Abb. 4.30 zeigt den Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substrat-Konzentration.

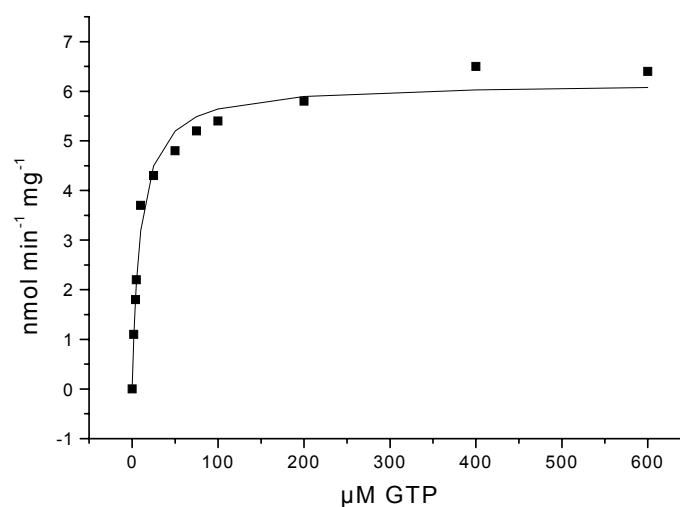


Abb 4.30: Kinetische Charakterisierung von His-ATGCHI: Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die GTP-Konzentration

#### 4.4.2 Versuche im rekombinanten *E. coli*-System

##### 4.4.2.1 Expression und Reinigung der Trx-ATGCHI

Der Expressionsvektor pET32-AT-CycHI wurde von Dr. Markus Fischer, Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie III, kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Er codiert für ein 596 Aminosäuren (65,359 kDa) umfassendes Protein mit N-terminaler 14 kDa-Thioredoxin(**Trx**)-Domäne. Zwischen Trx und ATGCHI befinden sich ein His<sub>6</sub>-Tag sowie eine Thrombinschnittstelle. Nach Thrombinverdau verbleibt ein Gly aus der Thrombinerkennungssequenz am N-Terminus der nun 465 Aminosäuren (51,249 kDa) großen ATGCHI (**Tb-ATGCHI**), welches im Vergleich zur nativen ATGCHI-Sequenz das Startmethionin ersetzt.

Im Rahmen der Master Thesis von Frau Iram Shamim Malik wurde das Plasmid pET32-AT-CycHI in den *E. coli*-Stamm Rosetta-gami (DE3) (2.3.2) transformiert (3.1.1.1). Es wurden Testkulturen von je drei Klonen mit Induktionstemperaturen von 30° und 37 °C über Nacht durchgeführt (3.1.2.1).

Induktion	Klon	$A_{\text{spez}}$ [nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]	
37 °C	Rosetta-gami (DE3) pET32a(+)	0,048	0,235
	Rosetta-gami (DE3) pET32-AT-CycHI-1	0,169	
	Rosetta-gami (DE3) pET32-AT-CycH -2	0,176	
	Rosetta-gami (DE3) pET32-AT-CycH -3	0,361	
30 °C	Rosetta-gami (DE3) pET32a(+)	0,032	0,390
	Rosetta-gami (DE3) pET32-AT-CycHI-1	0,227	
	Rosetta-gami (DE3) pET32-AT-CycHI-2	0,722	
	Rosetta-gami (DE3) pET32-AT-CycHI-3	0,222	

Tab. 4.8: Spezifische Aktivitäten ( $A_{\text{spez}}$ ) verschiedener Rosetta-gami (DE3) pET32-AT-CycHI-Klone aus Testexpression bei 30° und 37 °C.

Zum Vergleich wurde jeweils der Stamm Rosetta-gami (DE3) pET32a(+) mitgeführt. Nach der Ernte wurden die Pellets aufgeschlossen (3.3.1) und die spezifischen GCHI-Aktivitäten der Rohextrakte bestimmt (3.3.11.3). Die entsprechenden Daten sind in Tab. 4.8 zusammengefaßt.



In Vorversuchen zur Expression von pET32-AT-CycHI-3 in den Wirtsstämmen BL21*trxB* (DE3) und BL21 (DE3) konnte im Vergleich zur Kontrolle keine Trx-ATGCHI im Rohextrakt (mittels SDS-PAGE oder Aktivitätstest) festgestellt werden (nicht dargestellt).

Die spezifischen Aktivitäten aller Rosetta-gami (DE3) pET32-AT-CycHI-Klone lag jeweils deutlich über denen des Kontrollstammes (Tab. 4.8). Die Rohextrakte wurden vereint und wie unter (3.3.3.3) beschrieben an Talon gereinigt. Das Eluat wies eine spezifische Aktivität von  $1,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  auf.

Der Klon Rosetta-gami (DE3) pET32-AT-CycHI-3 wurde mit einer Induktionstemperatur von  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  kultiviert (3.1.2.1) und das Pellet von 1,5 L Kultur für eine Reinigung an Talon eingesetzt (3.3.3.3). Das Eluat wies eine spezifischen Aktivität von  $1,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  auf. Insgesamt konnten etwa 3 mg teilgereinigte Trx-ATGCHI (Abb. 4.31) aus 5 g Zellpellet gewonnen werden.

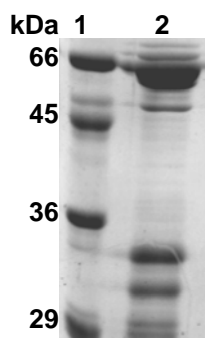


Abb. 4.31: Trx-ATGCHI nach Reinigung an Talon  
Bahn 1: SDS-Größenstandard; 2: Trx-ATGCHI nach Talon

#### 4.4.2.2 Klonierung, Expression und Reinigung der MBP-ATGCHI

Aufgrund der erfolgreichen Expression löslicher und aktiver Trx-getaggtter ATGCHI im bakteriellen System, wurde im Rahmen der Master Thesis von Frau Iram Shamim Malik ein ATGCHI-Fusionsprotein mit Maltose-binde-Protein (**MBP**) kloniert, exprimiert und gereinigt. Die durchgeführten Klonierungs- und Reinigungsarbeiten sind in der genannten Arbeit detailliert beschrieben und werden daher hier nur kurz zusammengefasst. Gereinigtes Protein für nähere Charakterisierungen wurde mir freundlicherweise von Frau Malik überlassen.

Die DNA-Sequenz von ATGCHI wurde mit den Primern AT-CYHI-NotI-vo und AT-CYHI-EcoRV-hi aus dem Vektor pNCO-AT-CycHI amplifiziert. Das 1400 bp-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *EcoRV* geschnitten und in den ebenso verdauten Vektor pNCO-MBP-H<sub>6</sub> ligiert. Der resultierende Vektor pNCO-MBP-H<sub>6</sub>-AT-CycHI codiert für ein 876 Aminosäuren (96,038 kDa) umfassendes Fusionsprotein aus der MBP-Domäne mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag, gefolgt von einer Thrombinschnittstelle und der ATGCHI (**MBP-ATGCHI**). Nach Thrombinverdau resultiert die gleiche Tb-ATGCHI wie unter (4.4.2.1) für das Trx-getaggte Protein beschrieben.

Der Vektor pNCO-MBP-H<sub>6</sub>-AT-CycHI wurde in M15 [pRep4] transformiert und mit einem der Klone eine Anzucht mit Induktion über Nacht bei 20 °C durchgeführt (3.1.2.1). Der Rohextrakt von 2 g Zellpellet wurde für eine Reinigung an Amyloseharz verwendet. Das Eluat wurde mit Thrombin verdaut und anschließend das freie MBP mittels Gelfiltration an S200 abgetrennt (3.3.3.3). Das Elutionsvolumen des Enzyms korrelierte mit 192,3 mL (apparentes Molekulargewicht von 96,5 kDa) gut mit dem Wert der His-ATGCHI von 190,1 mL (4.4.1.3).

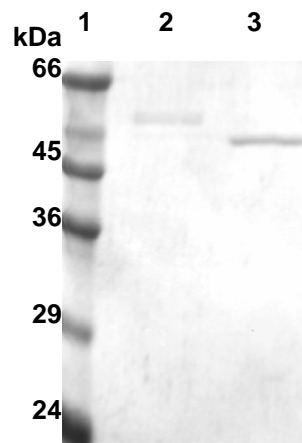


Abb. 4.32: Fraktionen der Gelfiltration von MBP-ATGCHI nach Thrombinverdau. Bahn 1: SDS-Größenstandard; 2: ATGCHI; 3: MBP-Domäne

Abb. 4.32 zeigt das gereinigte Protein Tb-ATGCHI nach der Gelfiltration. Die spezifischen Aktivitäten der Reinigungsschritte sind in Tab. 4.9 zusammengefasst.

Fraktion	$A_{\text{ges}}$ [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ ]	Protein <sub>ges</sub> [mg]	$A_{\text{spez}}$ [ $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ]	Anreicherung -fach	Ausbeute [%]
Rohextrakt	782	372	2,1	1	100
Amylose	100	20	5	2,4	12,8
S200	80	9	8,9	4,2	10,2

Tab. 4.9: Reinigung rekombinanter Tb-ATGCHI.

**Protein<sub>ges</sub>**: Gesamtproteinmenge der Fraktion;  **$A_{\text{spez}}$** : spezifische Aktivität;  **$A_{\text{ges}}$** : Gesamtaktivität; die Berechnung der Anreicherung erfolgte auf Basis der  $A_{\text{spez}}$ -Werte, die der Ausbeute auf Basis der Gesamtaktivitäten der Fraktionen.

#### 4.4.2.3 Kinetische Charakterisierung

Zur Bestimmung des  $K_M$ -Wertes für GTP wurde die Substrat-Konzentration variiert und der Test ansonsten wie unter (3.3.11.3) beschrieben durchgeführt. Das eingesetzte Enzym war direkt nach der Reinigung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren und nach dem Auftauen sogleich für die Messungen eingesetzt worden. Der  $K_M$ -Wert beträgt  $20,4\text{ }\mu\text{M}$  bei einer  $v_{\text{max}}$  von  $4,4\text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Abb. 4.33 zeigt den Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die GTP-Konzentration.

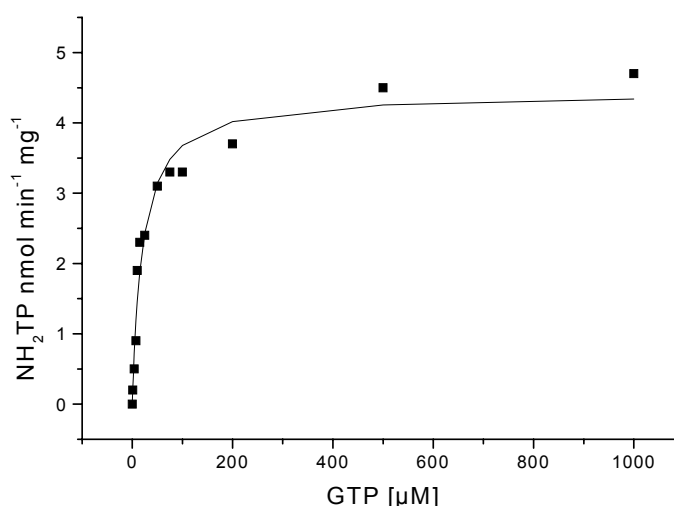


Abb. 4.33: Kinetische Charakterisierung von Tb-ATGCHI: Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die GTP-Konzentration.

#### 4.4.2.4 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes

Zur Klärung der Quartärstruktur wurde analytische Ultrazentrifugation mit Tb-ATGCHI durchgeführt (3.3.8). Die Gleichgewichtsedimentationsanalyse ergab ein Molekulargewicht von 214 kDa, was bei einer Monomermasse von 51,2 kDa auf ein Homotetramer hindeutet.

#### 4.4.3 Kristallisationsversuche

##### *His-ATGCHI*

Frisch gereinigtes Protein wurde mittels Ultrafiltration (3.3.5.2) auf eine Konzentration von 4,4 mg mL<sup>-1</sup> eingengt. Bei dem Versuch, die Konzentration weiter zu erhöhen, trat Präzipitation auf. Es wurde ein Eingangsscreening mit CS1+2 durchgeführt, allerdings ergab sich bislang kein Ansatzpunkt für weitere Verfeinerungen.

##### *Tb-ATGCHI*

Gereinigtes Protein (4.4.2.2) wurde auf eine Konzentration von 1,0 mg mL<sup>-1</sup> eingengt. Bei dem Versuch, die Konzentration weiter zu erhöhen, trat Präzipitation auf. Es wurde ein Set Platten mit nativer Tb-ATGCHI und eines unter Zusatz von 1 mM dGTP mit den Screens CS1+2 und PEG/Ion pipettiert. Bislang ergab sich kein Ansatzpunkt für weitere Verfeinerung.

#### 4.4.4 Diskussion

##### *Expression und Reinigung der ATGCHI*

Die Expression löslicher ATGCHI war bisher nur im rekombinanten Hefesystem gelungen (Basset *et al.*, 2002). In Bakterien konnte zwar eine hohe Expressionsrate erzielt werden, die ATGCHI lag jedoch immer in Form unlöslicher Einschlusskörper vor. Aus diesem Grund wurde zunächst die Reinigungseffizienz aus Heferohextrakt durch Klonierung einer His<sub>6</sub>-getaggtten ATGCHI in einen Galaktose-induzierbaren Hefeexpressionsvektor verbessert. Die Expression der His-ATGCHI konnte mittels

Westernblot-Analyse gezeigt und das Protein durch IMAC effizient aus dem Rohextrakt gereinigt werden.

Bakterielle Expressionssysteme sind Hefeexpressionssystemen in der Regel in Bezug auf Kulturbedingungen (Generationsdauer und Mediumansprüche) und erzieltm Überexpressionsniveau deutlich überlegen. Daher wurden parallel zur rekombinanten Hefeexpression Versuche unternommen, die Löslichkeit der ATGCHI in Bakterien durch die Fusion mit Tags zu verbessern (2.4.2). Durch die Verwendung des Trx-Tags in Kombination mit dem pET-Wirtsstamm Rosetta-gami (DE3) konnte Trx-ATGCHI teilweise löslich exprimiert und durch IMAC (3.3.3.3) aus dem bakteriellen Rohextrakt gereinigt werden.

Eine weitere Verbesserung der löslichen Expressionsrate gelang durch die Fusion der ATGCHI mit der MBP-Domäne. Das Fusionsprotein konnte über Amylose-Affinitätschromatographie effizient gereinigt und die MBP-Domäne mittels Thrombinspaltung und Gelfiltration abgetrennt werden. Tabelle 4.10 zeigt einen Vergleich der Ausbeuten aller drei verwendeten Expressionssysteme nach der jeweiligen Affinitätsreinigung an Talon oder Amylose-Harz.

Isolierte units pro g Zellmasse		
His-ATGCHI aus Hefe	Trx-ATGCHI aus <i>E. coli</i>	MBP-ATGCHI aus <i>E. coli</i>
4,7	2,6	50

Tab. 4.10: Vergleich der Ausbeuten der drei untersuchten rekombinanten Expressionssysteme. Angegeben sind jeweils die nach dem entsprechenden Affinitätsreinigungsschritt isolierten **units** [ $\text{nmol min}^{-1}$ ] ATGCHI-Aktivität bezogen auf 1 g Zellmasse.

Mit dem MBP-ATGCHI-Fusionsprotein steht nun ein einfaches und effizientes System zur Präparation pflanzlicher GCHI für weitere Charakterisierungen, insbesondere zielgerichtete Mutagenese und Proteinkristallisation, zur Verfügung.

#### *Biochemische Charakterisierung*

Gereinigte His-ATGCHI und Tb-ATGCHI zeigen beide eine Michaelis-Menten-Kinetik mit  $K_M$ -Werten von 9,3  $\mu\text{M}$  bzw. 20,4  $\mu\text{M}$  und maximalen Geschwindigkeiten von 6,2 und 4,4  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Dies steht im Gegensatz zu der von Basset *et al.*, 2002 gemachten Beobachtung der Substrathemmung. Allerdings beruht diese auf Versuchen mit Hefe-Rohextrakt. Die ermittelten  $v_{\text{max}}$ -Werte liegen etwa um den

Faktor 500 über dem Wert von  $623 \text{ pmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , der für die native GCHI aus Spinat berichtet wurde (Sohta *et al.*, 1997).

Die GCHIs aus Mensch und *E. coli* sind toroidförmige Homodecamere mit je zehn aktiven Zentren, die aus Aminosäuren von insgesamt je drei Monomeren konstituiert werden (Nar *et al.*, 1995; Auerbach *et al.*, 2000). Aufgrund des ungewöhnlichen Tandemdomänenaufbaus pflanzlicher GCHIs und der inkompletten Ausstattung jeder Einzeldomäne mit mutmaßlich essentiellen Aminosäuren (1.2.2.2), ist die Aufklärung der Quartärstruktur einer pflanzlichen GCHI von besonderem Interesse. Bisherige, auf Gelfiltrationsdaten beruhende, Annahmen gingen von einem Homodimer aus (Basset *et al.*, 2002). Auch die Gelfiltrationen im Rahmen dieser Arbeit erbrachten vergleichbare Daten, allerdings unterliegt diese Methode zahlreichen Störeffekten, was eine zuverlässige Bestimmung des tatsächlichen Molekulargewichtes ausschließt. Daher wurde mit gereinigter Tb-ATGCHI analytische Ultrazentrifugation durchgeführt, wodurch ein natives Molekulargewicht von etwa 213 kDa ermittelt werden konnte. Dies entspricht einem Homotetramer.

Weitergehende strukturelle Untersuchungen wären durch die Ermittlung der Röntgenstruktur der AT-GCHI möglich. Bisherige Kristallisationsversuche verliefen ergebnislos, was jedoch nicht zuletzt an der hohen Instabilität des Proteins und der recht niedrigen maximalen Proteinkonzentration liegen dürfte. Optimierungsmöglichkeiten in diesem Bereich liegen in der Stabilisation des Proteins durch geeignete Zusätze wie z. B. Glycerin und dGTP oder möglicherweise durch gezielte Mutagenese.

## 5 Zusammenfassung

Schlüsselenzyme essentieller Stoffwechselwege stellen potentielle Target-Proteine bei der Entwicklung neuer inhibitorischer Wirkstoffe in Medizin und Pflanzenschutz dar. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Expression, Reinigung und strukturelle Untersuchung von Enzymen der Riboflavin-, Folsäure- und Catecholamin-Biosynthese sowie des Calvin-Zyklus. Durch strukturelle Kenntnisse und biochemische Charakterisierung der reaktiven Zentren können die betreffenden Enzyme einem rationalen Drug-Design zugänglich gemacht werden.

### **Transketolase aus *Zea mays***

Die plastidäre Transketolase aus Mais katalysiert innerhalb des Calvin-Zyklus die reversible Übertragung einer C2-Einheit von Ketosephosphaten auf Aldosephosphate. Das Enzym wurde als Fusionsprotein mit einer Thioredoxin-Domäne effizient heterolog exprimiert und gereinigt. Nach spezifischer proteolytischer Entfernung des Fusionspartners wurde die Transketolase kinetisch charakterisiert und kristallisiert. Die spezifische Aktivität von  $25,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  liegt in dem für Transketolasen anderer Organismen üblichen Bereich.

Zunächst fehlgeordnete Proteinkristalle konnten durch gezieltes Proteinengineering des Konstruktes soweit verbessert werden, daß die Aufnahme eines auswertbaren Röntgendiffraktionsdatensatzes mit  $2,3 \text{ \AA}$  Auflösung ermöglicht wurde. Die Struktur der Transketolase wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Strukturforschung am MPI für Biochemie gelöst und konnte für Strukturvergleiche mit dem orthologen Hefe-Enzym sowie zur Erstellung eines modellierten Substrat-Enzym-Komplexes herangezogen werden.

### **Tyrosinhydroxylase aus *Drosophila melanogaster***

Tyrosinhydroxylase katalysiert mit der Umsetzung von Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Catecholamin-Biosynthese. Bei Insekten sind Catecholamine nicht nur wichtige Botenstoffe, das Catecholamin Dopamin bildet zudem den Ausgangsstoff für essentielle Gerüstsubstanzen der Cuticula. Das Gen der hypodermalen Tyrosinhydroxylase-Isoform II aus *D. melanogaster* wurde aus cDNA amplifiziert (Dr. Eva Franken, Bayer Pflanzenschutzzentrum) und anhand von DNA-Sequenzanalysen als bisher nicht in den Datenbanken verzeichnetes Allel identifiziert. Die gefundene Nukleotidsequenz

unterscheidet sich an 15 Stellen von dem Datenbankeintrag Q24000 (TrEMBL), was jedoch nur zu einem einzigen konservativen Aminosäureaustausch (D151E) führt. Auf Basis dieser Sequenz wurden die neuronale Isoform I, Einzeldomänen-Konstrukte der katalytischen und der jeweiligen regulatorischen Domänen sowie die Isoform I ohne Tetramerisierungsarm kloniert, exprimiert und – soweit möglich – gereinigt. Bei allen Konstrukten mit katalytischer Domäne konnte Tyrosinhydroxylase-Aktivität festgestellt werden, wobei die spezifischen Aktivitäten der Isoformen I und II im Bereich der bekannten Literaturwerte lagen.

Zur strukturellen Charakterisierung wurden Kristallisationsversuche mit den Isoformen I und II, der regulatorischen Domäne der Isoform I und der katalytischen Domäne durchgeführt. Es ergaben sich dabei mehrere initiale Kristallisationsbedingungen für beide Isoformen, z. T. in Anwesenheit von Liganden. Trotz intensiver Bemühungen ist es bisher jedoch nicht gelungen, röntgentaugliche Kristalle zu erhalten.

Ein weiterer Ansatz zur Strukturaufklärung der regulatorischen Domäne von Isoform II mit Hilfe von  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie führte aufgrund der hohen konformationellen Flexibilität des Proteins nicht zum Erfolg. Mittels analytischer Ultrazentrifugation konnte das native Molekulargewicht der Isoform I mit 238 kDa bestimmt werden. Dies bestätigt den aufgrund von Homologiebetrachtungen zu erwartenden Aufbau des Enzyms als Homotetramer.

### **3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *Candida albicans***

Die magnesiumabhängige 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase setzt einen der beiden Ausgangsstoffe der Riboflavin-Biosynthese, Ribulose-5-phosphat, zu 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat um. Das Gen der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *C. albicans* wurde parallel aus genomischer DNA amplifiziert und vollsynthetisch unter Optimierung der Codonbelegung für *E. coli* hergestellt. Das synthetische Konstrukt zeigte ein etwa dreifach höheres Expressionsniveau als das Wildtyp-Gen. DNA-Sequenzanalyse ergab, daß es sich bei der amplifizierten Sequenz um ein neues Allel handelt. Von den fünf gefundenen Basenaustauschen führt allerdings nur einer zu einem Aminosäureaustausch (Q181R).

Ausgehend von der optimierten Sequenz wurde die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase heterolog in *E. coli* exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Die spezifische Aktivität des Enzyms liegt bei  $332 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Das Enzymprodukt



3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat weist die L-Konfiguration auf. Die Geschwindigkeitssedimentationsanalyse erbrachte einen Sedimentationskoeffizienten von 3,0 S, während die Gleichgewichtssedimentationsanalyse ein natives Molekulargewicht von 41 kDa ergab, was einem Homodimer entspricht.

Zur weiteren Charakterisierung des aktiven Zentrums der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase wurden die Mutanten C59A, Y87A, D92A und E166A kloniert, gereinigt und enzymatisch charakterisiert.

Die Röntgenstruktur der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase wurde in Kooperation mit der Abteilung für Strukturforschung am MPI für Biochemie gelöst. Zusätzlich zur Struktur des Apoproteins konnte auch eine Komplexstruktur mit dem Substrat Ribulose-5-phosphat in Abwesenheit katalytisch wichtiger Magnesiumionen erhalten werden. Es zeigte sich dabei eine neue, offene Konformation des für dieses Enzym charakteristischen sauren Loops, der einen essentiellen Teil des aktiven Zentrums bildet und in Anwesenheit von divalenten Kationen meist in einer geschlossenen Konformation vorliegt.

### **GTP-Cyclohydrolase I aus *Arabidopsis thaliana***

Die zinkabhängige GTP-Cyclohydrolase I aus *A. thaliana* katalysiert mit der Umsetzung von GTP zu Dihydroneopterintriphosphat den Eingangsschritt der Folat-Biosynthese in Pflanzen. Das Enzym wurde heterolog in *S. cerevisiae* und *E. coli* exprimiert. Durch Fusion mit der Trx- bzw. MBP-Domäne ist es erstmals gelungen, eine pflanzliche GTP-Cyclohydrolase löslich im bakteriellen System zu exprimieren. Mit Hilfe von Affinitätschromatographie wurde das Enzym gereinigt und partiell charakterisiert. Die GTP-Cyclohydrolase I aus *A. thaliana* zeigt im Gegensatz zu GTP-Cyclohydrolasen anderer Organismen eine typische Michaelis-Menten-Kinetik ohne Hinweise auf Substrat- oder Produkthemmung. Mittels Gleichgewichtssedimentationsanalyse wurde ein natives Molekulargewicht von 213 kDa und damit das Vorliegen eines Homotetramers bestimmt. Damit unterscheidet sich der Aufbau der pflanzlichen GTP-Cyclohydrolase I grundlegend von dem bekannter Orthologe aus *E. coli* und Mensch, die als toroidförmige Homodecamere vorliegen.

## 6 Literatur

- Achari, A., Somers, D. O., Champness, J. N., Bryant, P. K., Rosemond, J., Stammers, D. K. (1997). Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. *Nat Struct Biol* **4**, 490-497.
- Almas, B., Le Bourdelles, B., Flatmark, T., Mallet, J., Haavik, J. (1992). Regulation of recombinant human tyrosine hydroxylase isozymes by catecholamine binding and phosphorylation. *Eur. J. Biochem* **209**, 249-255.
- Auerbach, G., Herrmann, A., Bracher, A., Bader, G., Gütlich, M., Fischer, M., Neukamm, M., Garrido-Franko, M., Richardson, J., Nar, H., Huber, R., Bacher, A. (2000). Zinc plays a key role in human and bacterial GTP cyclohydrolase I. *PNAS* **97** (25), 13567-13572.
- Bacher, A. (1991). Riboflavin kinase and FAD-synthetase. In Müller, F. (Hrsg.), *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, CRC Press, Boca Raton, FL. **1**, 349-370.
- Bacher, A., Le Van, Q., Buehler, M., Keller, P. J., Floss, H. G. (1983). Biosynthesis of riboflavin. Origin of the xylene ring. *Chem. Biol. Pteridines, Proc. Int. Symp. Pteridines Folic Acid Deriv.: Chem., Biol. Clin. Aspects, 7th*, 699-703.
- Bacher, A., Lingens, F. (1970). Biosynthesis of riboflavin. Formation of 2,5-diamino-6-hydroxy-4-(1'-D-ribitylamino)pyrimidine in a riboflavin auxotroph. *J. Biol. Chem.* **245**, 4647-4652.
- Basset, G., Quinlivan, E. P., Ziemak, M. J., de la Garza, R. D., Fischer, M., Schiffmann, S., Bacher, A., Gregory, J. F., Handson, A. D. (2002). Folate synthesis in plants: The first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I. *PNAS* **99** (19), 12489-12494.
- Bernaccia, G., Schwall, G., Lottspeich, F., Salamini, F., Bartels, D. (1995). The transketolase gene family of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*: differential expression during the rehydration phase. *EMBO J.* **14** (3), 610-618.
- Birman, S., Morgan, B., Anzivino, M., Hirsh, J. (1994). A Novel and Major Isoform of Tyrosine Hydroxylase in Drosophila Is Generated by Alternative RNA Processing. *J Biol Chem.* **269** (42), 26559-26567.
- Bouvier, F., d'Harlingue, A., Suire, C., Backhaus, R. A., Camara, B. (1998). Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol* **117** (4), 1423-1431.

- Bracher, A., Fischer, M., Eisenreich, W., Ritz, H., Schramek, N., Boyle, P., Gentili, P., Huber, R., Nar, H., Auerbach, G., Bacher, A. (1999). Histidine 179 Mutants of GTP Cyclohydrolase I Catalyze the formation of 2-Amino-5-formylamino-6-ribofuranosylamino-4(3H)-pyrimidinone Triphosphate. *J Biol Chem.* **274** (24), 16727-16735.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Budnik, V., White, K. (1987). Genetic dissection of dopamine and serotonin synthesis in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.* **4** (6), 309-314.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., Short, J. M. (1987). XL-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-379.
- Burrows, R. B. and G. M. Brown (1978). Presence in *Escherichia coli* of a deaminase and a reductase involved in biosynthesis of riboflavin. *J. Bacteriol.* **136**: 657-667.
- Busch, M. (1997). Klonierung und Expression von plastidärer Transketolase aus *Zea mays*. Studienarbeit, TU Braunschweig
- Chamberlin, M., Grath, J., Waskell, L. (1970). New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with the bacteriophage T7. *Nature* **228**, 227-231.
- Cohn, E. J., Edsall, J. T. (1943). Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions. New York, Reinhold.
- Covey, T. R., Bonner, R. F., Shushan, B. I., Henion, J. (1988). The determination of protein, oligonucleotide and peptide molecular weights by ion-spray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Sp.* **2**, 249-256.
- Cresswell, R. M., Neilson, T., Wood, H. C. S. (1960). The biosynthesis of pteridines. II. Self-condensation of 5-amino-4-(substituted amino)uracils. *J. Chem. Soc.*, 4776-4779.
- Daubner, S. C., Lohse, D. L., Fitzpatrick, P. F. (1993). Expression and characterization of catalytic and regulatory domains of rat tyrosine hydroxylase. *Protein Sci.* **2**, 1452-1460.
- De la Haba, G., Leder, I. G., Racker, E. (1955). Crystalline transketolase from baker's yeast. Isolation and properties. *J. Biol. Chem.* **214**, 409-426.

- Debnam, P. M., Emes, M. J. (1999). Subcellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway in root and in leaf tissues. *J Exp Bot.* **50** (340), 1653-1661.
- Derman, A. I., Prinz, W. A., Belin, D., Beckwith, J. (1993). Mutations that allow disulfid bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* **262**, 1744-1747.
- Echt, S. (2000). Heterologe Expression, Reinigung und Kristallisation von Transketolase aus *Zea mays*. Stuttgart-Hohenheim.
- Edman, P., Henschen, A. (1975). Sequence determination. *Protein Sequence Determination. Springer Verlag, Heidelberg.*
- Erlandsen, H., Bjorgo, E., Flatmark, T., Steven, R. C. (2000). Crystal Structure and Site-Specific Mutagenesis of Pterin-Bound Human Phenylalanine Hydroxylase. *Biochem.* **39**, 2208-2217.
- Erlandsen, H., Flatmark, T., Steven, R. C., Hough, E. (1998). Crystallographic Analysis of the Human Phenylalanine Hydroxylase Catalytic Domain with Bound Catechol Inhibitors at 2.0 Å Resolution. *Biochem. (Mosc).* **37**, 15638-15646.
- Fischer, M., Römisch, W., Schiffmann, S., Kelly, M., Oschkinat, H., Steinbacher, S., Huber, R., Eisenreich, W., Richter, G., Bacher, A. (2002). Biosynthesis of Riboflavin in Archaea Studies on the Mechanism of 3,4-Dihydroxy-2-butanone-4-phosphate Synthase of *Methanococcus jannaschii*. *J Biol Chem.* **277**, 41410-41416.
- Foor, F., Brown, G. M. (1975). Purification and properties of guanosine triphosphate cyclohydrolase II from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **250**, 3545-3551.
- Foor, F., Brown, G. M. (1980). GTP-cyclohydrolase II from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **66**, 303-307.
- Fusetti, F., Erlandsen, H., Flatmark, T., Steven, R. C. (1998). Structure of Tetrameric Human Phenylalanine Hydroxylase and its Implications for Phenylketonuria. *J. Biol. Chem.* **273** (27), 16962-16967.
- Gerhardt, S., Echt, S., Busch, M., Freigang, J., Auerbach, G., Bader, G., Martin, W. F., Bacher, A., Huber, R., Fischer, M. (2003). Structure and Properties of an Engineered Transketolase from Maize. *Plant Physiol.* **132**, 1941-1949.
- Giovanelli, J., Campos, K. L., Kaufman, S. (1991). Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase, does not function as a reactant in the oxygenation of arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7091-7095.

- Goodwill, K. E., Sabatier, C., Marks, C., Raag, R., Fitzpatrick, P. F., Steven, R. C. (1997). Crystal Structure of tyrosine hydroxylase at 2.3 Å and its implications for inherited neurodegenerative diseases. *Nat. Struct. Biol.* **4** (7), 578-585.
- Goodwill, K. E., Sabatier, C., Steven, R. C. (1998). Crystal Structure of Tyrosine Hydroxylase with Bound Cofactor Analogue and Iron at 2.0 Å Resolution: Self-Hydroxylation of Phe300 and the Pterin-Binding Site. *Biochemistry (Mosc)*. **37** (39), 13437-13445.
- Grima, B., Lamouroux, A., Boni, C., Julien, J. F., Javoy-Agid, F., Mallet, J. (1987). A single human gene encoding multiple tyrosine hydroxylases with different predicted functional characteristics. *Nature* **326**, 707-711.
- Hagihara, T., T. Fulio, et al. (1995). Cloning of FAD synthetase gene from *Corynebacterium ammoniagenes* and its application to FAD and FMN production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 724-729.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Harvey, R. A., Plaut, G. W. E. (1966). Riboflavin synthase from yeast: Properties of complexes of the enzyme with lumazine derivatives and riboflavin. *J. Biol. Chem.* **241**, 2120-2136.
- Hatakeyama, K., Harada, T., Suzuki, S., Watanabe, Y., Kagamiyama, H. (1989). Purification and Characterization of Rat Liver GTP Cyclohydrolase I. *J. Biol. Chem.* **254** (36), 21660-21664.
- Heinrich, P.C., Steffen, H., Janser, P., Wiss, O. (1972). Studies on the reconstitution of apotransketolase with thiamine pyrophosphate and analogs of the coenzyme. *Eur. J. Biochem.* **30** (3), 533-541
- Henkes, S., Sonnewald, U., Badur, R., Flachmann, R., Stitt, M. (2001). A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **13** (3), 535-551.
- Herz, S., Eberhardt, S., Bacher, A. (2000). Biosynthesis of Riboflavin in plants. The *ribA* gene of *Arabidopsis thaliana* specifies a bifunctional GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphatase synthase. *Phytochemistry* **53**, 723-731.
- Hess, D. (1999). Pflanzenphysiologie. Stuttgart-Hohenheim, Ulmer: 92.
- Hopkins, T. L., Kramer, K. J. (1992). Insect cuticle sclerotization. *An Rev Ent.* **37**, 273-302.

- Hoppe, W. (1957a). Die Faltmolekülmethode: eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen. *Acta Crystallogr A* **10**, 750-751.
- Hoppe, W. (1957b). Die Faltmolekülmethode und ihre Anwendung in der röntgenographischen Konstitutionsanalyse von Biflorin. *Z. Elektrochem.* **61**, 1076-1083.
- Huber, R. (1965). Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Crystallogr A* **19** (353-356).
- Hufton, S. E., Jennings, I. G., Cotton, R. G. H. (1995). Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem. J.* **311**, 353-366.
- Ichikawa, S., Ichinose, H., Nagatsu, T. (1990). Multiple mRNAs of monkey tyrosine hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173** (3), 1331-1336.
- Kamino, Y., C. K. Lin, et al. (1985). Characterization of the *ileX-lsp* operon in *Escherichia coli*: Identification of an open reading frame upstream of the *ileX* gene and potential promotor(s) for the *ileS-lsp* operon. *J. Biol. Chem.* **260**: 5616-5620.
- Kaufman, S. (1967). Pteridine Cofactors. *Annu. Rev. Biochem.* **36**, 171-184.
- Kaufman, S., Fischer, D. B. (1962). Oxygenases. New York, Academic Press: 285-337.
- Kaufman, S., Pollock, R. J., Summer, G. K., Das, A. K., Hajra, A. K. (1990). Dependence of alkyl glycerol ether monooxygenase activity upon tetrahydrobiopterins. *Biochem Biophys Acta* **1040**, 19-27.
- Kern, D., Neef, G., Tittmann, H., Killenberg-Jabs, K., Wilkner, C., Schneider, G., Hübner, G. (1996). How thiamine diphosphate is activated in enzymes. *Science* **275**, 67-70.
- Kiely, M. E., Tan, E. L., Wood, T. (1969). The purification of transketolase from *Candida utilis*. *Can. J. Biochem.* **47**, 455-460.
- Kis, K., Bacher, A. (1995). Substrate channeling in the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 16788-16795.
- Kis, K., Volk, R., Bacher, A. (1995). Biosynthesis of riboflavin. Studies on the reaction mechanism of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *Biochemistry (Mosc)*. **34**, 2883-2892.
- Kitatsuji, K., Ishino, S., Teshiba, S., Arimoto, M. (1993). Process for producing flavin nucleotides. Eur.Pat.Appl.EP 05422240 A2 92119308.2.

- Kobe, B., Jennings, I. G., House, C. M., Michell, B. J., Goodwill, K. E., Santarsiero, B. D., Steven, R. C., Cotton, R. G. H., Kemp, B. E. (1999). Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nat. Struct. Biol.* **6** (5), 442-448.
- König, S., Schellenberger, A., Neef, H., Schneider, G. (1994). Specificity of coenzyme binding in thiamin diphosphate-dependent enzymes. Crystal structures of yeast transketolase in complex with analogs of thiamin diphosphate. *J. Biol. Chem.* **269** (14), 10879-82.
- Kumer, S. C., Vrana, K. E. (1996). Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J. Neurochem.* **67** (2), 443-462.
- Kwon, N. S., Nathan, C. F., Stuehr, D. J. (1989). Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J. Biol. Chem.* **264**, 20496-20501.
- Lämmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M., Pelletier, S. L. (1992). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins.
- Liao, D., Calabrese, J. C., Wawrzak, Z., Viitanen, P. V., Jordan, D. B. (2001). Crystal Structure of 3,4-Dihydroxy-2-Butanone-4-Phosphate Synthase of Riboflavin Biosynthesis. *Structure* **9**, 11-18.
- Liao, D., Zheng, Y., Viitanen, P. V., Jordan, D. B. (2002). Structural Definition of the Active and Catalytic Mechanism of 3,4-Dihydroxy-2-butanone-4-phosphate Synthase. *Biochemistry (Mosc)*. **41**, 1795-1806.
- Lindquist, Y., Schneider, G., Ermler, U., Sundström, M. (1992). Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *EMBO J*: **11** (7), 2373-2379.
- Littlechild, J., Turner, N. (1995). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic data with *Escherichia coli* transketolase. *Acta Crystallogr.* **D51**, 1074-1076.
- Lundell, M. J., Hirsh, J. (1994). Temporal and spatial development of serotonin and dopamine neurons in the Drosophila CNS. *Dev. Biol.* **165** (2), 385-396.
- Mann, M., Wilm, M. (1995). Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 219-224.
- Manstein, D. J. and E. F. Pai (1986). Purification and characterization of FAD synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Am. Chem. Soc.* **34**: 16169-16173.

- Masako, M., Katoh, S., Akino, M., Kaufman, S. (1966). Sepiapterin reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 202-212.
- Müller, F., Ghisla, S., Bacher, A. (1988). Vitamin B<sub>2</sub> und natürliche Flavine. *in: Isler, O. et al. (Hrsg.) Vitamine II; Wasserlösliche Vitamine, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York*, 50-159.
- Muller, Y. A., Lindqvist, Y., Furey, W., Schulz, G. E., Jordan, F., Schneider, G. (1993). A thiamin diphosphate binding fold revealed by comparison of the crystal structures of transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase. *Structure* **1** (2), 95-103.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Nagatsu, T. (1991). Genes for Human catecholamine-synthesizing enzymes. *Neurosci. Res.* **12** (2), 315-345.
- Nakagawa, S., Igarashi, A., Ohata, T., Hagihara, T., Fujio, T., Aisaka, K. (1995). Nucleotide sequence of the FAD synthetase gene from *Corynebacterium ammoniagenes* and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 694-702.
- Nar, H., Huber, R., Auerbach, G., Fischer, M., Hoesl, C., Ritz, H., Bracher, A., Meining, W., Eberhardt, S., Bacher, A. (1995). Active site topology and reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92** (26), 12120-5.
- Neckameyer, W. S., White, K. (1993). Drosophila tyrosine hydroxylase is encoded by the pale locus. *J. Neurogenet.* **8** (4), 189-199.
- Neuberger, G., Bacher, A. (1986). Biosynthesis of riboflavin. Enzymatic formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139** (3), 1111-1116.
- Niederwieser, A., Blau, N., Wang, M., Joller, P., Amares, M., Cardesa-Garcia, J. (1984). GTP cyclohydrolase I deficiency, a new enzyme defect causing hyperphenylalaninemia with neopterin, biopterin, dopamine and serotonin deficiencies and muscular hypotonia. *Eur J Ped.* **141**, 208-214.
- Nielsen, P., Bacher, A. (1981). Biosynthesis of riboflavin. Characterization of the product of the deaminase. *Biochim. Biophys. A.* **662** (2), 312-317.
- Nikkola, M., Lindqvist, Y., Schneider, G. (1994). Refined structure of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **238** (3), 387-404.



- Nilsson, U., Lindqvist, Y., Kluger, R., Schneider, G. (1993). Crystal structure of transketolase in complex with thiamine thiazolone diphosphate, an analogue of the reaction intermediate, at 2.3 Å resolution. *FEBS Lett.* **326** (1-3), 145-8.
- Nilsson, U., Meshalkina, L., Lindqvist, Y., Schneider, G. (1997). Examination of substrate binding in thiamin diphosphate-dependent transketolase by protein crystallography and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **272**, 1864.
- Paoletti, F., Aldinucci, D. (1986). Immunoaffinity purification of rat liver transketolase: evidence of multiple forms of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **245**, 212-219.
- Phillipov, P. P., Shestakova, I. K., Tikhomirova, N. K., Kochetov, G. A. (1980). Characterization and properties of pig liver transketolase. *Biochim. Biophys. Acta* **613**, 359-369.
- Plaut, G. W. E. (1960). Studies on the stoichiometry of the enzymatic conversion of 6,7 dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *J. Biol. Chem.* **235**, 41-42.
- Plaut, G. W. E. (1963). Studies on the nature of the enzymatic conversion of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *J. Biol. Chem.* **238**, 2225-2243.
- Plaut, G. W. E. (1971). Metabolism of water-soluble vitamins: The biosynthesis of riboflavin. In: *Florkin, M., Stotz, E.H. (Hrsg.). Comprehensive Biochemistry, Elsevier, Amsterdam* **21**, 11-45.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M., Moncada, S. (1990). An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 5193-5197.
- Richter, G., Fischer, M., Krieger, C., Eberhardt, S., Lüttgen, H., Gerstenschläger, I., Bacher, A. (1997). Biosynthesis of riboflavin. Characterization of the bifunctional deaminase/reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**, 2022-2028.
- Richter, G., Ritz, H., Katzenmeier, G., Volk, R., Kohnle, A., Lottspeich, F., Allendorf, D., Bacher, A. (1993). Biosynthesis of riboflavin: Cloning, sequencing, mapping and expression of the gene coding for GTP cyclohydrolase II in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 4045-4051.
- Richter, G., Volk, R., Krieger, C., Lahm, H. W., Röthlisberger, U., Bacher, A. (1992). Biosynthesis of Riboflavin. Cloning, Sequencing and Expression of the Gene Code for 3,4-Dihydroxy-2-Butanone 4-Phosphate Synthase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174** (12), 4050-4056.

- Roland, S., Ferone, R., Harvey, R. J., Styles, V. L., Morrison, R. W. (1979). The characteristics and significance of sulfonamides as substrates for *Escherichia coli* dihydropteroate synthase. *J. Biol. Chem.* **254**, 10337-10345.
- Rossmann, M. G., Blow, D. M. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallogr A* **15**, 24-31.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F. A., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Sanger, F., S. Niklen, et al. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schallreuther, K., Wood, J., Pittelkow, M., Gütlich, M., Lemke, K., Rodl, W., Swanson, N., Hitzemann, K., Ziegler, I. (1994). Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* **263**, 1444-1446.
- Schenk, G., Duggleby, R. G., Nixon, P. F. (1998). Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *Int J Biochem Cell Biol.* **30** (12), 1297-318.
- Schnarrenberger, C., Flechner, A., Martin, W. (1995). Enzymatic evidence for a complete oxidative pentose phosphate pathway in chloroplasts and an incomplete pathway in the cytosol of spinach leaves. *Plant Physiol* **108**, 609-614.
- Schneider, G., Lindqvist, Y. (1998). Crystallography and mutagenesis of transketolase: mechanistic implications for enzymatic thiamin catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1385** (2), 387-98.
- Schweitzer, B. I., Dicker, A. P., Bertino, J. R. (1990). Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *FASEB J.* **4** (2441-2452).
- Singer, S., Elion, G. B., Hitchings, G. H. (1966). Resistance to inhibitors of dihydrofolate reductase in strains of *Lactobacillus casei* and *Proteus vulgaris*. *J Gen Microbiol* **42**, 185-196.
- Skold, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat* **3** (155-160).
- Skold, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res* **32**, 261-273.

- Sohta, Y., Ohta, T., Masada, M. (1997). Purification and some properties of GTP Cyclohydrolase I from Spinach Leaves. *Biotech. Biochem.* **61** (7), 1081-1085.
- Sprenger, G. A., Schorken, U., Sprenger, G., Sahm, H. (1995). Transketolase A of *Escherichia coli* K12. Purification and properties of the enzyme from recombinant strains. *Eur. J. Biochem.* **230** (2), 525-532.
- Steinbacher, S., Schiffmann, S., Richter, G., Huber, R., Bacher, A., Fischer, M. (2003). Structure of 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-Phosphate Synthase from *Methanococcus jannaschii* in Complex with Divalent Metal Ions and the Substrate Ribulose-5-phosphate. *J. Biol. Chem.* **278**, 42256-42265.
- Stüber, D., Matile, H., Garotta, G. (1990). System for high level production in *E. coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure function analysis.
- Tanaka, K., Kaufman, S., Milstien, S. (1998). Tetrahydrobiopterin, the cofactor for aromatic amino acid hydroxylases, is synthesized by and regulates proliferation of erythroid cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5864-5867.
- Teige, M., Kopriva, S., Bauwe, H., Süss, K. H. (1996). Primary structure of chloroplast transketolase from potato (Accession Nr. Z50099).
- Teige, M., Melzer, M., Suss, K. H. (1998). Purification, properties and in situ localization of the amphibolic enzymes D-Ribulose-5-phosphate 3-epimerase and transketolase from spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **252** (2), 237-44.
- Thöny, B., Auerbach, G., Blau, N. (2000). Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem. J.* **347**, 1-16.
- van Holde, K. E., Weischet, W. O. (1978). Boundary analysis of sedimentation velocity experiments with monodisperse and paucidisperse solutes. *Biopolymers* **17**, 1387-1403.
- Vernet, T., Dignard, D., Thomas, D. Y. (1987). A family of yeast expression vectors containing the phage f1 intergenic region. *Gene* **52**, 225-233.
- Vié, A., Cigna, M., Toci, R., Birman, S. (1999). Differential Regulation of *Drosophila* Tyrosine Hydroxylase Isoforms by Dopamine Binding and cAMP-dependent phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **274** (24), 16788-16795.
- Volk, R., Bacher, A. (1988). Biosynthesis of Riboflavin. The Structure of the Four-Carbon Precursor. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3651-3653.

- Volk, R., Bacher, A. (1990). Studies on the 4-Carbon Precursor in the Biosynthesis of Riboflavin. *J. Biol. Chem.* **265** (32), 19479-19485.
- Volk, R., Bacher, A. (1991). Biosynthesis of Riboflavin. *J. Biol. Chem.* **266** (31), 20610-20618.
- Vrana, K. E., Walker, S. J., Rucker, P., Liu, X. (1994). A Carboxyl Terminal Leucine Zipper Is Required for Tyrosine Hydroxylase Teramer Formation. *J. Neurochem.* **63** (6), 2014- 2020.
- Wacker, H., Harvey, R. A., Winestock, C. H., Plaut, G. W. E. (1964). 4-(1`-D-Ribitylamino)-5-amino-2,6,-dihydroxypyrimidine, the second product of the riboflavin synthetase reaction. *J. Biol. Chem.* **239**, 3493-3497.
- Wikner, C., Meshalkina, L., Nilsson, U., Backstrom, S., Lindqvist, Y., Schneider, G. (1995). His103 in yeast transketolase is required for substrate recognition and catalysis. *Eur. J. Biochem.* **233** (3), 750-5.
- Wikner, C., Meshalkina, L., Nilsson, U., Nikkola, M., Lindqvist, Y., Sundstrom, M., Schneider, G. (1994). Analysis of an invariant cofactor-protein interaction in thiamin diphosphate-dependent enzymes by site-directed mutagenesis. Glutamic acid 418 in transketolase is essential for catalysis. *J. Biol. Chem.* **269** (51), 32144-50.
- Wikner, C., Nilsson, U., Meshalkina, L., Udekwu, C., Lindqvist, Y., Schneider, G. (1997). Identification of catalytically important residues in yeast transketolase. *Biochemistry (Mosc)*. **36** (50), 15643-9.
- Wright, T. R. (1996). The Wilhelmine E. Key 1992 Invitational lecture. Phenotypic analysis of the Dopa decarboxylase gene cluster mutants in *Drosophila melanogaster*. *J. Hered.* **87** (3), 175-190.
- Wright, T. R. F. (1987). The genetics of biogenic amine metabolism, sclerotization, and melanization in *Drosophila melanogaster*. *Adv. Genet.* **24**, 127-222.
- Yim, J. J., Brown, G. M. (1976). Characteristics of Guanosine Triphosphate Cyclohydrolase I Purified from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **251** (16), 5087-5094.
- Yoneyama, T., Wilson, L. M., Hatakeyama, K. (2001). GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein independent and - independent inhibitors of GTP cyclohydrolase I. *Arch Biochem Biophys* **388**, 67-73.
- Zamenhof, P. J., Villarejo, M. (1972). Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting  $\alpha$ -complementation of  $\beta$ -galactosidase fragments in vivo. *J. Bacteriol.* **110**, 171-178.

Zigmound, R. E., Schwarzschild, M. A., Rittenhouse, A. R. (1989). Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**, 415-461.

## 7 Anhang

### 7.1 Primersequenzen

#### 7.1.1 Transketolase

ZMTK-Thrombin-Xbal-vo	5'-ataataatatctagaataatatttgtttaactttaagaagg-3'
ZMTK-Thrombin-1	5'-cgccggtggcggccttgccctggagcgtctcgacagcaccgctggc accagaccagaagaatg-3'
ZMTK-Thrombin-2	5'-cgatggccaggaaccggatcgtgtgaccgacttctcgagcagctcg cggcggcggccttgccctggag-3'
ZMTK-Thrombin-Ahyl-3	5'-tattattatcccgggtggccggagttggccttctcgacggcgtcgatggc caggaaccggatcgtgttg-3'

#### 7.1.2 Tyrosinhydroxylase

TH-deltetra-1	5'-gccaaggacaagtccgtcgctgggtgagcaccatgtcgcgtccat tcgaggtgctg-3'
TH-deltetra-2	5'-cgacgcgctcgggtgtgcccgtgaaacgcacctcgaatggacgcg acatggtgctc-3'
TH-deltetra-3	5'-tataataataccatctactatgtggccgagagcttcgaggatgccaa ggacaagtccgtcgctgg-3'
TH-deltetra-4	5'-tattatggatccttaagttactgtccacggagtccagcacctcgacg cgctcgggtgcccgggtg-3'
DMTH-Cter-Ndel-vo	5'-ataataacatatgaaggctccgtggtccccaag-3'
DMTH-BamHI-hi	5'-gctagtattgctcaccgg-3'
DMTH-Nter-lang-Ndel-vo	5'-ataataacatatgatggccgttcgacgagccc-3'
DMTH-Nter-lang-BamHI-hi	5'-ataataggatccttagacattcaagttattgtcggcc-3'
DMTH-delta71aa-XhoI-vo	5'-ataataatactcgaggaggcccgagcaaggcaaatgattacggg ctcaccgaggacgag-3'

### 7.1.3 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase

CAR3-WT-Rbs-EcoRI	5'-ataatagaattcattaaagaggagaaattaactatgactaacatctttactc ctattgaag-3'
CAR3-WT-BamHI-Hi	5'-tattatggatccttatttagaaatatattcaactaattgg-3'
CARB3-1	5'-cgccatggtaccgcttatactatcacatgtgatttgctgaaggactactac cggatttcggcccatg-3'
CARB3-2	5'-gaattaggattagcgagagaacgcgtggtgagagcacgatcatgggcc gaaataccggtagtagtaccttc-3'
CARB3-3	5'-gcaaatcaactcgaactgccaccaatgctcggaatcgttctgatcgccat ggtaccgcttatactatc-3'
CARB3-4	5'-ggaacggcgcgcagcgggaggatggcctggttaatgaaatctgtgg ttcgaattaggattagcgagagaacg-3'
CARB3-5	5'-cgttattctcaggtatgtttgttccactctctgaagaacgtgcaaatcaac tcgaactgccaccaatg-3'
CARB3-6	5'-gtacagctgctcagatgaccacgacgttcttaaggagacctggaacgg cgcgacgaggaggatag-3'
CARB3-7	5'-atggctgctgaactgatcactcaagaaaaatggcatttctggttcgttattc ttcaggtatgtttgtg-3'
CARB3-8	5'-tcacaaatcacactgcaggttgagaccagccagagtcgacagttgta cagctgctcagatgaccacg-3'
CARB3-9	5'-ctcattgttatggacgatgaagaccgtgaaaatgaaggagatctcattatg gctgctgaactgatcactcaag-3'
CARB3-10	5'-gcaatcgctcgagacgcatcatgagaccatctcatcacgtactagttcaca aatcacacctgcaggttg-3'
CARB3-11	5'-ctttactcctattgaagaggccttagaggcttacaacaaacggtgaatttctca ttgtatggacgatgaagac-3'
CARB3-12	5'-aatattaatgattttgatgcatgtttcttaccaaattgaatgcaatcgctcag acgcatcatgag-3'
CARB3-13	5'-ataatagaattcattaaagaggagaaattaactatgactaacatctttactc ctattgaagaggccttag-3'
CARB3-14	5'-tattattataagcttatttagagatatattcaacgagttggttaataatgatt ttgatgcatg-3'
CA-Rib3-C59A-BclI-vo	5'-ataatatgatcactcaagaaaaatggcatttctggttcgttattcttcaggtt acgtagcagttcc-3'
Y87A-1	5'-catggtaccgctgcaactatcacgtgtgatttgctgaaggactacta-3'
Y87A-2	5'-ccggtagtagtaccttcagcaaatcacacgtgatagttgcagcgggtac-3'
D92A-1	5'-catggtaccgcttatactatcacgtgtgcatttgctgaaggactacta-3'
D92A-2	5'-ccggtagtagtaccttcagcaaatgcacacgtgatagataagcgggtac-3'
E166A-1	5'-tcgactctggctggtctccaacctgctggtgtgatttgca-3'
E166A-2	5'-ctagtgcaaaatcacaccagcaggttgagaccagccagag-3'

---

#### 7.1.4 GTP-Cyclohydrolase I

AT-Cyc-TB-vo	5'-ctggtgccccgcggcgcattagatgagggatgtttgaatctgg-3'
AT-Cyc-His-vo	5'-attatgggtcaccatcaccaccatcattctggtctggtgccccgcggcg-3'
AT-Cyc-KpnI-vo	5'-ataataataggtaccattatgggtcaccatcaccacc-3'
AT-Cyc-EcoRI-hi	5'-tattatgaattctcaaaatggagagcttgactctgtcttcaaggc-3'
AT-CyHI-NotI-vo	5'-ataataatagcggccgcttcttctggtctggtgccccgcggttctggcgcat tagatgagggatgttg-3'
AT-CyHI-EcoRV-hi	5'-tattattatgatatcttaaaatggagagcttgactctgtcttc-3'