

Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität
München

**Biosynthese von Riboflavin.
Untersuchungen zur
GTP Cyclohydrolase II und 3,4-Dihydroxy-
2-butanon 4-phosphat Synthase.**

Stefan Michalel Kraut

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. F. P. Schmidtchen

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher, i.R.
2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Die Dissertation wurde am 29.10.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 27.08.2009 angenommen.

Für meine Mutter

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2003 bis Mai 2007 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. A. Bacher durchgeführt.

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

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Markus Fischer, der mich die Jahre hindurch betreut hat und durch seine Vorarbeiten und sein Wissen auf diesem Gebiet diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Meinen Arbeitskolleginnen und Arbeitskollegen Eva Sicklinger, Sabine Saller, Sebastian Schwamb, Thomas Wojtulewicz und Gabi Ostermeier möchte ich für das angenehme Arbeitsklima, für hilfreiche Diskussionen und die mir entgegengebrachte Freundschaft danken. Sebastian Schwamb gilt dabei mein besonderer Dank für die geduldige Einführung in die Methoden der Molekularbiologie zu Beginn meiner Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Ilka Haase bedanken, die mir über all die Jahre mit endloser Geduld bei allen Problemen im Laboralltag geholfen hat und mit zahllosen Stunden an der Ultrazentrifuge, am PC und an fast allen Laborgeräten wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Fritz Wendling für die freundliche Hilfe bei allen Computerproblemen, Herrn Dr. Werner Römisch für die Zusammenarbeit am NMR, sowie Herrn Richard Feicht, der mir bei vielen Proteinreinigungen eine große Hilfe war.

Meinem Praktikanten Florian Schmidt danke ich für sein großes Engagement während seiner Arbeit an der Mutagenesestudie.

Herrn PD Dr. Köhler und seinen Mitarbeitern vom Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der TU München gebührt ein besonderer Dank für die Mithilfe bei den EDMAN-Sequenzierungen.

Allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Organische Chemie und Biochemie danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ein liebevoller Dank geht an meine Schwester, die mir mit ihrer Freundschaft geholfen hat, so manche dunklen Momente zu überwinden und sich an den hellen umso mehr zu erfreuen.

Mein größter Dank gebührt meiner Mutter, die immer an mich glaubt und mir einen grenzenlosen Rückhalt in allen Dingen gibt.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Riboflavin (Vitamin B ₂)	1
1.2	Riboflavinbiosynthese	3
1.3	GTP Cyclohydrolasen	5
1.4	Die GTP Cyclohydrolase II	7
1.5	3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase	12
1.6	Die Organismen	15
1.7	Aufgabenstellung	17
2	MATERIAL	19
2.1	Geräte	19
2.2	Chemikalien	21
2.3	Bakterienstämme	22
2.4	Plasmide	23
2.4.1	pNCO113	23
2.4.2	pNCO-SB-HIS ₆ -ACYC184	24
2.4.3	pT77	24
2.4.4	pET-5a	25
2.5	Proteine und Nukleinsäuren	26
2.6	Nährmedien und Antibiotika	26
2.7	Trennmaterialien	27
2.8	Puffer	27
3	METHODEN	28
3.1	Molekularbiologische Methoden	28
3.1.1	Polymerasekettenreaktion	28

3.1.2	Gen-Vollsynthese	29
3.1.3	Oligo-Annealing	30
3.1.4	Restriktionsverdau	31
3.1.5	Reinigung von DNA Fragmenten	32
3.1.6	Ligation von DNA	33
3.1.7	Herstellung kompetenter Zellen	33
3.1.8	Transformation von Plasmid-DNA	35
3.1.9	PCR-Screening	36
3.1.10	Isolierung von Plasmid-DNA	36
3.1.11	Konzentrationsbestimmung von DNA	37
3.1.12	DNA-Sequenzierung	37
3.1.13	Zellanzucht und Ernte	38
3.1.14	Stammhaltung	39
3.1.15	<i>In vivo</i> -Assays	39
3.2	Gelelektrophorese	40
3.2.1	Agarosegelelektrophorese	40
3.2.2	SDS-Gelelektrophorese	41
3.2.3	Native Gelelektrophorese	43
3.3	Proteinaufbereitung	43
3.3.1	Zellaufschluss	43
3.3.2	Hitze-fällung	44
3.3.3	Säulenchromatographie	45
3.3.4	Ultrafiltration	48
3.3.5	Dialyse	48
3.3.6	Elektro-Blot	49
3.4	Analytik	50
3.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	50
3.4.2	N-Terminale Aminosäuresequenzierung nach Edman	51
3.4.3	Kinetische Untersuchungen	51
3.4.4	Analytische Ultrazentrifugation	56
3.4.5	Kalibrierte Gelfiltration zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts	59
3.4.6	Zinkbestimmung durch Atomabsorptionsspektroskopie	60
3.4.7	NMR-Spektroskopie	62
4	ERGEBNISSE	63
4.1	GTP Cyclohydrolase II aus <i>Candida albicans</i>	63

4.1.1	Konstruktion des synthetischen Gens CA-Rib1-syn	63
4.1.2	<i>In vivo</i> -Assay	66
4.1.3	Expression und Reinigung von CA-Rib1-syn	67
4.1.4	Bestimmung des nativen Molekulargewichts	68
4.1.5	Kinetische Charakterisierung	70
4.1.6	Zinkbestimmung	71
4.1.7	Einfluss von Metallionen auf die Aktivität	72
4.1.8	NMR-Untersuchungen	73
4.1.9	Analytische Ultrazentrifugation	76
4.1.10	Konstruktion von CA-H6-Rib1	76
4.1.11	Konstruktion der N-trunkierten Mutante CA-NT-H6-Rib1	78
4.1.12	Expression und Reinigung von CA-NT-H6-Rib1	78
4.1.13	Charakterisierung von CA-NT-H6-Rib1	80
4.1.14	Diskussion	81
4.2	GTP Cyclohydrolase II aus <i>Candida glabrata</i>	84
4.2.1	<i>In vivo</i> -Assay	84
4.2.2	Expression und Reinigung von CG-Rib1-H6	85
4.2.3	Analytische Ultrazentrifugation	87
4.2.4	Kinetische Charakterisierung	88
4.2.5	Zinkbestimmung	89
4.2.6	Diskussion	90
4.3	GTP Cyclohydrolase II aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	92
4.3.1	Klonierung des Gens AF-RibA	94
4.3.2	<i>In vivo</i> -Assay	95
4.3.3	Expression und Reinigung von AF-RibA	96
4.3.4	Konstruktion, Expression und Reinigung von AF-H6-RibA	97
4.3.5	Bestimmung des nativen Molekulargewichtes	98
4.3.6	Analytische Ultrazentrifugation	99
4.3.7	Kinetische Charakterisierung	100
4.3.8	Thermodynamische Untersuchungen	101
4.3.9	Zinkbestimmung	103
4.3.10	Diskussion	104
4.4	3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	108
4.4.1	Klonierung des Gens AF-RibB-H6	109
4.4.2	<i>In vivo</i> -Assay	109
4.4.3	Expression und Reinigung von AF-RibB-H6	110
4.4.4	Analytische Ultrazentrifugation	111

4.4.5	Kinetische Charakterisierung	113
4.4.6	Diskussion	114
4.5	3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase / GTP Cyclohydrolase II aus <i>Oryza sativa</i>	115
4.5.1	Klonierung der Gene OS-RibA und OS-H6-RibA	117
4.5.2	Klonierung der Einzeldomänen OS-H6-Mut und OS-H6-CycII	117
4.5.3	<i>In vivo</i> -Assays	118
4.5.4	Expression und Reinigung von OS-RibA und OS-H6-RibA	119
4.5.5	Expression und Reinigung von OS-H6-Mut und OS-H6-CycII	121
4.5.6	Kinetische Charakterisierungen	122
4.5.7	Diskussion	124
4.6	GTP Cyclohydrolase II aus <i>Escherichia coli</i>	126
4.6.1	Klonierung der Mutanten	127
4.6.2	Reinigung und Charakterisierung der EC-RibA Mutanten	131
4.6.3	Die Mutante EC-RibA-Y105F	133
4.6.4	Expression und Reinigung von EC-RibA-Y105F	133
4.6.5	Bestimmung der enzymatischen Aktivität von EC-RibA-Y105F	135
4.6.6	Diskussion	137
5	ZUSAMMENFASSUNG	144
6	ANHANG	145
6.1	Primersequenzen	145
7	LITERATURVERZEICHNIS	149

Verwendete Abkürzungen:

APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
dNTPs	Desoxyribonukleotid-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GMPCPP	Guanosin 5'-[α -, β -methylen]triphosphat
GTP	Guanosintri-phosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kbp	Kilobasenpaare
MCS	multiple cloning site
OD ₆₀₀	optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N,`N`-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

1.1 Riboflavin (Vitamin B₂)

Vitamine sind organische Verbindungen, die vom Organismus nicht als Energieträger, sondern in kleinsten Mengen für andere lebenswichtige Stoffwechselfunktionen benötigt werden. Diese Moleküle erfüllen in allen Lebensformen nahezu die gleichen Funktionen, jedoch haben Tiere die Fähigkeit verloren, sie selbst herzustellen. Vitamine müssen daher von Menschen und Tieren mit der Nahrung aufgenommen werden. Eine Ausnahme bildet Vitamin D, das von Erwachsenen unter Lichteinwirkung aus Cholesterin synthetisiert werden kann. Einige Vitamine werden dem Körper als Vorstufen (Provitamine) zugeführt, die dann erst im Körper in die Wirkform umgewandelt werden. Man unterteilt Vitamine in fettlösliche (lipophile) und wasserlösliche (hydrophile) Vitamine. Der polnische Biochemiker Casimir Funk prägte den Begriff "Vitamin" (aus lat. *vita* für Leben und *amin* für stickstoffhaltig) ausgehend von dem als lebensnotwendiges Amin erkannten Thiamin (Vitamin B₁). Weitere Untersuchungen zeigten aber, dass bei weitem nicht alle Vitamine Amine sind. Beispiele hierfür sind das Vitamin A (Retinol), ein stickstofffreier, ungesättigter Alkohol und das Vitamin C (Ascorbinsäure), eine strukturell den Kohlenhydraten ähnliche, jedoch sauer wirkende Substanz.

Die Sammelbezeichnung „B-Vitamine“ steht für eine Gruppe wasserlöslicher Vitamine unterschiedlicher chemischer Zusammensetzungen. Außer den eigentlichen B-Vitaminen, wie B₁ (Thiamin), B₂ (Riboflavin), B₆ (Pyridoxin) und B₁₂ (Cobalamin) rechnet man noch Biotin, Folsäure, Nicotinsäure und Pantothenensäure hinzu.

Vitamin B₂ (7,8-Dimethyl-10-(-D-ribityl)-isoalloxazin; Riboflavin) spielt in Form seiner Phosphorsäureester Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) (Abbildung 1.1) eine wichtige Rolle als Cofaktor in Flavoenzymen. Eine große Anzahl von Redoxenzymen, wie z.B. die Acyl-CoA-Dehydrogenase der β -Oxidation (Fettsäuremetabolismus), die Succinat-Dehydrogenase des Citratzykluses oder die NADH-Dehydrogenase der Atmungskette sind auf diese Coenzymformen des Riboflavins angewiesen. Da die von der DGE empfohlene tägliche Aufnahme von 1,5-1,7 mg Riboflavin pro Tag bereits durch eine ausgewogene Ernährung

ausreichend gedeckt wird, treten Mangelercheinungen wie Lichtempfindlichkeit, Dermatitis und Anämie (Foy & Mbaya, 1977) nur selten auf (Bacher et al., 2000). Riboflavin ist vor allem in Milch, Leber, Eiern und Gemüse, wie Spargel, Brokkoli und Spinat enthalten. Es ist stark lichtempfindlich, aber sehr hitzestabil, so dass es beim Kochen nicht zerstört wird.

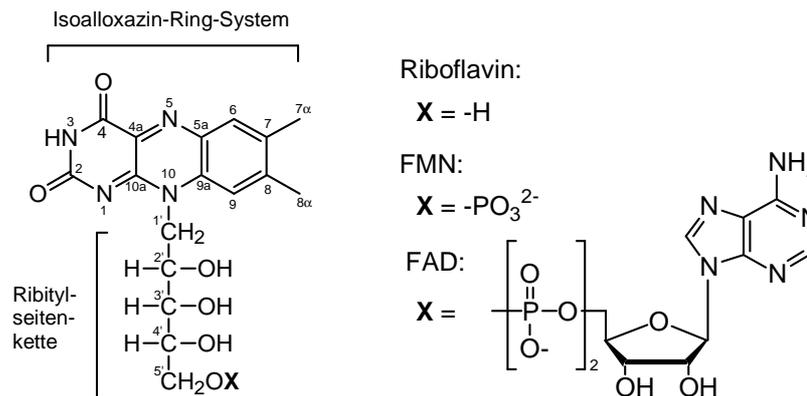


Abbildung 1.1: Riboflavin und seine Coenzymformen FMN und FAD

Riboflavin wird industriell in großen Mengen (4500 Tonnen Jahresproduktion) als Vitaminzusatz oder Lebensmittelfarbstoff (E101) für die Futter- und Nahrungsmittelindustrie produziert. Biotechnologische Fermentationsverfahren haben hier die klassische organische Synthese weitgehend abgelöst (Bacher et al., 2000). Zwei große Hersteller bedienen sich heute Fermentationsverfahren mit dem Ascomyceten *Ashbya gossypii* (BASF) und dem gram positiven Bakterium *Bacillus subtilis* (DSM). Das fortschreitende Verständnis der Riboflavinbiosynthese in Mikroorganismen führte in den letzten 50 Jahren zu einer stetigen Verbesserung dieser industriellen Prozesse.

Viele humanpathogene Mikroorganismen sind zwingend auf eine endogene Riboflavinsynthese angewiesen, da sie das Vitamin bzw. die davon abgeleiteten Coenzyme aufgrund fehlender Transportsysteme nicht aus dem umgebenden Milieu aufnehmen können. Die Enzyme der Riboflavinbiosynthese stellen daher attraktive Ziele für potentielle Antiinfektiva oder Herbizide dar. Da die Enzyme im Organismus von Menschen und höheren Tieren nicht vorhanden sind, ist hier das Problem der Toxizität reduziert.

1.2 Riboflavinbiosynthese

Die Aufklärung des Riboflavinbiosyntheseweges war über fünf Jahrzehnte Gegenstand intensiver Forschungen und wurde in zahlreichen Übersichtsartikeln zusammengefasst (Plaut, 1961; Plaut *et al.*, 1974; Brown & Reynolds, 1963; Brown *et al.*, 1975; Brown & Williamson, 1982; Brown & Williamson, 1987; Young, 1972; Bacher *et al.*, 1975; Bacher *et al.*, 1996; Bacher *et al.*, 2000; Bacher *et al.*, 2001; Fischer & Bacher, 2005; Fischer & Bacher, 2006).

Abbildung 1.2 fasst die einzelnen Schritte der Riboflavinbiosynthese bei Prokaryonten und Pflanzen zusammen und zeigt die Bildung der Coenzymformen FMN und FAD. Die beiden Vorläufermoleküle aus dem Nucleotid-Stoffwechsel bzw. dem Pentosephosphatweg, Guanosin-5'-triphosphat (GTP, **1**) und Ribulose-5-phosphat (**6**), sind im Verhältnis 1:2 am Aufbau eines Riboflavinmoleküls beteiligt.

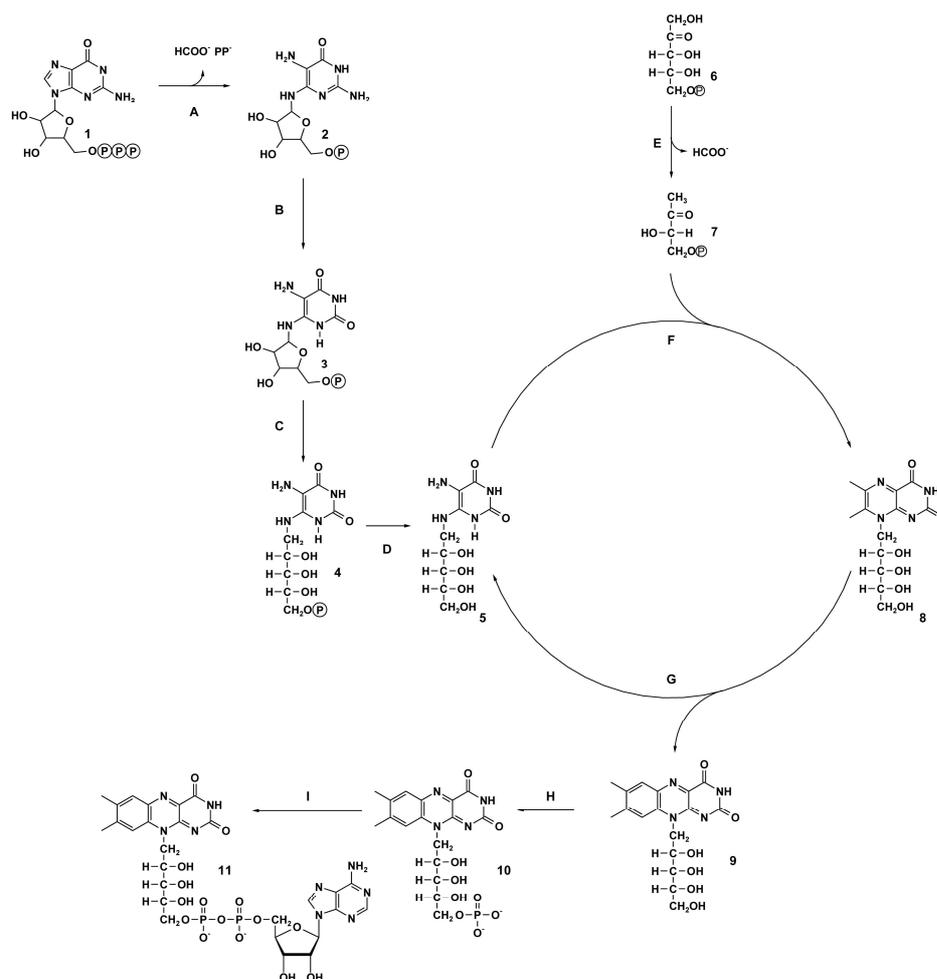


Abbildung 1.2: Riboflavinbiosynthese und Bildung von FMN und FAD bei Prokaryonten und Pflanzen

Die GTP Cyclohydrolase II (**A**) katalysiert die Umsetzung von GTP (**1**) zu 2,5-Diamino-6- β -ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat (**2**) unter Abspaltung von Pyrophosphat und Formiat (Foor & Brown, 1975; Foor & Brown, 1980) (siehe auch 1.4).

Es folgt eine Sequenz von Desaminierung am Pyrimidinring und Reduktion der Ribosylseitenkette, deren Reihenfolge sich bei verschiedenen Organismen unterscheidet. Bei Prokaryonten führt zunächst die Desaminase (**B**) zu 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion 5'-phosphat (**3**), welches dann durch die Reduktase (**C**) zu 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion 5'-phosphat (**4**) reduziert wird (Burrows & Brown, 1978). Die gleiche Reaktionsfolge findet auch in Pflanzen statt (Fischer *et al.*, 2004). In Hefen und Pilzen dagegen erfolgt ausgehend von **2** zunächst die Reduktion der Seitenkette, danach erst die Desaminierung (Bacher & Lingens, 1970; Nielsen & Bacher, 1981). Beide Reaktionswege führen jedoch letztendlich zum selben Intermediat **4**. Vor einigen Jahren wurden in den Bakterien *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* bifunktionelle Enzyme gefunden, die eine N-terminale Desaminase- und eine C-terminale Reduktase-Domäne besitzen (Fischer *et al.*, 1996; Richter *et al.*, 1997).

Da nur das unphosphorylierte Intermediat 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**5**) als Substrat für das nächste Enzym **F** in der Riboflavinbiosynthese dienen kann (Harzer *et al.*, 1978), muss an diesem Punkt eine Phosphatabspaltung mit Hilfe einer Phosphatase (**D**) stattfinden. Bisher wurde jedoch noch keine spezifische Phosphatase gefunden, was vermuten lässt, dass eine Phosphatase mit geringer Substratspezifität für diesen Umsatz verantwortlich ist. Das dephosphorylierte Intermediat **5** reagiert nun unter dem katalytischen Einfluss der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Synthase (**F**) mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (**8**) (Neuberger & Bacher, 1986; Kis *et al.*, 1995). Der zweite Reaktionspartner **7** wird in einer von der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase (**E**) katalysierten, intramolekularen Umlagerungsreaktion (siehe 1.5) aus Ribulose-5-phosphat (**6**) erzeugt, wobei Formiat abgespalten wird (Neuberger & Bacher, 1986; Volk & Bacher, 1988; Volk & Bacher, 1990). Vor wenigen Jahren wurden bei einigen Organismen, z.B. *B. subtilis* und *Arabidopsis thaliana*, bifunktionelle Enzyme gefunden, die durch eine N-terminale 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase- und eine C-terminale GTP Cyclohydrolase II-Domäne die Einschleusung beider Ausgangsstoffe **1** und **7**

in die Riboflavinbiosynthese katalysieren (Richter *et al.*, 1992; Richter *et al.*, 1993; Herz *et al.*, 2000).

Eine abschließende Dismutation zweier Moleküle **8** durch die Riboflavinsynthase (**G**) führt zur Bildung von Riboflavin (**9**) und einem Molekül **5**, welches wieder in den Kreislauf eingeht (Plaut, 1960; Plaut, 1963; Wacker *et al.*, 1964; Harvey & Plaut, 1966).

Sowohl Pflanzen und Mikroorganismen, die selbst in der Lage sind, Riboflavin zu produzieren, als auch andere Organismen, die, wie der Mensch, Riboflavin als Vitamin benötigen, müssen dieses noch in die aktiven Coenzymformen FMN (**10**) sowie FAD (**11**) umwandeln. Ersteres entsteht durch eine ATP-abhängige Phosphorylierung von Riboflavin an seiner 5'-Position mit Hilfe der Flavokinase (**H**) (Bacher, 1991). In einem weiteren Schritt entsteht FAD (**11**), indem **10**, katalysiert von der FAD-Synthetase (**I**), über eine Phosphodiesterbrücke mit einer AMP-Einheit, welche durch Pyrophosphatabspaltung aus ATP hervorgeht, verknüpft wird. Bifunktionelle Flavokinasen/FAD-Synthetasen konnten in den Eubakterien *Corynebacterium ammoniagenes* und *E. coli* gefunden werden (Kamino *et al.*, 1985; Manstein & Pai, 1986; Kitatsuji *et al.*, 1993; Hagihara *et al.*, 1995; Nakagawa *et al.*, 1995).

1.3 GTP Cyclohydrolasen

Es sind insgesamt 3 Arten von GTP Cyclohydrolasen bekannt. Allen gemeinsam ist die katalytische Ringöffnung des Imidazolrings von GTP (**1**). Die GTP Cyclohydrolase I stellt das erste Enzym im Biosyntheseweg von Tetrahydro-biopterin und Tetrahydrofolat dar (Brown & Williamson, 1987; Nichol *et al.*, 1985; Burg & Brown, 1966). Nach der Öffnung des Imidazolrings von GTP durch Abspaltung von C-8 als Formiat führt die Reaktion der GTP Cyclohydrolase I zu einer Amadori-Umlagerung der Ribose mit anschließender Ringbildung. Produkt dieser Reaktion ist Dihydroneopterintriphosphat (**12**, Abbildung 1.3) (Burg & Brown, 1966; Shiota *et al.*, 1967). Das Gen für die GTP Cyclohydrolase I ist, wie auch das Gen für die GTP Cyclohydrolase II, stark konserviert und wurde aus vielen verschiedenen Pro- und Eukaryonten kloniert (Hatakeyama *et al.*, 1991; Katzenmeier *et al.*, 1991;

McLean *et al.*, 1993; Maier *et al.*, 1995; Herz, 2000). Die Aminosäuresequenzen der GTP Cyclohydrolase I und II zeigen untereinander jedoch keinerlei Homologie. In Mycoplasmen und Archaeobakterien wurden bisher noch keine Gene für GTP Cyclohydrolase I und II gefunden (Bult *et al.*, 1996). Stattdessen wurde vor kurzer Zeit im Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii* eine neue Klasse von GTP Cyclohydrolasen entdeckt, deren Sequenz keine Homologien zu den bereits bekannten GTP Cyclohydrolasen I und II aufweist (Graham *et al.*, 2002). Diese GTP Cyclohydrolase III verbindet Eigenschaften der GTP Cyclohydrolasen I und II und katalysiert die Umsetzung von GTP zu 2-Amino-5-formylamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat (**13**, Abbildung 1.3). Dieses Reaktionsprodukt ist vermutlich Ausgangspunkt für Flavin- und Pteridinbiosynthesen diverser Archaea (Graham *et al.*, 2002).

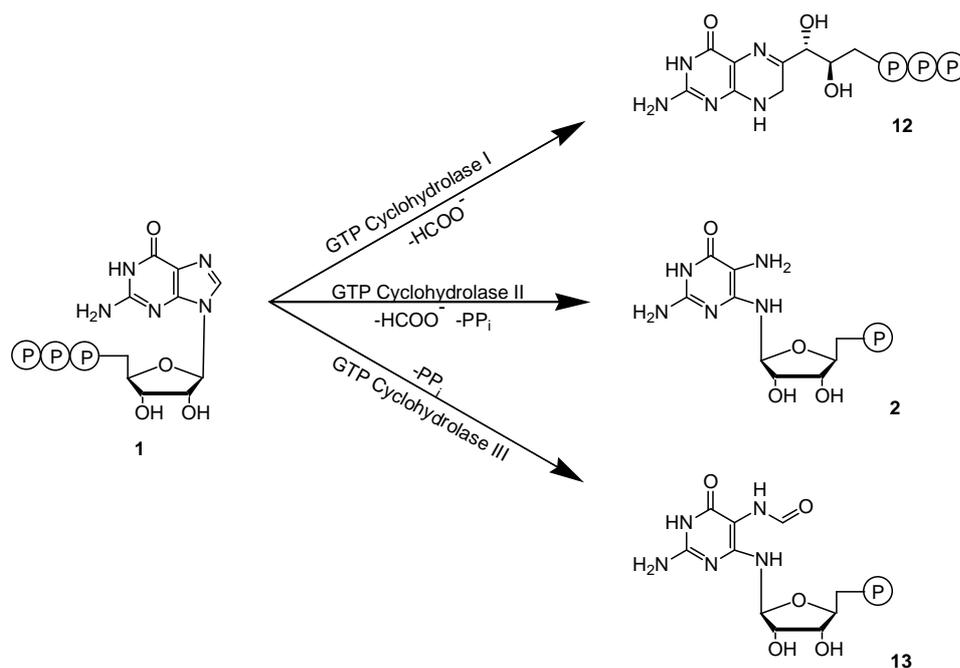


Abbildung 1.3: Die 3 GTP Cyclohydrolasen und ihre Produkte: (1) GTP; (12) Dihydroneopterintriphosphat; (2) 2,5-Diamino-6-β-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat; (13) 2-Amino-5-formylamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat.

1.4 Die GTP Cyclohydrolase II

Die GTP Cyclohydrolase II (EC 3.5.4.25) ist das erste Enzym der Riboflavinbiosynthese (Foor & Brown, 1975). Sie katalysiert die Öffnung des Imidazolrings von GTP unter Abspaltung von C-8 als Formiat und spaltet zusätzlich Pyrophosphat ab (Foor & Brown, 1980). Produkt der Reaktion ist 2,5-Diamino-6- β -ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat (**2**). Die meisten bisherigen Erkenntnisse wurden anhand der GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* gewonnen. Das Gen der GTP Cyclohydrolase II (*ribA*) befindet sich auf dem *E. coli* Chromosom bei 1356 kbp (Ritz, 1998). 1993 wurde das Gen kloniert und das Enzym in *E. coli* überexprimiert (Richter *et al.*, 1993). Das Gen kodiert für ein Protein mit 196 Aminosäuren (21,8 kDa), welches eine native Masse von 44 kDa aufweist, was annehmen lässt, dass das Enzym als Homodimer vorliegt (Foor & Brown, 1975; Richter *et al.*, 1993). Abbildung 1.4 zeigt im Aminosäuresequenzvergleich von GTP Cyclohydrolasen II aus Hefen, Pflanzen und Bakterien viele hochkonservierte Regionen. Durch Mutagenese-Studien und Flammenatomabsorptionsspektroskopie wurde gezeigt, dass die GTP Cyclohydrolase II ein Zn^{2+} -Ion enthält, das durch die Cysteinreste 54, 65 und 67 (bei *E. coli*) komplexiert wird und an der enzymatischen Reaktion beteiligt ist (Kaiser *et al.*, 2002). Ferner ist die Aktivität des Enzyms vom Vorhandensein zweiwertiger Kationen, vorzüglich Mg^{2+} oder Mn^{2+} , im Reaktionspuffer abhängig (Foor & Brown, 1975).

der Imidazolring von 8-Oxoguaninnukleotiden durch die GTP Cyclohydrolase II nicht hydrolysiert wird, jedoch Pyrophosphat abgespalten wird (Kobayashi *et al.*, 1998). GMP selbst ist kein Substrat der GTP Cyclohydrolase II (Schramek *et al.*, 2001) und bei der GTP-Umsetzung in H_2^{18}O werden lediglich 2,5-Diamino-6- β -ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat und GMP mit ^{18}O markiert, nicht aber das abgespaltene Pyrophosphat (Ritz *et al.*, 2001).

Durch Stopped Flow und Quenched Flow Experimente konnte gezeigt werden, dass die Abspaltung des Pyrophosphats den limitierenden Schritt der Reaktion darstellt (Schramek *et al.*, 2001). In diesen Experimenten konnte weiterhin kein Zwischenprodukt nachgewiesen werden, bei dem die Ringöffnung bereits erfolgt ist, Formiat aber noch nicht abgespalten war. Dennoch stellt das ringgeöffnete GTP Derivat 2-Amino-5-formylamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-triphosphat (Intermediat **18**, Abbildung 1.5) ein Substrat der GTP Cyclohydrolase II dar, wenn auch unter anderem kinetischen Verhalten (Schramek *et al.*, 2001). Durch Mutagenese-Studien wurde gezeigt, dass das Zinkion der GTP Cyclohydrolase II notwendig für die hydrolytische Öffnung des Imidazolrings von GTP und die Abspaltung des Formiats ist, nicht jedoch für die Abspaltung von Pyrophosphat (Kaiser *et al.*, 2002). Abbildung 1.5 stellt die daraufhin postulierte Reaktion der GTP Cyclohydrolase II dar, bei dem Wassermoleküle im aktiven Zentrum vom Zn^{2+} aktiviert werden, um dann zunächst den Imidazolring und anschließend das entstehende Formylamino-Intermediat anzugreifen.

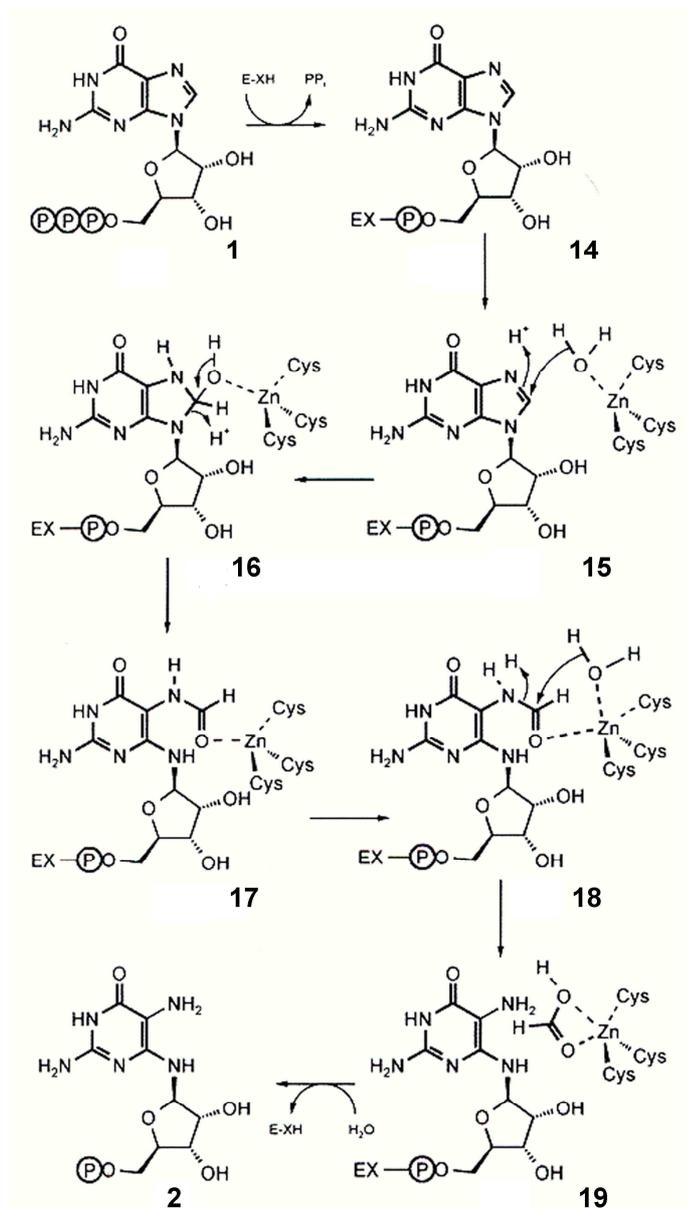


Abbildung 1.5: Postulierter Reaktionsmechanismus der GTP Cyclohydrolase II

Nach der kovalenten Bindung zwischen Enzym und Substrat (GTP, **1**) unter Pyrophosphatabspaltung (**14**) führt ein nukleophiler Angriff eines zinkaktivierten Wassermoleküls (**15**) zur Bildung eines GTP-Hydrats (**16**). Durch die Öffnung der C8-N9-Bindung entsteht das Formamid-Intermediat (**17**). Ein weiteres zinkaktiviertes Wassermolekül greift nun die zinkkomplexierte Formylgruppe an (**18**), wodurch Formiat abgespalten wird (**19**). In einem letzten Schritt wird das Produkt (**2**) durch Hydrolyse vom Enzym freigesetzt. Es entsteht zunächst als β -Anomer, welches

sich durch spontane Anomerisierung in das α -Anomer umlagern kann (Ritz *et al.*, 2001).

Vor kurzem gelang es Ren *et al.*, die GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* zur Kristallisation zu bringen und mittels Röntgenstrukturanalyse zu untersuchen (siehe Abbildung 1.6). Die Aufklärung der 3D-Struktur einer GTP Cyclohydrolase II in Abwesenheit und Gegenwart des schwer hydrolysierbaren GTP-Analogons Guanosin 5'-(α,β -methylen)triphosphat in einer Auflösung von 1.54 Å ermöglichte es, die an der Substratbindung und eventuell an der enzymatischen Katalyse beteiligten Aminosäuren zu identifizieren (Ren *et al.*, 2005). Anhand der Strukturdaten wurde vorgeschlagen, dass Arginin 128 das α -Phosphat des GTPs unter Bildung eines GMP-Enzym Adduktes (Intermediat **14**, Abbildung 1.5) nukleophil angreift, wobei Arginin 128 wiederum durch eine Salzbrücke vom benachbarten Aspartat 126 stabilisiert wird. Beim anschließenden Angriff des aktivierten Wassers auf den Imidazolring dient Tyrosin 105 als Protonendonator für das N-7 des GMPs und erleichtert so den nukleophilen Angriff (Intermediate **15** und **16**). Die Aminosäuren Arginin 94, Glutamin 108 und Threonin 114 unterstützen die Bindung des Substrats durch Wasserstoffbrückenbindungen.

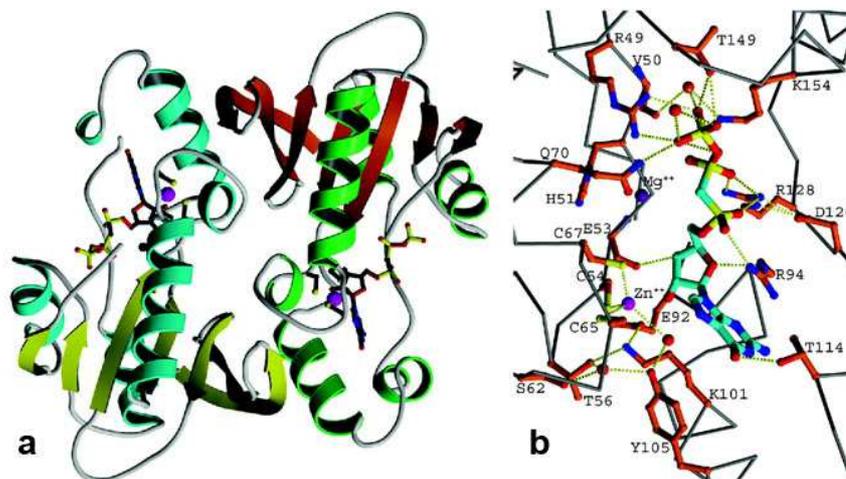


Abbildung 1.6: Struktur der GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli*. **a:** Bändermodell der dimeren Quartärstruktur der GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* mit gebundenem GMPCPP in der tetragonalen Kristallform. Die Helices der zwei Untereinheiten sind in cyan und aquamarine, die β -Faltblätter in gelb und rot dargestellt. Das Zinkion ist lila und das Magnesiumion schwarz gefärbt. Das gebundene GMPCPP ist in Standard-Atomfarben abgebildet. **b:** Stereoansicht der GMPCPP-Bindung im aktiven Zentrum der GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli*. Die C-Atome des GMPCPP sind in cyan, die mit GMPCPP interagierenden Aminosäurereste in rot dargestellt. Das Zinkion ist lila und das Magnesiumion blau gefärbt.

1.5 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase

Die Natur und Herkunft von 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat (**7**) als Intermediat der Riboflavinbiosynthese war lange Zeit unbekannt und Thema intensiver Forschung (Bacher *et al.*, 1983a; Volk & Bacher, 1988; Volk & Bacher, 1990; Volk & Bacher, 1991). Neben Diacetyl und Acetoin wurden zahlreiche Tetrosen und Pentosen sowie die Ribitylseitenkette von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**5**) als Ausgangssubstanz diskutiert (Bacher, 1991). Bei Einbauversuchen mit ¹³C-markierten Vorstufen konnten mittels NMR-Spektroskopie an bestimmten Positionen des Riboflavins ¹³C-Anreicherungen beobachtet werden und so schließlich der Pentosephosphatweg als Quelle der gesuchten Verbindung identifiziert werden (Bacher *et al.*, 1983b). Neuberger und Bacher fanden 1985 den an der Riboflavinbiosynthese beteiligten Phosphorsäureester einer Kohlenhydratverbindung, den sie „Compound X“ nannten (Neuberger & Bacher, 1985). Von seinen fünf Kohlenstoffatomen wurden jedoch nur C-1 bis C-3 und das C-5 Atom in die Lumazinverbindung eingebaut, wobei eine neue Bindung zwischen C-3 und C-5 entstand (Bacher *et al.*, 1985; Le Van *et al.*, 1985). Es folgte schließlich die Isolierung eines Enzyms (**E**), das aus Ribulose-5-phosphat (**6**) unter Umlagerung und unter Abspaltung des C-4 als Formiat 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**7**) bilden kann (Volk & Bacher, 1988; Volk & Bacher, 1990; Volk & Bacher, 1991; Richter *et al.*, 1992). Das Enzym enthält pro aktivem Zentrum zwei Metallionen, vermutlich Zink und Calcium, die maßgeblich an der Reaktion beteiligt sind (Steinbacher *et al.*, 2003). Nach der Klonierung und Charakterisierung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *E. coli* (Richter *et al.*, 1992) konnten in jüngster Zeit die Röntgenstrukturen der Enzyme aus *E. coli* (Liao *et al.*, 2001), *Magnaporthe grisea* (Liao *et al.*, 2002), *Methanococcus jannaschii* (Steinbacher *et al.*, 2003) und *Candida albicans* (Echt *et al.*, 2004) gelöst werden (Abbildung 1.7).

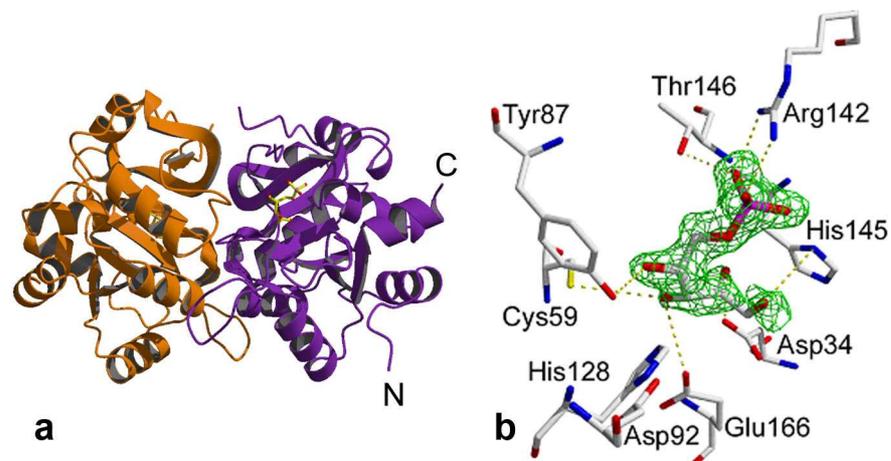


Abbildung 1.7: Struktur der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *C. albicans*. a: Stereoansicht des Dimers. Die Untereinheiten sind violett bzw. orange gefärbt, der Ligand Ribulose-5-phosphat ist als gelbes Ball-and-Stick-Modell gezeigt. b: Stereoansicht eines aktiven Zentrums mit gebundenem Substrat Ribulose-5-phosphat

Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase 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 der in Abbildung 1.8 dargestellte Reaktionsmechanismus vorgeschlagen (Fischer *et al.*, 2002; Steinbacher *et al.*, 2003). Demnach sind die Hydroxylgruppen OH-3 und OH-4 und die Carbonylgruppe (O-2) des Substrats durch vier Bindungen mit zwei Metallen koordiniert. Es bestehen je zwei Bindungen zwischen Zink (M_I) und OH-3, bzw. OH-4, sowie zwischen Calcium (M_{II}) und O-2, bzw. OH-3.

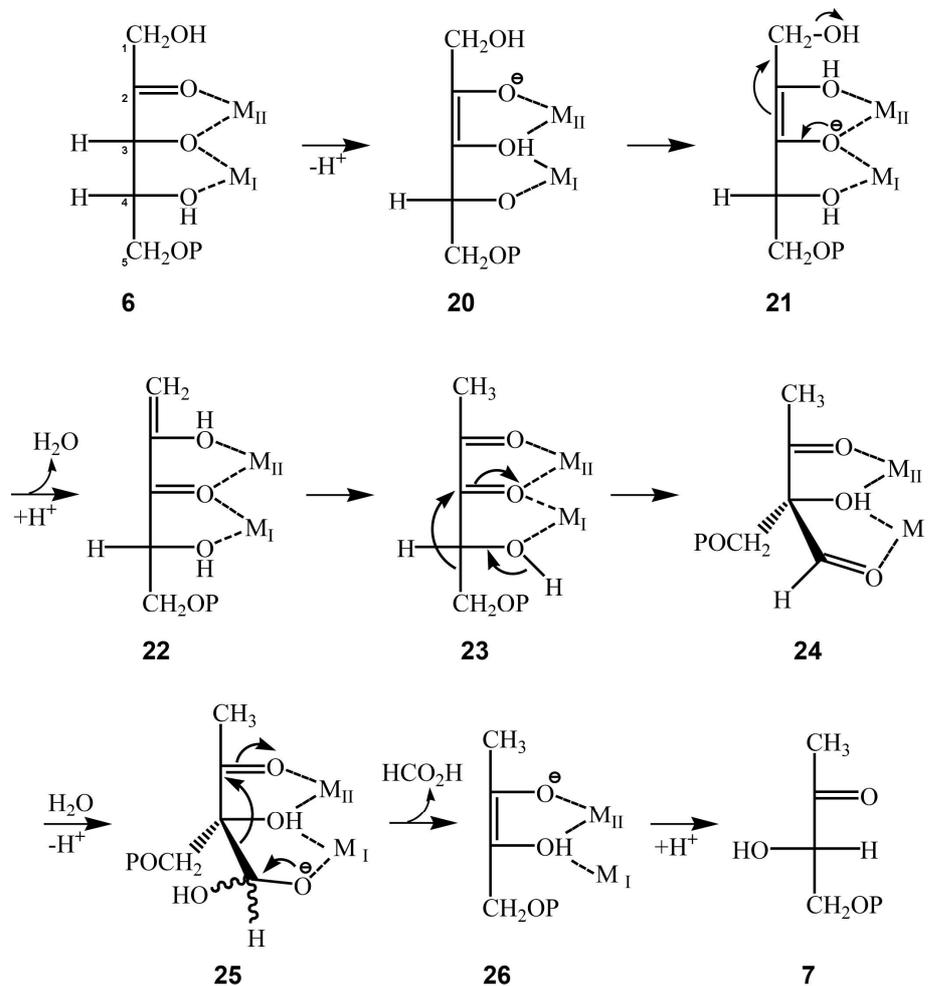


Abbildung 1.8: Postulierter Reaktionsmechanismus der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase

Den Eingangsschritt der Reaktion der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase bildet die Enolisierung von Ribulose-5-phosphat (**6**) nach Abstraktion des Protons (**20**). Aufgrund der Koordination des Carbonylsauerstoffes von C-2 an Metall II ergibt sich die *cis*-Konformation des 2,3-Endiols. Im nächsten Schritt erfolgt eine Verschiebung des Protons zwischen O-2 und O-3 (**21**). Die OH-Gruppe am C-1 wird protoniert und als Wasser abgespalten. Das resultierende Intermediat **22** tautomerisiert zu dem 2,3-Diketon **23**, wobei die OH-Gruppe am C-2 deprotoniert wird und das C-1 ein Proton aus dem Lösungsmittel erhält (Volk & Bacher, 1988). In der folgenden sigmatropen Umlagerung der Phosphomethylengruppe zu Intermediat **24** wird die OH-Gruppe des C-4 deprotoniert, während der C-3-Sauerstoff ein Proton erhält (Volk & Bacher, 1988). Ermöglicht wird diese Umlagerung vermutlich durch den elektronenziehenden Charakter der Carbonylgruppe am C-2 und die kompakte Geometrie des Substrates durch die

Koordination von O-2, O-3 und O-4 an die beiden Metalle. Im anschließenden Schritt wird die von C-4 gebildete Formylgruppe nach Hydratisierung als Formiat abgespalten. Es wird vermutet, dass das zunächst gebildete Aldehydhydrat **25** durch Koordination an Metall I stabilisiert wird. Nach dem Austritt des Formiats entsteht das Endiol **26**, welches durch Keto-Enol-Tautomerisierung in 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat (**7**) übergeht.

1.6 Die Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden GTP Cyclohydrolasen II, bzw. 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen aus folgenden Organismen untersucht:

Candida albicans und *Candida glabrata*:

C. albicans und *C. glabrata* sind humanpathogene Pilze der Candidagruppe, die zu den Hefepilzen gehören. Sie zählen zu den fakultativ pathogenen Erregern und können bei 75 % aller gesunden Menschen (www.dge.de/modules.php?name=News&file=article&sid=292) auf den Schleimhäuten von Nase und Rachen, im Genitalbereich sowie im Verdauungstrakt nachgewiesen werden. Als Saprophyten siedeln sie dort im Gleichgewichtszustand mit anderen Mikroorganismen und verursachen bei gesunden Menschen in der Regel keine Beschwerden. Bei fehlender oder verminderter Immunität, z.B. durch Krankheit oder Medikamentengabe verursacht, konvertieren diese Pilze zu pathogenen Keimen und verursachen meist endogene Infektionen (Candidose). Durch die sich weltweit ausbreitenden HIV-Infektionen hat sich dieses Problem in den letzten Jahrzehnten zusätzlich verschärft. Medikamente zur systemischen Behandlung von Pilzerkrankungen haben aufgrund ihrer relativ hohen Toxizität oft unerwünschte Nebenwirkungen. Generell besteht ein Mangel an wirksamen und gut verträglichen Antimykotika für systemische Anwendung.

Archaeoglobus fulgidus:

Archaea sind in der Forschung von Interesse, da in ihnen manchmal Merkmale des früheren Lebens auf der Erde erhalten geblieben sind. Auch ihr außergewöhnlicher

Stoffwechsel ist von Interesse, zum Beispiel die Fähigkeit, bei bis zu 110 °C zu wachsen.

A. fulgidus ist ein mariner hyperthermophiler Sulfat-Reduzierer, der aus der Nähe hydrothermalen Quellen isoliert wurde und ein Wachstumsoptimum von 83 °C aufweist (Achenbach-Richter *et al.*, 1987; Stetter *et al.*, 1987; Stetter, 1988). Dieses strikt anaerobe Archaeon nutzt Sulfat oder Thiosulfat als terminalen Elektronenakzeptor und ist in der Lage auf einer Reihe verschiedener organischer Substrate, wie z. B. Laktat, verschiedenen Aminosäuren oder Glukose, zu wachsen (Stetter *et al.*, 1987). Als mariner Organismus ist *A. fulgidus* im Vergleich zu Organismen aus Frischwasserhabitaten permanent einer erhöhten Salinität ausgesetzt und daher leicht halophil (Stetter *et al.*, 1987). Da *A. fulgidus* sein Habitat in der Nähe hydrothermalen Quellen hat, ist er auch Schwankungen in Salzgehalt und Temperatur des umgebenden Mediums ausgesetzt und muss demzufolge in der Lage sein, sich solchen Veränderungen effektiv anzupassen.

Die Untersuchung der Enzyme der Riboflavinbiosynthese aus diesem Organismus ist von großem Interesse, da aufgrund der extremen Lebensbedingungen von *A. fulgidus* eine hohe Stabilität seiner Enzyme erwartet werden kann.

Escherichia coli:

E. coli ist ein säurebildendes, gramnegatives, stäbchenförmiges, peritrich begeißeltes Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae, das im tierischen Darm vorkommt. Es gehört zu den fakultativ anaeroben Mikroorganismen und besitzt die Fähigkeit, Energie sowohl durch Atmung als auch durch „Gemischte Säuregärung“ zu gewinnen. *E. coli* gehört zu den am besten untersuchten Organismen der Welt.

Die meisten bisherigen Erkenntnisse über GTP Cyclohydrolasen II wurden aus *E. coli* gewonnen (vgl. 1.4). Die Untersuchungen an der GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* in dieser Arbeit bauen vor allem auf der erst kürzlich durch Ren *et al.* erstmals gelösten Proteinstruktur dieses Enzyms auf (Ren *et al.*, 2005).

Oryza sativa:

Die Gattung *Oryza* (*Reis*) umfasst schätzungsweise 130.000 Sorten und wilde Arten. *Oryza* ist der wichtigste Vertreter der Gramineen-Unterfamilie Oryzoideae, gekennzeichnet durch einblütige Ährchen mit harter Deck- und Vorspelze, die das Korn bei der Reife einschließen und 6 Antheren in der zwittrigen Blüte. Die Gattung

kommt in den warmen Zonen aller Kontinente vor. Zur Kulturpflanze wurden *Oryza sativa* L in Südostasien und *Oryza glaberrima* in Westafrika. Beide Arten sind mehrjährig, werden jedoch meist nur für eine Ernte angebaut. *Oryza sativa* umfasst viele tausend Sorten, die sich herausbilden konnten, da Reis selbstbefruchtend ist und die Ernte jahrtausendlang von Hand durch Abschneiden jeder einzelnen Rispe erfolgte. Die beiden wichtigsten Artengruppen sind Indica und Japonica. Durch die Untersuchungen der Enzyme der Riboflavinbiosynthese von *Oryza sativa* sollen die Grundlagen für eine spätere Herstellung von Herbiziden geschaffen werden.

1.7 Aufgabenstellung

Vorrangiges Ziel dieser Arbeit war es, die Gene der beiden aus der Riboflavinbiosynthese stammenden Enzyme GTP Cyclohydrolase II und 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus verschiedenen Organismen zu klonieren, sie in *E. coli* in löslicher Form und ausreichender Menge zur Überexpression zu bringen und die so erzeugten Enzyme aus dem Zelllysat möglichst rein zu extrahieren. Die Enzyme und ihre Reaktionsmechanismen sollten dann mit biochemischen und spektroskopischen Methoden untersucht werden. Neben den eukaryontischen GTP Cyclohydrolasen II aus den Hefen *Candida albicans* und *Candida glabrata* sollten auch die bifunktionellen Enzyme mit je einer GTP Cyclohydrolase II- und einer 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase-Domäne aus dem hyperthermophilen Archaeobakterium *Archaeoglobus fulgidus* sowie aus der Nutzpflanze *Oryza sativa* untersucht werden. Des Weiteren sollten durch eine Mutagenesestudie an der GTP Cyclohydrolase II aus *Escherichia coli* die durch die erst kürzlich erfolgte Strukturaufklärung gefundenen Bindestellen des Substrates sowie die möglicherweise an der Katalyse beteiligten Aminosäuren biochemisch charakterisiert und ihre Relevanz für die enzymatische Aktivität der GTP Cyclohydrolase II untersucht werden.

Letztendliches Ziel dieser Grundlagenforschung soll es sein, die gewonnenen Erkenntnisse für die Entwicklung neuer Inhibitoren nutzbar zu machen, da die Enzyme der Riboflavinbiosynthese attraktive Ziele für die Entwicklung neuer Antiinfektiva oder Herbizide darstellen.

2 Material

2.1 Geräte

Agarosegelapparatur:

Elektrophoresekammer Appligene 210 (Appligene, Heidelberg)

Atomabsorptionsspektrometer:

Varian SpectrAA-100 flame atomic absorption spectrometer (Varian, Zug, Schweiz)

Brutschrank:

B5060 EK-CO (Heraeus, Hanau)

Dialyse-Mikrokammern:

QuixSep Micro Dialyzer (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe)

EDMAN-Sequenzer:

471A Protein Sequencer (Perkin-Elmer, Foster City, CA, U.S.A.)

Elektroporator:

Gene Pulse mit Pulse Controller (Biorad, München)

Fluorimeter:

HSI TKO 100 (Hofer, San Francisco, U.S.A.)

Gefrierschrank:

-80 °C - Biofreezer; U570 Premium, Ultra Low Temperature Freezer, (New Brunswick, N.Y., USA)

Gefriertrockner:

Alpha 1-4 (Christ, Osterode/Harz)

Hochdrucksterilisator:

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

HPLC:

Automatischer Probengeber: MIDAS (Spark Instruments, Holland)

Pumpe: WellChrom HPLC Pump K-1001 (Knauer, Berlin)

WellChrom Solvent Organizer K-1500 (Knauer, Berlin)

Säule: Nucleosil 100 (C18) 5u 250 mm x 4,6 mm (Alltech, Nicholasville, KY, USA)

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)

NMR-Spektrometer:

Bruker DRX 500 (Bruker, Karlsruhe)

PCR-Maschinen:

Biometra Tgradient (Whatman, Maidstone, Kent, UK)

Biometra T3 Thermocycler (Whatman, Maidstone, Kent, UK)

pH-Meter:

inoLab pH 720 mit SenTix81 pH-Einstabelektrode (WTW GmbH, Weilheim)

Photodokumentation:

UV-Leuchttisch (302 nm) UVIS 131100 mit Kamera RA1 (Desaga, Heidelberg), Video Copy Processor P68E (Mitsubishi, Ratingen)

Photometer:

UV-VIS-Spektralphotometer Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit Quarzküvetten (Helma, Mühlheim, Baden) sowie:

Novaspec II 2000 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit ½ Mikro-Plastikküvetten (ratiolab)

Proteinreinigung:

FPLC: LKB-GP10 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), sowie:

GradiFrac-Fraktionssammler und Steuereinheit, Monitor UV-optische Einheit, Monitor UV-1 Kontrolleinheit, Schlauchpumpe P-1, Mixer 0.6 ml, Gradientenventil PSV-50, Zweikanalschreiber REC 102 sowie:

ÄKTAexplorer mit Unicorn Software 3.1 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

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 GmbH, 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)

Vakuumpumpe:

MZ 2C (VAKUUBRAND GmbH & Co / Wertheim)

Waage:

Analysenfeinwaage 1602 MP (Sartorius, Göttingen)

Wasserbad:

D1 (Haake, Karlsruhe)

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 100bp Marker (Peqlab, Erlangen)
- DNA-Reinigungskits E.Z.N.A. Cycle-Pure und E.Z.N.A. Gel-Extraction (PEQLAB Biotech, Erlangen)
- dNTPs (Peqlab, Erlangen)
- Plasmidisolierungskit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
- Nickel-NTA Spin column-Kit (Qiagen, Hilden)
- illustra NAP-25-Säulchen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion als Substrat für die Herstellung von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (siehe 3.4.3.2) wurde freundlicherweise von Prof. M. Cushman (Purdue University, West Lafayette, USA) zur Verfügung gestellt.

2.3 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden zur Vermehrung von Plasmid-DNA, zur Expression rekombinanter Proteine sowie für Prototrophierungs-experimente eingesetzt:

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Literatur
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1 lac[F', proAB, lacI^fZΔM15, Tn10(tet^r)]</i>	(Bullock et al., 1987)
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	<i>lac, ara, gal, mtl, recA⁺, uvr⁺, [pREP4: lacI, kan^r]</i>	(Zamenhof & Villarejo, 1972)
<i>E. coli</i> Rib 7	<i>Thi, leu, pro, lac, ara, xyl, endA, recA, hsd r⁻, m⁻, pheS, supE44, ribA</i>	(Richter et al., 1993)
<i>E. coli</i> Rib 5	<i>Thi, leu, pro, lac, ara, xyl, endA, recA, hsd r⁻, m⁻, pheS, supE44, ribB</i>	(Richter et al., 1992)
<i>E. coli</i> BL21(DE)	<i>F⁻, ompT, hsdSB, (rB⁻, mB⁻), gal, dcm (DE3)</i>	Novagen (Bad Soden)
<i>E. coli</i> ER2925	<i>ara-14, leuB6, fhuA31, lacY1, tsx78, glnV44, galK2, galT22, mcrA, dcm-6, hisG4, rfbD1, R(zgb210::Tn10)TetS, endA1, rpsL136, dam13::Tn9 xylA-5, mtl-1, thi-1, mcrB1, hsdR2</i>	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>E. coli</i> ER2566	<i>F, λ, fhuA2, [lon]ompT, lacZ::T7, gebel gal, sulA11, Δ(mcrC-mrr.) 114::IS10, R(mcr-73::miniTn10)2, R(zgb-210::Tn10), 1 (Tet^S), endA1, [dcm]</i>	Invitrogen (Karlsruhe)

2.4 Plasmide

2.4.1 pNCO113

Als Standard-Expressionsvektor für *E. coli* wurde das Plasmid pNCO113 (Stüber et al., 1990) eingesetzt. Es liegt in der Zelle in mittlerer Kopienzahl vor und besitzt neben den Standardstrukturelementen wie Replikationsursprung (ori), T5-Promotor, ribosomaler Bindungsstelle, Polylinker, Transkriptionsterminatoren und β -Lactamasegen 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 (Tabelle 2.1) eingesetzt, der über zusätzliche Kopien des lacI-Gens verfügt und so die Zelle zur konstitutiven Expression des lac-Repressors befähigt. Somit ist es möglich, die Zellen zunächst ohne hohe Expressionsraten, die in den meisten Fällen den Zellmetabolismus negativ beeinflussen, anzuziehen und die Expression erst bei der gewünschten Zelldichte (hier $OD_{600} = 0,6$) durch Zugabe von IPTG zu induzieren.

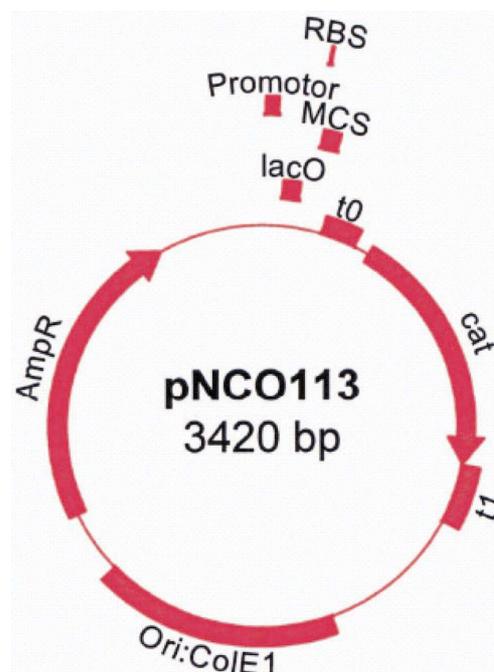


Abbildung 2.1: Expressionsplasmid pNCO113: lacO: lacOperator; RBS: Ribosomale Bindungsstelle; MCS: Multiple Cloning Site; t0 und t1: Terminatorsequenzen; (cat): nicht aktives Gen der Chloramphenikoltransferase (Leserahmenverschiebung); Amp^R: Ampicillin-Resistenzgen; Ori:ColE1: Replikationsursprung.

2.4.2 pNCO-SB-HIS₆-ACYC184

Bei dem Plasmid pNCO-SB-HIS₆-ACYC184 handelt es sich um ein pNCO113-Konstrukt, bei dem zwischen der ribosomalen Bindungsstelle und der Multiple Cloning Site (genauer der *Nco*I-Schnittstelle) künstlich eine für 6 Histidine kodierende Sequenz (His₆-Tag) eingefügt wurde (Rohdich *et al.*, 2000). Wird eine Gensequenz in dieses Konstrukt kloniert, so wird das codierte Protein mit einem N-terminalen His₆-Tag exprimiert.

pNCO113:

```

      100           110           120
      |           |           |
AAA GAG GAG AAA TTA ACC ATG GGA GGA
                        |   |   |
                        M   G   G
      RBS                MCS-----

```

His₆-pNCO113:

```

      100           110           120           130           140           150
      |           |           |           |           |           |
AAA GAG GAG AAA TTA ACC ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC GCG TCC ATG GGA GGA
                        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
                        M   H   H   H   H   H   H   H   A   S   M   G   G
      RBS                MCS-----

```

Abbildung 2.2: Veränderte Gensequenz in pNCO-SB-HIS₆-ACYC184: RBS: Ribosomale Bindungsstelle; MCS: Beginn der Multiple Cloning Site.

2.4.3 pT77

Bei dem Plasmid pT77 (Tabor & Richardson, 1985) handelt es sich um ein Überexpressionsplasmid mit Ampicillin-Resistenz. In diesem Expressionssystem gewährleistet der virale, aus dem Bakteriophagen T7 stammende Promotor Φ 10 eine hohe Transkriptionseffizienz; eine effiziente Translation wird durch eine Ribosomale Bindungsstelle vor dem Startcodon erreicht. Darüber hinaus ist die Transkription nicht von einer bakteriellen, sondern von der viralen T7-Polymerase abhängig, deren Gen ins Genom der *E. coli* BL21 (DE) Zellen integriert und durch einen lac-Operator kontrolliert ist. So lässt sich die Expression des hinter dem

T7-Promotor einklonierten Gens in diesem Stamm durch Zugabe von IPTG zu einem gewünschten Zeitpunkt induzieren.

2.4.4 pET-5a

Das pET-System („*plasmid for Expression by T7 RNA Polymerase*“) wurde für die effiziente Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* entwickelt. 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 von *E. coli* BL21 (DE) Zellen integriert (Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme) und beinhaltet das *lacI*-Gen und die T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors. In Anwesenheit des *lacI*-Repressors wird die Transkription der T7 RNA-Polymerase unterdrückt. Durch Zugabe von IPTG kann sie gezielt induziert werden. Die Vektoren der pET-Serie ermöglichen die Klonierung eines Gens hinter den spezifischen $\Phi 10$ -Promotor des Bakteriophagen T7. Dieser wird von T7 RNA-Polymerase, nicht jedoch von der *E. coli*-RNA-Polymerase erkannt. Zur Produktion rekombinanten Proteins wird ein pET-Plasmid mit dem entsprechenden Insert in einen DE3-lysogenen Wirtstamm 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 $\Phi 10$ -Promotors transkribieren. Die pET-Vektoren 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.

Beim Vektor pET-5a (Novagen, Bad Soden) handelt es sich um einen Vektor der pET-Reihe mit N-terminaler T7-Tag-Sequenz, einer *Bam*HI / *Eco*RI cloning site und Ampicillinresistenz.

2.5 Proteine und Nukleinsäuren

- BSA (New England Biolabs, Schwalbach)
- DyNAzyme EXT DNA-Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland)
- Oligonukleotide (Thermo Electron GmbH, Ulm)
- Phosphoriboisomerase (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Schwalbach)
- T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach)
- Taq-Polymerase (Eurogentec, Seraign, Belgien)
- HMW Gel Filtration Calibration Kit (Pharmacia, Freiburg)

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
H₂O ad 1l
Für Platten: Agar 20 g

LB-Rib400-Medium: Pepton 10 g
Hefe-Extrakt 5 g
NaCl 5 g
Riboflavin 400 mg
H₂O ad 1l
Für Platten: Agar 20 g

Eingesetzte Antibiotika:

Antibiotika wurden je nach Bakterienstamm (siehe 2.3) 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

2.7 Trennmaterialien

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

Fertig bezogene Säulen:

- HiLoad Superdex 200pg 26/60 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- HiLoad Superdex 75pg 26/60 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Nickel-NTA Spin column-Kit (Qiagen, Hilden)

2.8 Puffer

Alle Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt, enthielten 0,02 % Natriumazid und wurden vor Gebrauch mittels Vakuumpumpe entgast. Der pH-Wert wurde bei Raumtemperatur mit einer Standardglaselektrode eingestellt. Puffer für Gelfiltrationen wurden vor dem Entgasen sterilfiltriert.

Die detaillierten Pufferzusammensetzungen sind in den betreffenden Kapiteln aufgeführt.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerasekettenreaktion

Durch die Polymerasekettenreaktion (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. Dazu wird die doppelsträngige DNA zunächst thermisch bei 95 °C denaturiert. An die nun einzelsträngig und linear vorliegende DNA lagern sich die Primer an die Stelle des DNA-Stranges bzw. Gegenstranges an, die ihrer eigenen Sequenz komplementär ist. Dies wird als „Primer-Annealing“ bezeichnet und erfolgt in Abhängigkeit von der Sequenz und Länge des Primers bei einer Temperatur von 45–65 °C innerhalb von 30 s. DNA-Polymerasen wie z. B. *Taq*, *Pwo* und Deep Vent sind nun in der Lage, die einsträngige Sequenz zwischen den Primern unter dNTP-Verbrauch zu doppelsträngiger DNA zu vervollständigen. Die optimale Arbeitstemperatur der hier verwendeten DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) liegt bei 72 °C. Die Dauer des Polymerisationsschrittes richtet sich nach der Länge des Amplifikates; wobei in 1 Minute etwa 1000 Nukleotide angehängt werden. Durch mehrmaliges Durchlaufen dieses PCR-Zyklus wird das genetische Material auf das 10⁶- bis 10⁷-fache der Ausgangskonzentration angereichert. Als abschließender Schritt wird noch ein 3–5-minütiger Elongationsschritt durchgeführt, um alle noch nicht abgeschlossenen Fragmente vollständig zu verlängern.

Ein Standard-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

10 µl Pufferkonzentrat (10x)
 8 µl dNTP`s (je 200 µM)
 1 µl Primer 1 (100 pmol)
 1 µl Primer 2 (100 pmol)
 1 µl Matrize (10ng)
 1 µl thermostabile DNA-Polymerase
 78 µl Wasser

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

Pufferkonzentrat (10x): 750 mM Tris/HCl, pH 9,0
 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 0,1 % (w/v) Tween 20
 15 mM MgCl_2

Die Polymerasekettenreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

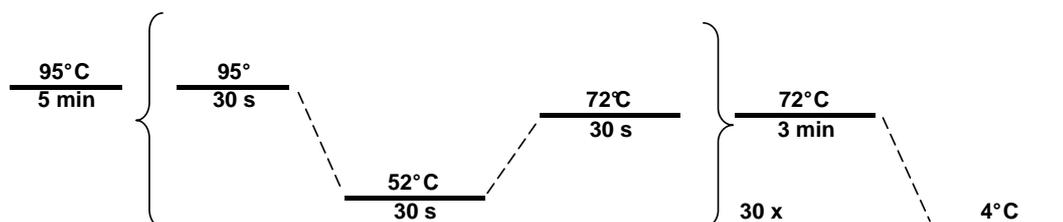


Abbildung 3.1: Temperaturführung bei einer Standard PCR

3.1.2 Gen-Vollsynthese

Um ein künstliches Genfragment aus Primern zu synthetisieren, wurde in einem Initiationsschritt eine synthetische Doppelstrang-DNA aus zwei sich an den 5'-

Enden überlappenden Primern in einem PCR-Ansatz ohne zusätzliche Matrizen-DNA erzeugt. Dieses Fragment wurde dann beidseitig in aufeinander folgenden PCR-Amplifikationen durch weitere Primerpaare, die jeweils 5'-Überhänge aufwiesen und deren 3'-Enden jeweils komplementär zu den 3'-Enden der aufgeschmolzenen DNA-Einzelstränge aus dem vorangegangenen Reaktionsschritt waren, verlängert, bis das gewünschte Gen aufgebaut war. Alle Amplifikationen wurden mit EXT-Polymerase und 20 Zyklen durchgeführt. Nur für die letzte PCR wurde Taq-Polymerase bei einer Zyklenanzahl von 25 eingesetzt.

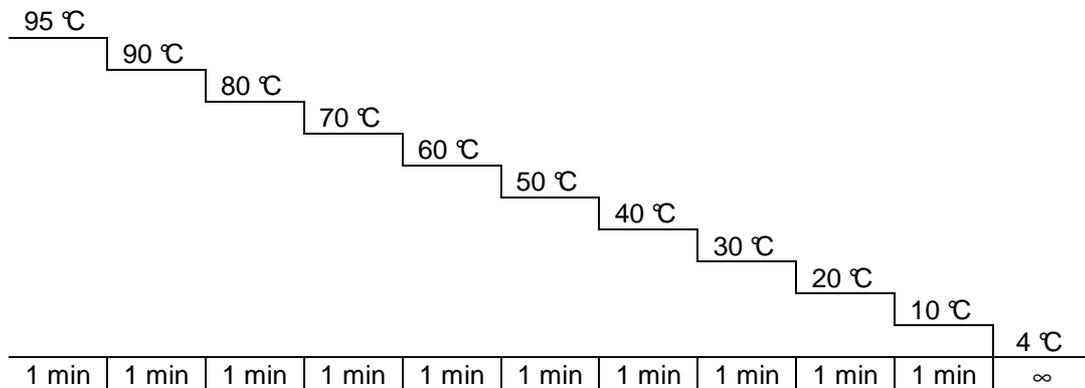
Die jeweils resultierenden Amplifikate wurden mittels Gelextraktion (siehe 3.1.5) gereinigt und mit 20 µl Wasser eluiert. Hiervon wurde 1 µl als Matrize für die folgende PCR eingesetzt. Das Reaktionsgemisch des letzten Amplifikationsschrittes wurde ohne Gelextraktion direkt mit einem E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (PEQLAB Biotech, Erlangen) aufgereinigt, mit 87 µl Wasser eluiert und nach Restriktionsverdau (siehe 3.1.4) in ein Plasmid ligiert (siehe 3.1.6).

3.1.3 Oligo-Annealing

Um doppelsträngige DNA-Fragmente mit Einzelstrangüberhängen zu generieren, die mit einem linearisierten Plasmid mit komplementären Überhängen ligiert werden können, wurden alternativ zu einer Gensynthese mit anschließendem Restriktionsverdau (siehe 3.1.2) in manchen Fällen entsprechende Oligonukleotide hybridisiert. Diese wurden dabei so entworfen, dass sie nach dem Annealing eine doppelsträngige DNA bilden, die dem gewünschten Gen nach Restriktion entspricht. Ein Standard-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

10 µl PCR- Pufferkonzentrat (10x) (vgl. 3.1.1)
1 µl Primer 1 (100 pmol)
1 µl Primer 2 (100 pmol)
82 µl H₂O

Das Annealing wurde wie folgt durchgeführt:

Tabelle 3.1: Temperaturführung beim Oligo-Annealing

3.1.4 Restriktionsverdau

Die Restriktion präparativer DNA-Mengen (20–50 µg) wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. Dazu wurden der DNA-Lösung ca. 10 units der entsprechenden Restriktionsendonuklease pro µg DNA und 10 µl eines enzymespezifischen Reaktionspuffers (10-fach Konzentrat, New England Biolabs, Schwalbach) zugegeben. Das fehlende Volumen wurde mit sterilem Wasser ergänzt. Je nach Enzym wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich BSA in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 3 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur.

Wurden für einen Doppelverdau zwei Enzyme benutzt, für deren optimale Reaktionsbedingungen unterschiedliche Puffer benötigt wurden, so wurde die DNA sequentiell verdaut, d.h., nach Inkubation mit dem ersten Restriktionsenzym wurde die DNA mittels E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (PEQLAB Biotech, Erlangen) aufgereinigt (siehe 3.1.5.1), mit 87 µl sterilem Wasser eluiert und dann unter den passenden Pufferbedingungen für den zweiten Verdau eingesetzt. Die fertig verdaute DNA wurde dann nach Aufreinigung mittels Gelextraktion (siehe 3.1.5.2) zur Ligation (siehe 3.1.6) eingesetzt.

Zur Identifizierung von PCR-Produkten, denen im Zuge einer Klonierung neue Restriktionsschnittstellen eingefügt wurden, wurden diese im analytischen Maßstab enzymatisch verdaut und die Entstehung der spezifischen DNA-Fragmente per Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Für einen analytischen Restriktions-

verdau wurden 8 μl Standard-PCR-Ansatz (siehe 3.1.1), 1 μl des entsprechenden Restriktionsenzym und 1 μl des enzymespezifischen Puffers mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 20 μl aufgefüllt und 1 h bei der optimalen Reaktionstemperatur des jeweiligen Enzyms inkubiert.

3.1.5 Reinigung von DNA Fragmenten

3.1.5.1 Direkte Reinigung

Die direkte Reinigung von PCR-Fragmenten, bzw. von Plasmid-DNA nach Restriktionsverdau erfolgte unter Verwendung des E.Z.N.A. Cycle-Pure Kits (PEQLAB Biotech, Erlangen). Dazu wurde die DNA-Lösung mit dem 5-fachen Volumen eines Bindepuffers (hier CP-Puffer) gemischt und durch ein HiBind-DNA-Säulchen zentrifugiert, in der die DNA reversibel an die Silikamembran bindet. Nach einem Waschschrift mit 750 μl DNA-Waschpuffer, der Salze, freie Nukleotide und Proteine von der Membran entfernt, und einem Trocknungsschritt (10 min bei 13000 U/min zentrifugieren), wurde die DNA je nach weiterem Vorgehen mit 20–87 μl sterilem Wasser eluiert.

Das E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit bestand aus CP-Puffer, HiBind-DNA-Säulchen und DNA-Waschpuffer, welcher vor Benutzung mit 1,5 ml Ethanol pro ml komplettiert wurde.

3.1.5.2 Reinigung aus Agarosegelen

Zur Reinigung eines bestimmten DNA-Fragmentes aus einem Gemisch wurde die Probe mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 3.2.1) aufgetrennt. Nach Färben des Gels mit Ethidiumbromid wurde die gewünschte Bande auf einem UV-Leuchttisch ($\lambda = 302 \text{ nm}$) ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des Gel Extraction Kits (PEQLAB Biotech, Erlangen) extrahiert. Dazu wurde die ausgeschnittene Bande mit 1,5 ml des Bindepuffers versetzt und im Wasserbad bei 55 $^{\circ}\text{C}$ aufgelöst. Nach Abkühlen wurde die DNA durch Zentrifugation der Lösung durch ein HiBind-DNA-Säulchen gebunden und nach einem Waschschrift mit 750 μl DNA-Waschpuffer, sowie einem Trocknungsschritt (10 min bei 13000 U/min zentrifugieren), je nach weiterem Vorgehen mit 20–87 μl sterilem Wasser eluiert.

Das E.Z.N.A. Gel Extraction Kit bestand aus Bindepuffer, HiBind-DNA-Säulchen und DNA-Waschpuffer, welcher vor Benutzung mit 1,5 ml Ethanol pro ml komplettiert wurde.

3.1.6 Ligation von DNA

Die enzymatische Verknüpfung des Inserts mit dem Expressionsvektor durch Bildung von Phosphorsäurediesterbrücken zwischen 3'-Hydroxylgruppen und 5'-Phosphatgruppen erfolgte mit Hilfe der T4-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach). Dazu wurde der verdaut Vektor mit der zwei- bis fünffachen Menge an verdautem Insert in einem mit sterilem Wasser aufgefüllten Gesamtvolumen von 17 µl vermischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 55 °C und fünfminütigem Abkühlen auf Eis, wurde der Ansatz mit 2 µl T4-Puffer (10-fach Konzentrat; New England Biolabs, Schwalbach) und 1 µl T4-Ligase komplettiert und für mindestens 12 h bei 4 °C inkubiert.

T4-Puffer (10 x): 500 mM Tris/HCl, pH 7,6
 100 mM MgCl₂
 10 mM ATP
 10 mM DTT
 50 % (w:v) Polyethylenglycol-8000

3.1.7 Herstellung kompetenter Zellen

3.1.7.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983). Dazu wurden unter sterilen Bedingungen 200 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (siehe 2.6) sowie 5 mM MgCl₂ versetzt und mit 2 ml einer bei 37 °C gewachsenen Vorkultur angeimpft. Bei 37 °C wurde die Kultur im Schüttelinkubator (200 U/min) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bebrütet. Um

das Zellwachstum zu stoppen, wurde 15 min auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (2300 U/min, 15 min, 4 °C). Der Rückstand wurde in 100 ml eiskaltem RF1-Puffer resuspendiert. Nach weiteren 15 min Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert (2300 U/min, 15 min, 4 °C), das Pellet vorsichtig in 10 ml eiskaltem RF2-Puffer suspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die chemisch kompetenten Zellen wurden in Kryo-Gefäßen zu 800 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

RF1-Puffer: 100 mM KCl
 50 mM MnCl₂
 30 mM K-Acetat
 10 mM CaCl₂
 15 % (w/v) Glycerin
 pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert

RF2-Puffer: 10 mM MOPS
 10 mM KCl
 75 mM CaCl₂
 15 % (w/v) Glycerin
 pH 6,3 mit Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert

3.1.7.2 Herstellung elektrisch kompetenter Zellen

Die Herstellung elektrisch kompetenter Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Dower (Dower et al., 1988) in leicht modifizierter Form. Dazu wurden 400 ml LB-Medium (Antibiotika nach 2.6) mit 4 ml Vorkultur angeimpft. Sobald die Kultur im Schüttelinkubator bei 37 °C eine OD₆₀₀ von 0,5-0,7 erreicht hatte, wurde sie 15 min auf Eis gekühlt und danach abzentrifugiert (4000 U/min; 15 min; 4 °C). Der Rückstand wurde in 500 ml eiskalter, steriler, 10%iger wässriger Glycerinlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (4000 U/min; 15 min; 4 °C). Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt, wobei erst 250 ml, dann 10 ml der Glycerinlösung eingesetzt wurden. Der Überstand wurde nach jedem Schritt verworfen. Das Pellet wurde in einem endgültigen Volumen von 1 ml der Glycerinlösung resuspendiert, in Kryo-Gefäßen zu 400 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.1.8 Transformation von Plasmid-DNA

3.1.8.1 Transformation in chemisch kompetente Zellen

Die Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli* Zellen erfolgte durch die Methode nach Hanahan (Hanahan, 1983). Dazu wurden unter sterilen Bedingungen entweder die gesamten 20 µl eines Ligationsansatzes (siehe 3.1.6) oder 1 µl isoliertes Plasmid (siehe 3.1.10) mit 200 µl chemisch kompetenten Zellen (siehe 3.1.7.1) vermischt und zur Anlagerung der DNA an die Zellwände 60 min auf Eis inkubiert. Um die Zellwände für den Vektor durchlässig zu machen, wurde der Ansatz für 90 s im Wasserbad bei 42 °C erwärmt. Zur Regeneration der Zellen wurde danach 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium (siehe 2.6) erfolgte die phänotypische Expression für 60 min bei 37 °C im Schüttelinkubator. Die Selektion der Transformanten erfolgte über die jeweils auf dem transformierten Plasmid enthaltenen Antibiotikaresistenzgene. Dazu wurden je 20 µl bzw. 200 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten (siehe 2.6), die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

3.1.8.2 Transformation in elektrisch kompetente Zellen

40 µl elektrisch kompetente Zellen (siehe 3.1.7.2) wurden auf Eis aufgetaut, unter sterilen Bedingungen in ein vorgekühltes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit ca. 10 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von 1 µl versetzt. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,2 cm) überführt und diese in der Elektroporationskammer einem Puls mit den unten aufgeführten Parametern ausgesetzt. Danach wurden die Zellen sofort mit 1 ml LB-Medium (siehe 2.6) versetzt und zur phänotypischen Expression 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator bebrütet. Je 20 µl und 200 µl wurden analog zu 3.1.8.1 auf Selektivagar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Einstellungen der Elektroporationsapparatur:

Kapazität: 25 µF
Widerstand: 200 Ω
Spannung: 2,5 kV

3.1.9 PCR-Screening

Um nach einer Transformation die Transformanden, welche Plasmide mit dem gewünschten Insert aufgenommen haben, von denen zu unterscheiden, die leere oder beschädigte Vektoren aufgenommen haben, wurden über Nacht angewachsenen Transformationskolonien (siehe 3.1.8) jeweils mit einem sterilen Zahnstocher angepickt und das aufgenommene Zellmaterial in 30 µl Standard-PCR-Ansatz (siehe 3.1.1) ohne Matrize resuspendiert. Die PCR wurde dann unter Standardbedingungen durchgeführt und das Ergebnis auf einem Agarosegel aufgetrennt und sichtbar gemacht. Die verwendeten Primer waren bei Standard Klonierungen in pNCO113 BSEcoRI (vorwärts) und mRNA5 (rückwärts) (siehe Primertabelle 6.1), welche vor und nach der MCS des Plasmids binden. Dabei werden 217 Basenpaare des Plasmids mit erfasst, welche auf dem Agarosegel ein negatives Ergebnis anzeigen. Bei einem positiven Klon ist die DNA-Bande um diese 217 Basenpaare größer als das einligierte Fragment. Durch mehrmaliges Anstechen zuvor markierter Segmente auf einer frischen Agarplatte mit den verwendeten Zahnstochern wurden Subkulturen der analysierten Klone angelegt. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die nten dann zum Animpfen von Flüssigkulturen der positiven Klone.

3.1.10 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Dazu wurden 5 ml der plasmidhaltigen Vorkultur (siehe 3.1.12) abzentrifugiert (10 min; 3000 U/min; 4 °C) und das Zellpellet mit Hilfe von SDS und Natronlauge (Puffer P1 und P2) alkalisch lysiert. Die Lyse wurde durch Neutralisation der Lösung mit Puffer N3 gestoppt, bevor chromosomale DNA mit freigesetzt wurde. Nach Abzentrifugieren der unlöslichen Rückstände (10 min; 13000 U/min; 4 °C) wurde der Überstand auf eine QIAprep Spin Kartusche (Silikamembran) geladen und die gebundene Plasmid-DNA durch einen Waschschrift mit PE-Puffer von Kontaminationen befreit. Nach einem Trocknungsschritt (10 min bei 13000 U/min zentrifugieren) wurde die Plasmid-DNA

mit 60 µl sterilem Wasser eluiert. Ausbeute und Qualität wurden auf 1 %igen Agarosegelen (siehe 3.2.1) kontrolliert.

Das QIAprep Spin Miniprep Kit bestand aus den Puffern P1, P2, N3 und PE und QIAprep Spin Kartuschen. Puffer P1 wurde durch Zugabe von 100 µg RNase pro ml Puffer, Puffer PE durch Zugabe von 1,5 ml Ethanol pro ml Puffer komplettiert.

3.1.11 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte fluorimetrisch unter Verwendung des Farbstoffes Bisbenzimid bei einer Anregung von 365 nm und einer Emission von 458 nm. Das Fluorimeter wurde vor jeder Bestimmung geeicht. Dazu wurden nach Einstellen des Nullwertes mit frischer Farbstofflösung (1x-TNE-Puffer, 0,1 µg/ml Bisbenzimid) 2 µl einer Lösung mit bekannter DNA-Konzentration in 2 ml Farbstofflösung gemessen und die Konzentration am Fluorimeter eingestellt. Zur Konzentrationsbestimmung der unbekanntes DNA-Lösung wurden davon 2 µl in 2 ml Farbstofflösung vermessen. Das Ergebnis konnte dann direkt in µg/µl abgelesen werden.

TNE-Puffer (10x): 100 mM Tris/HCl, pH 7,4
 10 mM EDTA
 1 M NaCl

3.1.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) gemäß der Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Dafür wurden pro Ansatz 20 µl isoliertes Plasmid (siehe 3.1.10) und 10 µl eines 1:10 verdünnten Primers (Endkonzentration 10 pmol/µl) benötigt. Die Primer wurden so gewählt, dass das zu sequenzierende Fragment vollständig erfasst wurde. Da sich eine Sequenzierungsreaktion über ca. 700 bp erstreckt, waren für längere Fragmente zwei

Primer notwendig. Für eine Standard Sequenzierung in pNCO113 wurden die Primer pNCO-XH-Seq und mRNA5 (siehe Primertabelle 6.1) eingesetzt, die jeweils vor und nach der MCS des Plasmids binden.

3.1.13 Zellanzucht und Ernte

Die Fermentation aller *E. coli*-Stämme erfolgte in sterilen Schüttelkolben unter Verwendung von LB-Medium (siehe 2.6). Je nach Stamm wurden die entsprechenden Antibiotika in der jeweiligen Konzentration (siehe 2.6) eingesetzt. Vorkulturen wurden entweder direkt von der Agarplatte oder aus einer Dauerkultur (siehe 3.1.14) in 25 ml Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C in sterilen 100 ml-Erlenmeyerkolben geschüttelt. Die Hauptkulturen (500-800 ml) wurden in 2 l-Erlenmeyerkolben 1:100 aus der Vorkultur inokuliert. Bei induktionsabhängigen Kulturen, die ein durch ein Lac-Operon gesteuertes Expressionssystem besitzen (M15, pET- oder pT77-Wirtsstämme), wurde die Hauptkultur bis zum Erreichen einer $OD_{600nm} = 0,6$ bei 37 °C und 140 rpm geschüttelt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte photometrisch in einer Plastikkuvette ($d = 1$ cm) gegen Wasser. Die Induktion erfolgte mit steriler IPTG-Lösung in einer Endkonzentration von 1 mM. Je nach Bakterienstamm und Expressionskonstrukt wurde die Proteinexpressionsphase dann 4-18 h bei Temperaturen von 18-37 °C unter Schütteln fortgeführt. Die Fermentation von XL1-Stämmen erfolgte ohne Induktion bei 37 °C über Nacht, da der Lac-Repressor-Spiegel in diesem Stamm nicht hoch genug ist, um eine Lac-Operon gesteuerte Proteinexpression merklich zu unterdrücken.

Testexpressionskulturen wurden in einem Volumen von 25-50 ml Medium unter ansonsten identischen Bedingungen durchgeführt.

Nach der Fermentation wurden die Zellen mittels Zentrifugation (4000 U/min, 15 min, 4 °C) pelletiert, mit 0,9 %iger Saline (0,9 % NaCl-Lsg.) gewaschen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.14 Stammhaltung

Für kurzzeitige Lagerung (1-2 Wochen) wurden die Bakterienkulturen auf Agarplatten bei 4°C gelagert. Zur Langzeitlagerung wurde von jedem Bakterienklon eine Dauerkultur hergestellt. Dazu wurden 10 ml der Vorkultur (siehe 3.1.12) unter sterilen Bedingungen zentrifugiert (10 min; 3000 U/min; 4 °C), das Pellet mit 800 µl LB-Medium (siehe 2.6) mit 50 % Glycerin resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

3.1.15 *In vivo*-Assays

Die von Richter erzeugte *E. coli*-Mutante *Rib7* (Richter et al., 1993) hat einen Defekt im Gen für die GTP Cyclohydrolase II. Da dadurch der erste Schritt der Biosynthese von Riboflavin inhibiert wird, ist dieser Stamm riboflavinauxotroph, d.h. die *E. coli*-Mutante *Rib7* wächst nicht ohne externe Zufuhr von Riboflavin über das Medium. Durch Transformation eines Plasmids, das ein funktionstüchtiges Gen einer GTP Cyclohydrolase II enthält, lässt sich dieser Stamm jedoch prototrophieren.

Diese Methode wurde als *in vivo*-Assay verschiedener GTP Cyclohydrolasen II angewandt. Dazu wurde das Plasmid mit dem jeweils zu testenden Gen in chemisch kompetente *E. coli Rib7*-Zellen transformiert und diese auf LB-Platten mit und ohne Riboflavin ausplattiert. Parallel wurden noch eine Positivkontrolle mit einem bekanntermaßen funktionstüchtigen Gen und eine Negativkontrolle mit einem leeren Plasmid transformiert und ebenfalls auf LB-Platten mit und ohne Riboflavin ausplattiert. Ein positiver *in vivo*-Assay wurde durch prototrophierte *E. coli Rib7*-Transformanden angezeigt, die sowohl auf LB-Platten mit, als auch auf solchen ohne zusätzliches Riboflavin Kolonien bildeten.

Analog wurden *in vivo*-Assays für 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen in der *E. coli*-Mutante *Rib5* (Richter et al., 1992) durchgeführt.

3.2 Gelelektrophorese

3.2.1 Agarosegelelektrophorese

Die Trennung und Analyse von DNA unterschiedlicher Größe erfolgte per Agarosegelelektrophorese. Dafür wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1-3 % hergestellt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 60 °C in einen Gelträger gegossen. Die erst arrte Gelmatrix wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein DNA-Leiter-Mix (Peqlab, Erlangen) mit Fragmenten von 100-10.000 bp verwendet.

Die Proben (1:10 mit Probenpuffer versetzt) wurden in die Taschen pipettiert und die Elektrophorese bei 150 V durchgeführt. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel 10 min unter Lichtausschluss in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml Wasser) angefärbt, mit Wasser gewaschen und unter UV-Licht (323 nm) dokumentiert. Zur präparativen Isolierung von DNA wurden die entsprechenden Banden nach der Dokumentation mit einem Skalpell auf dem UV-Leuchttisch ausgeschnitten und anschließend aufgereinigt (siehe 3.1.5.2).

TAE-Puffer (50x):

2,0 M Tris/Acetat pH 8,2
0,1 M EDTA

Probenpuffer für Agarosegelelektrophorese:

50 % (v/v) Glycerin
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylenblau
in TAE-Puffer gelöst

3.2.2 SDS-Gelelektrophorese

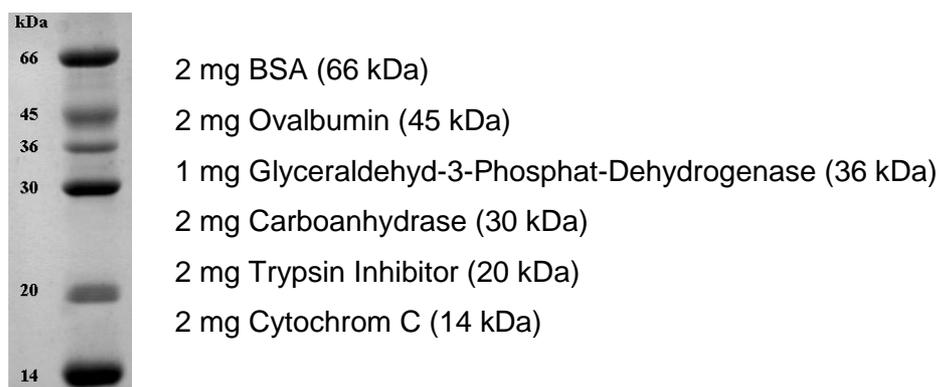
Zur Trennung und Analyse von Proteinen unterschiedlicher Größe wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dazu wurden Gele mit 3,2 % Acrylamid im Sammelgel und 10-16 % Acrylamid im Trenngel angefertigt.

Trenngel (10 - 16 %): 2,5 - 4 ml 40 %ige Acrylamidlösung
2,5 ml Trenngelpuffer
3,5 - 5 ml H₂O_{bidest.}
50 µl 10 %ige APS-Lösung
10 µl TEMED (99 % für die Elektrophorese)

Sammelgel (3,2 %): 0,4 ml 40 %ige Acrylamidlösung
2,5 ml Sammelgelpuffer
2,1 ml H₂O_{bidest.}
50 µl 10 %ige APS-Lösung
5 µl TEMED (99 % für die Elektrophorese)

Je nach Proteinkonzentration wurden 5-50 µl Probe mit 50 µl Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95 °C denaturiert und davon 10 µl in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 35 mA pro SDS-Gel durchgeführt. Zur Detektion der Proteinbanden wurde das Gel 10 min in Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung des Gelhintergrundes erfolgte durch mehrstündiges Waschen in Entfärbelösung, die mehrmals gewechselt wurde.

Als Molekulargewichtsstandard wurde eine Lösung aus folgenden Proteinen (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in 6 ml Probenpuffer hergestellt:



Sammelgelpuffer: 0,25 M Tris/HCl, pH 6,8
0,2 % SDS

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,3
0,4 % SDS

Acrylamidlösung (40 %):
40 % (w/v) Acrylamid
3% (w/v) N,N`-Methylenbisacrylamid

APS-Lösung: 10 % (w/v) in H₂O_{bidest.}

Elektrophoresepuffer:
25 mM Tris, pH 8,3
192 mM Glycin
0,1 % SDS

2x-Probenpuffer: 6 % 2-Mercaptoethanol
10 % Glycerin
6 % (w/v) SDS
0,05 % Bromphenolblau
0,062 M Tris/HCl, pH 6,8

Färbelösung: 0,2 % (w/v) Coomassie Blue R 250
40 % Methanol
10 % Eisessig

Entfärbelösung: 50 % Methanol
10 % Eisessig

3.2.3 Native Gelelektrophorese

Die nicht denaturierende, native Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte auf 4 %igen Polyacrylamidgelen, die wie folgt hergestellt wurden:

500 µl 40%ige Acrylamidlösung
700 µl 1 M Tris / HCl; pH 8,5
3,745 µl H₂O_{bidest.}
5 µl TEMED (99 % für die Elektrophorese)
50 µl 10 %ige APS-Lösung

Die Proteinlösungen wurden mit 50 mM Trispuffer (pH 8,5) zu einer Konzentration von 5 mg/ml verdünnt und in Volumina von 2-10 µl in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 200 mM Trispuffer (pH 8,5) als Laufpuffer über 3 h durchgeführt. Die Stromstärke betrug 35 mA pro Gel. Die Färbung und Entfärbung der Gele erfolgte mit den in 3.2.2 angegebenen Lösungen.

3.3 Proteinaufbereitung

3.3.1 Zellaufschluss

Bakteriensuspensionen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen:

Präparativer Ultraschallaufschluss:

Das Zellpellet wurde in 5 ml Aufschlusspuffer je Gramm feuchter Zellmasse resuspendiert. Die Zellsuspension wurde unter Eiskühlung in 12 Intervallen von je 10 s mit je 1 min Pause mit Ultraschall aufgeschlossen (1,5 cm Tellersonde, Stärke 5). Danach wurde zentrifugiert (15000 U/min; 20 min; 4 °C) und der Überstand mit der gelösten Fraktion für weitere Untersuchungen eingesetzt.

Analytischer Ultraschallaufschluss:

Zur Herstellung analytischer Rohextrakte wurden 10 ml frische Bakteriensuspension zentrifugiert (3000 U/min; 10 min; 4 °C) und das Pellet in 800 µl

Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde unter Eiskühlung in 2 Intervallen von je 8 s mit je 1 min Pause mit Ultraschall abgeschlossen (0,3 cm Ultraschallsonde, Stärke 4). Danach wurde zentrifugiert (10000 U/min; 10 min; 4 °C) und der Überstand mit der gelösten Fraktion für weitere Untersuchungen eingesetzt.

Aufschlusspuffer: 50 mM Tris/HCl; pH 8,5
100 mM KCl
1 mM MgCl₂

3.3.2 Hitzefällung

Bei thermostabilen Proteinen wurde als erster Reinigungsschritt meist eine Hitzedenaturierung durchgeführt. Dabei wurde der Rohextrakt (siehe 3.3.1) in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen im Wasserbad für 10 min bei einer Temperatur von 60 – 80 °C (je nach Protein) inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die hitzedenaturierten Proteine durch Zentrifugation (15000 U/min; 15 min; 4 °C) abgetrennt und der Überstand für weitere Reinigungsschritte eingesetzt.

3.3.3 Säulenchromatographie

Q-Sepharose (Anionenaustauscher)

Säulenvolumen	120 ml
Fluss	2 ml/min
Temperatur	4 °C
Äquilibrierung	Puffer A
Auftragevolumen	20-50 ml
Fraktionen	8 ml
Programm	Waschen mit 120 ml Puffer A Gradient von 100% Puffer A bis 100 % Puffer B über 600 ml Waschen mit 120 ml Puffer B Waschen mit 120 ml Puffer A
Puffer A	50 mM Tris/HCl; pH 8,5 1 mM MgCl ₂
Puffer B	50 mM Tris/HCl; pH 8,5 1 M KCl 1 mM MgCl ₂

Butylsepharose (hydrophobe Chromatographie)

Zur Erhöhung der Hydrophobität der Proteine wurden vor dem Auftragen alle Lösungen mit 1 M (NH₄)₂SO₄ versetzt.

Säulenvolumen	20 ml
Fluss	2 ml/min
Temperatur	4 °C
Äquilibrierung	Puffer A
Auftragevolumen	10-20 ml
Fraktionen	6 ml
Programm	Waschen mit 20 ml Puffer A Gradient von 100% Puffer A bis 100 % Puffer B über 100 ml Waschen mit 100 ml Puffer B
Puffer A	50 mM Tris/HCl; pH 8,5 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 mM MgCl ₂
Puffer B	50 mM Tris/HCl; pH 8,5 1 mM MgCl ₂

Superdex 200 (Gelfiltration)

Um einen konstanten Pumpendruck zu gewährleisten wurden Gelfiltrationen ausschließlich an FPLC-Anlagen.

Säulenvolumen	360 ml
Fluss	3 ml/min
Temperatur	Raumtemperatur
Äquilibrierung	Puffer A
Auftragevolumen	3-7 ml
Fraktionen	6 ml
Programm	360 ml Puffer A
Puffer A	50 mM Tris/HCl; pH 8,5 100 mM KCl 1 mM MgCl ₂

illustra NAP-25 (Entsalzung durch Gelfiltration)

Um kleine Volumina Proteinlösung ohne großen Zeitaufwand in andere Puffer zu überführen, wurden illustra NAP-25-Säulchen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Die stationäre Phase dieser Tropfsäulchen besteht aus Sephadex G-25 und die Entsalzung verläuft nach dem Prinzip der Gelfiltration.

Die Probe wurde dazu in einem Volumen von 2,5 ml auf die zuvor mit 20 ml des gewünschten Puffers äquilibrierte Säule aufgetragen. Nachdem die Probe vollständig in das Säulenmaterial eingezogen ist, wurden 3,5 ml des Äquilibrierpuffers aufgetragen. Die umgepufferten Proteine wurden dadurch in einem Volumen von 3,5 ml von der Säule eluiert.

Nickel Chelating Sepharose (Affinitätschromatographie)

Um eine hohe Bindekapazität zu erhalten, wurden die Nickel Chelating Sepharose-Säulen regelmäßig regeneriert. Dazu wurde die Säule mit 100 mM EDTA-Lösung bis zur vollständigen Entfärbung gespült und das EDTA mit 5 Säulenvolumina $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ von der Säule gewaschen. Durch Spülen mit 200 mM NiSO_4 -Lösung wurde die Säule neu mit Nickel beladen.

Säulenvolumen	8 ml
Fluss	2 ml/min
Temperatur	4 °C
Äquilibrierung	Puffer A
Auftragevolumen	20-50 ml
Fraktionen	8 ml
Programm	Waschen mit 100 ml Puffer A Gradient von 100% Puffer A bis 100 % Puffer B über 250 ml Waschen mit 50 ml Puffer B Waschen mit 50 ml Puffer A
Puffer A	50 mM Tris/HCl; pH 8,5 300 mM NaCl 1 mM MgCl_2
Puffer B	50 mM Tris/HCl; pH 8,5 500 mM Imidazol 300 mM NaCl 1 mM MgCl_2

Nickel-NTA Spin column-Kit (Affinitätschromatographie)

Um kleine Mengen von Proteinen mit endständigen His_6 -Tags aufzureinigen, wurde das Nickel-NTA Spin column-Kit von Qiagen (Hilden) eingesetzt. Die enthaltenen Säulchen wurden nach untenstehendem Schema beladen. Bei jedem Schritt wurde die entsprechende Lösung durch Zentrifugation (2000 U/min; 2 min; Raumtemperatur) in ein frisches 2 ml Eppendorf-Cap eluiert und sofort auf Eis gestellt.

-
- | | |
|----|--------------------------------------|
| 1 | 3 x 600 µl Puffer 0 (Äquilibrieren) |
| 2 | 600 µl eines Rohextraktes nach 3.3.1 |
| 3 | 600 µl Puffer 0 (Waschen) |
| 4 | 600 µl Puffer 0 mit 10 mM Imidazol |
| 5 | 600 µl Puffer 0 mit 50 mM Imidazol |
| 6 | 600 µl Puffer 0 mit 100 mM Imidazol |
| 7 | 600 µl Puffer 0 mit 200 mM Imidazol |
| 8 | 600 µl Puffer 0 mit 300 mM Imidazol |
| 9 | 600 µl Puffer 0 mit 400 mM Imidazol |
| 10 | 600 µl Puffer 0 mit 500 mM Imidazol |

Puffer 0: 50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂

3.3.4 Ultrafiltration

Das Aufkonzentrieren von Proteinlösungen erfolgte durch Ultrafiltration in Amicon-Rührzellen mit Ultrafiltermembranen entsprechender Porengröße (Pall Gelman Laboratory, USA). Standardmäßig wurden je nach Protein Membrangrößen von 10-50 kDa benutzt. Die Rührzellen wurden an einem Stickstoffanschluss bei 4 °C betrieben.

3.3.5 Dialyse

Zur Umpufferung von Proteinlösungen wurden Visking-Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgröße von 1 kDa verwendet. Alle Dialysen wurden bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Der Dialysepuffer wurde vor Beginn der Dialyse auf 4 °C vorgekühlt. Für Probenvolumina unter 1 ml wurden QuixSep Micro Dialyzer (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) verwendet. Hierbei wurde die Probe in die Kammer eines knopfförmigen Schwimmers pipettiert und diese durch eine darüber befestigte Dialysemembran verschlossen. Der QuixSep Micro Dialyzer wurde mit der Öffnung

nach unten in den Dialysepuffer gelegt und unter leichtem Rühren über Nacht inkubiert.

Für größere Probenvolumina wurde ein Visking-Dialyseschlauch der benötigten Länge an einem Ende mit einer Klemme verschlossen und die Probe durch das offene Ende eingefüllt. Das zweite Schlauchende wurde ebenfalls mit einer Klemme verschlossen und der Schlauch in den Dialysepuffer gelegt. Nach einer Stunde unter Rühren wurde der Dialysepuffer erneuert und die Dialyse über Nacht fortgesetzt.

3.3.6 Elektro-Blot

Um die Proteinbanden von einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran zu übertragen (z.B. für Edman-Sequenzierungen) wurde ein Elektro-Blot durchgeführt. Dazu wurden die Proteinproben zunächst auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 3.2.2). Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel nicht gefärbt, sondern 15 min in Kathodenpuffer eingelegt.

Die PVDF-Membran wurde auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten, wobei jede Berührung der Oberflächen vermieden wurde. Nun wurde die Membran zunächst 15 sec in Methanol, 2 min in $H_2O_{\text{bidest.}}$ und schließlich 10 sec in Anodenpuffer II eingelegt. Zeitgleich wurden drei Lagen auf die Membrangröße zugeschnittenes Whatman-Chromatographiepapier in Kathodenpuffer, zwei weitere in Anodenpuffer I und eine weitere in Anodenpuffer II eingelegt. Die zuvor mit Wasser befeuchtete Graphitkathode der Elektro-Blot Apparatur wurde nun nach Abbildung 3.2 belegt, wobei darauf zu achten war, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten eingeschlossen wurden:

+ Anode +
2 Whatmanpaper (Anodenpuffer I)
1 Whatmanpaper (Anodenpuffer II)
Membran (Anodenpuffer II)
SDS-Gel (Kathodenpuffer)
3 Whatmanpaper (Kathodenpuffer)
- Kathode -

Abbildung 3.2: Aufbau der Elektro-Blot Apparatur

Die Apparatur wurde mit der zuvor mit Wasser befeuchteten Graphitanode abgedeckt und an eine Spannungsquelle angeschlossen. Der Transfer wurde in 2 h bei 40 mA durchgeführt.

Kathodenpuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 9,4
192 mM Glycerin
10 % Methanol
0,02 % Na-Azid

Anodenpuffer I: 300 mM Tris/HCl, pH 10,4
10 % Methanol
0,02 % Na-Azid

Anodenpuffer II: 25 mM Tris/HCl, pH 10,4
10 % Methanol
0,02 % Na-Azid

3.4 Analytik

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für die Konzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) wurde für jede Messreihe eine Eichgerade mit BSA-Standards aufgestellt. Dazu wurde je 1 µl einer BSA-Lösung der Konzentration 1, 2, 3 bzw. 4 mg/ml mit 1000 µl Bradfordreagenz versetzt. Von der zu bestimmenden Proteinlösung wurden je nach zu erwartender Proteinkonzentration 0,5-5 µl auf 1000 µl Bradfordreagenz eingesetzt. Die Ansätze wurden gemischt und nach fünfminütiger Inkubation unter Lichtausschluss photometrisch bei 595 nm gegen Bradfordreagenz vermessen. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

Herstellung des Bradfordreagenz:

0,1 g Serva Blue G wurden in 47 ml Ethanol gelöst. Nach der Zugabe von 100 ml 16 M Phosphorsäure wurde mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und mindestens 3 h gerührt. Um eventuell ungelösten Farbstoff zu entfernen wurde durch ein Faltenfilter filtriert und das fertige Bradfordreagenz unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

3.4.2 N-Terminale Aminosäuresequenzierung nach Edman

Zur Identifizierung von Proteinen wurden die N-terminalen Aminosäuren mittels Edman-Abbau (Edman & Henschen, 1975) bestimmt. Bei dieser Methode werden jeweils die N-terminalen Aminosäuren schrittweise unter Reaktion mit Phenylisothiocyanat als Phenylthiohydantoin-Derivate abgespalten. Nach der Auftrennung über HPLC werden die Aminosäuren durch Vergleich ihrer Retentionszeiten mit denen eines Standard-Aminosäuregemisches identifiziert.

Für die Sequenzierung wurden die Proteinproben zunächst auf einem SDS-Polyacrylamidgel (siehe 3.2.2) aufgetrennt und mittels Elektro-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 3.3.6). Nach Coomassie-Färbung wurde die Membran luftgetrocknet und die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Die Sequenzierung wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Köhler am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der TU München durchgeführt.

3.4.3 Kinetische Untersuchungen

3.4.3.1 Messung der GTP Cyclohydrolase II-Aktivität

GTP Cyclohydrolase II katalysiert die Reaktion von GTP zu 2,5-Diamino-6- β -ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat. Zur Bestimmung der Aktivität wurde die Bildung von 2,5-Diamino-6- β -ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat photometrisch beobachtet. Dazu wurde das Enzym und der Reaktionspuffer in eine 1 cm Quarzküvette pipettiert und in einem 37 °C warmen Küvettenblock etwa 10 min temperiert. Nach Zugabe von GTP in einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von $\lambda = 310$ nm über 5-20 min aufgezeichnet. Der Extinktionskoeffizient von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat beträgt bei 310 nm $7430 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Schramek et al., 2001). Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte nach Gleichung 3.1.

Ein Ansatz setzt sich zusammen aus:

50 mM Tris/HCl; pH 8,5
 5 mM MgCl₂
 1 mM GTP
 10-100 µg GTP Cyclohydrolase II

Gesamtvolumen 300 µl

Gleichung 3.1: Berechnung der spezifischen Aktivität

$$A_{\text{spez.}} = \frac{\Delta E \cdot V_{\text{Küvette}}}{\Delta t \cdot \varepsilon \cdot d \cdot c_{\text{Protein}} \cdot V_{\text{Probe}}} \cdot 1000$$

$A_{\text{spez.}}$:	[µmol mg ⁻¹ min ⁻¹]	spezifische Aktivität
ΔE :	[]	Extinktionsänderung
Δt :	[min]	Zeitintervall der Extinktionsänderung
$V_{\text{Küvette}}$:	[ml]	Reaktionsvolumen
ε :	[M ⁻¹ cm ⁻¹]	Extinktionskoeffizient
d :	[cm]	Schichtdicke der Küvette
c_{Protein} :	[mg ml ⁻¹]	Konzentration der ein- gesetzten Proteinlösung
V_{Probe} :	[ml]	eingesetztes Volumen der Proteinlösung

3.4.3.2 Messung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase-Aktivität

Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase-Aktivität wurde in einem gekoppelten Test mit Phosphoriboisomerase und 6,7-Dimethyl-8-ribitylumazinsynthase bestimmt. Dabei erzeugt zunächst die Phosphoriboisomerase Ribulose-5-phosphat aus Ribose-5-Phosphat. Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase setzt dann Ribulose-5-phosphat zu Formiat und 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat um. Dieses wird von der 6,7-Dimethyl-8-ribityl-

lumazinsynthase mit 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, Phosphat und Wasser umgesetzt. Die Zunahme der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 410 \text{ nm}$ beobachtet. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte über Gleichung 3.1 mit $\epsilon = 12100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Fischer et al., 2002)

Ein Reaktionsansatz setzte sich aus je 100 μl Mix A und 100 μl Mix B zusammen, die vor jeder Messreihe frisch hergestellt wurden. Mix A wurde zunächst 5 min bei 37 °C inkubiert um Ribulose-5-phosphat zu erzeugen. 100 μl Mix B wurden in eine Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke pipettiert und in dem auf 37 °C temperierten Küvettenblock vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μl Mix A gestartet und für 10-20 min beobachtet.

Mix A (1 ml):	795 μl	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
	50 μl	Tris/HCl ; pH 7,5; [1 M]
	10 μl	MgCl_2 ; [1 M]
	20 μl	D-Ribose-5-phosphat; [0,5 M]
	25 μl	Phosphoriboisomerase; [500 U/ml]
	100 μl	6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase; [6 mg/ml] *
Mix B (1 ml):	883 μl	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
	50 μl	Tris/HCl ; pH 7,5; [1 M]
	10 μl	MgCl_2 ; [1 M]
	57 μl	5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)- pyrimidindion [13,3 mM]
	10-100 μg	3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase

* Die 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde freundlicher Weise von Frau Dr. Ilka Haase zur Verfügung gestellt

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

0,1-0,2 mmol (MW = 306 g/mol) 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion wurden in einem 50 ml Rundkolben mit 10 ml H₂O_{bidest} und ca. 40 mg Palladium/Aktivkohle versetzt und 12 h unter H₂-Gas hydriert. Nach Entfernung des Katalysators durch Filtration wurde die Konzentration des Produktes 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (ϵ_{323} : 14200 M⁻¹ cm⁻¹; (Cresswell et al., 1960)) und des eventuell nicht umgesetzten Eduktes 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (ϵ_{268} : 24500 M⁻¹ cm⁻¹; (Plaut, 1971)) in der Lösung photometrisch bei pH 1,0 (0,1 n HCl) bestimmt. Die Lagerung erfolgte nach Zugabe von 80 mM DTT unter Lichtausschluss bei -80 °C.

3.4.3.3 Michaelis-Menten-Kinetik

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der untersuchten Enzyme wurden die spezifischen Aktivitäten wie unter 3.4.3.1, bzw. 3.4.3.2 beschrieben bei mindestens acht verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Die Steuerung des Photometers erfolgte über einen Computer, der mit dem Programmpaket SWIFT (Biochrom Ltd, Cambridge, UK) ausgestattet war. Die Daten wurden mit der Origin 6.0G Professional-Software zur Berechnung der maximalen Geschwindigkeit v_{\max} und der Michaelis-Menten-Konstante K_M nach der Michaelis-Menten-Gleichung (Michaelis & Menten, 1913) (Gleichung 3.2) ausgewertet.

Gleichung 3.2: Michaelis-Menten-Gleichung

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

v:	[nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]	Reaktionsgeschwindigkeit
[S]	[μM]	Substratkonzentration
v_{\max}	[nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
K_M	[μM]	Michaelis-Menten Konstante

3.4.3.4 Messung der GMP-Bildung bei der Mutante EC-RibA Y105F

Um den Umsatz von GTP zu GMP durch die Mutante EC-RibA Y105F (siehe 4.6.5) zu untersuchen, wurden zunächst 10 ml einer entgasten 1 mM GTP-Lösung in Proteinpuffer auf 37 °C temperiert. Durch Zugabe von EC-RibA Y105F in einer finalen Konzentration von 5,57 µM wurde der enzymatische Umsatz von GTP gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils in Doppelansätzen 100 µl entnommen und zu 50 µl einer 20% TCA-Lösung gegeben, um die Reaktion durch Denaturierung des Proteins zu stoppen. Durch Zentrifugation (13000 U/min; 5 min; 4 °C) wurde das ausgefallene Protein sedimentiert und der Überstand 1:20 mit H₂O_{bidest} verdünnt.

30 µl dieser Lösung wurden anschließend auf einer „reversed phase“ HPLC-Säule (Nucleosil 100 (C18) 5µ; 250 mm x 4,6 mm (Alltech, Nicholasville, KY, USA)) aufgetrennt. Die Säule wurde dazu bei Raumtemperatur mit Ionenpaar-Laufpuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min für 45 min entwickelt. Die Elution von GTP, GDP und GMP wurde photometrisch bei 254 nm aufgezeichnet. Über einen angeschlossenen Computer mit der Software ChromGate Vers. 2.5 (Knauer, Berlin) wurde der quantitative Umsatz von GTP zu GMP über die Fläche unter den Peaks ausgewertet. Über Gleichung 3.3 wurde dann die spezifische Aktivität berechnet.

Gleichung 3.3: Berechnung der spezifischen Aktivität für die Bildung von GMP

$$A_{\text{spez.}} = \frac{\Delta C_{\text{GMP}}}{C_{\text{Protein}}}$$

$A_{\text{spez.}}$:	[nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]	spezifische Aktivität
ΔC_{GMP} :	[nM min ⁻¹]	GTP-Konzentrationsänderung pro Minute
C_{Protein} :	[mg l ⁻¹]	Proteinkonzentration

Proteinpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,5
 100 mM KCl
 5 mM MgCl₂
 2 mM DTT
 0,02% Na-Azid
 (filtriert und entgast)

Ionenpaar-Laufpuffer:

Isopropanol/Triethylamin/85% H₃PO₄/H₂O (8:10:3:979; v:v:v:v); pH 7.0 (filtriert und entgast)

3.4.4 Analytische Ultrazentrifugation

Die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten bzw. der molaren Massen von Proteinen erfolgte durch Ultrazentrifugation. Die Zentrifugationsläufe wurden in der Optima XL-I 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-1 Analytical Data Analysis Software, Version 2.01, ausgestattet war. Die Messzellen bestanden aus Doppelkammern mit einem Aluminiummittelstück und Saphirfenstern.

3.4.4.1 Gleichgewichtslauf

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts wurden die Proben auf eine OD₂₈₀ von 0,3 verdünnt und davon 120 µl in der Messzelle mit 15 µl Öl (Fluorochemical FC43, Beckman) unterschichtet. Als Referenz dienten 150 µl des Puffers, in dem auch das Protein gelöst war (siehe Tabelle 3.2). Die Zentrifugationsläufe wurden bei 4 °C über etwa 72 h (bis zur Einstellung des Gleichgewichts) bei einer Geschwindigkeit von 9000-15000 rpm, je nach vermuteter Quartärstruktur, durchgeführt (siehe Tabelle 3.2). Für die Auswertung wurde das Programm Origin single (Origin v 3.78) der Software XLAData Analysis (Beckman) verwendet. Das benötigte partielle spezifische Volumen wurde näherungsweise aus den partiellen spezifischen Volumina der Aminosäuren (Cohn & Edsall, 1943) mit einer Temperaturkorrektur (Laue et al., 1992) berechnet:

Gleichung 3.4: Berechnung des partiellen spezifischen Volumens eines Proteins

$$V_4 = V_{25} + T_{\text{corr}} = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i \cdot V_i}{\sum_i N_i \cdot M_i} + \frac{277,16 - 298,16}{2352,9}$$

- V_4 : partielles spezifisches Volumen
 V_{25} : partielle spezifische Volumina der Aminosäuren
 T_{corr} : Temperaturkorrektur
 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 wurde aus den einzelnen Pufferkomponenten und einem Temperaturkorrekturfaktor berechnet (Laue et al., 1992):

Gleichung 3.5:

$$\rho_{b,4} = \frac{(0,998234 + \sum \Delta\rho_{ci}) \cdot \rho_4}{0,998234}$$

- $\rho_{b,4}$: Dichte der Pufferlösung
 $\Delta\rho_{ci}$: Dichteinkrement der Pufferkomponente i mit der molaren Konzentration c_i ; errechnet sich nach:
 $\Delta\rho_{ci} = (A_i + B_{iCi}^{0,5} + C_{iCi} + D_{iCi}^2 + E_{iCi}^3 + F_{iCi}^4) - 0,998234$
 $A_i - F_i$: Parameter nach Laue et al., 1992
 ρ_4 : Temperaturkorrekturfaktor

und:

Gleichung 3.6:

$$\rho_4 = 1,000028 \cdot 10^{-3} \cdot \left[\frac{999,83952 + 16,945176 \cdot T}{1 + (16,879850 \cdot 10^{-3} \cdot T)} - \frac{(7,9870401 \cdot 10^{-3} \cdot T^2) + (46,170461 \cdot 10^{-6} \cdot T^3)}{1 + (16,879850 \cdot 10^{-3} \cdot T)} - \frac{(105,56302 \cdot 10^{-3} \cdot T^2) - (280,54253 \cdot 10^{-12} \cdot T^5)}{1 + (16,879850 \cdot 10^{-3} \cdot T)} \right]$$

- T : Temperatur

Durch Bestimmung der Absorption in Abhängigkeit vom Radius im Sedimentationsgleichgewicht kann so mit Hilfe der Gleichung 3.7 das Molekulargewicht ermittelt werden:

Gleichung 3.7:

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

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

A, A₀: Absorption

r, r₀: Radius

E: konstante Abweichung durch nicht sedimentierende Substanzen

M: Molekulargewicht

mit:

Gleichung 3.8:

$$H = \frac{(1 - v \cdot \rho) \cdot \omega^2}{2 \cdot R \cdot T}$$

R: Gaskonstante = 8,3144 J K⁻¹ mol⁻¹

ω: Winkelgeschwindigkeit

Tabelle 3.2: Parameter der durchgeführten Sedimentationsgleichgewichtsläufe

Protein	Puffer	rpm
AF-H6-RibA (4.3.6)	1	10300
AF-RibB-H6 (4.4.4)	2	15000
CG-RibA-H6 (4.2.3)	3	15000

Puffer 1: 50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 300 mM NaCl; 1 mM MgCl₂

Puffer 2: 5 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM MgCl₂

Puffer 3: 50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 100 mM KCl; 1 mM MgCl₂

3.4.4.2 Sedimentationslauf

Zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten wurden 400 µl Probe mit einer OD_{280} von 1,0 in die rechte Kammer und 500 µl des selben Puffers, in dem auch das Protein gelöst war, als Referenz in die linke Kammer gefüllt. Der Sedimentationslauf wurde bei 20 °C bei einer Geschwindigkeit von 59000 rpm durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Ultrascan Version 7.0 nach der Fitmethode von van Holde und Weischet (Van Holde & Weischet, 1978). Diese Methode entfernt den störenden Beitrag der Diffusion von den Daten und führt zu einem Mittelwert von Sedimentationskoeffizientenscharen.

3.4.5 Kalibrierte Gelfiltration zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts

Bei manchen Proteinen mit geringer Stabilität war ein Sedimentationsgleichgewichtslauf wegen seiner langen Versuchsdauer zur Bestimmung der molaren Masse nicht geeignet. Alternativ wurde bei diesen Proteinen das native Molekulargewicht per Gelfiltration bestimmt. Die dazu verwendete Superdex 200-Säule (Pharmacia, Freiburg) wurde vorher mit Eichproteinen bekannter Größe (HMW Gel Filtration Calibration Kit; Pharmacia) kalibriert. Dazu wurden jeweils 5 mg des Proteins in 3 ml des Puffers, in dem auch das Probenprotein vorlag, gelöst und einzeln auf die Säule aufgetragen. So wurden alle Eichproteine nach und nach unter identischen Bedingungen aufgetragen und eluiert. Aus den Elutionsvolumina und den dekadischen Logarithmen der Molekulargewichte wurde dann eine Eichgerade erstellt. Durch Vergleich mit dem Elutionsvolumen des Probenproteins, welches unter identischen Bedingungen wie die Eichproteine gelfiltriert wurde, konnte dann dessen molare Masse bestimmt werden.

In Rahmen dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck 2 Superdex 200-Säulen unterschiedlicher Säulenvolumina kalibriert. Die Eichproteine wurden jeweils so gewählt, dass das Probenprotein möglichst in der Mitte der Eichgeraden lag.

Säule 1:**Tabelle 3.3: Eichproteine zur Kalibrierung der Superdex 200 Nr. 1**

Protein	MW [kDa]
Chymotrypsinogen A	25
Ovalbumin	43
BSA	67
Aldolase	158

Säule 2:**Tabelle 3.4: Eichproteine zur Kalibrierung der Superdex 200 Nr. 2**

Protein	MW [kDa]
Ovalbumin	43
BSA	67
MG-Lusy ¹	105 ²
Aldolase	158
Katalase	240

¹ 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase aus *Magnaporthe grisea* wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Ilka Haase.

² das Enzym liegt als Pentamer vor (Persson et al., 1999); ein Monomer hat ein Molekulargewicht von 21 kDa (NCBI, accession number AAD55372).

3.4.6 Zinkbestimmung durch Atomabsorptionsspektroskopie

Die Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie (F-AAS) ist ein sehr empfindliches Verfahren zur quantitativen Bestimmung einzelner chemischer Elemente. Die gelöste Probe wird dazu mittels Koaxialrohrzerstäuber fein zerstäubt und anschließend im Flammenatomisator atomisiert. Die Probenzufuhr erfolgt kontinuierlich, da die Probenaufenthaltsdauer im Messraum nur wenige Sekundenbruchteile beträgt. Eine Hohlkathodenlampe emittiert durch Elementanregung monochromatische Strahlung im Absorptionsbereich des zu untersuchenden Elementes. Gemessen wird die Strahlungsabsorption durch den atomisierten Analyten (Extinktion) im Ein- oder Zweistrahlverfahren. In beiden Fällen ist ein Nullabgleich mit reinem Lösungsmittel erforderlich. Mit Standards

genau bekannter Analytkonzentrationen müssen Eichkurven aufgenommen werden, aus denen dann der Analytgehalt in der Probe ermittelt werden kann.

Vor der Probenaufbereitung wurden alle Geräte mit 6,5% HNO₃ und Milliporewasser gereinigt. Die Zinkbestimmungen wurden an einem SpectrAA-100 Flammen-Atomabsorptionsspektrometer mit der Software SpectrAA 100/200 Ver. 1.1 (beides VARIAN; Zug, Schweiz) unter folgenden Parametern durchgeführt.

Tabelle 3.5: Parameter für die Zinkbestimmung mittels F-AAS

Strahlungsquelle	Wellenlänge [nm]	Spaltöffnung [nm]	Lampenstrom [mA]
Zn/Cu Hohlkathode	213,9	1,0	5

Die Proteine wurden in einer Endkonzentration von 9,2 µM in 10% HNO₃ zur Messung eingesetzt, was bei einer optimalen Bindungszahl von 1 Zink pro aktivem Zentrum einer Zinkkonzentration von 0,6 mg/l entspräche. Dazu wurden 0,092 µmol aufgereinigtes Protein in einem Puffervolumen von 200-400 µl mit 1 ml 65% HNO₃ versetzt und im Sovirel-Röhrchen 1 h bei 96 °C hydr olysiert. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung im Messkolben mit Milliporewasser auf genau 10 ml aufgefüllt. Parallel wurde ein Ansatz mit Probenpuffer unter gleichen Bedingungen bearbeitet (Probenblindwert).

Zum Aufnehmen der Eichkurve wurden aus einer Zink-Stammlösung (1 mg/ml) mit 6,5% HNO₃ Standardlösungen in den Konzentrationen 0,2, 0,4, 0,8 und 1,6 mg/l hergestellt. Die hergestellten Lösungen konnten so direkt zur Messung eingesetzt werden.

3.4.7 NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Messungen und Auswertungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Werner Römisch durchgeführt.

Die Proben wurden in 0,5 ml 50 mM Trispuffer, pH 8,5 mit 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 10% D₂O gelöst. Die ¹H und ¹³C Spektren wurden an einem DRX 500 NMR-Spektrometer (Bruker Instruments, Karlsruhe) bei einer Temperatur von 17 °C aufgenommen. Dieses lieferte bei 11,75 Tesla ¹H-Resonanzfrequenzen von 500.13 MHz und ¹³C-Resonanzfrequenzen von 125.77 MHz. Für ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurde ein ¹³C-/¹H-Dualprobenkopf verwendet. Für alle zweidimensionalen Experimente mit Detektion von Protonen wurde ein inverser ¹H-/¹³C/¹⁵N-Tripelresonanzprobenkopf benutzt. Die Spektrenaufnahme und -bearbeitung erfolgte mit einer Bruker-Standardsoftware (XWINNMR 3.0). Die Mischzeit im ¹³C-TOCSY betrug 60 ms. ¹³C-Messungen wurden mittels CPD Protonen-entkoppelt gemessen. 3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonat diente als externer Standard für ¹H- und ¹³C-Spektren.

4 Ergebnisse

4.1 GTP Cyclohydrolase II aus *Candida albicans*

Ausgangspunkt dieses Projektes war das von Prof. Dr. Markus Fischer freundlicherweise zur Verfügung gestellte Expressionskonstrukt pNCO-CA-Rib1-wt. Es enthielt den offenen Leserahmen orf19.2862 ([http://genolist.pasteur.fr/ CandidaDB/](http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/)) aus *C. albicans*, der in das Expressionsplasmid pNCO113 ligiert wurde. Das Gen codiert für ein Protein aus 342 Aminosäuren (36,7 kDa).

4.1.1 Konstruktion des synthetischen Gens CA-Rib1-syn

Eine Sequenzanalyse von CA-Rib1-wt ergab eine hohe Anzahl an Codons, die schlecht in *E. coli* exprimiert werden. Zur Optimierung der Sequenz wurden 24 % der Codons in einer Vollsynthese mit 12 PCR-Schritten (3.1.2) durch Codons entsprechend der *E. coli*-Codonpräferenz (www.kazusa.or.jp/codon) ersetzt. Die Gensynthese erfolgte zunächst in zwei Segmenten, die dann ligiert wurden (3.1.6). Segment A enthielt die Basenpaare 1 – 558, Segment B die Basenpaare 550 – 1075. Für beide Segmente wurden per PCR DNA-Starttemplate (A 113 bp; B 110 bp) aus den überlappenden Oligonukleotiden CARIB1A-1 und CARIB1A-2 (Segment A), bzw. CARIB1B-1 und CARIB1B-2 (Segment B) hergestellt (Oligonukleotidsequenzen siehe Primertabelle 6.1). Die so entstandenen DNA-Starttemplate wurden durch eine Serie von 5 PCR-Amplifikationsschritten pro Segment entsprechend Abb. 4.1 durch paarweise Kombination von Oligonukleotiden verlängert.

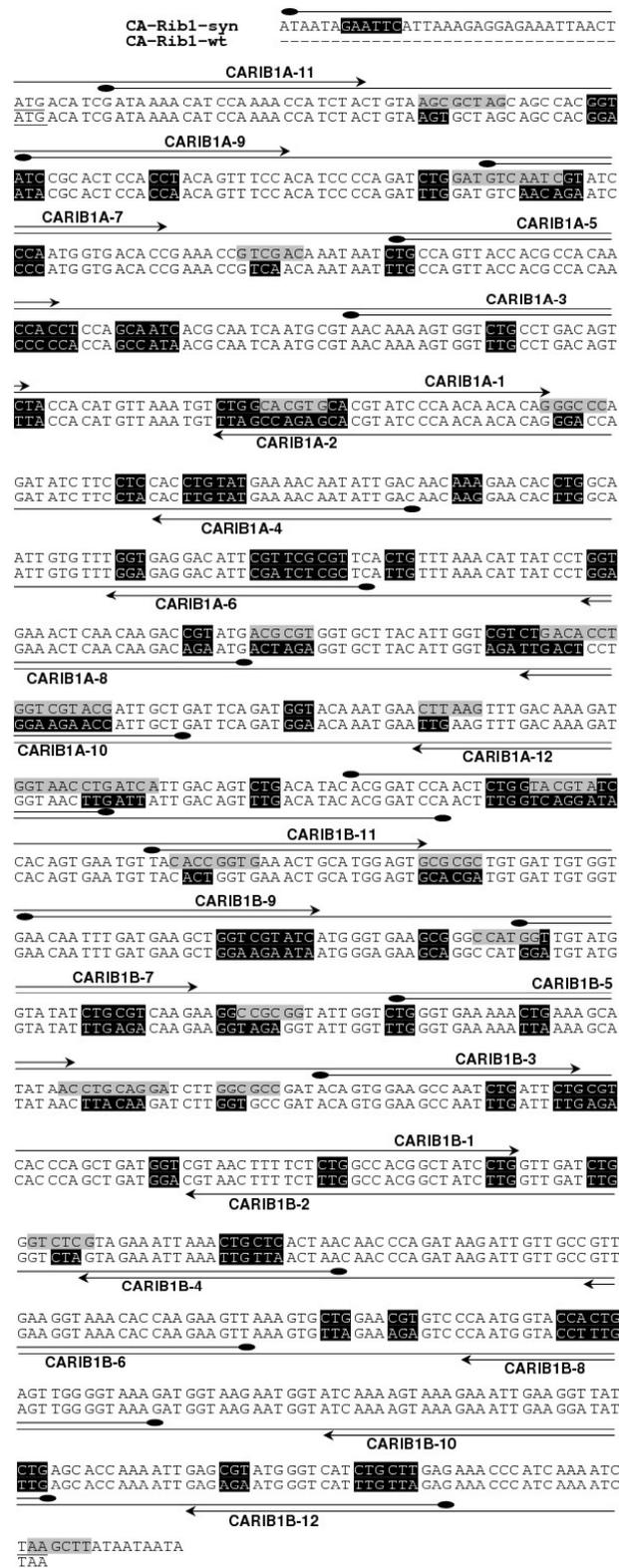


Abbildung 4.1: Synthese des Gens der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* mit optimierter Codon usage (CA-Rib1-syn): Alignment von CA-Rib1-syn und CA-Rib1-wt mit 5' und 3' Überhängen einschließlich der synthetischen Schnittstellen für *EcoRI* und *HindIII*. Veränderte Codons sind schwarz, neue singuläre Schnittstellen grau unterlegt. Die verwendeten Oligonukleotide sind als Pfeile oberhalb (forward-primer) und unterhalb (reverse-primer) der Sequenz dargestellt.

Dementsprechend wurde der erste Zyklus mit den Oligonukleotiden CARIB1A-3 und CARIB1A-4 (Segment A), bzw. CARIB1B-3 und CARIB1B-4 (Segment B) durchgeführt. Die jeweils entstandenen Fragmente dienten als Template für den folgenden Amplifikationsschritt. Das so entstandene Segment A (564 bp) wurde schließlich mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* verdaut (3.1.4), Segment B (531 bp) entsprechend mit *BamHI* und *HindIII*. Die beiden Segmente wurden nun durch Ligation zusammengefügt (siehe 3.1.6) und danach in das Expressionsplasmid pNCO113 ligiert, welches zuvor mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* verdaut wurde. Nach der Transformation des so erzeugten Konstruktes pNCO-CA-Rib1-syn in XL1-Blue-Zellen (3.1.8.1) und der Separation der positiven Transformanden mittels PCR-Screening (siehe 3.1.9) wurden die Sequenzen der Plasmide auf Fehler überprüft (siehe 3.1.12). Durch Aktivitätstests (3.4.3.1, Tabelle 4.1) und SDS-Gelelektrophorese (3.2.2, Abbildung 4.2) der Rohextrakte konnte gezeigt werden, dass das Expressionskonstrukt pNCO-CA-Rib1-syn in *E. coli* eine etwa zehn mal höhere Expressionsrate aufweist als das ursprüngliche Konstrukt pNCO-CA-Rib1-wt.

Tabelle 4.1: spezifische Aktivitäten der Rohextrakte

Expressionskonstrukt	spez. Aktivität [nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]
XL1 pNCO-CA-Rib1-wt	3,4
XL1 pNCO-CA-Rib1-syn	30

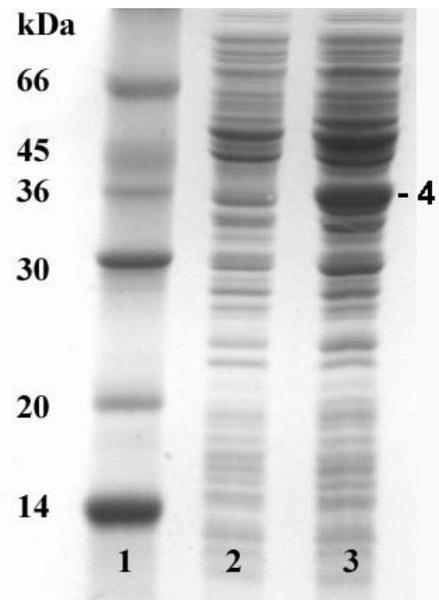


Abbildung 4.2: SDS-Gelelektrophorese der Rohextrakte: 1: SDS-Marker; 2: Rohextrakt XL1 pNCO-CA-Rib1-wt; 3: Rohextrakt XL1 pNCO-CA-Rib1-syn; 4: Proteinbande von CA-Rib1 bei 37 kDa.

4.1.2 *In vivo*-Assay

Die Funktionstüchtigkeit der synthetischen GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* wurde *in vivo* durch Transformation des Expressionsplasmides pNCO-CA-Rib1-syn in den riboflavinauxotrophen *E. coli*-Stamm *Rib7* geprüft (3.1.15). Als Negativkontrolle wurde das Plasmid pNCO113 ohne Insert verwendet. Die Vitalität der Transformanden wurde durch Inkubation auf LB-Agarplatten mit 170 mg/l Ampicillin über 24 Stunden bei 37 °C untersucht. Gleichzeitig wurde auf LB-Agarplatten, die zusätzlich 400 mg/l Riboflavin enthielten, geprüft, ob die Transformation erfolgreich war. Die deutliche Kolonienbildung in Abbildung 4.3 zeigt, dass die synthetische GTP Cyclohydrolase II, sowie die im Folgenden hergestellten und beschriebenen Expressionskonstrukte aus *C. albicans*, in der Lage sind, den Stamm zu prototrophieren.

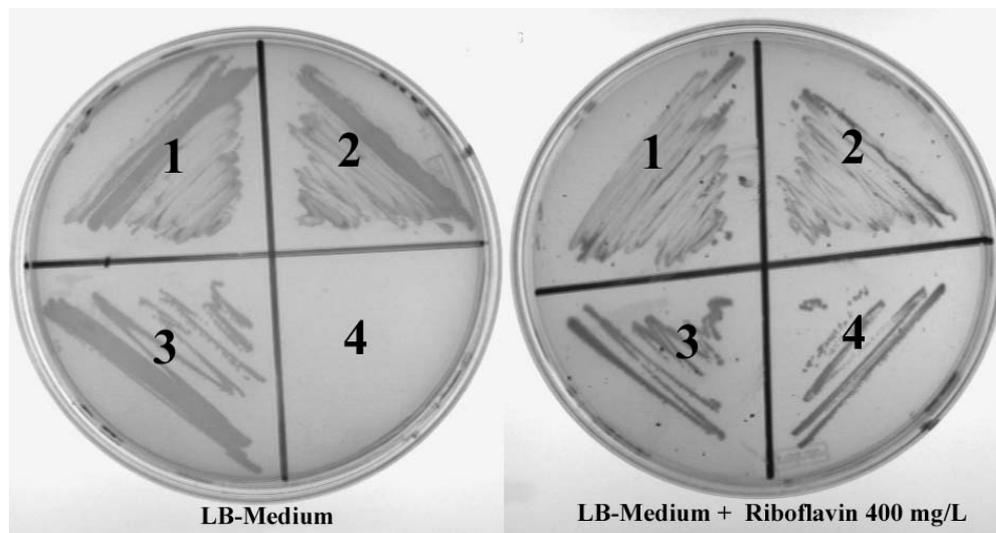


Abbildung 4.3: Ausstriche der versch. *Rib7* Mutanten nach den Prototrophierungsversuchen. Alle enthalten das Plasmid pNCO113 mit folgenden Inserts: 1: CA-Rib1-syn; 2: CA-H6-Rib1 (siehe 4.1.10); 3: CA-H6-NT-Rib1 (siehe 4.1.11); 4: Negativkontrolle ohne Insert; Links: LB-Agarplatte mit 170 mg/l Ampicillin; Rechts: LB-Agarplatte mit 170 mg/l Ampicillin und 400 mg/l Riboflavin.

4.1.3 Expression und Reinigung von CA-Rib1-syn

Nach dem Überprüfen der korrekten DNA-Sequenz (3.1.12) wurde das Plasmid pNCO-CA-Rib1-syn in *E. coli* M15[pREP4] transformiert (3.1.8.1). Expressionsversuche im analytischen Maßstab ergaben eine Temperatur von 20 °C und eine Expressionsphase von 16 h nach Induktion mit 1 mM IPTG als optimale Anzuchtbedingungen. Dementsprechend wurde eine Großanzucht nach 3.1.13 angesetzt. 5 g der geernteten feuchten Zellmasse wurden in 50 ml Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 1 mM MgCl₂) resuspendiert und durch Behandlung mit Ultraschall (3.3.1) aufgeschlossen. Aus dem so erhaltenen Rohextrakt konnte die GTP Cyclohydrolase II über ein Zwei-Säulen-System bis zur elektrophoretischen Homogenität aufgereinigt werden. Zunächst wurde der Rohextrakt auf eine Anionentauscher-Säule (Q-Sepharose) aufgetragen und diese nach 3.3.3 entwickelt. Die einzelnen Fraktionen wurden per SDS-Gelelektrophorese (3.2.2) sichtbar gemacht. Die GTP Cyclohydrolase II eluierte bei einer KCl-Konzentration

von 250 – 300 mM und zeigte auf dem SDS-Gel deutliche Banden bei 37 kDa, dem rechnerisch zu erwartende Molekulargewicht für eine Untereinheit. Die Fraktionen, die die GTP Cyclohydrolase II enthielten, wurden vereint und durch Ultrafiltration mit einer 10 kDa-Membran (3.3.4) auf ein Volumen von 5 ml eingengt. Die Proteinlösung wurde dann per Gelfiltration (Superdex 200, 3.3.3) aufgetrennt und das Ergebnis per SDS-Gelelektrophorese überprüft. Die GTP Cyclohydrolase II eluierte bei einem Volumen von 195 ml. Die Fraktionen, die das Enzym enthielten, wurden vereint und nach Konzentrationserhöhung auf ca. 10 mg/ml mittels Ultrafiltration sofort kühl gelagert. Eine Edman-Sequenzierung (3.4.2) ergab die zu erwartende Aminosäureabfolge MTSIKHPKPS. Abbildung 4.4 fasst die vereinten Fraktionen nach jedem Reinigungsschritt zusammen.

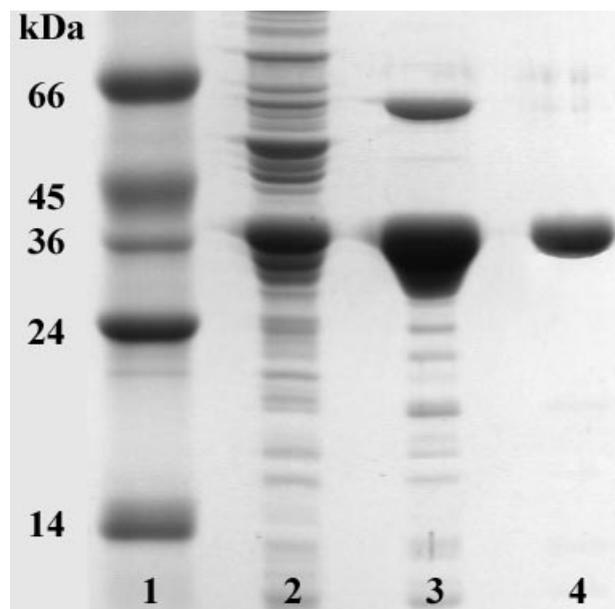


Abbildung 4.4: 14%iges SDS-Gel der Reinigung der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans*: 1: Marker; 2: Rohextrakt; 3: Q-Sepharose; 4: Superdex

4.1.4 Bestimmung des nativen Molekulargewichts

Die GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* wurde wie unter 4.1.3 beschrieben über zwei Säulen gereinigt. Der letzte Reinigungsschritt erfolgte über eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200), die anhand des Elutionsvolumens eine Abschätzung

des nativen Molekulargewichtes des Enzyms erlaubte. Dies war möglich, da die Gelfiltrationssäule zuvor mit definierten Proteinen kalibriert worden war (siehe 3.4.5) und dementsprechend eine Eichgerade erstellt wurde (siehe Gleichung 4.1 und Abbildung 4.5).

Tabelle 4.2: Eichproteine zur Kalibrierung der Superdex 200 für die Bestimmung des nativen Molekulargewichts der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans*

Protein	MW [kDa]	log (MW)	Elutionsvolumen [ml]
Chymotrypsinogen A	25	1,398	248
Ovalbumin	43	1,634	223
BSA	67	1,826	200
Aldolase	158	2,199	161

Gleichung 4.1: Geradengleichung für die Eichgerade der Superdex 200 zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans*

$$\log(\text{MW}) = -0,0092 \cdot V_{\text{Elution}} + 3,6723$$

log (MW): dekadischer Logarithmus des Molekulargewichts

V_{Elution} Elutionsvolumen [ml]

In mehreren Reinigungsexperimenten konnte die GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* reproduzierbar bei einem Retentionsvolumen von 195 ml eluiert werden, was auf ein natives Molekulargewicht von 75 kDa hinweist. Das Enzym mit dem rechnerischen Molekulargewicht von 36,7 kDa pro Untereinheit liegt somit als Dimer vor, was mit den bisher veröffentlichten GTP Cyclohydrolasen II aus anderen Organismen übereinstimmt (vgl. 1.4).

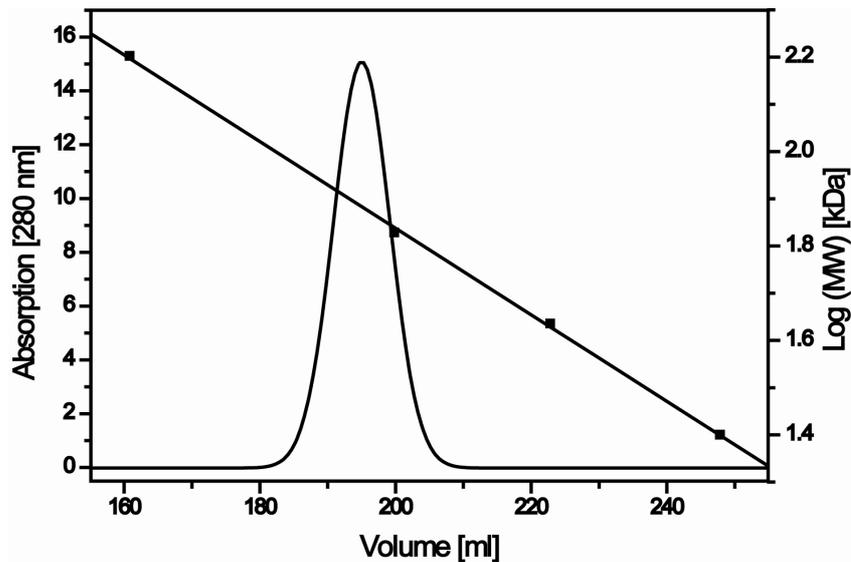


Abbildung 4.5: Gelfiltration: Elutionsprofil der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* an einer Superdex 200 mit der dazugehörigen Eichgerade.

4.1.5 Kinetische Charakterisierung

Für die GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* wurden direkt nach der Reinigung die kinetischen Parameter im „steady-state“ wie unter 3.4.3.3 beschrieben bestimmt. Die Reaktionstemperatur bei den kinetischen Untersuchungen betrug 37 °C, der pH-Wert 8,5. Die Konzentration des Substrats GTP wurde von 1,5 µM – 440 µM variiert. Das Enzym wurde in einer Endkonzentration von 0,5 µM eingesetzt. Die kinetischen Untersuchungen im „steady-state“ ergaben für die GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* eine Michaelis-Menten Konstante von $K_M = 9,4 \mu\text{M}$ ($\pm 1,0$) bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von $v_{\text{max}} = 363 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (± 13). Abbildung 4.6 zeigt den Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration.

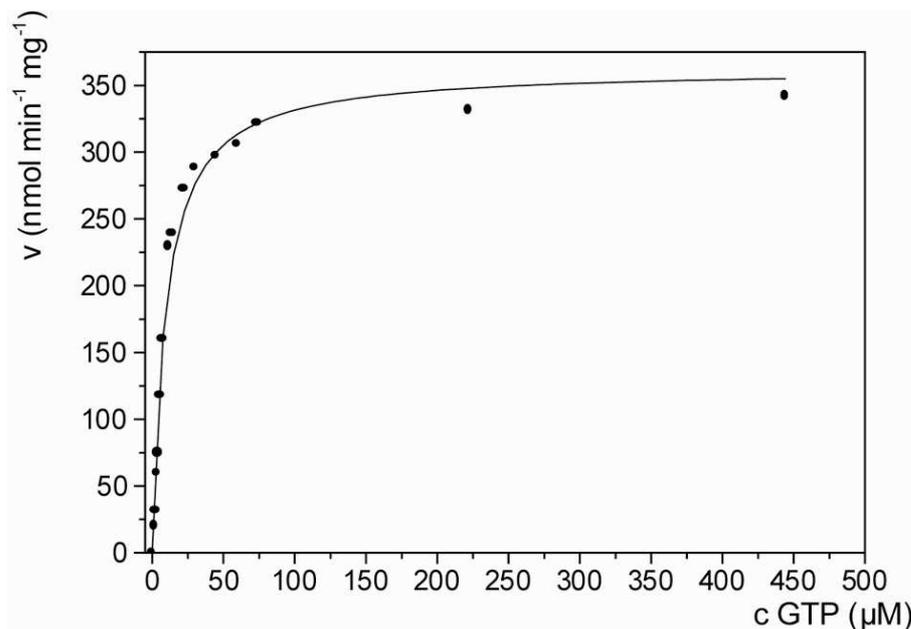


Abbildung 4.6: Kinetische Charakterisierung der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans*: Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration. Die durchgezogene Linie stellt die Fitkurve dar.

4.1.6 Zinkbestimmung

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass ein durch 3 Cysteine am aktiven Zentrum gebundenes Zinkion erheblich am katalytischen Mechanismus der GTP Cyclohydrolase II beteiligt ist (Kaiser *et al.*, 2002). Zur Bestimmung des Zinkgehaltes der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* wurde eine Flammenatomabsorptionsspektroskopie wie unter 3.4.6 beschrieben durchgeführt. Das Enzym wurde in einer Endkonzentration von 9,2 μM in 10% HNO₃ zur Messung eingesetzt. Tabelle 4.3 fasst die Ergebnisse der Messungen zusammen, Abbildung 4.7 zeigt die durch die Messung von Zink-Standardlösungen ermittelte Eichgerade, die Grundlage der Zinkbestimmung war. Es wurden Standardlösungen mit den Zinkkonzentrationen 0,2 mg/l, 0,4 mg/l, 0,8 mg/l und 1,6 mg/l eingesetzt.

Tabelle 4.3: Messwerte der Zinkbestimmung für die GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* mittels Flammen-AAS.

Probe	Absorption	Zinkkonz. [mg/l]
Nullwert (Millipore)	0,0010	0,000
Standard 1 [0,2 mg/l]	0,0064	0,200
Standard 2 [0,4 mg/l]	0,0125	0,400
Standard 3 [0,8 mg/l]	0,0291	0,800
Standard 4 [1,6 mg/l]	0,0590	1,600
CA-Rib1-syn	0,0203	0,594

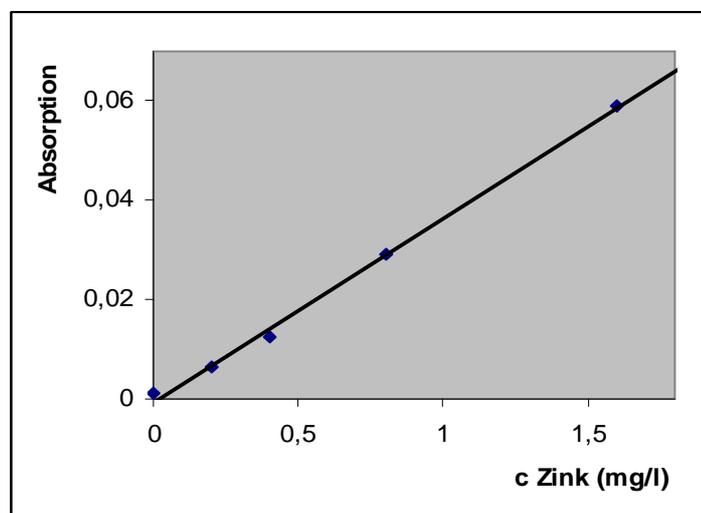


Abbildung 4.7: Eichgerade für die Zinkbestimmung der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* mittels Flammen-AAS.

Die Untersuchungen mittels Flammen-AAS ergaben für die GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* eine Zinkbindung von 1 Zinkion pro Untereinheit. Die ermittelte Nachweisgrenze lag bei 0,08 mg/l.

4.1.7 Einfluss von Metallionen auf die Aktivität

Um volle Aktivität zu erreichen, ist für die GTP Cyclohydrolase II die Anwesenheit zweiwertiger Metall-Kationen, wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} , im Reaktionspuffer notwendig (Foor & Brown, 1975). Um zu untersuchen, welche Metallionen für das Enzym aus

C. albicans am besten geeignet sind, wurden mehrere Aliquote frisch gereinigten Enzyms durch Dialyse (3.3.5) in Puffer, die jeweils eines der folgenden zweiwertigen Metall-Kationen enthielten, umgepuffert. Neben Mg^{2+} wurden die Metallionen Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} eingesetzt. Danach wurden die spezifischen Aktivitäten der Proben wie unter 3.4.3.1 beschrieben bestimmt, mit der Abweichung, dass der jeweilige Reaktionspuffer statt 5 mM $MgCl_2$ 5 mM des entsprechenden Metallions enthielt. Tabelle 4.4 fasst die Ergebnisse der Untersuchungen zusammen.

Tabelle 4.4: Messung der spezifischen Aktivitäten der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* unter dem Einfluss verschiedener Metallionen.

Metallkation	Aktivität [nmol mg^{-1} min^{-1}]	% der Aktivität mit Mg^{2+}
ohne Metallkation	-	-
Mg^{2+}	206 *	100
Mn^{2+}	175	85
Ca^{2+}	110	53
Co^{2+}	204	99
Zn^{2+}	-	-
Cu^{2+}	-	-

* Der Wert liegt deutlich unter der spezifischen Aktivität des frisch gereinigten Enzyms (siehe Diskussion 4.1.14)

Die Messungen zeigen, dass die Anwesenheit von Magnesium, Cobalt und Mangan für die Aktivität der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* am besten geeignet ist. Die ausschließliche Anwesenheit von Calcium senkte die Aktivität um 50 %. Bei den Metallionen Zink und Kupfer konnte gar keine Aktivität gemessen werden.

4.1.8 NMR-Untersuchungen

Alle NMR-Messungen und Auswertungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Werner Römisch durchgeführt.

Die Reaktion der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* wurde mit $[U-^{13}C_{10}, U-^{15}N_5]GTP$ als Substrat wie unter 3.4.7 beschrieben per ^{13}C -NMR-Spektroskopie beobachtet. Neben Formiat entstanden zwei Produkte, die mittels

zweidimensionaler NMR-Techniken als α - und β -Anomere von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat identifiziert werden konnten. Im HMQC Spektrum sind für den Zuckerbereich zehn ^1H , ^{13}C Korrelationen zu erkennen, was einem doppelten Signalsatz entspricht (Abbildung 4.8, linke Seite). Mit Hilfe des ^{13}C -TOCSY-Spektrums konnten diese Signale zwei verschiedenen Spinsystemen und somit den jeweiligen Anomeren zugeordnet werden (Abbildung 4.8, rechte Seite).

Die gewonnenen NMR-Daten der GTP-Cyclohydrolase II-Produkte stimmen weitgehend mit früheren Untersuchungen von Ritz *et al.* an dem Enzym aus *E. coli* überein (Ritz *et al.*, 2001).

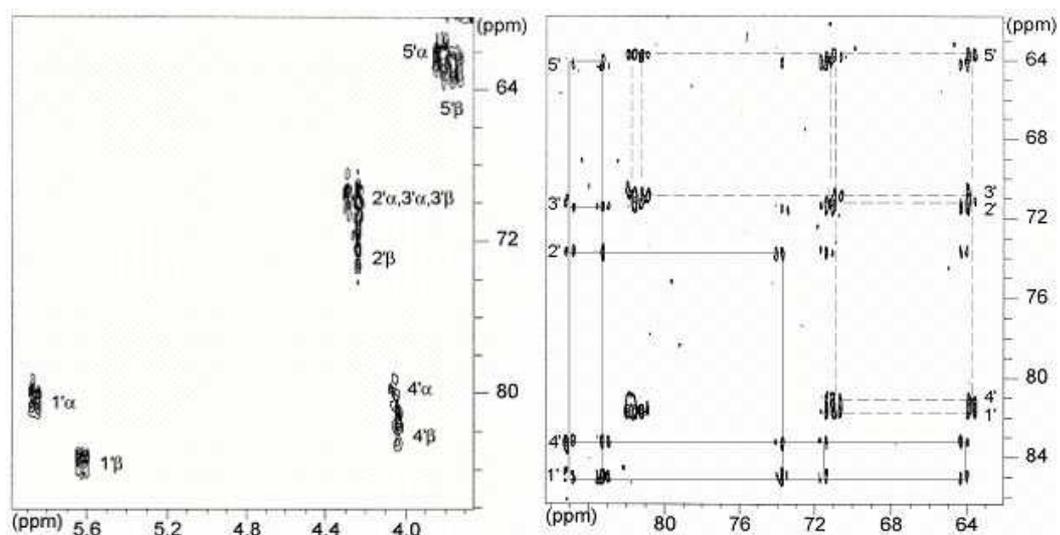


Abbildung 4.8: 2D-NMR-Spektren von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat. Linke Seite: ^1H , ^{13}C -Korrelationspektrum (HMQC). Rechte Seite: ^{13}C TOCSY; die Spinsysteme des β - bzw. α -Anomers sind mit durchgezogenen bzw. gestrichelten Linien gekennzeichnet.

Darüber hinaus wurden die Reaktionen des Enzyms mit $[1\text{'-}^{13}\text{C}_1]\text{GTP}$ als Substrat beobachtet (Abb. Abbildung 4.9). Dabei entstand aufgrund fehlender Kopplungspartner jeweils ein scharfes Singulett mit hoher Intensität für GTP und die beiden Produktanomere. Da sich die Markierung im Produkt am anomeren Kohlenstoffatom befindet, unterscheiden sich die beiden Signale in ihren chemischen Verschiebungen mit 85,1 bzw. 81,7 ppm deutlich voneinander. Dabei

stellen die β -Anomere das primär gebildete Produkt dar, während die α -Anomere zeitlich verzögert entstehen.

Ein Formiatsignal ist bei dieser Spektrenserie nicht zu erkennen, da die Position C-8 im Edukt nicht markiert war.

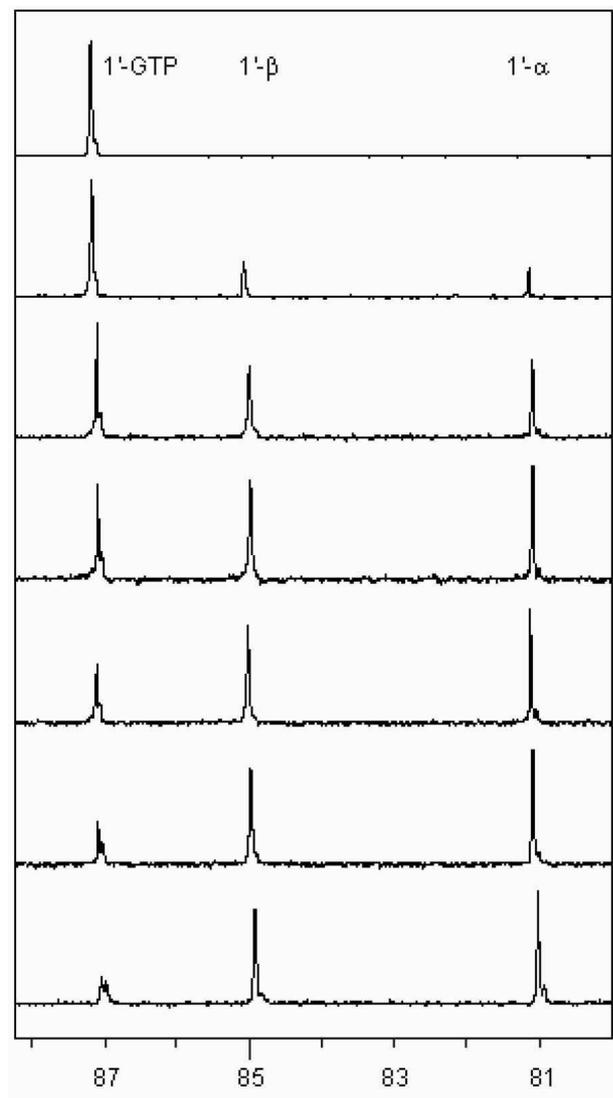


Abbildung 4.9: Zeitaufgelöste ^{13}C -NMR-Spektren der GTP-Cyclohydrolase II aus *C. albicans* mit $[1'-^{13}\text{C}_1]\text{GTP}$ als Substrat.

4.1.9 Analytische Ultrazentrifugation

Aufgrund der Instabilität der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* konnte keine Gleichgewichtssedimentationsanalyse durchgeführt werden (siehe auch Diskussion 4.1.14). Durch Geschwindigkeitssedimentationsanalyse (siehe 3.4.4.2) konnte aber ein Sedimentationskoeffizient von 4,1 S (bei 20 °C in 50 mM Trispuffer, pH 8,5; 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂) ermittelt werden.

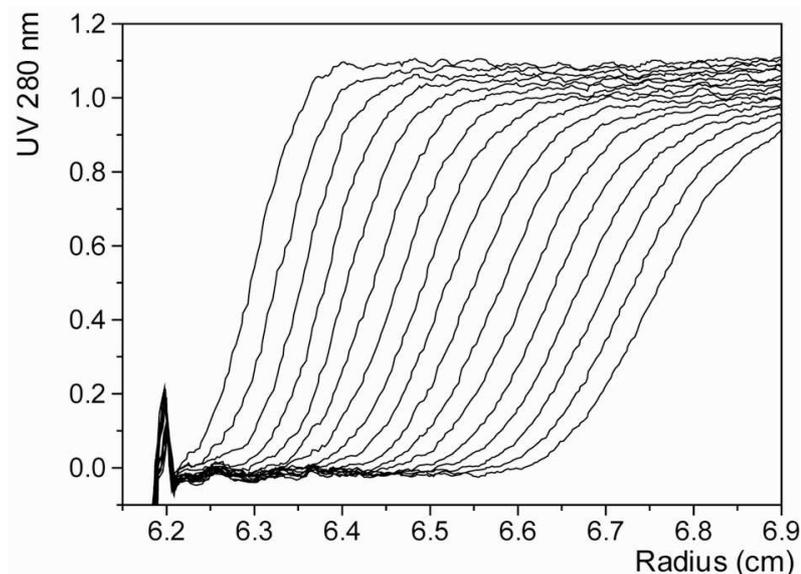


Abbildung 4.10: Sedimentationsgeschwindigkeitslauf der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans*

4.1.10 Konstruktion von CA-H6-Rib1

Um die aufgrund der Instabilität der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* auftretenden Schwierigkeiten bei der Aufreinigung (siehe Diskussion 4.1.14) mittels Anionentauschersäule (Q-Sepharose) und Gelfiltration (Superdex 200) (siehe 4.1.3) zu minimieren, wurde ein Gen konstruiert, das für die GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* mit einer zusätzlich angebrachten Sequenz von 6 Histidinen (His₆-Tag) am N-Terminus codiert. Ziel war es, das modifizierte Enzym (genannt CA-H6-Rib1) dann via Affinitätschromatographie (Nickel Chelating Sepharose-Säule, vgl. 3.3.3) wesentlich effizienter aufzureinigen zu können.

Dazu wurde das überlappende Oligonukleotidpaar CARIB1-H6-*EcoRI-ClaI*-fw und CARIB1-H6-*EcoRI-ClaI*-rv (siehe Primertabelle 6.1) hybridisiert (3.1.3), wodurch ein doppelsträngiges DNA-Fragment entstand, das neben der 5'-Startsequenz (Basenpaare 1-9) von CA-Rib1-syn die Codierung für den His₆-Tag, sowie eine neue Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bam*HI enthielt. Die Oligonukleotide wurden so konstruiert, dass das 5'-Ende des Fragments einen Überhang aufwies, der dem Schnittmuster des Restriktionsenzym *EcoRI* entsprach. Am 3'-Ende entstand das Schnittmuster des Restriktionsenzym *ClaI*. Die Erkennungssequenzen für diese beiden Enzyme liegen auf dem Gen CA-Rib1-syn an entsprechender Stelle jeweils als singuläre Schnittstelle vor.

Nachdem das zuvor aus dem *E. coli*-Stamm ER2925 (siehe Tabelle 2.1 und Diskussion 4.1.14) isolierte Plasmid (siehe 3.1.10) pNCO-CA-Rib1-syn mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *ClaI* verdaut (siehe 3.1.4) und das ausgeschnittene Fragment durch Agarose-gelelektrophorese entfernt wurde (3.2.1), konnten die hybridisierten Oligonukleotide zwischen die beiden Schnittstellen ligiert werden (siehe 3.1.6). Es entstand das Plasmid pNCO-CA-H6-Rib1.

Nach der Transformation in XL1-Blue (3.1.8.1) wurde ein PCR-Screen durchgeführt (3.1.9). Ein analytischer Verdau (3.1.4) der dabei bei den positiven Klonen entstandenen PCR-Fragmente mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI zeigte, welche dieser Klone das neue Fragment mit der zusätzlichen Schnittstelle für dieses Enzym in ihr Plasmid aufgenommen hatten. Die Sequenzen der Plasmide wurden schließlich mittels DNA-Sequenzierung (3.1.12) auf Fehler überprüft.

Danach wurde die Funktionstüchtigkeit des Enzyms CA-H6-Rib1 *in-vivo* (siehe 3.1.15) durch Transformation des Plasmids pNCO-CA-H6-Rib1 in den riboflavinauxotrophen *E. coli*-Stamm Rib7 (siehe Tabelle 2.1) überprüft. Dieser konnte dadurch prototrophiert werden (siehe Abbildung 4.3).

Die Expression von CA-H6-Rib1 in *E. coli* M15[pREP4] (nicht abgebildet) entsprach der des unter 4.1.1 beschriebenen Enzyms ohne His₆-Tag, CA-Rib1-syn. Reinigungsversuche über Nickel-Chelating-Sepharose-Säulen (siehe 3.3.3) schlugen jedoch fehl, das Protein wurde in allen Versuchen bereits beim Auftragen mit dem Auftragspuffer von der Säule eluiert. Das Protein CA-H6-Rib1 war also nicht in der Lage an dem Nickel des Säulenmaterials zu binden (siehe Diskussion 4.1.14). Eine Edman-Sequenzierung aus dem Rohextrakt (3.4.2) ergab die zu erwartende Aminosäureabfolge MHHHHHHGST.

4.1.11 Konstruktion der N-trunkierten Mutante CA-NT-H6-Rib1

Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener GTP Cyclohydrolasen II (siehe Abbildung 1.4) wird deutlich, dass die GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* am N-Terminus eine Sequenz von 70 Aminosäuren aufweist, die mit keiner anderen GTP Cyclohydrolase II übereinstimmt. Um zu prüfen, ob diese Sequenz Einfluss auf die Stabilität und Aktivität des Enzyms hat, wurden die ersten 70 Aminosäuren mittels PCR aus dem Gen CA-Rib1-syn entfernt. Zusätzlich erhielt dieses Konstrukt einen N-terminalen His₆-Tag.

Dazu wurden in einem ersten PCR-Schritt (siehe 3.1.1) mit den Primern CAH6R1-1 und CAH6R1-390-2 (siehe Primertabelle 6.1) die Basenpaare 250 bis 584 aus dem Plasmid pNCO-CA-Rib1-syn amplifiziert. Das Fragment wurde per Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (3.1.5.2) und als Templat für einen zweiten PCR-Schritt mit den Primern CAH6R1-Rbs-*EcoRI*-3 und CAH6R1-390-2 eingesetzt, bei dem es am 5'-Ende um eine Sequenz verlängert wurde, die neben dem His₆-Tag und der ribosomalen Bindungsstelle auch eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *EcoRI* enthielt. Das PCR-Fragment wurde über ein HiBind-DNA-Säulchen gereinigt (siehe 3.1.5.1) und, ebenso wie das Plasmid pNCO-CA-Rib1-syn, mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *Bam*HI verdaut (siehe 3.1.4). Nach der Aufreinigung über Agarosegele wurden die beiden Komponenten ligiert (siehe 3.1.6); es entstand das Plasmid pNCO-CA-H6-NT-Rib1.

Nach Transformation in XL1-Blue (3.1.8) und PCR-Screen (3.1.9) wurde das Plasmid durch DNA-Sequenzierung (3.1.12) auf Fehler in der Basenfolge überprüft. Prototrophierungsexperimente mit *E. coli* Rib7-Mangelmutanten (siehe Tabelle 2.1 und 3.1.15) zeigten, dass die Aktivität des N-trunkierten Enzyms CA-H6-NT-Rib1 erhalten geblieben war (siehe Abbildung 4.3).

4.1.12 Expression und Reinigung von CA-NT-H6-Rib1

Das Plasmid pNCO-CA-H6-NT-Rib1 wurde in den *E. coli*-Stamm M15[pREP4] (Tabelle 2.1) transformiert (3.1.8.1) und unter den in 3.1.13 beschriebenen Bedingungen exprimiert. 3 g der geernteten feuchten Zellmasse wurden in 30 ml Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 300 mM NaCl; 1 mM MgCl₂) suspendiert und durch Behandlung mit Ultraschall (3.3.1) aufgeschlossen. Die deutliche

Proteinbande bei ca. 31 kDa auf dem SDS-Gel des Rohextraktes (Abbildung 4.11) zeigt, dass das Protein in ausreichender Menge in löslicher Form exprimiert wurde. Im Gegensatz zu dem Enzym CA-H6-Rib1 (vgl. 4.1.10) konnte die N-trunkierte GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* nun mit Hilfe des His₆-Tag über eine Nickel-Chelating-Sepharose-Säule aufgereinigt werden (siehe auch Diskussion 4.1.14). Der Rohextrakt wurde auf die Säule aufgetragen und diese nach 3.3.3 entwickelt. Die einzelnen Fraktionen wurden per SDS-Gelelektrophorese (siehe 3.2.2) sichtbar gemacht. Das Enzym CA-H6-NT-Rib1 eluierte bei einer Imidazolkonzentration von 250 mM in ausreichender Reinheit (siehe Abbildung 4.11), so dass kein weiterer Reinigungsschritt mehr nötig war. Die Fraktionen, die das Enzym enthielten, wurden vereint und durch Ultrafiltration (siehe 3.3.4) mit einer 10 kDa-Membran auf ein Volumen von 2,5 ml eingengt. Das gereinigte Enzym wurde über ein illustra NAP-25-Säulchen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach der unter 3.3.3 beschriebenen Methode in einen imidazolfreien Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 100 mM KCl; 1 mM MgCl₂) überführt (siehe Diskussion 4.1.14). Eine Edman-Sequenzierung (3.4.2) ergab die zu erwartende Aminosäureabfolge MHHHHHHGSL. Abbildung 4.11 zeigt den Verlauf der Reinigung.

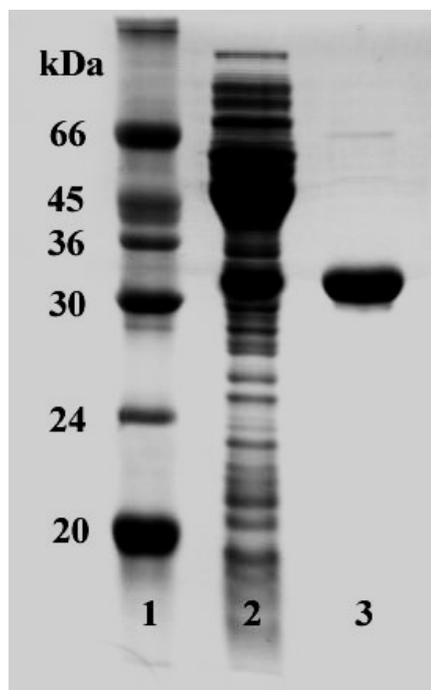


Abbildung 4.11: 14%iges SDS-Gel der Reinigung der N-trunkierten GTP Cyclohydrolase II mit His₆-Tag aus *C. albicans*: 1: Marker; 2: Rohextrakt; 3: Nickel-Chelating-Sepharose-Säule

4.1.13 Charakterisierung von CA-NT-H6-Rib1

Für das Enzym CA-NT-H6-Rib1 wurde direkt nach der Reinigung die spezifische Aktivität wie unter 3.4.3.1 beschrieben bestimmt. Bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C und einem pH-Wert von 8,5 ergab sich eine spezifische Aktivität von 280 nmol min⁻¹ mg⁻¹ (siehe Diskussion 4.1.14).

Ebenso wie mit dem Enzym CA-Rib1-syn (vgl. 4.1.9) war auch mit CA-NT-H6-Rib1 aufgrund der geringen Stabilität keine Sedimentationsgleichgewichtsanalyse möglich (siehe Diskussion 4.1.14). Geschwindigkeits sedimentationsläufe (3.4.4.1) ergaben einen Sedimentationskoeffizienten von 3,9 S (bei 20 °C in 50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂) (siehe Diskussion 4.1.14).

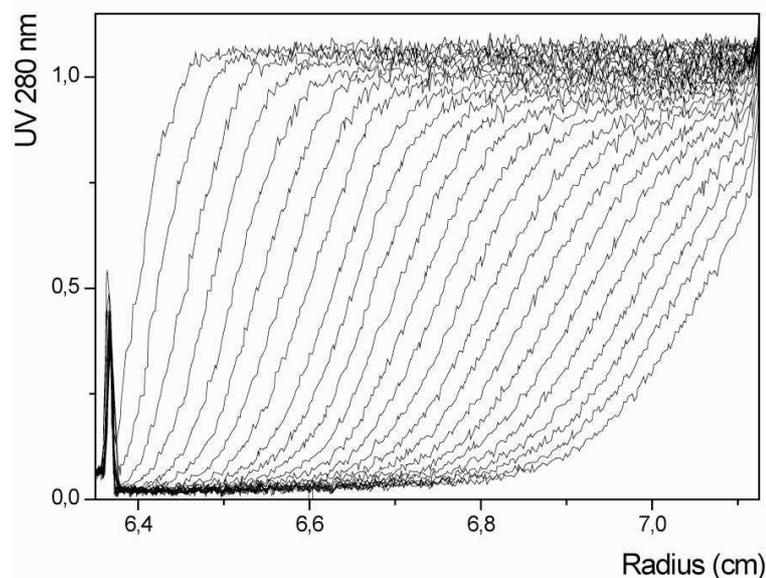


Abbildung 4.12: Sedimentationsgeschwindigkeitslauf der N-trunkierten GTP Cyclohydrolase II mit His₆-Tag aus *C. albicans*.

Zur Bestimmung des Zinkgehaltes wurde das gereinigte Enzym in einer Endkonzentration von 9,2 µM in 10% HNO₃ zur Atomabsorptionsspektroskopie (3.4.6) eingesetzt. Tabelle 4.5 fasst die Ergebnisse der Messungen zusammen. Grundlage der Zinkbestimmung war eine analog zu 4.1.6 aufgenommene Eichgerade.

Tabelle 4.5: Messwerte der Zinkbestimmung für die N-trunkierte GTP Cyclohydrolase II mit His₆-Tag aus *C. albicans* mittels Flammen-AAS:

Probe	Absorption	Zinkkonz. [mg/l]
Nullwert (Millipore)	0,0010	0,000
Standard 1 [0,2 mg/l]	0,0064	0,200
Standard 2 [0,4 mg/l]	0,0125	0,400
Standard 3 [0,8 mg/l]	0,0291	0,800
Standard 4 [1,6 mg/l]	0,0590	1,600
CA-NT-H6-Rib1	0,0162	0,484

Die Messung ergab einen Zinkgehalt des Enzyms CA-NT-H6-Rib1 von 0,8 Zinkionen pro aktivem Zentrum (siehe Diskussion 4.1.14). Die ermittelte Nachweisgrenze lag bei 0,08 mg/l.

4.1.14 Diskussion

Die zunächst schwache Expression der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* in *E. coli* konnte durch die Anpassung der Basentriplets des Gens an die *E. coli*-Codonpräferenz deutlich gesteigert werden. Die so erreichte Expressionsrate vereinfachte das weitere Vorgehen mit dem Enzym stark, vor allem hinsichtlich dessen geringer Stabilität, die den Einsatz von stets frisch aufgereinigtem Enzym für alle Versuche erforderlich machte. Diese Instabilität äußert sich in einem raschen Abbau der spezifischen Aktivität, begleitet von einer auf SDS-Gelen sichtbaren Bildung von stetig größer werdenden Abbaubanden unterhalb der Proteinbande. So konnte nach einer Lagerung über Nacht bei 4 °C am nächsten Morgen nur noch eine um bis zu 50% verringerte spezifische Aktivität gemessen werden. Bei höheren Temperaturen verlief der Abbau entsprechend schneller.

Die kinetischen Untersuchungen der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* (siehe 4.1.5) ergaben eine im Vergleich zu GTP Cyclohydrolasen II aus anderen Organismen sehr hohe spezifische Aktivität von 363 nmol mg⁻¹ min⁻¹ (z.B. *E. coli*: 182 nmol mg⁻¹ min⁻¹; (Kaiser *et al.*, 2002)).

Aufgrund der Instabilität war auch eine Bestimmung des nativen Molekulargewichtes des Enzyms mittels analytischer Ultrazentrifugation nicht möglich (siehe 4.1.9). Während die Geschwindigkeits sedimentationsläufe mit der geringen Versuchsdauer von 2 h reproduzierbare Ergebnisse lieferten, ergaben die

Gleichgewichtssedimentationsläufe mit einer Versuchsdauer von 72 h keine brauchbaren Messwerte. Das native Molekulargewicht der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* konnte somit nur annäherungsweise über das Elutionsvolumen von einer zuvor kalibrierten Gelfiltrationssäule abgeschätzt werden (siehe 4.1.4).

Es wurde versucht, die Stabilität des Enzyms in Lösung durch die Zugabe des Proteinaseinhibitors PMSF und von Glycerin zum Puffer zu erhöhen, was jedoch keine Verbesserung brachte. Die beste Methode zur Erhaltung des Enzyms war das nach der Reinigung sofortige Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und die anschließende Lagerung im Gefrierschrank bei -80 °C. Die Aktivitätsverluste und die Bildung von Abbaubanden waren bei diesem Vorgehen nach schonendem Auftauen bei Raumtemperatur zu vernachlässigen. Dennoch wurde für die meisten Versuche der Einsatz von frisch aufgereinigtem Enzym bevorzugt. Die regelmäßigen Aufreinigungen waren jedoch immer mit hohem Arbeitsaufwand verbunden, da auch hier ein schnelles Vorgehen unter möglichst guter Kühlung Voraussetzung für ein gutes Reinigungsergebnis war. Da eine Lagerung des Enzyms über Nacht im Kühlschrank nicht möglich war, mussten vom Aufschluss an alle Reinigungsschritte, sowie die entsprechenden anschließenden Messungen zügig und am selben Tag erfolgen.

All diese Tatsachen sprachen für die Konstruktion eines Enzyms mit His₆-Tag, das sich dann per Affinitätschromatographie erheblich schneller aufreinigen lassen sollte.

Bei der Klonierung des Konstruktes mit N-terminalem His₆-Tag, CA-H6-Rib1 (siehe 4.1.10) kam es zu Problemen bei dem Verdau des Plasmids pNCO-CA-Rib1-syn mit dem Restriktionsenzym *Cla*I. Da sich an Position 12 des Gens für die GTP Cyclohydrolase II eine stille Mutation befand (C statt A), entstand an dieser Stelle die Erkennungssequenz für die dam-Methyltransferase (GATC). Da der *E. coli*-Stamm XL1-Blue, aus dem die Plasmide standardmäßig isoliert wurden, dieses Enzym besitzt, war die Plasmid-DNA an dieser Stelle methyliert und somit gegen den Verdau durch das Restriktionsenzym *Cla*I, dessen Erkennungssequenz (ATCGAT) in dem methylierten Bereich lag, geschützt. Nach Erkennung dieses Problems konnte es durch die Gewinnung des Plasmids aus dem dam-Methyltransferase-freien *E. coli*-Stamm ER2925 (Tabelle 2.1) schnell gelöst werden. Der erste Versuch einer affinitätschromatographischen Reinigung mit einem N-terminalen His₆-Tag schlug jedoch fehl (siehe 4.1.10). Das konstruierte Protein CA-H6-Rib1 war zwar funktionsfähig und wurde in *E. coli* gut exprimiert, jedoch

erwies sich der N-Terminus als nicht geeigneter Ort für einen His₆-Tag. Das Protein konnte nicht an das Nickel der Chelating Sepharose-Säule binden. Offensichtlich ist der N-Terminus der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* aufgrund der Tertiärstruktur des Proteins nicht gut zugänglich und somit wurde der His₆-Tag nicht nach außen präsentiert. Ein weiterer Ansatz wäre die Konstruktion eines C-terminalen His₆-Tags.

Die Entfernung der ersten 70 Aminosäuren der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans*, welche keine Übereinstimmung mit GTP Cyclohydrolasen II aus anderen Organismen zeigten (vgl. 4.1.11), erlaubte neben der Untersuchung des Einflusses dieser Anfangssequenz auf die Stabilität und Aktivität des Enzyms auch einen neuen Versuch zur Konstruktion eines N-terminalen His₆-Tags. Das entsprechend erzeugte N-terminal trunkeerte Enzym CA-NT-H6-Rib1 ließ sich nun mittels Affinitätschromatographie unter deutlich reduziertem Zeitaufwand aufreinigen (siehe 4.1.12). Die spezifische Aktivität entsprach zwar nur noch 80% derer des nativen Enzyms, jedoch ergab auch die Atomabsorptionsspektroskopie eine auf 80% verringerte Zinkbelegung (siehe 4.1.13). Der Aktivitätsverlust hängt demnach wahrscheinlich mit dem Herauslösen des Zinkions aus dem aktiven Zentrum zusammen, vermutlich verursacht durch den Komplexbildner Imidazol, welcher als Elutionsmittel für die Nickel Chelating Sepharose-Säule diente. Daher wurde das Enzym im Anschluss an den Affinitätschromatographieschritt immer rasch in einen imidazolfreien Puffer überführt (siehe 4.1.12).

Das N-trunkeerte Enzym zeigte im Vergleich zum nativen keine Verbesserung der Stabilität. Auch hier war keine Bestimmung des Molekulargewichtes mittels analytischer Ultrazentrifugation möglich. Es konnte ebenfalls lediglich ein Geschwindigkeitssedimentationslauf durchgeführt werden.

4.2 GTP Cyclohydrolase II aus *Candida glabrata*

Ausgangspunkt für dieses Projekt war das von Prof. Dr. Markus Fischer freundlicherweise zur Verfügung gestellte Expressionskonstrukt pNCO-CG-Rib1-H6. Dieses Plasmid enthielt das Gen für die GTP Cyclohydrolase II aus *Candida glabrata* (Accession number XM446151) mit C-terminalem His₆-Tag. Das Gen codiert für ein Protein aus 303 Aminosäuren (34,4 kDa).

Das Plasmid wurde in den *E. coli*-Stamm XL-1 (Tabelle 2.1) transformiert (siehe 3.1.8.1) und die positiven Transformanden mittels PCR-Screen (siehe 3.1.9) identifiziert. Die Sequenzen der Plasmide wurden schließlich mittels DNA-Sequenzierung (3.1.12) auf Fehler überprüft.

4.2.1 *In vivo*-Assay

Die Funktionstüchtigkeit der GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata* wurde wie unter 3.1.15 beschrieben *in vivo* durch Transformation des Expressionsplasmids pNCO-CG-Rib1-H6 in den riboflavinauxotrophen *E. coli*-Stamm *Rib7* (siehe Tabelle 2.1) überprüft. Zur Negativkontrolle wurde das Plasmid pNCO113 ohne Insert transformiert. Die Vitalität der Transformanden wurde durch Inkubation auf LB-Agarplatten mit 170 mg/l Ampicillin über 24 Stunden bei 37 °C untersucht. Gleichzeitig wurde auf LB-Agarplatten, die zusätzlich 400 mg/l Riboflavin enthielten, geprüft, ob die Transformation erfolgreich war. Die deutliche Kolonienbildung in Abbildung 4.13 zeigt, dass die GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata* in der Lage ist, den Stamm zu prototrophieren.

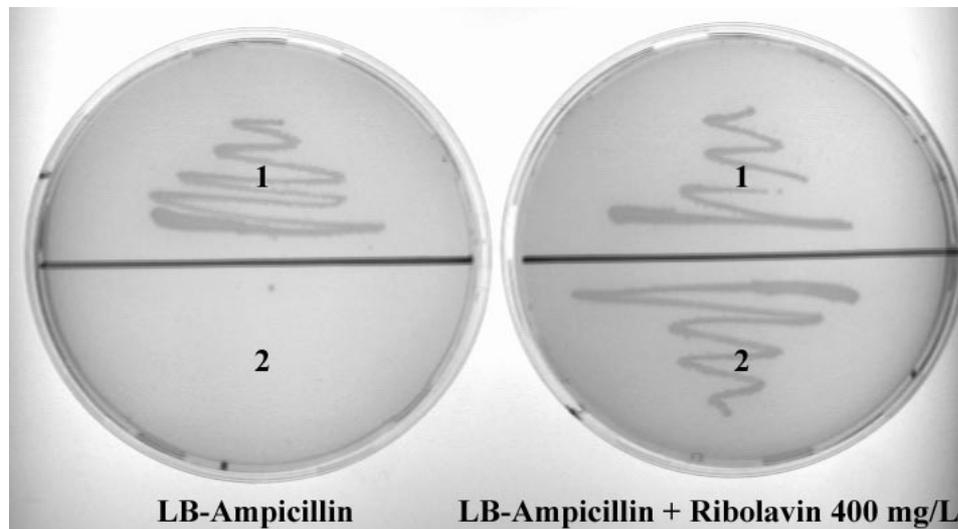


Abbildung 4.13: Ausstriche der *Rib7* Mutanten nach dem Prototrophierungsversuch mit dem Plasmid pNCO-CG-Rib1-H6. 1: *Rib7*-pNCO-CG-Rib1-H6; 2: Negativkontrolle (*Rib7*-pNCO113 ohne Insert). Links: LB-Agarplatte mit 170 mg/l Ampicillin; Rechts: LB-Agarplatte mit 170 mg/l Ampicillin und 400 mg/l Riboflavin.

4.2.2 Expression und Reinigung von CG-Rib1-H6

Das Plasmid pNCO-CG-Rib1-H6 wurde in den *E. coli*-Stamm M15[pREP4] (Tabelle 2.1) transformiert (3.1.8.1) und die entstandenen Klone wie unter 3.1.13 beschrieben angezogen. Expressionsversuche im analytischen Maßstab ergaben eine Temperatur von 37 °C und eine Expressionsphase von 5 h nach Induktion mit 1 mM IPTG als optimale Anzuchtbedingungen. Die deutliche Proteinbande bei ca. 34,4 kDa, dem rechnerischen Molekulargewicht einer Untereinheit, auf dem SDS-Gel des Rohextraktes (Abbildung 4.14) zeigt, dass das Protein so in ausreichender Menge und in löslicher Form exprimiert wurde.

Aufgrund ihres C-terminalen His₆-Tags konnte die GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata* mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dazu wurden 5 g der geernteten feuchten Zellmasse in 30 ml Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 300 mM NaCl; 1 mM MgCl₂) resuspendiert und durch Behandlung mit Ultraschall (3.3.1) aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde auf eine Nickel-Chelating-Sepharose-Säule aufgetragen und diese bei 4 °C nach 3.3.3 entwickelt. Die

einzelnen Fraktionen wurden per SDS-Gelelektrophorese (siehe 3.2.2) sichtbar gemacht. Die GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata* eluierte bei einer Imidazolkonzentration von 250 mM von der Säule. Die Fraktionen, die das Enzym enthielten, wurden vereint und durch Ultrafiltration (siehe 3.3.4) mit einer 10 kDa-Membran bei 4 °C auf ein Volumen von 5 ml eingeeengt. Die Lösung wurde dann auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200) aufgetragen und diese nach 3.3.3 entwickelt (Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 100 mM KCl; 1 mM MgCl₂). SDS-Gele der einzelnen Fraktionen zeigten, dass die GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata* bei einem Volumen von 200 ml von der Säule eluierte (siehe Diskussion 4.2.6). Die Fraktionen, die das Enzym enthielten, wurden vereint und nach Konzentrationserhöhung auf ca. 10 mg/ml mittels Ultrafiltration sofort kühl gelagert. Eine Edman-Sequenzierung (3.4.2) ergab die zu erwartende N-terminale Aminosäuresequenz MSLPVVQCIA. Abbildung 4.14 fasst die vereinten Fraktionen nach jedem Reinigungsschritt zusammen.

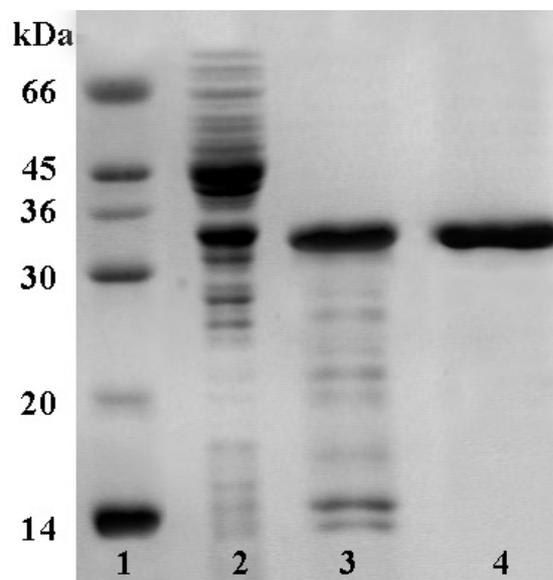


Abbildung 4.14: 14%iges SDS-Gel der Reinigung der GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata*: 1: Marker; 2: Rohextrakt; 3: Nickel-Chelating-Sepharose-Säule; 4: Superdex 200

4.2.3 Analytische Ultrazentrifugation

Durch analytische Ultrazentrifugation konnten klare Erkenntnisse über die Quartärstruktur der GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata* gewonnen werden. Sowohl der durch Geschwindigkeitssedimentationsanalyse (siehe 3.4.4.2 und Abbildung 4.15) ermittelte Sedimentationskoeffizient von 4,1 S (bei 20 °C in 50 mM Trispuffer, pH 8,5; 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂), als auch die durch Gleichgewichtssedimentationsanalyse (siehe 3.4.4.1 und Abbildung 4.16) mit 15000 rpm ermittelte Masse von 68,5 kDa (bei 4 °C in 50 mM Trispuffer, pH 8,5; 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂) stehen in Einklang mit dem Ergebnis des Gelfiltrationslaufes (siehe 4.2.2 und Diskussion 4.2.6), dass es sich bei der GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata* um ein Dimer handelt. Das rechnerische Molekulargewicht für eine Untereinheit des Enzyms mit His₆Tag beträgt 34,4 kDa.

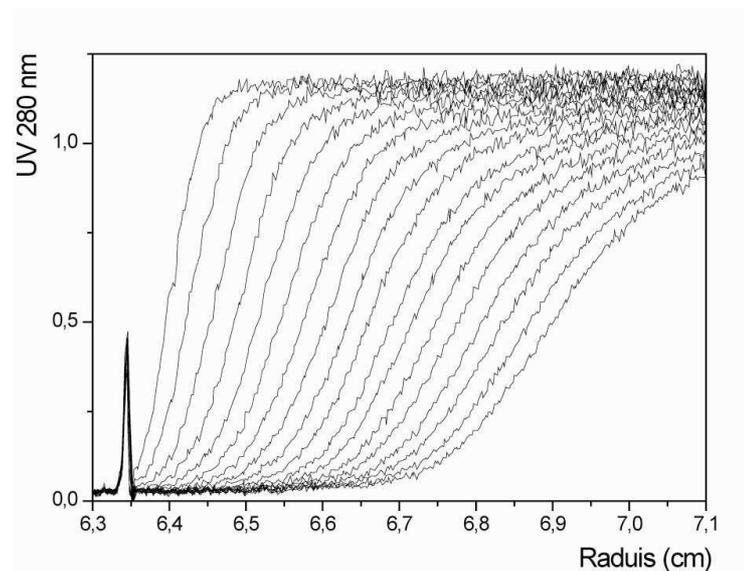


Abbildung 4.15: Sedimentationslauf der GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata*.

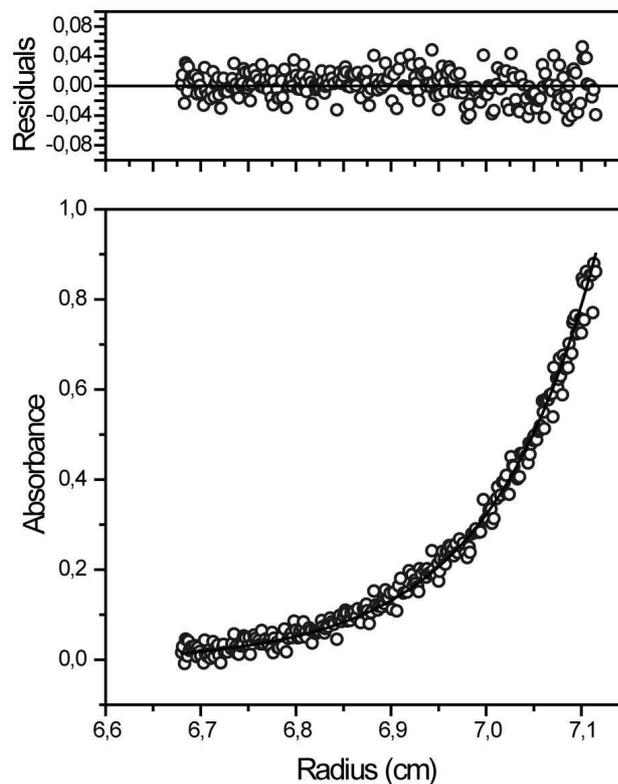


Abbildung 4.16: Gleichgewichtssedimentationslauf der GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata*

4.2.4 Kinetische Charakterisierung

Die frisch aufgereinigte GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata* (siehe 4.2.2) wurde in einer Endkonzentration von $1,5 \mu\text{M}$ zur kinetischen Charakterisierung (nach 3.4.3.3) eingesetzt. Die Reaktionstemperatur betrug $37 \text{ }^\circ\text{C}$, der pH-Wert des Reaktionspuffers 8,5. Die Konzentration des Substrats GTP wurde von $6,1 \mu\text{M}$ – $875 \mu\text{M}$ variiert. Die kinetischen Untersuchungen im „steady-state“ ergaben für die GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata* eine Michaelis-Menten Konstante von $K_M = 30 \mu\text{M} (\pm 1)$ bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von $v_{\text{max}} = 85 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1} (\pm 2)$ (siehe Diskussion 4.2.6). Abbildung 4.17 zeigt den Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration.

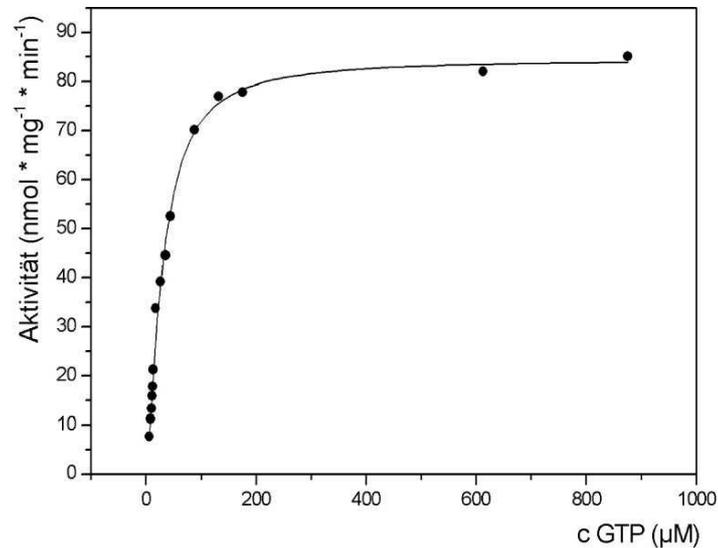


Abbildung 4.17: Kinetische Charakterisierung der GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata*: Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration. Die durchgezogene Linie stellt die Fitkurve dar.

4.2.5 Zinkbestimmung

Zur Bestimmung des Zinkgehaltes der GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata* wurde eine Flammenatomabsorptionsspektroskopie wie unter 3.4.6 beschrieben durchgeführt. Das Enzym wurde in einer Endkonzentration von 5,2 µM in 10% HNO₃ zur Messung eingesetzt. Tabelle 4.6 fasst die Ergebnisse der Messungen zusammen. Grundlage der Zinkbestimmung war eine analog zu 4.1.6 aufgenommene Eichgerade.

Tabelle 4.6: Messwerte der Zinkbestimmung für die GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata* mittels Flammen-AAS.

Probe	Absorption	Zinkkonz. [mg/l]
Nullwert (Millipore)	0,0000	0,000
Standard 1 [0,2 mg/l]	0,0540	0,200
Standard 2 [0,4 mg/l]	0,1005	0,400
Standard 3 [0,8 mg/l]	0,1904	0,800
Standard 4 [1,6 mg/l]	0,3366	1,600
CG-Rib1-H6	0,0704	0,270

Die Messung ergab für die GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata* einen Zinkgehalt von 0,8 Zinkionen pro Untereinheit (siehe Diskussion 4.2.6).

4.2.6 Diskussion

Die gesamte Arbeit an der GTP Cyclohydrolase II aus *C. glabrata* basierte auf dem bereits mit C-terminalem His₆-Tag versehenen Konstrukt CG-Rib1-H6 (siehe 4.2). Da keine Untersuchungen am nativen Enzym vorgenommen wurden, sind auch keine Aussagen über den Einfluss des His₆-Tags auf dessen Eigenschaften möglich.

Im Vergleich zu der GTP Cyclohydrolase II aus *C. albicans* (siehe 4.1) ist das Enzym aus *C. glabrata* relativ stabil. Es konnte ohne Aktivitätsverluste und ohne die auf SDS-Gelen sichtbare Bildung von Abbaubanden bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert werden. Dennoch wurde für alle Experimente der Einsatz von frisch aufgereinigtem Enzym bevorzugt.

Aufgrund der besseren Stabilität konnte bei diesem Enzym nun auch die Quartärstruktur mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmt werden (siehe 4.2.3). Die so ermittelte Dimerstruktur stimmt mit den Quartärstrukturen der bisher untersuchten GTP Cyclohydrolasen II (vgl. 4.1.4 und 1.4) überein. Auch das durch Gelfiltration ermittelte Elutionsvolumen des Enzyms von 200 ml (siehe 4.2.2) ergibt ein Molekulargewicht von 69 kDa (Ermittlung des Molekulargewichtes siehe 3.4.5). Es kam dabei die selbe Superdex 200-Säule zum Einsatz, die zur Bestimmung des Molekulargewichtes des Enzyms aus *C. albicans* kalibriert wurde (siehe 4.1.4).

Bei der Zinkbestimmung mittels Flammenatomabsorptionsspektroskopie wurden bei allen Messungen (sowohl bei den Proben als auch bei den Standards) im Vergleich zu einer früheren Messung (siehe 4.1.6) deutlich höhere Absorptionen detektiert. Die Messwerte für die Kalibriergerade und die Proben führten jedoch zu sinnvollen und realistischen Ergebnissen. Da zwischen den beiden Messungen mehr als zwei Jahre lagen, ist es möglich, dass die unterschiedlichen Absorptionen durch Wartung, Verschleiß, den Austausch der Hohlkathodenlampe oder durch von anderen Benutzern veränderte Parameter entstanden sind.

Die Zinkbestimmung ergab für das Enzym CG-Rib1-H6 0,8 Zinkionen pro Untereinheit (vgl. 4.2.5). Wie auch unter 4.1.14 für das Enzym aus *C. albicans* beschrieben, kann für das Herauslösen des Zinkions aus dem aktiven Zentrum auch hier das Imidazol, welches als Elutionsmittel für die Nickel Chelating Sepharose-Säule diente (siehe 4.2.2), verantwortlich sein. Daher ist es bei der Reinigung des Enzyms wichtig, zwischen dem Affinitätschromatographieschritt und dem Gelfiltrationsschritt möglichst wenig Zeit vergehen zu lassen, um den imidazolhaltigen Puffer möglichst schnell zu entfernen.

4.3 GTP Cyclohydrolase II aus *Archaeoglobus fulgidus*

Sequenzanalysen zeigten, dass das Gen AF-RibA aus *Archaeoglobus fulgidus* (Accession Nummer NC_000917.1) für ein Protein codiert, das am C-Terminus eine Domäne mit hoher Übereinstimmung mit GTP Cyclohydrolasen II aus verschiedenen Organismen aufweist. Daneben enthält das Protein am N-Terminus eine Region mit teilweiser Übereinstimmung mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen aus verschiedenen Organismen. Abbildung 4.18 zeigt die Aminosäuresequenz von AF-RibA im Vergleich mit GTP Cyclohydrolasen II, 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen, sowie bifunktionellen Enzymen mit beiden Domänen aus verschiedenen Bakterien. Daraus ergab sich die Annahme, dass es sich bei AF-RibA um ein bifunktionelles Enzym mit N-terminaler 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase Domäne und C-terminaler GTP Cyclohydrolase II Domäne handelt (siehe Diskussion 4.3.10). Um die beiden Domänen zu untersuchen, sollte das AF-RibA-Gen in ein Expressionsplasmid kloniert werden und das Enzym nach Expression in *E. coli* untersucht werden.

```

AF-RibA      -----MEEVSSHVKSGKPVMIL
EC-RibA
AT-RibA      61 TDGSLFDSASFETVDAEITPETDDFFVSDAEGDPDCTQGYSSIELALQATRKGKFVIVV
BS-RibA      -----MFHPIEEALDAKKGEVIVV
EC-RibB      -----MNQTLSSFGTPFERVENALALREGRGMVL

AF-RibA      18 DSEKSAIC----IPAEVVSGEILNFMMKNCDEIRLALTWKQILNLGLNRFRFQNGNLPII
EC-RibA      -----MQLKRVAEAKLPTPWGDFLMVGFEELATG-----
AT-RibA      121 DDETGDVEGNLMAATLTSPKDIAFLIKNGSGIVSVGMKENLERLSTLMSPEMEDEDS
BS-RibA      22 DDEDRENEGDFVALAEHATPEVINFMATHGRGLICTPLSEIADRLDLHPMVEHNTDSHH
EC-RibB      33 DDEDRENEGDMIFPAETMTVEQMALTIRHGSGIVCLCITEDRRKQLDLPMVENNTSAYG

AF-RibA      74 DPNLEKISAEERA-----KFIRELVSGNAGDIKYPGRIEVEETKEMGVLER
EC-RibA
AT-RibA      181 SAPTFTITVDAKSGTSTGVSASDRAMTVLALSSLDAKPDDFRRPGHVFPLKYRDGGVLRR
BS-RibA      82 TAFTVSIDHRETKTG---ISAQERSETVOALLDSKSVPSDFORPGHFPLIAKKGGVLKR
EC-RibB      93 TGFTVTIEAAEGVTTG--VSAADRITVRAIADGAKPSDLNRPGHVFPLRAQAGVLTR

AF-RibA      120 PGIAEACVDLARMAGFAPSAVYAPLMTAE-GVAGEDYALKFAKEHSMPVRIKDMIEFR
EC-RibA
AT-RibA      241 AGHTEASVDLMILAGLRELSVLSAILDOEDCSMASLPYMKKLATEHDIPIVSITDLIRYR
BS-RibA      139 AGHTEAAVDLAEACGSPGAGVICEIMNED-GTMARVPELIEIAKHQLKMITIKDLIOYR
EC-RibB      151 CGHTEATIDLMTLAGFKPAGVLCELTNDD-GTMARAPECIEFANKHNMALVTIEDLVAYR

AF-RibA      179 IKSEKIVERVIEATLPTKF-YGTFRAVGYKTPLGEIVALVKG-RVD-EGDVLVRIHSECL
EC-RibA      -----HDHVALVYG-DISGHTPVLARVHSECL
AT-RibA      301 RKRDKLVERITVSRLPTKWGLFOAYCYRSKLDGTENIALVKG-NVGNGEDLVRVHSECL
BS-RibA      198 YNLTTLVEREVDITLPTDFGTFKVYGTNEVDGKEVAFVMGDVPFGEEPVLVRVHSECL
EC-RibB      210 QAHERKAS-----

AF-RibA      236 TGDVFHSLRCDCGDOLENALKMIDREGKGVAIYMRGHEGRGIGLINKLMAYKLQEEGKDT
EC-RibA      56 TGDALFSLRCDCGFOLEAALTQIAEEGRGILLYHR-QEGRNIGLLNKIRAYALQDOGYDT
AT-RibA      360 TGDIFGSARCDCGNOLDLAMELIEKEGRGVVVYLRGHEGRGIGLGHKLRAYNLQEDGHDT
BS-RibA      258 TGDVFGSHRCDCGPOLHAALNOIAAEGRGVLLYLR-QEGRGIGLINKLAYKLQEOGYDT
EC-RibB

AF-RibA      296 VDANIELGFPPDMRSYGIAAQILMDLKVKSIRLLTNNPLKIEELKKYGFKIVR-EPIEVE
EC-RibA      115 VEANHQLGFAADERDFTLCADMFKLIGVNEVRLLTNNPKKVEILTEAGINIVERVPLIVG
AT-RibA      420 VOANVELGLSIDSREYGIGAOMLRDIGVRTMRLMTNNPAKFTGLKGYGLAVVGRVPVVTP
BS-RibA      317 VEANEALGFLPDLRNYGIGAQILRDLGVRNMKLLTNNPRKIAGLEGYGLSISERVPLQME
EC-RibB

AF-RibA      355 PCEVNLPYLKAKKDKMGHLICFND-----
EC-RibA      175 RNPNEHYLDTKAEKMGHLLNK-----
AT-RibA      480 ITKENRRYMETKRKMGHIYISDNNDOPLA
BS-RibA      377 AKEHNKKYLOTKMNKDGHLLHF-----
EC-RibB

```

Abbildung 4.18: Alignment der Aminosäuresequenzen verschiedener GTP Cyclohydrolasen II, 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen und bifunktioneller Enzyme mit beiden Domänen aus verschiedenen Organismen: AF-RibA: bifunktionelles Enzym aus *Archaeoglobus fulgidus* (Accession No. NP_069320); EC-RibA: GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* (Accession No. CAA48075); AT-RibA: bifunktionelles Enzym aus *Arabidopsis thaliana* (Accession No. BAB09512); BS-RibA: bifunktionelles Enzym aus *Bacillus subtilis* (Accession No. CAB14258); EC-RibB: 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *E. coli* (Accession No. CAA47252). Gleiche Reste sind schwarz, ähnliche Reste grau unterlegt.

4.3.1 Klonierung des Gens AF-RibA

Zunächst wurde in einem ersten PCR-Schritt (siehe 3.1.1) das Gen AF-RibA großzügig (siehe Diskussion 4.3.10) von der chromosomalen DNA von *A. fulgidus* amplifiziert. Die dazu verwendeten Primer AFRibA-CHR-vo und AFRibA-CHR-hi (siehe Primertabelle 6.1) waren so konzipiert, dass sie jeweils 30 Basenpaare vor dem 5'-Ende und nach dem 3'-Ende des Gens für AF-RibA auf der DNA hybridisierten. Das entstandene DNA-Fragment wurde über ein präparatives Agarosegel (siehe 3.1.5.2) gereinigt und als Templat für einen zweiten PCR-Schritt eingesetzt. Dabei wurde das Gen für AF-RibA mit den Selektivprimern AFRibA-H6-*NdeI*-vo und AF-RibA-*Bam*HI-hi (siehe Primertabelle 6.1) von dem Templat amplifiziert und zusätzlich eine His₆-Tag-Sequenz und eine singuläre Schnittstelle für das Restriktionsenzym *NdeI* am 5'-Ende, sowie eine singuläre Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bam*HI am 3'-Ende eingebaut. Das entstandene PCR-Fragment wurde über eine Kartusche gereinigt (3.1.5.1), mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *Bam*HI verdaut (siehe 3.1.4) und in das mit den gleichen Enzymen verdaute Plasmid pT77 (siehe 2.4.3 und Diskussion 4.3.10) ligiert (siehe 3.1.6). Das entstandene Plasmid pT77-AF-H6-RibA wurde zunächst in dem *E. coli*-Stamm XL-1 (siehe Tabelle 2.1) vervielfältigt und nach PCR-Screen (3.1.9) und Sequenzierung (3.1.12) zur Expression in den *E. coli*-Stamm BL21(DE) transformiert (siehe Tabelle 2.1 und Diskussion 4.3.10).

Obwohl die Sequenzierung gezeigt hatte, dass das Plasmid pT77-AF-H6-RibA fehlerfrei war, wurde das Enzym in *E. coli* BL21(DE) nicht exprimiert.

Daher wurde der zweite PCR-Schritt (siehe oben) erneut durchgeführt, das PCR-Fragment wieder mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *Bam*HI verdaut und diesmal in das mit den gleichen Enzymen verdaute Plasmid pET5a (siehe 2.4.3 und Diskussion 4.3.10) ligiert. Expressionsversuche mit dem so entstandenen, zuvor sequenzierten Plasmid pET5a-AF-H6-RibA in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE) und ER2566 (siehe Tabelle 2.1) verliefen jedoch ebenfalls negativ.

Ein weiterer Ansatz lag in der Umklonierung des Gens AF-H6-RibA in das Plasmid pNCO113. Dazu wurde das DNA-Fragment des ersten PCR-Schrittes (siehe oben) als Templat für einen weiteren PCR-Schritt mit den Primern AFRIBA1-*NcoI*-vo und AF-RibA-*Bam*HI-hi (siehe Primertabelle 6.1) eingesetzt. Dabei wurden dem Gen für AF-RibA eine singuläre Schnittstelle für das Restriktionsenzym *NcoI* am 5'-Ende, sowie eine singuläre Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bam*HI am 3'-Ende

eingebaut. Der N-terminale His₆-Tag wurde dabei nicht in das neue Konstrukt übernommen. Das entstandene PCR-Fragment wurde analog zum ersten Klonierungsversuch (siehe oben) über eine Kartusche gereinigt, mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Bam*HI verdaut und in das mit den gleichen Enzymen verdaute Plasmid pNCO113 (siehe Diskussion 4.3.10) ligiert. Das so erzeugte Konstrukt pNCO-AF-RibA wurde in den *E. coli*-Stamm XL-1 transformiert, die Transformanten mit dem passenden Insert per PCR-Screening selektiert (siehe 3.1.9) und die Plasmide auf Fehler in der Basenfolge untersucht (siehe 3.1.12).

Das so erzeugte Plasmid zeigte bei Expressionsversuchen in den *E. coli*-Stämmen XL1-Blue und M15(pREP4) auf dem SDS-Gel (siehe Abbildung 4.20) eine deutliche Proteinbande bei 43 kDa, dem rechnerischen Molekulargewicht einer Untereinheit.

4.3.2 *In vivo*-Assay

Die Funktionstüchtigkeit der beiden Domänen (siehe 4.3) auf dem Enzym AF-RibA wurde nun zunächst *in vivo* durch Prototrophierungsversuche (siehe 3.1.15) in den riboflavinauxotrophen *E. coli*-Stämmen *Rib5* und *Rib7* (siehe Tabelle 2.1) geprüft. Zur Negativkontrolle wurde das Expressionsplasmid pNCO113 ohne Insert in die beiden Stämme transformiert. Die Vitalität der Transformanten wurde durch Inkubation auf LB-Agarplatten mit 170 mg/l Ampicillin über 24 Stunden bei 37 °C untersucht. Gleichzeitig wurde auf LB-Agarplatten, die zusätzlich 400 mg/l Riboflavin enthielten, geprüft, ob die Transformation erfolgreich war. Abbildung 4.19 zeigt, dass das Plasmid pNCO-AF-RibA die GTP Cyclohydrolase II-defiziente Mutante (*Rib7*) prototrophieren kann, nicht jedoch den 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase-defizienten Stamm (*Rib5*). Somit ist offensichtlich die C-terminale GTP Cyclohydrolase II Domäne des Enzyms AF-RibA funktionsfähig, die N-terminale 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase Domäne jedoch nicht (siehe Diskussion 4.3.10).

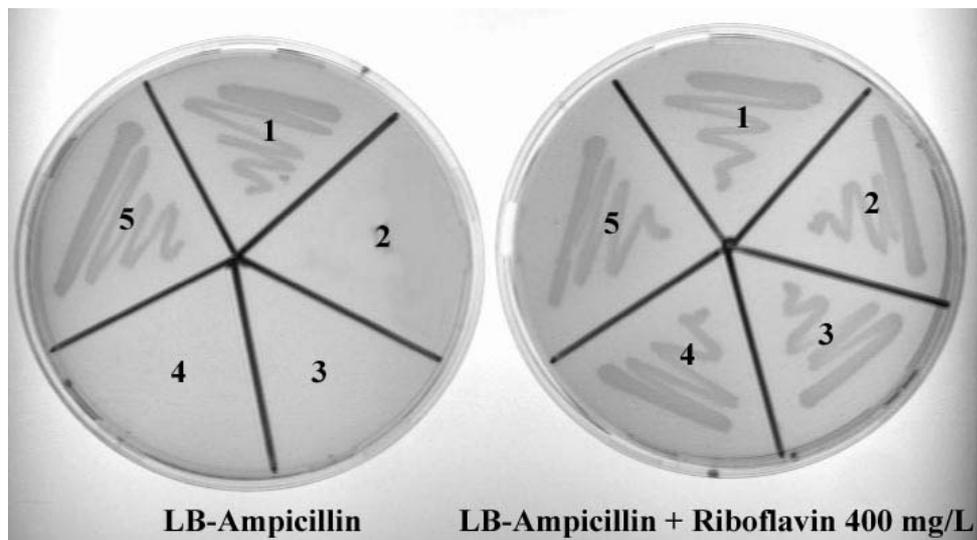


Abbildung 4.19: Ausstriche der *Rib5* / *Rib7* Mutanten nach den Prototrophierungsversuchen mit den Plasmiden pNCO-AF-RibA und pNCO-AF-RibB-H6 (siehe 4.4.2). 1: *Rib7*-pNCO-AF-RibA; 2: *Rib5*-pNCO-AF-RibA; 3: Negativkontrolle (*Rib7*-pNCO113 ohne Insert); 4: Negativkontrolle (*Rib5*-pNCO113 ohne Insert); 5: *Rib5*-pNCO-AF-RibB-H6 (siehe 4.4.2). Links: LB-Agarplatte mit 170 mg/l Ampicillin; Rechts: LB-Agarplatte mit 170 mg/l Ampicillin und 400 mg/l Riboflavin.

4.3.3 Expression und Reinigung von AF-RibA

Die Expression des Proteins RibA aus *A. fulgidus* erfolgte in *E. coli* XL1-Blue (siehe Tabelle 2.1). Expressionsversuche im analytischen Maßstab zeigten, dass in diesem Stamm bei einer Wachstumsdauer von 16 h bei 37 °C die beste Enzymausbeute erreicht wird. Dementsprechend wurde eine Großanzucht nach 3.1.12 durchgeführt. 7 g der geernteten feuchten Zellmasse wurden in 50 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 100 mM KCl; 1 mM MgCl₂) resuspendiert und durch Behandlung mit Ultraschall (3.3.1) aufgeschlossen.

Aufgrund der hohen thermischen Stabilität des Enzyms RibA (siehe Diskussion 4.3.10) konnte als erster Reinigungsschritt eine Hitzefällung (siehe 3.3.2) des Rohextraktes bei 80 °C durchgeführt werden. Aus dem Überstand wurde versucht, das Enzym RibA wie unter 3.3.3 beschrieben durch Anionentauscherchromatographie (Q-Sepharose), hydrophobe Chromatographie (Butylsepharose,

Phenylsepharose) und Gelfiltration (Superdex) zu extrahieren. Mit diesen Methoden war es jedoch nicht möglich, das Enzym ausreichend aufzureinigen.

4.3.4 Konstruktion, Expression und Reinigung von AF-H6-RibA

Nach den Schwierigkeiten bei der Aufreinigung des Proteins RibA aus *A. fulgidus* (siehe 4.3.3) sollte die Affinitätschromatographie (Nickel Chelating Sepharose-Säule, vgl. 3.3.3) als alternative Reinigungsmöglichkeit untersucht werden. Dazu musste jedoch zuerst ein Gen konstruiert werden, das für RibA aus *A. fulgidus* mit einer zusätzlich angebrachten Sequenz von 6 Histidinen (His₆-Tag) codiert.

Dafür wurde das mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Bam*HI verdaute PCR-Fragment, das auch schon unter 4.3.1 zur Ligation in das Plasmid pNCO113 verwendet wurde, zur Ligation in das zuvor mit den gleichen Enzymen verdaute Plasmid pNCO-SB-HIS₆-ACYC184 (siehe 2.4.2) eingesetzt (siehe Diskussion 4.3.10). Das so erzeugte Konstrukt pNCO-AF-H6-RibA mit N-terminalem His₆-Tag wurde in den *E. coli*-Stamm XL-1 transformiert, die Transformanten mit dem passenden Insert per PCR-Screening selektiert (siehe 3.1.9) und die Plasmide auf Fehler in der Basenfolge untersucht (siehe 3.1.12).

Das Enzym RibA mit N-terminalem His₆-Tag wurde analog zu 4.3.3 in XL1-Blue exprimiert, aufgeschlossen und nach Hitzefällung auf eine Nickel-Chelating-Sepharose-Säule aufgetragen. Diese wurde nach 3.3.3 entwickelt und die einzelnen Fraktionen per SDS-Gelelektrophorese (siehe 3.2.2) sichtbar gemacht. Das Enzym AF-H6-RibA eluierte bei einer Imidazolkonzentration von 125 mM. Die Fraktionen, die das Enzym enthielten, wurden vereint, durch Ultrafiltration (siehe 3.3.4) mit einer 10 kDa-Membran auf ein Volumen von 5 ml eingeeengt und auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200, siehe 3.3.3; Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 300 mM NaCl; 1 mM MgCl₂) aufgetragen. Die Betrachtung der Fraktionen per SDS-Gelelektrophorese zeigte, dass das Enzym AF-H6-RibA bei einem Retentionsvolumen von 189 ml in ausreichender Reinheit (Abbildung 4.20) von der Säule eluierte. Abbildung 4.20 zeigt den Verlauf der Reinigung. Eine Edman-Sequenzierung (3.4.2) ergab die zu erwartende Aminosäureabfolge MHHHHHASM, die sich aus dem N-terminalen His₆-Tag und der Spacersequenz (Alanin und Serin, vgl. 2.4.2) ergibt.

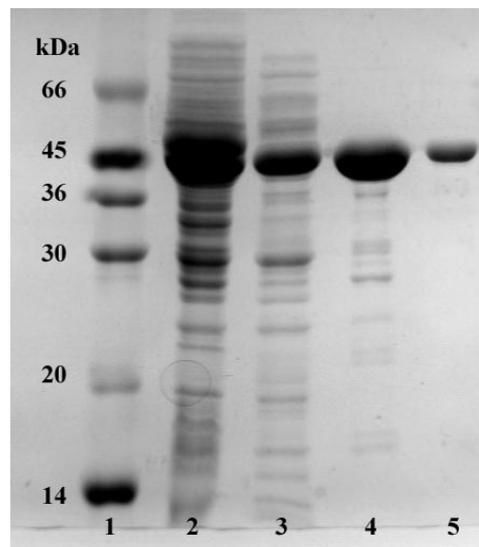


Abbildung 4.20: 14%iges SDS-Gel der Reinigung von AF-H6-RibA: 1: Marker; 2: Rohextrakt; 3: Hitzefällung; 4: Nickel-Chelating-Sepharose; 5: Superdex 200.

4.3.5 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes

Durch das Elutionsvolumen beim letzten Reinigungsschritt (Superdex 200, siehe 4.3.4) konnte das native Molekulargewicht von AF-H6-RibA abgeschätzt werden. Dies war möglich, da die Gelfiltrationssäule zuvor mit definierten Proteinen kalibriert worden war (siehe 3.4.5).

Tabelle 4.7: Eichproteine zur Kalibrierung der Superdex 200 für die Bestimmung des nativen Molekulargewichts von AF-H6-RibA.

Protein	MW [kDa]	log (MW)	Elutionsvolumen [ml]
Ovalbumin	43	1,633	224,5
BSA	67	1,826	214
MG-Lusy ¹	105 ²	2,021	201
Aldolase	158	2,199	191
Katalase	240	2,380	181,5

¹ 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase aus *Magnaporthe grisea* wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Sabine Saller.

² das Enzym liegt als Pentamer vor (Persson et al., 1999); ein Monomer hat ein Molekulargewicht von 21 kDa (NCBI, accession AAD55372).

Gleichung 4.2: Geradengleichung für die Eicherade der Superdex 200 zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts von AF-H6-RibA.

$$\log(\text{MW}) = -0,0171 \cdot V_{\text{Elution}} + 5,4697$$

log (MW): dekadischer Logarithmus des Molekulargewichts
 V_{Elution} Elutionsvolumen [ml]

Bei allen durchgeführten Reinigungen eluierte das Enzym AF-H6-RibA bei einem Volumen von 189 ml von der Superdex 200, was laut Gleichung 4.2 auf ein natives Molekulargewicht von 173 kDa hinweist. Das Enzym mit dem rechnerischen Molekulargewicht von 43,4 kDa pro Untereinheit liegt somit offenbar als Tetramer vor (siehe Diskussion 4.3.10).

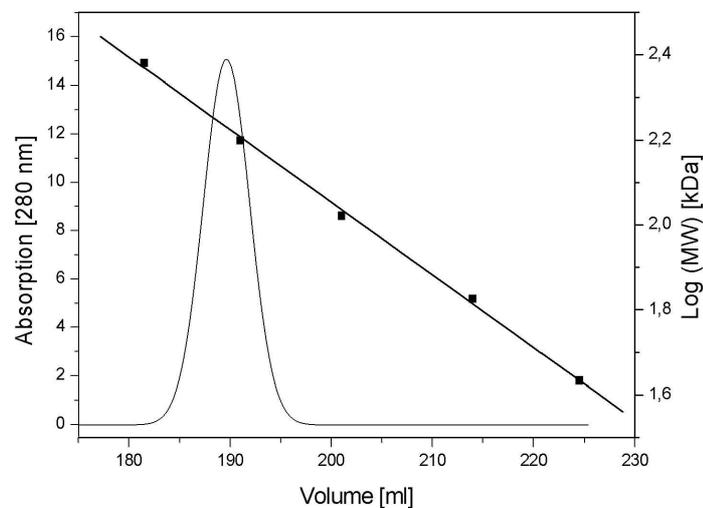


Abbildung 4.21: Gelfiltration: Elutionsprofil von AF-H6-RibA an der Superdex 200 mit der dazugehörigen Eichgeraden.

4.3.6 Analytische Ultrazentrifugation

Durch analytische Ultrazentrifugation konnten weitere Erkenntnisse über die Quartärstruktur des Enzyms AF-H6-RibA gewonnen werden. Sowohl der durch

Geschwindigkeitssedimentationsanalyse (siehe 3.4.4.2) ermittelte Sedimentationskoeffizient von 6,74 S (bei 20 °C in 50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 300 mM NaCl; 1 mM MgCl₂), als auch die durch Gleichgewichtssedimentationsanalyse (siehe 3.4.4.1 und Abbildung 4.22) bei 10300 rpm ermittelte Masse von 175 kDa (bei 4 °C in 50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 300 mM NaCl; 1 mM MgCl₂) stehen im Einklang mit dem Ergebnis des Gelfiltrationslaufes (siehe 4.3.5 und Diskussion 4.3.10), dass es sich bei dem Enzym AF-H6-RibA um ein Tetramer handelt. Das rechnerische Molekulargewicht für eine Untereinheit des Enzyms mit His₆-Tag beträgt 43,4 kDa.

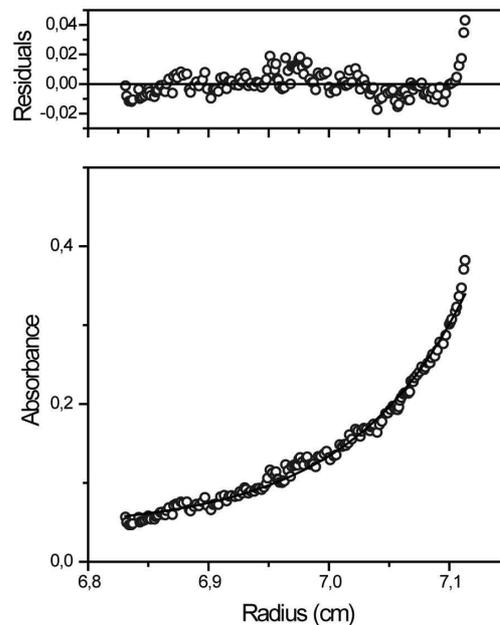


Abbildung 4.22: Gleichgewichtssedimentationslauf von AF-H6-RibA.

4.3.7 Kinetische Charakterisierung

Für die beiden Domänen des Enzyms AF-H6-RibA sollten direkt nach der Reinigung die kinetischen Parameter im „steady-state“ wie unter 3.4.3 beschrieben bestimmt werden. Da die Domäne für die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase keine Aktivität zeigte (siehe Diskussion 4.3.10), konnte nur die GTP Cyclohydrolase II Domäne untersucht werden. Die Reaktionstemperatur bei

den kinetischen Untersuchungen betrug 45 °C, der pH-Wert 8,5. Die Konzentration des Substrats GTP wurde von 13 µM – 2,6 mM variiert. Das Enzym wurde in einer Endkonzentration von 10 µM eingesetzt. Die kinetischen Untersuchungen im „steady-state“ ergaben für die GTP Cyclohydrolase II Domäne von AF-H6-RibA eine Michaelis-Menten Konstante von $K_M = 637 \mu\text{M} (\pm 40)$ bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von $v_{\text{max}} = 18,0 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1} (\pm 0,5)$. Abbildung 4.23 zeigt den Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration.

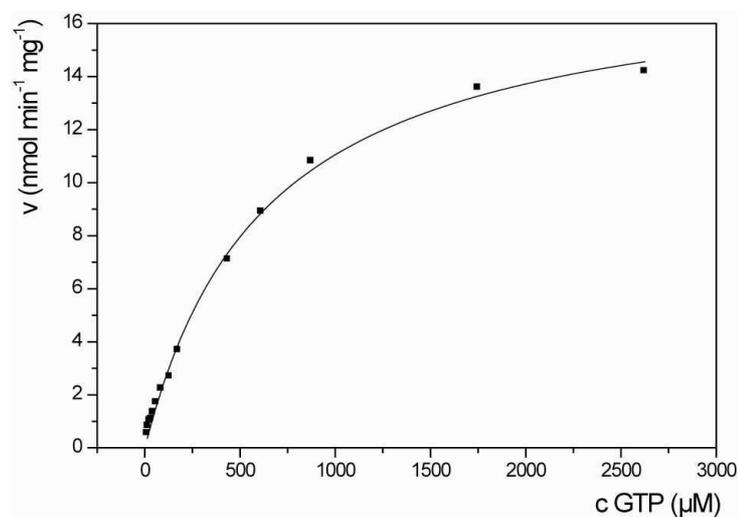


Abbildung 4.23: Kinetische Charakterisierung der GTP Cyclohydrolase II Domäne von AF-H6-RibA: Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration. Die durchgezogene Linie stellt die Fitkurve dar.

4.3.8 Thermodynamische Untersuchungen

Zur Ermittlung der thermodynamischen Parameter für die Reaktion der GTP Cyclohydrolase II Domäne von AF-H6-RibA wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Temperatur ermittelt (Abbildung 4.24). Dazu wurde mit frisch aufgereinigtem Enzym bei Temperaturen von 40 °C bis 95 °C jeweils die spezifische Aktivität (siehe 3.4.3.1) bestimmt. Die Untersuchungen ergaben die aus dem Arrhenius-Plot (Abbildung 4.25, links) und dem Eyring-Plot (Abbildung 4.25, rechts) ermittelten und in Tabelle 4.8 zusammengefassten thermodynamischen Parameter.

Die höchste spezifische Aktivität konnte bei etwa 90 °C festgestellt werden (siehe Diskussion 4.3.10), ab 95 °C denaturierte das Enzym .

Tabelle 4.8: Thermodynamische Parameter der GTP Cyclohydrolase II Domäne von AF-H6-Rib1.

E_a (kJ mol ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J K ⁻¹ mol ⁻¹)
51,5 ± 2,1	90,4 ± 4,2	48,7 ± 2,1	-138,95 ± 6,3

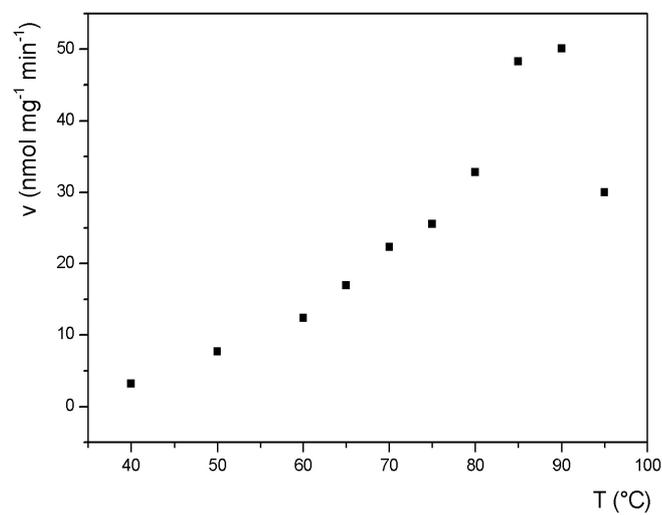


Abbildung 4.24: Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der GTP Cyclohydrolase II Domäne von AF-H6-RibA. Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur.

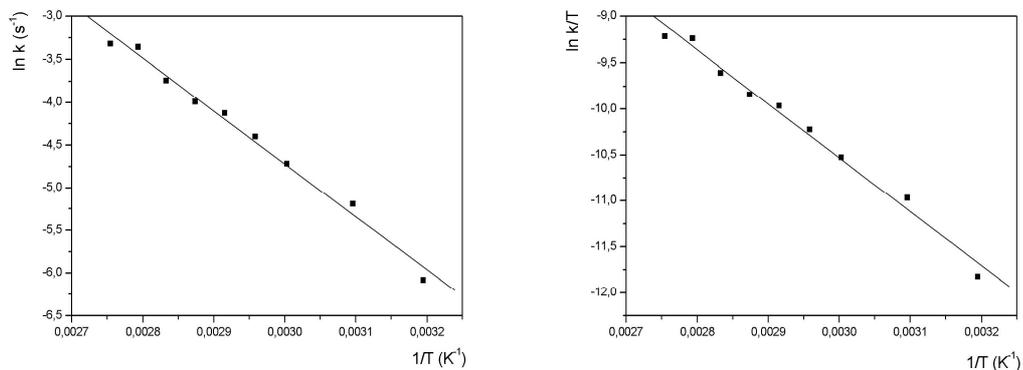


Abbildung 4.25: Ermittlung der thermodynamischen Parameter für die Reaktion der GTP Cyclohydrolase II Domäne von AF-H6-RibA.

Links: Arrhenius-Plot mit

$$\ln k = \frac{-E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln A$$

Rechts: Eyring-Plot mit

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} - \ln\left(\frac{h}{k_B}\right)$$

4.3.9 Zinkbestimmung

Zur Bestimmung des Zinkgehaltes wurde das gereinigte Enzym in einer Endkonzentration von 9,2 μM in 10% HNO_3 zur Atomabsorptionsspektroskopie (3.4.6) eingesetzt. Tabelle 4.9 fasst die Ergebnisse der Messungen zusammen. Grundlage der Zinkbestimmung war eine analog zu 4.1.6 aufgenommene Eichgerade.

Tabelle 4.9: Messwerte der Zinkbestimmung für AF-H6-RibA mittels Flammen-AAS.

Probe	Absorption	Zinkkonz. [mg/l]
Nullwert (Millipore)	0,0000	0,000
Standard 1 [0,2 mg/l]	0,0540	0,200
Standard 2 [0,4 mg/l]	0,1005	0,400
Standard 3 [0,8 mg/l]	0,1904	0,800
Standard 4 [1,6 mg/l]	0,3366	1,600
AF-H6-RibA	0,0916	0,420

Die Messung ergab für AF-H6-RibA einen Zinkgehalt von 0,7 Zinkionen pro Untereinheit (siehe Diskussion 4.3.10).

4.3.10 Diskussion

Die Sequenzanalyse ließ zunächst vermuten, dass es sich bei AF-RibA um ein bifunktionelles Enzym mit N-terminaler 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase Domäne und C-terminaler GTP Cyclohydrolase II Domäne handelt. Während sich im Bereich der C-terminalen Domäne die bei bekannten GTP Cyclohydrolasen II konservierten Aminosäuren wieder finden, ist die Übereinstimmung der N-terminalen Region mit bekannten 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen unvollständig. Abbildung 4.26 zeigt, dass die hoch konservierten Aminosäuren des sauren Loops, D25, R29, E30 und D34, die an der Substratbindung beteiligt sind, bei AF-RibA nicht vorhanden sind (Fischer *et al.*, 2002; Echt *et al.*, 2004). Des Weiteren fehlen die essentiell an der Katalyse beteiligten Aminosäuren C59, T85, Y87, H145, T146 und E166, wobei das Y87 bei dem Archaeobakterium *A. fulgidus* auch als F87 vorliegen könnte (Fischer *et al.*, 2002; Echt *et al.*, 2004). Es fällt auf, dass die konservierten Bereiche, die diese essentiellen Aminosäuren umgeben, auch bei AF-RibA vorhanden sind, die für die Katalyse benötigten Aminosäuren fehlen jedoch. Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase Domäne von AF-RibA nur noch als Rudiment vorliegt, das im Laufe der Evolution seine Funktionsfähigkeit verloren hat. Dieser Verdacht wurde untermauert, als im Genom von *A. fulgidus* zusätzlich noch ein offener Leserahmen entdeckt wurde, der eine weit höhere Übereinstimmung mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen aus anderen Organismen aufweist (siehe 4.4). Die durchgeführten Aktivitätstests mit dem Enzym (4.3.2 und 4.3.7) zeigten, dass tatsächlich nur die Domäne für die GTP Cyclohydrolase II funktionsfähig ist. Die Aufgabe der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase wird in *A. fulgidus* durch ein monofunktionelles Enzym (AF-RibB, siehe 4.4) übernommen.

```

                25   29   34
CA-Rib3 -----MTNIEITPIEEALEAYKNGEFLIVMDDEDRENEGDLIMAAELITQEKMAF
AF-RibA -----MEEVSSHVKSGKPVMILDSE----KSAICIPAEVVSGEILNE
OS-RibA EDKDEQDLDSPTEGFSSISEAIKDIQQGKLVIVDDESRENEGDLIMAASLVTPEAMAF
BS-RibA -----MHPLEALDALKKGEVIIVDDEDRENEGDFVALAEHATPEVINE
EC-RibB ---MNQTLLSSFGTPERVENALALREGRGVMILDEDRENEGDMIFPAETMTVEQMAL
EC-RibA -----M

                59                85 87
CA-Rib3 LVRYSSCYVCVPLSERANOIELEPPLAN--RSDRHGTAYTITICDFAEGTTTGISAHDRA
AF-RibA MMKNCDEIRLALTWKQIINLGLNRFRONG-----NLIPIDPNLEKISAEERA
OS-RibA VVRYCTGIVCVSMKEDLERINLEPLMVATKENEKLCTAFTVTVDAEGTTTGVSAKDRA
BS-RibA MATHERGLICTPLSEIADRIDIHPMVEHN--TDSHHTAFTVSIDHRETKTG-ISAOERS
EC-RibB TIRHGSGIVCLCITEDRRKQLDLEMMVEN--NTSAYGTGETVTIEAAEGVTTGVSAADRI
EC-RibA QLKRVAEAKLPTPWGDFIMVGFEELATG-----

                145                166
CA-Rib3 LTTRSIANPNSKPODEIKPGHILELRAVPGLLKKRRGHTEAAVOLSTLAGLOPAGVICEL
AF-RibA KFIRELVSGNA--GDIKYPGRIFVEETKEMGVLERPGIAEACVDLARMAGFAPSAVYAPL
OS-RibA KFVMTLASPDSKPEDFNRPGHIFPLKYREGVLKRAGHTEASVDLAMLAGLPPAAVLCEI
BS-RibA FTVQALLDSKSVPSDEORPGHIFPLIAKKGVLKRAGHTEAAVDLAEACSPGAGVICEI
EC-RibB TVRAAIADAKPSDLNRPGHVFLRAQAGVLTRGHTEATIDLMTLAGFKPAGVLCEL
EC-RibA -----

CA-Rib3 VREDCLMMRLDDCIOFGKKHGIKIININOLVEYISK-----
AF-RibA MTA-EGVAGEDYALKFAKEHSMPVFRIKDMIEFRIKSEKIVERVIEATLETKF--YGTF
OS-RibA VDE-DGSMARLEKLRVFAERNLKIVSIADILIRYRRKRDRLVERSSVARLPLRWGNVRAY
BS-RibA MNE-DGTMARVELETAKKHOLKMITIKDLLOYRYNLTTLVEREVDITLPTDFGTFKVY
EC-RibB TND-DGTMARAPECTEFANKHNMALVTIEDLVAYROAHERKAS-----
EC-RibA -----

CA-Rib3 -----
AF-RibA RAVGYKTPLGEIVALVKGRVD-EGDVLVRIHSECLTGDVFHSLRCDCGDOLENALKMIDR
OS-RibA CYRSVIDGIEHIAMVKGEIGDGOG-VLVRVHSECLTGDIEGSARCDCGDOLAMAMEMTEK
BS-RibA GYTNEVDGKEHVAFVMGDVPFCEEPVLVRVHSECLTGDVFGSHRCDCGPOLHAALNOIAA
EC-RibB -----
EC-RibA -----HDHVALVYGDISGHTPVLARVHSECLTGDALFSLRCDCGFOLEAALTOIAE

CA-Rib3 -----
AF-RibA EGKGVAIYMRGHEGRGIGLINKLMAYKLOEEGKDTVDANIELGFPPDMRSYGIAOILMD
OS-RibA AGRGVLVYLRGHEGRGIGLGHKLRAYNLODDGRDTVEANEDLGLPVDSREYGIGAOILRD
BS-RibA EGRGVLVYLR-QEGRGIGLINKLKAYKLOEQGYDTVEANEALGFLPDLRNYGIGAOILRD
EC-RibB -----
EC-RibA EGRGILVYR-QEGRNIGLINKIRAYALODOGYDTVEANHOLGFAADERDFTLCADMFKL

CA-Rib3 -----
AF-RibA KKVKSIRLLTNNPLKIEEIKKYGFKIVR-EPIEVEPCEVNLPYIKAKKDKMGHLICFND-
OS-RibA LGVRSMKLMTNNPAKYGGLKGYGLSIVGRVLVTPITSENRRYLETKRTKMGHVYGLANG
BS-RibA LGVRNMKLLTNNPRKIAGLEGYGLSISERVLOMEAKEHNKKYLOTKMNKIGHLLHF---
EC-RibB -----
EC-RibA LGVNEVRLLTNNPKKVEIITEAGINIVERVLIVGRNPNNEHYLDTKAEKMGHLINK-----

```

Abbildung 4.26: Alignment der Aminosäuresequenzen verschiedener GTP Cyclohydrolasen II, 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen und bifunktioneller Enzyme mit beiden Domänen aus verschiedenen Organismen: CA-Rib3: 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *C. albicans* (Accession No. XP_716297); AF-RibA: bifunktionelles Enzym aus *Archaeoglobus fulgidus* (Accession No. NP_069320); OS-RibA: bifunktionelles Enzym aus *Oryza sativa* (Accession No. NP_001047195) ohne N-terminale Signalsequenz, vgl. 4.5.7; BS-RibA: bifunktionelles Enzym aus *Bacillus subtilis* (Accession No. CAB14258); EC-RibB: 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *E. coli* (Accession No. CAA47252); EC-RibA: GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* (Accession No. CAA48075). Gleiche Reste sind schwarz, ähnliche Reste grau unterlegt. Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz von CA-Rib3.

Bei der Klonierung eines funktionstüchtigen Expressionskonstruktes für das Enzym AF-RibA kam es an mehreren Stellen zu Schwierigkeiten. Zunächst ließ sich das AF-RibA-Gen nicht direkt mit Selektivprimern aus der chromosomalen DNA amplifizieren. Es musste zuerst in einem vorausgehenden PCR-Schritt mit Primern, die in einiger Entfernung vom Gen komplett auf der Matrize binden, ein großzügiges DNA-Fragment amplifiziert werden (siehe 4.3.1), aus dem dann in einem weiteren PCR-Schritt mit Selektivprimern das eigentliche Gen amplifiziert werden konnte („nested PCR“).

Zunächst wurden zwei Expressionsvektoren (pT77 und pET5a), die über effiziente T7-Promotoren verfügen, verwendet. Entsprechende Expressionsversuche wurden im *E. coli*-Stamm BL21(DE) durchgeführt, da dieser die virale T7-Polymerase exprimiert, die für die Transkription der beiden Plasmide notwendig ist. Keiner der beiden Ansätze führte jedoch zur Expression, daher wurde das Gen in das Plasmid pNCO113 umklontiert, wozu wegen der ungünstigen Schnittstellensituation ein weiterer PCR-Schritt nötig war (siehe 4.3.4). Das Protein konnte nun in ausreichender Menge exprimiert werden.

Da es sich bei *A. fulgidus* um einen hypothermophilen Organismus handelt, der bei Temperaturen um 83 °C lebt (Achenbach-Richter *et al.*, 1987; Stetter *et al.*, 1987; Stetter, 1988), müssen seine Enzyme eine sehr hohe Temperaturstabilität aufweisen. Diese Tatsache konnte bei der Proteinreinigung durch einen Hitzefällungsschritt (siehe 4.3.3) ausgenutzt werden. Da sich die Reinigung dennoch als sehr schwierig erwies, musste ein His₆-Tag Konstrukt erstellt werden. Bei der Reinigung über eine Nickel-Chelating-Sepharose-Säule musste jedoch darauf geachtet werden, die Verweildauer des Enzyms in dem imidazolhaltigen Elutionspuffer möglichst gering zu halten, da der Komplexbildner Imidazol das Zinkion aus dem aktiven Zentrum des Enzyms lösen kann. Dies ist wahrscheinlich auch der Grund, warum die Atomabsorptionsspektroskopie (siehe 4.3.9) nur einen Zinkgehalt von 0,7 Zinkionen pro Untereinheit ergab. Offensichtlich kam es hierbei zu einem partiellen Verlust der Zinkionen. Die im Vergleich zum Enzym aus *C. albicans* fast vierzehn mal kleinere spezifische Aktivität ist bei einem hypothermophilen Organismus nicht ungewöhnlich und konnte durch Erhöhung der Reaktionstemperatur auf bis zu 90 °C erheblich gesteigert werden (siehe 4.3.8).

Die Untersuchungen der Quartärstruktur von AF-H6-RibA ergaben sowohl bei der analytischen Ultrazentrifugation (siehe 4.3.6), als auch bei der kalibrierten Gelfiltration (siehe 4.3.5) ein Tetramer als die native Enzymform in Lösung. Dies ist

bisher bei noch keiner GTP Cyclohydrolase II festgestellt worden, auch nicht bei den bifunktionellen Enzymen. Zwar sprechen alle Messwerte für die tetramere Struktur, allerdings neigte das Enzym nach der Reinigung stark zur Aggregation, was die Messwerte verfälscht haben könnte.

4.4 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase aus *Archaeoglobus fulgidus*

Ausgangspunkt für dieses Projekt war das von Prof. Dr. Markus Fischer freundlicherweise zur Verfügung gestellte Expressionskonstrukt pNCO-AF-H6-RibB. Dieses Plasmid enthielt das Gen für die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *A. fulgidus* (Accession number O28173) mit N-terminalem His₆-Tag. Das Gen codiert für ein Protein aus 246 Aminosäuren (27,6 kDa). Abbildung 4.27 zeigt die Aminosäuresequenz des Enzyms AF-RibB im Vergleich mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen aus verschiedenen Bakterien.

```

MM-RibB      1 MSENMA YECLKYSNENINRALEALRAKMIQIYDSDSREGETDLVIPAKAVTYTDVKKWMR
MB-RibB      1 MSGSTVYECLTYRNEINQALEALRAKMIQIYDSDTREGETDLVIPAKAVTFKDVKKWMR
AF-RibB      -----MILDFEESLRAFRKCGSPVLIYDFEDREGETDIAIPIAHVKGDEVAMMR
MJ-RibB      -----MNNVBEKAIKALKKCEIILVYDSDEREGETDMVVASQFITPEHIRIMR
EC-RibB      -MNQTLSSFGTPTFFERVENALAALREGRGVMVLDEDERENEGDMIFPAETMTVEQMALTI

MM-RibB      61 KDAGGLICVAVDPVASKQLKLPFMADLVREASKTSDSSTGEVVEKGDGLKYDAHSSFSLWV
MB-RibB      61 KDAGGLICVAVDPVASKQLRLPFMAELVREASKTSDVLEGEIAEKEGDGLKYDAHSSFSLWV
AF-RibB      49 IDGGGLICVAIHPVAAEKDGLPFMHQVLR IASEKLP EIRK VADAD-DIKYDSRSSFSLWV
MJ-RibB      48 KDAGGLICTALHPPDICNKDGIFFMV DILEFASQKFKVIRELYPND--IPYDEKSSFSITI
EC-RibB      60 RHGSGIVCLCITEDRRKQLDLPMMVENNTSAYGTGFTVTIEAAEG-----

MM-RibB      121 NHRDTRTGTPIERALTIRKIGEITEESLSGNGVRFGNFRTPGHVALLRAAEGLLDERM
MB-RibB      121 NHRETRTCTPDNERALTIRKIGEITEKKLSCDVIHFCEFRTPGHVALLRAAEGLLDERK
AF-RibB      108 NHRDTFTGTIDVDRALTIRRIGEVVDEVMGKKVDFGREFRSPGHVALLRAADKLT YERV
MJ-RibB      106 NHRKTFGTIDNDRAFTIKKLAELVKEGRFN---DFGKREFRSPGHVTL LRAAEGLVKNRQ
EC-RibB      ---VTGVSAAADRI TVRAAIADGAK-----PSDLNRP GHVFFLRAAQAGVLTTRG

MM-RibB      181 GQTELSVALARMAGITPAMVVCEMLDDDSGKALSKEKSKEYGKEHGLVLEGREIVEAVL
MB-RibB      181 GQTELSVALARMAGITPAMVVCEMLDDNNGKALSKEKDSKEYGKEHELVELEGOEIVEAYM
AF-RibB      168 GQTELSVALAEMAGIAPAVAI CEMLDAETGKALTK EKAMEYAAEEKGIFPFDGRTIVEVHR
MJ-RibB      163 GHTEMTVALAELANLVPIITTI CEMMGDD-GNAMSKNETKRYAEKHNTLYLSGEEILNYVL
EC-RibB      152 GHTEATIDLMTLAGFKPAGVLC ELTNDG-GTMARAPECIEFANKHNMALVTTIEDLVAYRQ

MM-RibB      241 LWAGTDC----
MB-RibB      241 MWAGSE----
AF-RibB      228 KFREVEVSLFV
MJ-RibB      222 DKYTKD----
EC-RibB      211 AHERKAS----

```

Abbildung 4.27: Alignment der Aminosäuresequenzen von 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen aus verschiedenen Bakterien: *MM-RibB*: 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *Methanosarcina mazei* (Accession No. Q8PW86); *MB-RibB*: 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *Methanosarcina barkeri* (Accession No. YP_305055); *AF-RibB*: 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *A. fulgidus* (Accession No. O28173); *MJ-RibB*: 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *Methanococcus jannaschii* (Accession No. Q60364); *EC-RibB*: 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *E. coli* (Accession No. CAA47252). Gleiche Reste sind schwarz, ähnliche Reste grau unterlegt.

Das Plasmid wurde in den *E. coli*-Stamm XL-1 (Tabelle 2.1) transformiert (siehe 3.1.8.1) und die positiven Transformanten mittels PCR-Screen überprüft (siehe 3.1.9). Die Sequenzen der Plasmide wurden schließlich per DNA-Sequenzierung (3.1.12) auf Fehler überprüft. Nach der Expression im *E. coli*-Stamm XL-1 nach 3.1.13 sollte das Enzym über eine Nickel Chelating Sepharose-Säule gereinigt werden (3.3.3), jedoch erfolgte keine Bindung des Proteins mit seinem N-terminalen His₆-Tag durch das Nickel der stationären Phase und wurde bereits mit dem Waschpuffer von der Säule eluiert (siehe Diskussion 4.4.6).

4.4.1 Klonierung des Gens AF-RibB-H6

Eine weitere Möglichkeit, die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *A. fulgidus* über eine Nickel Chelating Sepharose-Säule reinigen zu können, lag darin, den His₆-Tag vom N-Terminus an den C-Terminus von AF-RibB zu verlegen. Dazu wurde eine PCR (siehe 3.1.1) mit den Primern AFRibB-Rbs-*EcoRI*-vo und AFRibB-H6-*HindIII*-hi (siehe Primertabelle 6.1) und dem Plasmid pNCO-AF-H6-RibB als Templat durchgeführt. Das entstandene DNA-Fragment wurde nach Verdau (3.1.4) mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* in das Plasmid pNCO113, das zuvor mit den gleichen Enzymen verdaut wurde, ligiert (3.1.6). Das entstandene Plasmid pNCO-AF-RibB-H6 wurde in den *E. coli*-Stamm XL-1 transformiert, die Transformanten mit dem passenden Insert per PCR-Screening selektiert (siehe 3.1.9) und die Plasmide auf Fehler in der Basenfolge untersucht (siehe 3.1.12). Das Plasmid zeigte nach Expression in dem *E. coli*-Stamm XL1-Blue auf dem SDS-Gel des Rohextraktes (siehe Abbildung 4.28) eine deutliche Proteinbande bei 28 kDa, dem rechnerischen Molekulargewicht einer Untereinheit.

4.4.2 *In vivo*-Assay

Die Funktionstüchtigkeit der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *A. fulgidus* wurde wie unter 3.1.15 beschrieben *in vivo* durch Transformation des

Expressionsplasmids pNCO-AF-RibB-H6 in den riboflavinauxotrophen *E. coli*-Stamm *Rib5* (siehe Tabelle 2.1) überprüft. Zur Negativkontrolle wurde das Expressionsplasmid pNCO113 ohne Insert transformiert. Die Vitalität der Transformanden wurde durch Inkubation auf LB-Agarplatten mit 170 mg/l Ampicillin über 24 Stunden bei 37 °C untersucht. Gleichzeitig wurde auf LB-Agarplatten, die zusätzlich 400 mg/l Riboflavin enthielten, geprüft, ob die Transformation erfolgreich war. Die deutliche Kolonienbildung in Abbildung 4.19 zeigt, dass das Enzym AF-RibB-H6 in der Lage ist, den Stamm zu prototrophieren.

4.4.3 Expression und Reinigung von AF-RibB-H6

Das Enzym AF-RibB-H6 wurde über Nacht bei 37 °C in XL1-Blue exprimiert, 7 g der feuchten Zellmasse im Ultraschall aufgeschlossen (3.1.13, Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 300 mM NaCl; 1 mM MgCl₂) und nach Hitzefällung (3.3.2) auf eine Nickel-Chelating-Sepharose-Säule aufgetragen. Diese wurde nach 3.3.3 entwickelt und die einzelnen Fraktionen per SDS-Gelelektrophorese (siehe 3.2.2) sichtbar gemacht. Das Enzym AF-RibB-H6 eluierte bei einer Imidazolkonzentration von 250 mM in ausreichender Reinheit, so dass kein weiterer Reinigungsschritt nötig war. Die Fraktionen, die das Enzym enthielten, wurden vereint und durch Ultrafiltration (siehe 3.3.4) mit einer 10 kDa-Membran auf ein Volumen von 2,5 ml eingengt. Das gereinigte Enzym wurde über ein illustra NAP-25-Säulchen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach der unter 3.3.3 beschriebenen Methode in einen imidazolfreien Puffer (5 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM MgCl₂) überführt. Eine Edman-Sequenzierung (3.4.2) ergab die zu erwartende Aminosäurenabfolge MILDFEESLR. Abbildung 4.28 zeigt den Verlauf der Reinigung.

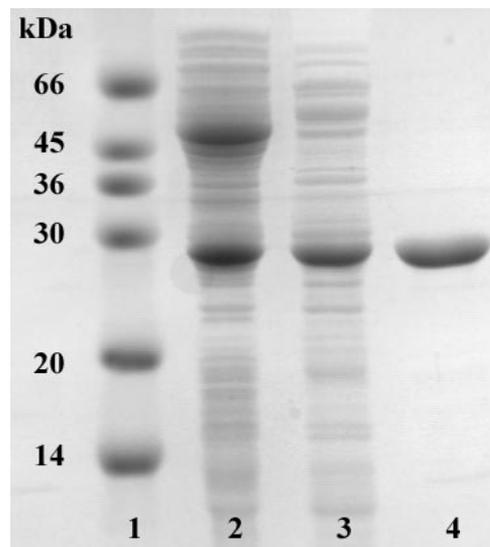


Abbildung 4.28: 16%iges SDS-Gel der Reinigung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *A. fulgidus*: 1: Marker; 2: Hitzefällung; 3: Rohextrakt; 4: Nickel-Chelating-Sepharose-Säule.

4.4.4 Analytische Ultrazentrifugation

Durch analytische Ultrazentrifugation konnten klare Erkenntnisse über die Quartärstruktur der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *A. fulgidus* gewonnen werden. Sowohl der durch Geschwindigkeitssedimentationsanalyse (siehe 3.4.4.2 und Abbildung 4.29) ermittelte Sedimentationskoeffizient von 4,0 S (bei 20 °C in 5 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM $MgCl_2$), als auch die durch Gleichgewichtssedimentationsanalyse (siehe 3.4.4.1 und Abbildung 4.30) bei 15000 rpm ermittelte Masse von 55 kDa (bei 4 °C in 5 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM $MgCl_2$) zeigten, dass es sich bei der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *A. fulgidus* um ein Dimer handelt. Das rechnerische Molekulargewicht für eine Untereinheit des Enzyms mit His₆-Tag beträgt 27,5 kDa.

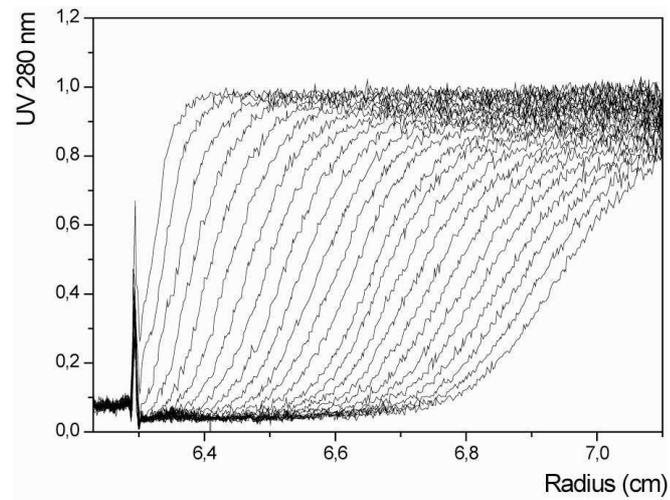


Abbildung 4.29: Sedimentationslauf der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *A. fulgidus*.

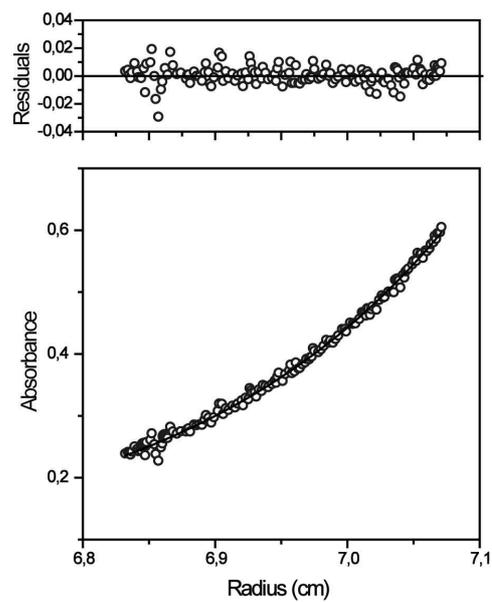


Abbildung 4.30: Gleichgewichtssedimentationslauf der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *A. fulgidus*.

4.4.5 Kinetische Charakterisierung

Für die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *A. fulgidus* wurden direkt nach der Reinigung die kinetischen Parameter im „steady-state“ wie unter 3.4.3.3 beschrieben bestimmt. Die Reaktionstemperatur bei den kinetischen Untersuchungen betrug 37 °C (siehe Diskussion 4.4.6), der pH-Wert 7,5. Das Enzym wurde bei allen Messungen in einer Endkonzentration von 3,5 µM eingesetzt. Zur Bestimmung der Michaelis-Menten Konstante für das Substrat Ribulose-5-phosphat wurde die Konzentration von Ribose-5-phosphat (vgl. 3.4.3.3) von 50 µM bis 4 mM variiert. Die kinetischen Untersuchungen ergaben eine Michaelis-Menten Konstante von $K_M = 2,0 \text{ mM} (\pm 0,03)$ bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von $v_{\max} = 99 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1} (\pm 2)$. Abbildung 4.31 zeigt den Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration.

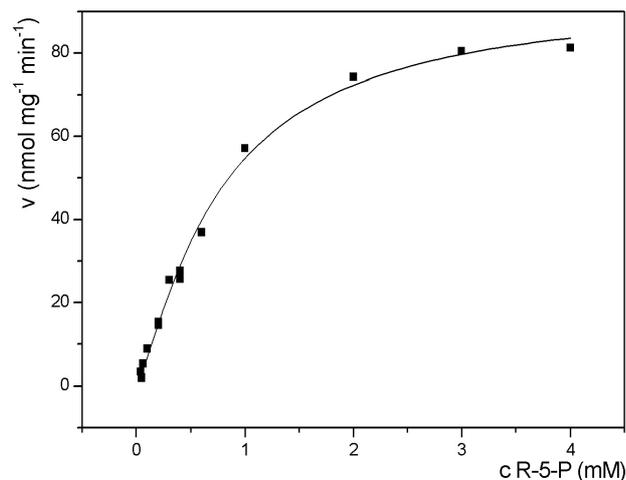


Abbildung 4.31: Kinetische Charakterisierung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *A. fulgidus*. Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentrationen von Ribulose-5-phosphat. Die durchgezogene Linie stellt die Fitkurve dar.

4.4.6 Diskussion

Nachdem die Untersuchungen an AF-RibA (siehe 4.3) zeigten, dass die Domäne für die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase auf diesem zunächst als bifunktionell vermuteten Enzym nicht funktionsfähig war, wurde nun die monofunktionelle 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *A. fulgidus* untersucht. Die Funktionsfähigkeit dieses Enzyms weist darauf hin, dass die Aufgabe der rudimentären Domäne von AF-RibA im Laufe der Evolution von einem eigenständigen, monofunktionellen Enzym (AF-RibB) übernommen wurde.

Der erste Versuch einer Affinitätschromatographischen Reinigung von AF-RibB mit N-terminalem His₆-Tag schlug fehl (siehe 4.4). Das Protein AF-H6-RibB war zwar funktionsfähig und wurde in *E. coli* gut exprimiert, jedoch konnte es nicht an das Nickel der Chelating Sepharose-Säule binden. Offensichtlich ist der N-Terminus der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *A. fulgidus* aufgrund der Tertiär- oder Quartärstruktur des Proteins nicht gut zugänglich und somit wurde der His₆-Tag nicht nach außen präsentiert. Ein weiterer Ansatz lag hier in der Konstruktion eines C-terminalen His₆-Tags, über den sich das Enzym dann auch gut per Affinitätschromatographie reinigen ließ (siehe 4.4.3).

Die Temperatur bei den kinetischen Untersuchungen (4.4.5) lag mit 37 °C weit unter der üblichen Umgebungstemperatur von *A. fulgidus* von 83 °C (Achenbach-Richter *et al.*, 1987; Stetter *et al.*, 1987; Stetter, 1988). Da an der Messung jedoch auch die Enzyme Phosphoriboisomerase, 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase, sowie die hitzeempfindliche Verbindung 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion beteiligt sind (siehe 3.4.3.2), konnten nur bei dieser Temperatur aussagekräftige Messwerte erwartet werden.

Die per analytischer Ultrazentrifugation ermittelte Dimerstruktur stimmt mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen aus anderen Organismen überein (vgl. 1.5).

4.5 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase / GTP Cyclohydrolase II aus *Oryza sativa*

Ausgangspunkt dieses Projektes war ein synthetisches Plasmid mit der Bezeichnung AK069475 (Kikuchi *et al.*, 2003), das unter anderem die bereits intronfreie Gensequenz (1662 Basenpaare) für das Protein Os02g0572400 (Accession number NP_001047195) aus *Oryza sativa* enthielt. Ein Aminosäurevergleich zeigte, dass dieses Protein, bestehend aus 553 Aminosäuren (59,6 kDa), hohe Übereinstimmungen mit bifunktionellen 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen / GTP Cyclohydrolasen II aus anderen Organismen aufweist (Abbildung 4.32). Zur weiteren Charakterisierung musste das Gen zunächst aus dem Plasmid AK069475 isoliert und in ein Expressionsplasmid überführt werden (4.5.1). Dabei wurden die Primer so gewählt, dass am 5'-Ende die Anfangssequenz für die ersten 124 Aminosäuren nicht mit amplifiziert wurde (siehe Diskussion 4.5.7).

Les-RibA	1	MASINISFPSTTFHSRSQANFKLFSGLHSGDVVSLNG-----VSSGSFIRLNARPHLTIK
OS-RibA	1	MASISPTSSSSVAALRGHPVQFVKGGAVSKEAKGSISFSPVANSNNANVKFTGLRVAASLK
Ath-RibA		-----MMSDALYHPRIFFAHSFINGLYSSPRFANTCWRLVSRSS
Chy-RibA		-----
Bsu-RibA		-----
Les-RibA	56	SDFKITSALLSGEGDIRFQSRGKTLFSSLSGTGTQPDVAVTFATLEADGVQTTSGFLSD
OS-RibA	61	RDGAFPGDGYSGNDNTVLPKSTSVRGQDYP TADSVLP TESIIVPEISNAGLKCVD MFSD
Ath-RibA	40	WEIKASENSDRNVFDENPVRKTDGSLFDSASFETVDAEITPETDDFFVS-----
Chy-RibA		-----
Bsu-RibA		-----
Les-RibA	116	DD---ECDLDRPTEGFSSVPEAIEDIROGKMLVLT DDEEDRENEGDLVMAASKATPEAMAF
OS-RibA	121	EDKDT EODLDSPT EGFSSISEAKDI OOGKLVIVVDDESRENEGDLVMAASLVTPEAMAF
Ath-RibA		---DAEGDPDCPTQGYSSIEIALQALRKGFVIVVDDE TGDVEGNLMAATLTSKDTAF
Chy-RibA		-----MGFNTEIEALEDLKQKMLVIVVDDEEDRENEGDLVCAAEKVTPETIINF
Bsu-RibA		-----MFHPTEEALDALKKGEVIVIVVDDEEDRENEGDFVALAEHATPEVINF
Les-RibA	173	FVKYGTGIVCVSMTEEHLERLQPLMVNDKKN EKLCTAFTVSVDAKHGT TGVSAHDRA
OS-RibA	181	VVRYGTGIVCVSMKEEDLERLNLPLMVATKEN EKLCTAFTVTVDAKEGT TGVSAKDRA
Ath-RibA	146	LIKNGSGIVSVGMKKENLERLSLTLMSPEMED EDSAPTFITVDAKSGTSTGVSAEDRA
Chy-RibA	48	MAKYGRGLICVPMEGKRLDELTEIMVTQN--TDPHHTAFTVSVDAVD--THTGISAAERA
Bsu-RibA	47	MATHGRGLICTPTESEIADRLELHPMVEHN--TDSHHTAFTVSVIDHRE--TKTGISAQERS
Les-RibA	233	TTVLALASGDSKPEDFNRPGHIFPLKYREGGVLK RAGHTEASVDLAVLAGLDFVGVICEV
OS-RibA	241	KTVMTLASPDSPKPEDFNRPGHIFPLKYREGGVLK RAGHTEASVDLAVLAGLPPAAVCEI
Ath-RibA	206	MTVLALSSLDKPEDDFRRPGHVFPLKYR DGGVLR RAGHTEASVDLMLAGLRPLSVLSAI
Chy-RibA	105	KTILKRLIDPQARPQDFRRPGHIFPLRAK EGGVLR RAGHTEAAVDLAVLAGLYPAGVICEI
Bsu-RibA	104	FTVQALLDSKSVPSDFORPGHIFPLIAKKG VLGVLK RAGHTEAAVDLAEACGSPGAGVICEI
Les-RibA	293	VD-DDGSMARLPMLEROFAKEHNLKIISVADLIRY RRRKTDOLVEHASAARIPTMWCPEATAH
OS-RibA	301	VD-EDGSMARLPKLRVEAERENLKIIVSIADLIRY RRRKRDRLVERSSVARLPLRWGNVRAY
Ath-RibA	266	LDQEDGSMASLPYMKKLATEHDIPVSLTDLIRY RRRKRDKLVERTVSRLPKKGLEQAV
Chy-RibA	165	MR-DDGOMARVPELLEFAQKHNLKIIITIASL IQYRRRNEKLVERGAFAMLPKYGEEVAV
Bsu-RibA	164	MN-EDGTMARVPELEIYAKKHOLKMITIKDLIQY RYRLTTLVEREVDITLPTDFGTRKVVY
Les-RibA	352	CFKSIIDGIEHIAMVKGDI GDGQ-DILVRVHSECLTGDIFGSARCD CGSOLATAMKQIEA
OS-RibA	360	CYRSVIDGIEHIAMVKGEI GDGQ-GVLVRVHSECLTGDIFGSARCD CGDOLAMAMEMIEK
Ath-RibA	326	CYRSKLDGTEHIALVKGNGVNGE-DILVRVHSECLTGDIFGSARCD CGNQLDLAMELIEK
Chy-RibA	224	AVESLLDHQTHLAVVKGNVADGE-PVLVRVHSECLTGDVFGSLRCD CGDOLQALMKIEK
Bsu-RibA	223	GYTNEVDGKEHVAFVMGDVPGCEPEPVLVRVHSECLTGDVFGSHRCD CGPQLHAALNQIAA
Les-RibA	411	AGRGVLVYLRGHDGRGIGLGHKL RAYNLQDA GRDTVEANEDLGLPVD SRNYGVGAQILRD
OS-RibA	419	AGRGVLVYLRGHEGRGIGLGHKL RAYNLQDD GRDTVEANEDLGLPVD SRREYIGIAQILRD
Ath-RibA	385	EGRGVVYLRGHEGRGIGLGHKL RAYNLQDEGHDTVQANVELGLSDSRREYIGIAQILRD
Chy-RibA	283	EGRGVLLYMR- QEGRGIGLANIKKAYHLQDMGKDTVEANEALGFFADRRDYGIGIAQILAD
Bsu-RibA	283	EGRGVLLYLR- QEGRGIGL INKLKAYKLOEQGYDTVEANEALGFFLPDLRNYGIGIAQILRD
Les-RibA	471	LGVPTMKFITNPNPAQYSWLKGYGLAITS GMVPPVTPFTNHYDTYLETTRAKMGHVYGFNLI
OS-RibA	479	LGVRSMKLMTNPNPAKYGGLKGYGLSIVGRVPLVTPITSENRRYLETKRTRKMGHVYGLANG
Ath-RibA	445	IGVRTMRLMTNPNPAKFTGLKGYGLAVGRVPPVTPITKENRRYMETKRKKMGHIVISDNN
Chy-RibA	342	LGIKKIRLMTNPNPKIKGLEGYGLETVRVPTEIPPKKENKKYLLTKKKLGHLLNTEN
Bsu-RibA	342	LGVRNMKLLTNNPKIAGLEGYGLSISERVELOMEAKEHNNKKYLOTKMKNLGHLLHF---
Les-RibA	531	RPATSTSTTNGKPNSENTSTIR
OS-RibA	539	QASHQTGSNGAKGEH-----
Ath-RibA	505	DQPLA-----
Chy-RibA		-----
Bsu-RibA		-----

Abbildung 4.32: Vergleich der Aminosäuresequenz des Proteins Os02g0572400 (OS-RibA) mit den bifunktionellen 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen/ GTP Cyclohydrolasen II aus *Lycopersicon esculentum* (Les-RibA, Accession No. CAA05308), *Arabidopsis thaliana* (Ath-RibA, Accession No. BAB09512), *Carboxydotherrnus hydrogeniformans* (Chy-RibA, Accession No. YP_360305) und *Bacillus subtilis* (Bsu-RibA, Accession No. CAB14258). Gleiche Reste sind schwarz, ähnliche Reste grau unterlegt.

4.5.1 Klonierung der Gene OS-RibA und OS-H6-RibA

Das Gen für die bifunktionelle 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase / GTP Cyclohydrolase II aus *O. sativa* (OS-RibA) wurde per PCR (siehe 3.1.1) mit den Selektivprimern OSRibA-*Bsp*HI-vo und OSRibA-*Hind*III-hi (siehe Primertabelle 6.1) aus dem Plasmid AK069475 amplifiziert. Das so entstandene DNA-Fragment (1310 Basenpaare) wurde über ein HiBind-DNA-Säulchen gereinigt (siehe 3.1.5.1) und mit den Restriktionsenzymen *Bsp*HI und *Hind*III verdaut (siehe 3.1.4). Parallel wurde das Plasmid pNCO113 mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Hind*III verdaut (siehe Diskussion 4.5.7). Nach der Aufreinigung über Agarosegele wurden die beiden Komponenten ligiert (siehe 3.1.6); es entstand das Plasmid pNCO-OS-RibA. Parallel wurde durch Ligation des verdauten PCR-Fragments in das mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Hind*III verdaute Plasmid pNCO-SB-HIS₆-ACYC184 (siehe 2.4.2) ein zweites Konstrukt mit N-terminalem His₆-Tag (pNCO-OS-H6-RibA) hergestellt.

Nach Transformation in den *E. coli*-Stamm XL-1 (siehe 3.1.8 und Tabelle 2.1) und PCR-Screens (3.1.9) wurden die Plasmide durch DNA-Sequenzierung (3.1.12) auf Fehler in der Basenfolge überprüft.

4.5.2 Klonierung der Einzeldomänen OS-H6-Mut und OS-H6-CyclII

Neben dem bifunktionellen Enzym OS-RibA sollten die beiden Domänen für die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase und die GTP Cyclohydrolase II auch getrennt von einander exprimiert und untersucht werden. Dazu wurden die entsprechenden Genabschnitte durch PCR (siehe 3.1.1) mit den Primern OSRibA-*Bsp*HI-vo und OSRibA-Mut-*Hind*III-hi (3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase Domäne), bzw. OSRibA-CyclII-*Bsp*HI-vo und OSRibA-*Hind*III-hi (GTP Cyclohydrolase II Domäne) (siehe Primertabelle 6.1) von dem Plasmid pNCO-OS-RibA amplifiziert. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden über HiBind-DNA-Säulchen gereinigt (siehe 3.1.5.1) und jeweils mit den Restriktionsenzymen *Bsp*HI und *Hind*III verdaut (siehe 3.1.4). Parallel wurde das Plasmid pNCO-SB-HIS₆-ACYC184 mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Hind*III verdaut (siehe Diskussion 4.5.7). Nach der Aufreinigung über Agarosegele wurden

die beiden Gene für die Einzeldomänen jeweils in das Plasmid ligiert (siehe 3.1.6). Das entstandene Plasmid mit dem Gen für die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase aus *O. sativa* mit N-terminalem His₆-Tag wurde pNCO-OS-H6-Mut genannt, das mit dem Gen für die GTP Cyclohydrolase II aus *O. sativa* mit N-terminalem His₆-Tag pNCO-OS-H6-CyclII. Nach Transformation in den *E. coli*-Stamm XL-1 (siehe 3.1.8 und Tabelle 2.1) und PCR-Screens (3.1.9) wurden die Plasmide durch DNA-Sequenzierung (3.1.12) auf Fehler in der Basenfolge überprüft.

4.5.3 *In vivo*-Assays

Vor der Expression und Charakterisierung der oben erzeugten Konstrukte sollte deren Funktionstüchtigkeit zunächst *in vivo* durch Prototrophierungsversuche (siehe 3.1.15) mit den riboflavinauxotrophen *E. coli*-Stämmen *Rib5* und *Rib7* (siehe Tabelle 2.1) geprüft werden. Dazu wurden die Plasmide pNCO-OS-RibA und pNCO-OS-H6-Mut in *E. coli Rib5* und die Plasmide pNCO-OS-RibA und pNCO-OS-H6-CyclII in *E. coli Rib7* transformiert (siehe 3.1.8). Zur Negativkontrolle wurde das Expressionsplasmid pNCO113 ohne Insert in die beiden Stämme transformiert. Die Vitalität der Transformanden wurde durch Inkubation auf LB-Agarplatten mit 170 mg/l Ampicillin über 24 Stunden bei 37 °C untersucht. Gleichzeitig wurde auf LB-Agarplatten, die zusätzlich 400 mg/l Riboflavin enthielten, geprüft, ob die Transformation erfolgreich war. Abbildung 4.33 zeigt, dass alle erzeugten Konstrukte in der Lage waren, das entsprechende Enzym der jeweiligen Mangelmutante zu ersetzen und somit diese Stämme zu prototrophieren.

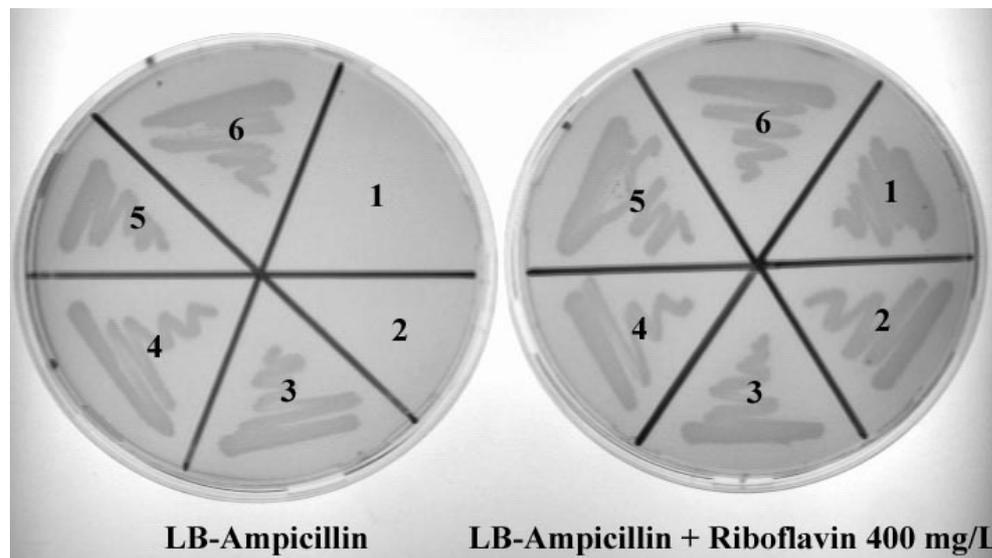


Abbildung 4.33: Ausstriche der Rib5 / Rib7 Mutanten nach den Prototrophierungsversuchen mit den erzeugten Expressionskonstrukten aus *O. sativa*. 1: Negativkontrolle (*Rib5*-pNCO113 ohne Insert); 2: Negativkontrolle (*Rib7*-pNCO113 ohne Insert); 3: *Rib5*-pNCO-OS-RibA; 4: *Rib7*-pNCO-OS-RibA; 5: *Rib5*-pNCO-OS-H6-Mut; 6: *Rib7*-pNCO-OS-H6-CyclI. Links: LB-Agarplatte mit 170 mg/l Ampicillin; Rechts: LB-Agarplatte mit 170 mg/l Ampicillin und 400 mg/l Riboflavin.

4.5.4 Expression und Reinigung von OS-RibA und OS-H6-RibA

Die Expression des Proteins RibA aus *O. sativa* erfolgte in *E. coli* M15[pREP4] (siehe Tabelle 2.1) bei einer Temperatur von 37 °C und einer Expressionsphase von 6 h nach Induktion mit 1 mM IPTG (siehe 3.1.13). 10 g der geernteten feuchten Zellmasse wurden in 50 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 100 mM KCl; 1 mM MgCl₂) resuspendiert und durch Behandlung mit Ultraschall (3.3.1) aufgeschlossen. Es wurde versucht, das Enzym RibA wie unter 3.3.3 beschrieben durch Anionentauscherchromatographie (Q-Sepharose), hydrophobe Chromatographie (Butylsepharose, Phenylsepharose) und Gelfiltration (Superdex) aus dem Rohextrakt zu extrahieren. Mit diesen Methoden war es jedoch nicht möglich, das instabile Enzym in ausreichender Homogenität zu extrahieren, ohne dass dieses durch die lange Reinigungsdauer seine Aktivität verlor.

Eine weitere Möglichkeit bestand in der affinitätschromatographischen Reinigung des Enzyms OS-H6-RibA (siehe 4.5.1). Dieses wurde analog zu OS-RibA exprimiert. 10 g der feuchten Zellmasse wurden in 50 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 300 mM NaCl; 1 mM MgCl₂) suspendiert und durch Behandlung mit Ultraschall (3.3.1) aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde auf eine Nickel Chelating Sepharose-Säule aufgetragen und diese bei 4 °C nach 3.3.3 entwickelt. Die einzelnen Fraktionen wurden per SDS-Gelelektrophorese (siehe 3.2.2) sichtbar gemacht. Das Enzym OS-H6-RibA eluierte bei einer Imidazolkonzentration von 220 - 280 mM in ausreichender Reinheit von der Säule. Die Fraktionen, die das Enzym enthielten, wurden vereint und durch Ultrafiltration (siehe 3.3.4) mit einer 10 kDa-Membran bei 4 °C auf ein Volumen von 2,5 ml eingengt. Das gereinigte Enzym wurde über ein illustra NAP-25-Säulchen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach der unter 3.3.3 beschriebenen Methode in einen imidazolfreien Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 300 mM NaCl; 1 mM MgCl₂) überführt. Eine Edman-Sequenzierung (3.4.2) ergab die zu erwartende N-terminale Aminosäuresequenz MHHHHHASM. Abbildung 4.34 fasst die vereinten Fraktionen nach jedem Reinigungsschritt zusammen.

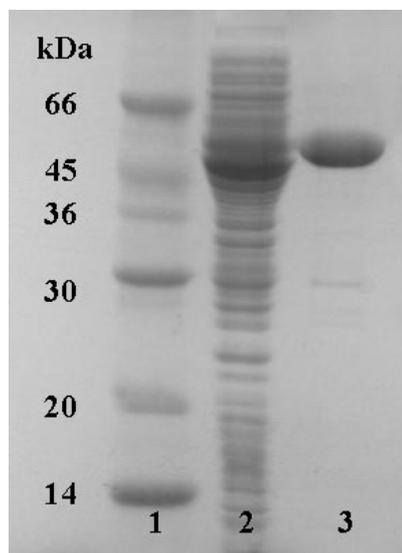


Abbildung 4.34: 14%iges SDS-Gel der Reinigung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase / GTP Cyclohydrolase II mit N-terminalem His₆-Tag aus *O. sativa* (OS-H6-RibA): 1: Marker; 2: Rohextrakt; 3: Nickel-Chelating-Sepharose-Säule.

4.5.5 Expression und Reinigung von OS-H6-Mut und OS-H6-CyclII

Die Expression der beiden Einzeldomänen (siehe 4.5.2) erfolgte jeweils in *E. coli* M15[pREP4] (siehe Tabelle 2.1) bei einer Temperatur von 37 °C und einer Expressionsphase von 6 h nach Induktion mit 1 mM IPTG (siehe 3.1.13). Die Reinigung der beiden Enzyme verlief nach dem selben Protokoll. Dabei wurden 5 g feuchte Zellmasse in 50 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5 (OS-H6-Mut), bzw. pH 8,5 (OS-H6-CyclII); 300 mM NaCl; 1 mM MgCl₂) suspendiert und durch Behandlung mit Ultraschall (3.3.1) aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde auf eine Nickel Chelating Sepharose-Säule aufgetragen und diese bei 4 °C nach 3.3.3 entwickelt. Die einzelnen Fraktionen wurden per SDS-Gelelektrophorese (siehe 3.2.2) sichtbar gemacht. Beide Enzyme eluierten bei einer Imidazolkonzentration von 230 - 260 mM in ausreichender Reinheit von der Säule. Die Fraktionen, die das Enzym enthielten, wurden vereint und durch Ultrafiltration (siehe 3.3.4) mit einer 10 kDa-Membran bei 4 °C auf ein Volumen von 2,5 ml eingengt. Die gereinigten Enzyme wurden über ein illustra NAP-25-Säulchen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach der unter 3.3.3 beschriebenen Methode in einen imidazolfreien Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5 (OS-H6-Mut), bzw. pH 8,5 (OS-H6-CyclII); 300 mM NaCl; 1 mM MgCl₂) überführt. Eine Edman-Sequenzierung (3.4.2) ergab die zu erwartende N-terminale Aminosäuresequenz MHHHHHASM, die sich sowohl für OS-H6-Mut, als auch für OS-H6-CyclII aus dem N-terminalen His₆-Tag und der Spacersequenz (Alanin und Serin, vgl. 2.4.2) ergibt. Abbildung 4.35 fasst jeweils die vereinten Fraktionen nach jedem Reinigungsschritt zusammen.

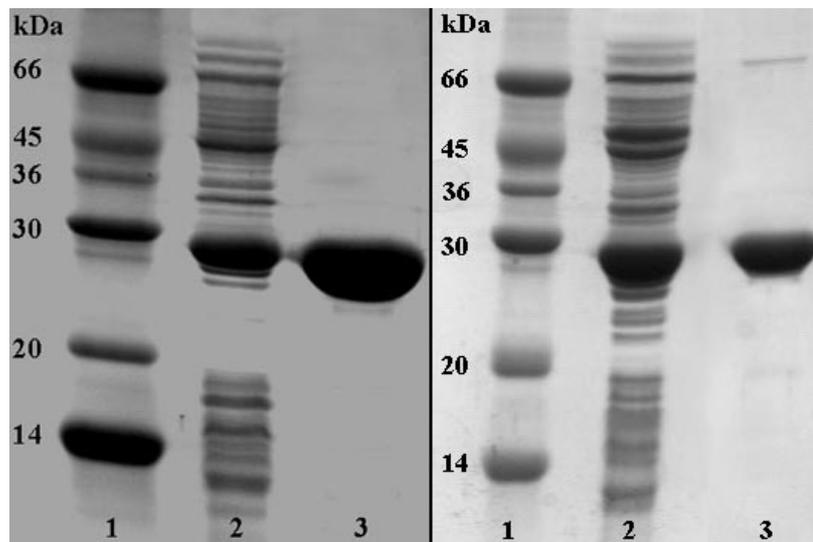


Abbildung 4.35: 16%iges SDS-Gel der Reinigung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase Domäne mit N-terminalem His₆-Tag aus *O. sativa* (OS-H6-Mut) (links), bzw. der GTP Cyclohydrolase II Domäne mit N-terminalem His₆-Tag aus *O. sativa* (OS-H6-CyclII) (rechts): 1: Marker; 2: Rohextrakt; 3: Nickel-Chelating-Sepharose-Säule.

4.5.6 Kinetische Charakterisierungen

Für das bifunktionelle Enzym OS-RibA, sowie für die beiden Einzeldomänen OS-H6-Mut und OS-H6-CyclII wurden direkt nach der Reinigung die kinetischen Parameter im steady-state wie unter 3.4.3.3 beschrieben bestimmt. Tabelle 4.10 und Tabelle 4.11 fassen die Parameter und Ergebnisse der einzelnen Messungen zusammen. Abbildung 4.36 zeigt den Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentrationen.

Tabelle 4.10: Messparameter der kinetischen Untersuchungen der verschiedenen Konstrukte aus *O. sativa* im steady-state.

Enzym	Substrat	c (Substrat) [μ M]	c (Enzym) [μ M]	pH-Wert
OS-H6-RibA	GTP	5-625	8,0	8,5
OS-H6-RibA	Ribulose-5-phosphat	50-4000	20	7,5
OS-H6-Mut	Ribulose-5-phosphat	50-4350	21,0	7,5
OS-H6-CyclII	GTP	5-875	5,8	8,5

Tabelle 4.11: Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen der verschiedenen Konstrukte aus *O. sativa* im steady-state.

Enzym	K_M [μM]	v_{\max} [$\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$]
OS-H6-RibA	130 (± 16)	18 (± 1)
OS-H6-RibA	- *	- *
OS-H6-Mut	850 (± 13)	18 (± 1)
OS-H6-CyclI	217 (± 29)	80 (± 4)

* = siehe Diskussion 4.5.7

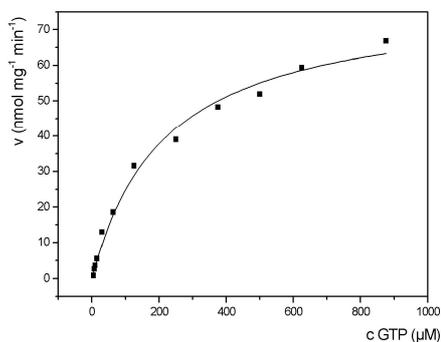
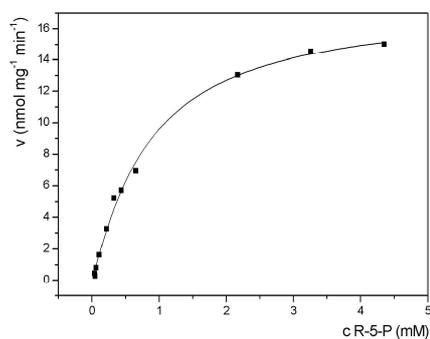
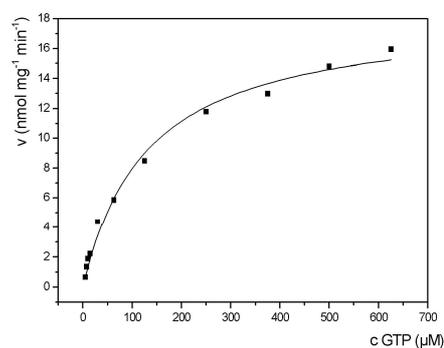


Abbildung 4.36: Kinetische Charakterisierung der verschiedenen Konstrukte aus *Oryza sativa*. Verlauf der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentrationen von: Oben: OS-H6-RibA (GTP); Mitte: OS-H6-Mut (Ribulose-5-phosphat); Unten: OS-H6-CyclI (GTP). Die durchgezogenen Linien stellen die Fitkurven dar.

4.5.7 Diskussion

Zur Charakterisierung des Enzyms OS-RibA musste das Gen zunächst aus dem Plasmid AK069475 isoliert werden. Dies geschah mittels PCR-Amplifikation, wobei früheren Erkenntnissen aus *A. thaliana* (Herz *et al.*, 2000) folgend, die N-terminale Signalsequenz, die dem Transport in Chloroplasten dient und keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität hat, nicht mit amplifiziert wurde. Abbildung 4.32 zeigt, dass eine solche Signalsequenz bei vielen Pflanzen vorkommt und dass in diesem Bereich keine Übereinstimmungen mit anderen GTP Cyclohydrolasen II, bzw. 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen vorliegen.

Aus Gründen der unterschiedlichen Schnittstellensituationen auf dem Plasmid pNCO113 und dem Gen OS-RibA mussten bei der Klonierung (siehe 4.5.1) neben *HindIII* die beiden Restriktionsenzyme *BspHI* und *NcoI* eingesetzt werden. Diese haben unterschiedliche Erkennungssequenzen, generieren aber kompatible Überhänge. Die auf dem Plasmid singulär und in geeigneter Position vorliegende Schnittstelle für das Restriktionsenzym *NcoI* konnte auf dem Gen OS-RibA nicht genutzt werden, da diese dort drei mal vorkam. Beim Verdau mit diesem Enzym würde so das PCR-Fragment in vier Fragmente zerschnitten werden. Da aber die Erkennungssequenz für *BspHI* auf dem Gen nicht vorkam, konnte diese durch den entsprechenden Primer (OSRibA-*BspHI*-vo) künstlich an der entsprechenden Stelle eingefügt werden. Daher mussten die beiden Komponenten vor der Ligation mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut werden (vgl. 4.5.1).

Bei der Wahl des N-Terminus als Ort des His₆-Tag machte man sich die Tatsache zunutze, dass die dort zuvor entfernte Signalsequenz für den Transport in Chloroplasten vom Enzym nach außen präsentiert werden muss, was auch für einen His₆-Tag gelten muss, um als Mittel zur Reinigung via Nickel-Affinitätschromatographie dienen zu können.

Neben der Charakterisierung des bifunktionellen Enzyms OS-RibA wurden auch die beiden Domänen für GTP Cyclohydrolase II und 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase einzeln durch PCR vom RibA-Gen amplifiziert und jeweils in das Expressionsplasmid pNCO113- His₆ kloniert. Daraus resultierten zwei funktionsfähige monofunktionelle Enzyme mit erheblich besseren Expressionsraten als der des bifunktionellen Enzyms.

Bei der Reinigung von OS-H6-RibA eluierte das Enzym relativ sauber von der Nickel Chelating Sepharose-Säule (siehe Abbildung 4.34). Es wurde versucht, die

Reinheit per Gelfiltration noch zu erhöhen, jedoch führte dieser Schritt aufgrund der sehr schlechten Stabilität des Enzyms durch Abbaubanden zu einer Verschlechterung des Ergebnisses. Daher wurde auf einen weiteren Reinigungsschritt verzichtet.

Bei den Enzymkinetiken konnten für die 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase Domäne des bifunktionellen Enzyms OS-H6-RibA aufgrund der kaum messbaren Aktivität keine kinetischen Parameter bestimmt werden. Bei dem monofunktionellen Enzym mit der 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthase Domäne (OS-H6-Mut) war die Aktivität jedoch hoch genug, so dass dort eine kinetische Charakterisierung möglich war. Auch das monofunktionelle Enzym OS-H6-CyclI wies eine 4-mal so hohe Aktivität auf, wie die entsprechende Domäne auf dem bifunktionellen Enzym OS-H6-RibA.

4.6 GTP Cyclohydrolase II aus *Escherichia coli*

Die Aufklärung der 3D-Struktur der GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* ermöglichte eine Untersuchung der an der Substratbindung und vermutlich an der enzymatischen Katalyse des Enzyms beteiligten Aminosäuren (Ren *et al.*, 2005). Um die dort postulierten Aminosäuren biochemisch zu charakterisieren, sollte durch eine Mutagenesestudie deren Relevanz für die enzymatische Aktivität des Enzyms untersucht werden.

Dazu sollten Expressionsvektoren für die GTP Cyclohydrolase II-Mutanten R94K, R94S, Y105F, Y105S, Q108E, Q108N, Q108S, T114A, T114S, D126N, D126S, R128K und R128S erzeugt werden und die jeweiligen Proteine nach Expression in *E. coli* aufgereinigt und kinetisch charakterisiert werden. Alle mutierten Aminosäurereste sind bei GTP Cyclohydrolasen II anderer Organismen vollständig konserviert (siehe Abbildung 4.37).

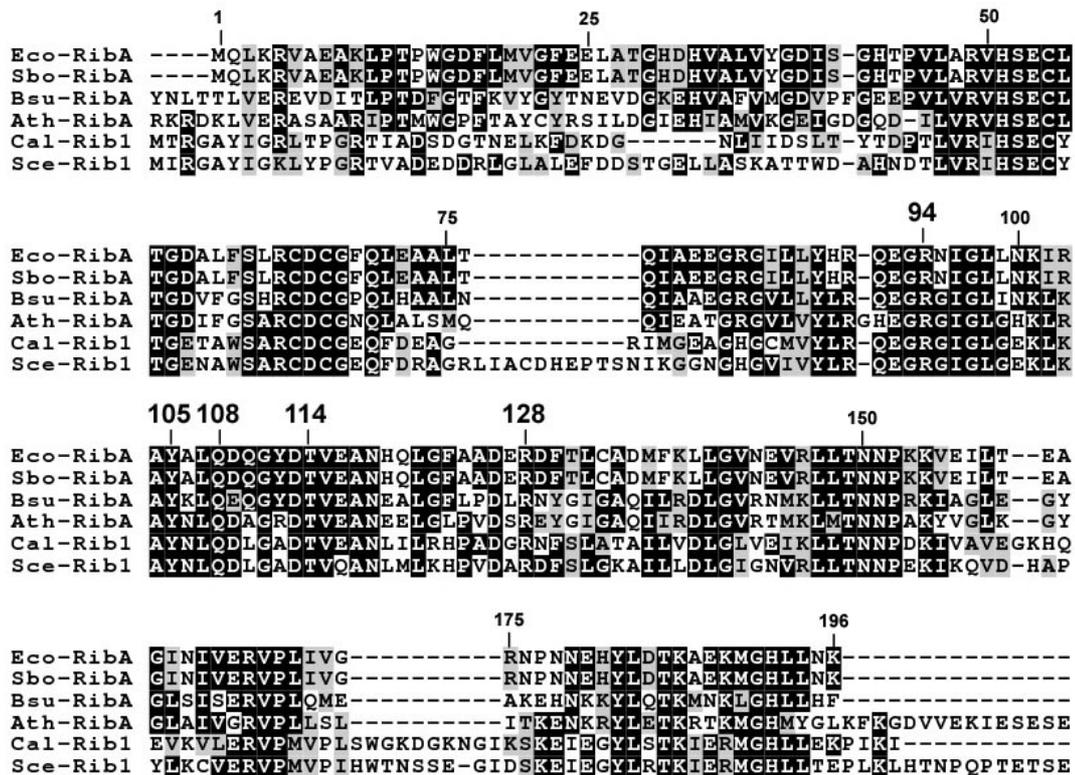


Abbildung 4.37: Vergleich der Aminosäuresequenzen von GTP Cyclohydrolasen II aus *E. coli* (*Eco-RibA*, Accession No. CAA48075), *Shigella boydii* (*Sbo-RibA*, Accession No. YP_408215); *B subtilis* (*Bsu-RibA*, Accession No. CAB14258); *A. thaliana* (*Ath-RibA*, Accession No. BAB09512), *C. albicans* (*Cal-Rib1*, Accession No. XP_715792) und *Saccharomyces cerevisiae* (*Sce-Rib1*, Accession No. P38066). Die Nummerierung bezieht sich auf das Enzym aus *E. coli*. Gleiche Reste sind schwarz, ähnliche Reste grau unterlegt.

4.6.1 Klonierung der Mutanten

Zur einfacheren Herstellung der Expressionsvektoren für die verschiedenen GTP Cyclohydrolase II-Mutanten sollte zunächst ein Ausgangsplasmid (pNCO-*EC-RibA*-Mut) erzeugt werden, aus dem dann verschiedene Kassetten herausgeschnitten und durch hybridisierte Oligonukleotide mit den gewünschten Mutationen ersetzt werden konnten. Dieses Plasmid sollte die Gensequenz für die GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* (*EC-RibA*) mit C-terminalem His₆-Tag enthalten, in die durch stille Mutationen unter Beibehaltung der kodierenden Informationen zusätzliche Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingefügt werden sollten (siehe Abbildung 4.38).

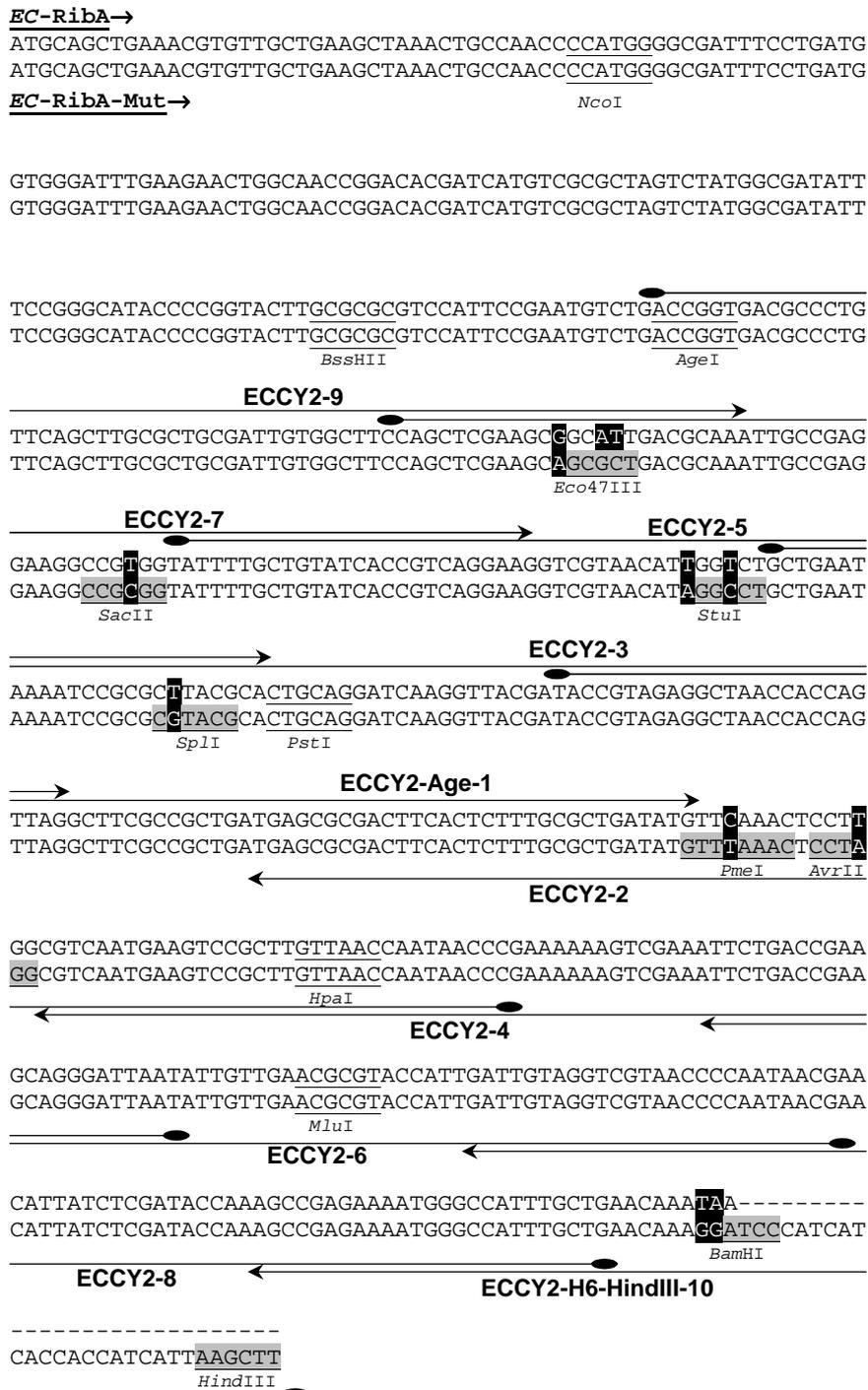


Abbildung 4.38: Vergleich des Gens der GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* (*EC-RibA*; oben) mit dem erzeugten Ausgangsgen für die Mutagenese (*EC-RibA-Mut*; unten). Veränderte Basen sind schwarz, neue singuläre Schnittstellen grau unterlegt. Singuläre Schnittstellen sind unterstrichen und beschriftet. Die verwendeten Oligonukleotide sind als Pfeile oberhalb (forward-primer) und unterhalb (reverse-primer) der Sequenz dargestellt.

Dazu wurde mittels PCR (siehe 3.1.1) ein synthetisches Fragment generiert, das unter Modifikation der Basenfolge (siehe Abbildung 4.38) einem 470 Basenpaare großen Abschnitt des *EC-RibA*-Gens zuzüglich der Information für den C-terminalen His₆-Tag entsprach. Tabelle 4.12 fasst die verwendeten Primer und Template der einzelnen PCR-Schritte zusammen.

Tabelle 4.12: PCR-Schema für die Klonierung des Konstruktes *EC-RibA-Mut*.

Fragment	Primer 1*	Primer 2*	Templat	Fragmentgröße
a	ECCY2-AgeI-1	ECCY2-2	-	108 bp
b	ECCY2-3	ECCY2-4	a	199 bp
c	ECCY2-5	ECCY2-6	b	286 bp
d	ECCY2-7	ECCY2-8	c	376 bp
e	ECCY2-9	ECCY2-H6-HindIII-10	d	472 bp

* siehe Primertabelle 6.1

Das so entstandene Fragment *EC-RibA-Mut* wurde mit den Restriktionsenzymen *AgeI* und *HindIII* verdaut (siehe 3.1.4) und in das freundlicherweise von Herrn Dr. Johannes Kaiser zur Verfügung gestellte Plasmid pNCO-*EC-RibA*, das zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut wurde, ligiert (siehe 3.1.6). Nach Transformation in XL1-Blue (3.1.8) und PCR-Screen (3.1.9) wurden die dabei entstandenen PCR-Fragmente mittels analytischem Verdau (siehe 3.1.4) mit dem Restriktionsenzym *PmeI* auf das Vorhandensein des modifizierten Inserts überprüft. Danach wurde das Plasmid durch DNA-Sequenzierung (3.1.12) auf Fehler in der Basenfolge überprüft.

Um Expressionsvektoren für die verschiedenen Mutanten herzustellen, wurde aus dem Plasmid pNCO-*EC-RibA-Mut* jeweils eine Kasette herausgeschnitten, die unter anderem die kodierende Sequenz für die zu verändernde Aminosäure, sowie die Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym enthielt. Das herausgeschnittene Fragment wurde durch ein synthetisches DNA-Fragment ersetzt, das verschiedene Modifikationen aufwies. Dazu wurde durch Hybridisierung zweier Oligonukleotide (siehe Tabelle 4.13) ein DNA-Fragment erzeugt, dessen Sequenz der des herausgeschnittenen Fragments mit der gewünschten Punktmutation entsprach. Zusätzlich wurde durch eine stille Mutation die im herausgeschnittenen DNA-Fragment enthaltene Restriktionsenzym-Erkennungssequenz zerstört. Durch geeignete Wahl der Sequenz der verwendeten Oligonukleotide enthielten die hybridisierten DNA-Fragmente außerdem die zum geschnittenen Plasmid pNCO-

EC-RibA-Mut komplementären Einzelstrang-Überhänge und konnten so direkt zur Ligation eingesetzt werden. Tabelle 4.13 fasst die jeweils verwendeten Oligonukleotide und Restriktionsenzyme für die Generierung der einzelnen Mutanten zusammen.

Tabelle 4.13: Verwendete Oligonukleotide und Restriktionsenzyme für die Generierung der *EC*-RibA Mutanten.

Mutante	Oligonukleotide*	5'-Schnittstelle	3'-Schnittstelle	Zerstörte Schnittstelle
R94K	ECC2-SpII-R94K-C ECC2-SpII-R94K-AC	Sac II	Pst I	Spl I
R94S	ECC2-SpII-R94S-C ECC2-SpII-R94S-AC	Sac II	Pst I	Spl I
Y105F	ECC2-SpII-Y105F-C ECC2-SpII-Y105F-AC	Sac II	Pst I	Spl I
Y105S	ECC2-SpII-Y105S-C ECC2-SpII-Y105S-AC	Sac II	Pst I	Spl I
Q108E	ECC2-PstI-Q108E-C ECC2-PstI-Q108E-AC	Spl I	Avr II	Pst I
Q108N	ECC2-PstI-Q108N-C ECC2-PstI-Q108N-AC	Spl I	Avr II	Pst I
Q108S	ECC2-PstI-Q108S-C ECC2-PstI-Q108S-AC	Spl I	Avr II	Pst I
T114A	ECC2-PmeI-T114A-C ECC2-PmeI-T114A-AC	Pst I	Avr II	Pme I
T114S	ECC2-PmeI-T114S-C ECC2-PmeI-T114S-AC	Pst I	Avr II	Pme I
D126N	ECC2-PmeI-D126N-C ECC2-PmeI-D126N-AC	Pst I	Avr II	Pme I
D126S	ECC2-PmeI-D126S-C ECC2-PmeI-D126S-AC	Pst I	Avr II	Pme I
R128K	ECC2-PmeI-R128K-C ECC2-PmeI-R128K-AC	Pst I	Avr II	Pme I
R128S	ECC2-PmeI-R128S-C ECC2-PmeI-R128S-AC	Pst I	Avr II	Pme I

* siehe Primertabelle 6.1

Die so generierten Plasmide wurden in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue (siehe 3.1.8) transformiert, die resultierenden Bakterienkolonien zum PCR-Screen (siehe 3.1.9) eingesetzt und die dort entstandenen DNA-Fragmente mit dem jeweils im modifizierten Insert zerstörten Restriktionsenzym (vgl. Tabelle 4.13) zur Identifizierung analytisch verdaut (siehe 3.1.4). Die so als modifiziert identifizierten Plasmide wurden dann durch DNA-Sequenzierung (3.1.12) auf Fehler in der Basenfolge überprüft.

4.6.2 Reinigung und Charakterisierung der *EC*-RibA Mutanten

Die *EC*-RibA Mutanten wurden über Nacht bei 37 °C in XL1-Blue exprimiert. Aufgrund der sehr guten Expression und des geringen Bedarfs an Protein für die kinetischen Voruntersuchungen wurden alle Mutanten im kleinen Maßstab über ein Nickel-NTA Spin column-Kit von Qiagen (Hilden) aufgereinigt (siehe 3.3.3). Dabei wurde bereits bei einer Imidazolkonzentration von 10 mM eine ausreichende Menge Proteins in ausreichender Reinheit eluiert. Die Qualität der Reinigungen wurde per SDS-Gelelektrophorese (siehe 3.2.2) beurteilt; Abbildung 4.39 zeigt am Beispiel der Mutante Y105S ein exemplarisches Ergebnis einer solchen Aufreinigung.

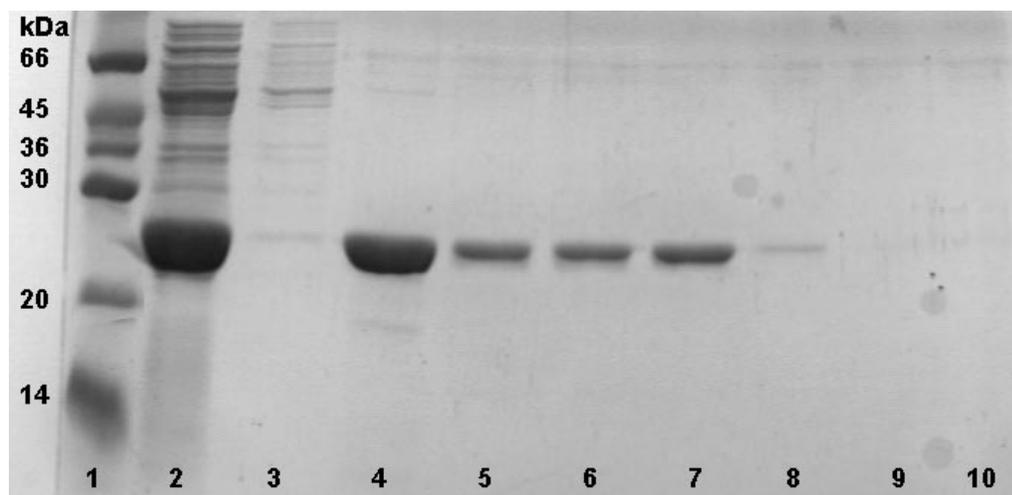


Abbildung 4.39: 16%iges SDS-Gel der Reinigung der *EC*-RibA Mutante Y105S über ein Nickel-NTA Spin column-Kit: 1: Marker; 2: Rohextrakt; 3: 0 mM Imidazol; 4: 10 mM Imidazol; 5: 50 mM Imidazol; 6: 100 mM Imidazol; 7: 200 mM Imidazol; 8: 300 mM Imidazol; 9: 400 mM Imidazol; 10: 500 mM Imidazol.

Die enzymatischen Aktivitäten der frisch aufgereinigten *EC*-RibA Mutanten wurden wie unter 3.4.3.1 beschrieben photometrisch untersucht. Die Reaktionstemperatur betrug dabei 37 °C, der pH-Wert 8,5. Tabelle 4.14 fasst die Ergebnisse der Messungen zusammen.

Tabelle 4.14: Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen der *EC*-RibA Mutanten. Bei der relativen spezifischen Aktivität wurde die spez. Aktivität von *EC*-RibA-Mut als 100% gesetzt.

Mutante	spez. Aktivität [nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]	relative spez. Aktivität
<i>EC</i> -RibA-Mut	250,0	100%
R94K	11,0	4%
R94S	6,0	2%
Y105F	2,8	1%
Y105S	4,5	2%
Q108E	8,6	3%
Q108N	42,8	17%
Q108S	77,3	31%
T114A	4,6	2%
T114S	101,5	41%
D126N	2,4	1%
D126S	2,8	1%
R128K	0,1	0%
R128S	6,6	3%

Um eventuelle Einflüsse der eingeführten Punktmutationen auf den Oligomerisierungsgrad der *EC*-RibA Mutanten zu untersuchen, wurde das Protein *EC*-RibA-Mut sowie die aufgereinigten Mutanten auf nativen Acrylamidgele (siehe 3.2.3) aufgetrennt und sichtbar gemacht (Abbildung 4.40). Dabei konnten keine Unterschiede in den Laufzeiten der einzelnen Mutanten festgestellt werden.

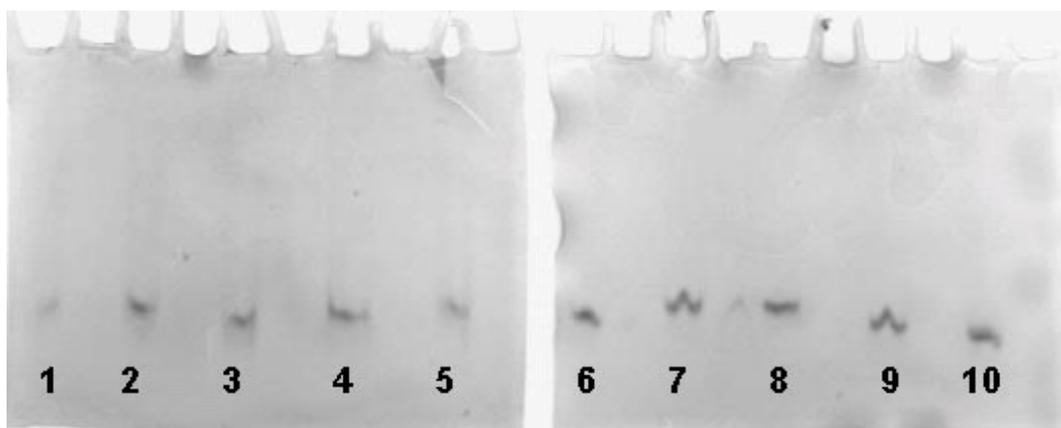


Abbildung 4.40: native Acrylamidgele der *EC*-RibA Mutanten. 1: *EC*-RibA-Mut; 2: R94K; 3: R94S; 4: Y105F; 5: Y105S; 6: T114S; 7: D126N; 8: D126S; 9: R128K; 10: R128S.

4.6.3 Die Mutante EC-RibA-Y105F

Für die Aminosäuren Arginin 128 und Tyrosin 105 wurden direkte Rollen im Reaktionsmechanismus der GTP Cyclohydrolase II postuliert (Ren *et al.*, 2005). Wurden diese Aminosäuren ausgetauscht (R128K, R128S bzw. Y105F, Y105S; vgl. 4.6.2), so war nahezu keine enzymatische Aktivität mehr messbar. Da Arginin 128 entsprechend dem gegenwärtigen Modell den nukleophilen Angriff an das α -Phosphat von GTP vollzieht, kann beim Fehlen dieser Aminosäure davon ausgegangen werden, dass keine enzymatische Reaktion stattfindet. Der Ringöffnung, an der Tyrosin 105 als Protonendonator beteiligt sein könnte, geht jedoch vermutlich die Bildung des kovalenten GMP-Adduktes voraus (siehe 1.4). Da bei den Mutanten Y105F und Y105S die für die Ringöffnung notwendige reaktive Hydroxylgruppe des Tyrosins fehlt, kann hier also vermutet werden, dass die vorherigen Schritte der GTP-Umsetzung dennoch katalysiert werden. Die Entstehung von GMP als Nebenprodukt der GTP Cyclohydrolase II-Reaktion, die durch die Abspaltung von kovalent an das Enzym gebundenem GMP vor der Ringöffnung zu erklären ist, unterstützt diese Vermutung. Es wäre also denkbar, dass die Tyrosin 105 Mutanten in der Lage sind, die Abspaltung des Pyrophosphats von GTP und somit die Bildung von GMP zu katalysieren.

Da Phenylalanin dem Tyrosin in seinen strukturellen Eigenschaften mit Ausnahme der fehlenden Hydroxylgruppe sehr ähnlich ist, lässt die Y105F Mutante einen geringeren Einfluss der Punktmutation auf die Struktur des Proteins vermuten. Deshalb sollte diese Mutante für weitere Untersuchungen aufgereinigt und dessen katalytische Aktivität untersucht werden.

4.6.4 Expression und Reinigung von EC-RibA-Y105F

Zu diesem Zweck wurde die Mutante EC-RibA-Y105F im *E. coli*-Stamm XL-1 (siehe Tabelle 2.1) wie unter 3.1.13 beschrieben exprimiert. Aufgrund ihres C-terminalen His₆-Tags konnte das Enzym mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dazu wurden 5 g der geernteten feuchten Zellmasse in 30 ml Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 300 mM NaCl; 1 mM MgCl₂) resuspendiert und durch Behandlung mit Ultraschall (3.3.1) aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde auf eine Nickel

Chelating Sepharose-Säule aufgetragen und diese bei 4 °C nach 3.3.3 entwickelt. Die einzelnen Fraktionen wurden per SDS-Gelelektrophorese (siehe 3.2.2) sichtbar gemacht. Das Enzym eluierte bei einer Imidazolkonzentration von 10-50 mM von der Säule. Die Fraktionen, die das Enzym enthielten, wurden vereint und durch Ultrafiltration (siehe 3.3.4) mit einer 10 kDa-Membran bei 4 °C auf ein Volumen von 5 ml eingeeengt. Diese Lösung wurde dann auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200) aufgetragen und diese nach 3.3.3 entwickelt (Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 100 mM KCl; 1 mM MgCl₂). SDS-Gele der einzelnen Fraktionen zeigten, dass das Enzym EC-RibA-Y105F bei einem Volumen von 225 ml von der Säule eluierte. Die Fraktionen, die das Enzym enthielten, wurden vereint und nach Konzentrationserhöhung auf ca. 10 mg/ml mittels Ultrafiltration sofort zu weiteren Messungen eingesetzt. Abbildung 4.41 fasst die vereinten Fraktionen nach jedem Reinigungsschritt zusammen.

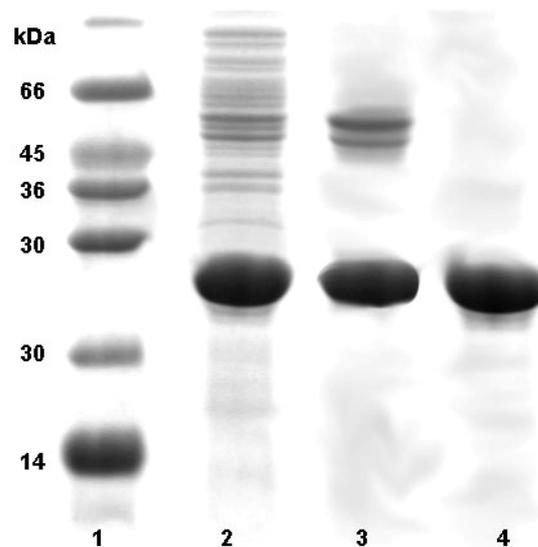


Abbildung 4.41: 16%iges SDS-Gel der Reinigung der Mutante EC-RibA-Y105F mit C-terminalem His₆-Tag: 1: Marker; 2: Rohextrakt; 3: Nickel-Chelating-Sepharose-Säule; 4: Superdex 200.

4.6.5 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von EC-RibA-Y105F

Da sich das potentielle Produkt GMP und das Edukt GTP photometrisch kaum unterscheiden lassen, wurden die Produkte der enzymatischen Umsetzung von GTP durch EC-RibA-Y105F per HPLC analysiert (siehe 3.4.3.4). Dabei wurden die Reaktionsprodukte mittels einer reversed phase Säule mit Ionenpaar-Puffer aufgetrennt und durch ihre Absorption bei 254 nm detektiert. Als Substrat für die enzymatische Untersuchung wurde GTP verwendet, welches in der verwendeten Qualitätsklasse mit geringen Mengen GDP und GMP verunreinigt ist. Die Konzentrationen dieser Kontaminanten waren ausreichend um im Eluat der Säule nachgewiesen zu werden und konnten somit als interner Standard verwendet werden, um eventuell neu gebildetes GMP eindeutig zu identifizieren. Durch Vergleich der entsprechenden Retentionszeiten des GMP-Peaks aus der GTP-Lösung mit denen einer reinen GMP-Standardlösung konnte diese Zuordnung bestätigt werden.

Nachdem in ersten Vorversuchen tatsächlich der durch EC-RibA-Y105F katalysierte Umsatz von GTP zu GMP beobachtet werden konnte, sollte anschließend die Kinetik der Umsetzung von GTP zu GMP durch die Mutante wie unter 3.4.3.4 beschrieben per HPLC untersucht werden.

Nach dem Festlegen einer Basislinie wurde die Fläche unter den Peaks von GMP, GDP und GTP bestimmt. Da die Summe dieser Konzentrationen in der Stammlösung photometrisch durch die Absorption bei 254 nm bestimmt worden war, war die Gesamtkonzentration aller Guanosinderivate (1 mM, vgl. 3.4.3.4) in den entnommenen Proben bekannt. Durch die jeweiligen Verhältnisse der Flächen unter den Peaks zueinander, konnten daher die GMP-, GDP- und GTP-Konzentrationen in jeder einzelnen Fraktion berechnet werden. Eine Zusammenfassung der Retentionszeiten, Flächen unter den Peaks und daraus berechneten Konzentrationen der einzelnen Substanzen findet sich in Tabelle 4.15, eine graphische Darstellung der Konzentrationen der einzelnen Substanzen in Abhängigkeit von der Zeit in Abbildung 4.42. Mit Hilfe der linear steigenden GMP-Konzentrationen zu Beginn der Reaktion wurde unter Benutzung von Gleichung 3.3

für EC-RibA-Y105F in Bezug auf die GMP-Produktion die spezifische Aktivität von EC-RibA-Y105F von $120 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ berechnet.

Tabelle 4.15: Messwerte der Umsetzung von GTP durch EC-RibA-Y105F.

t [min]	GMP			GDP			GTP			Gesamt Fläche
	Fläche	c[mM]	t _R [min]	Fläche	c[mM]	t _R [min]	Fläche	c[mM]	t _R [min]	
0				80375		8,433	551072		11,183	
	12895	0.019	5.95	89005	0.128	8.417	594697	0.854	11.317	696597
1	22184	0.035	5.917	79520	0.125	8.35	534218	0.840	11.217	635922
	28377	0.040	5.95	92285	0.129	8.4	595709	0.832	11.283	716371
2	32652	0.052	5.933	80281	0.129	8.35	511207	0.819	11.217	624140
	37435	0.054	5.983	88778	0.128	8.433	568481	0.818	11.333	694694
3	44649	0.069	5.9	81314	0.126	8.333	519645	0.805	11.233	645608
	51427	0.071	5.95	95432	0.132	8.4	577937	0.797	11.283	724796
5	68070	0.101	5.933	86260	0.129	8.367	516725	0.770	11.25	671055
	70074	0.101	5.983	89917	0.130	8.433	532224	0.769	11.333	692215
7,5	93660	0.142	5.933	84241	0.128	8.367	480735	0.730	11.25	658636
	103663	0.141	5.95	94535	0.128	8.4	538986	0.731	11.267	737184
10	116173	0.177	5.967	83672	0.127	8.417	457744	0.696	11.3	657589
	114656	0.177	5.967	84400	0.130	8.417	450042	0.693	11.317	649098
15	160262	0.246	5.933	82107	0.126	8.383	409114	0.628	11.267	651483
	178838	0.248	5.983	92940	0.129	8.417	448127	0.622	11.317	719905
20	201755	0.313	5.967	82592	0.128	8.433	360236	0.559	11.317	644583
	211006	0.313	5.967	87625	0.130	8.417	375162	0.557	11.3	673793
30	291875	0.437	5.95	84988	0.127	8.383	291028	0.436	11.283	667891
	299210	0.429	5.983	88942	0.127	8.433	309731	0.444	11.333	697883
45	378819	0.564	5.967	82960	0.124	8.433	209321	0.312	11.317	671100
	426443	0.567	5.967	95307	0.127	8.4	230282	0.306	11.283	752032
60	429121	0.661	5.95	82419	0.127	8.4	137680	0.212	11.283	649220
	439587	0.671	5.983	84011	0.128	8.417	131327	0.201	11.317	654925
90	517011	0.774	5.968	83144	0.124	8.417	67914	0.102	11.317	668069
	541931	0.774	5.983	87156	0.124	8.417	71121	0.102	11.283	700208
120	610665	0.823	5.95	92722	0.125	8.4	38920	0.052	11.283	742307
	585627	0.8266	6,0	87582	0.124	8.433	35797	0.050	11.333	709006

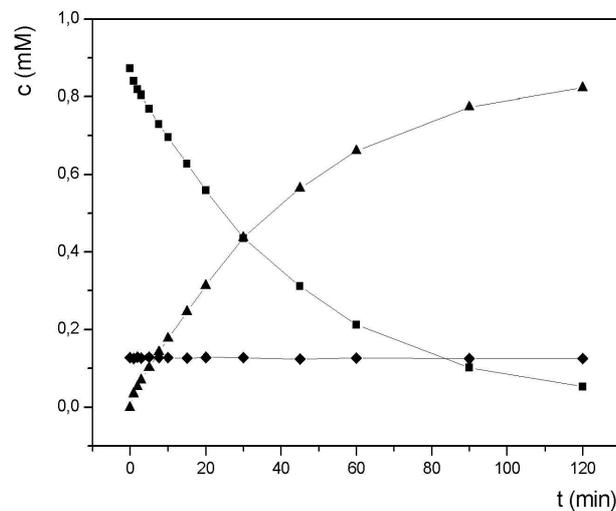


Abbildung 4.42: Graphische Darstellung der Umsetzung von GTP (■) zu GMP (▲) durch EC-RibA-Y105F. Die GDP (◆)-Konzentration blieb nahezu konstant.

4.6.6 Diskussion

Alle im Rahmen dieses Projektes klonierten Expressionsvektoren für EC-RibA-Mut und die Mutanten R94K, R94S, Y105F, Y105S, Q108E, Q108N, Q108S, T114A, T114S, D126N, D126S, R128K und R128S mit C-terminalem His₆-Tag führten in *E. coli* XL-1 zu sehr guter Expression und alle entstandenen Proteine konnten über Nickel-NTA Spin columns effizient aufgereinigt werden. Die spezifische Aktivität des Wildtypenzym mit C-terminalem His₆-Tag (EC-RibA-Mut) lag mit 250 nmol mg⁻¹ min⁻¹ deutlich höher als die veröffentlichte spezifische Aktivität des Enzyms ohne His₆-Tag (Kaiser *et al.*, 2002). Abweichungen zum Literaturwert lassen sich durch Unterschiede bei der Aufarbeitung (z.B. schnellere und gekühlte Reinigung, kein Gelfiltrationsschritt) und der Lagerzeit der instabilen GTP Cyclohydrolase II (sofortige Messung der Enzymaktivität nach der Reinigung) erklären.

Für alle Mutanten mit einer relativen spezifischen Aktivität von weniger als 5% (vgl. Tabelle 4.14) ist aufgrund der geringen Messwerte und der relativ großen Schwankungsbreite der Messergebnisse am Photometer die Exaktheit der Zahlenwerte relativ gering. Die entsprechenden 21 Mutanten wiesen keine eindeutig messbare enzymatische Aktivität mehr auf.

Keine der Mutanten war so stark in der Tertiärstruktur verändert, dass es zu einem abweichenden Laufverhalten im Nativgel kam. Es kann also davon ausgegangen werden, dass alle aufgereinigten Mutanten als Dimer vorlagen (vgl. 1.4).

Arginin 94 Mutanten

Arginin 94 ist nach dem aktuellen Strukturmodell direkt an der Bindung des Substrates GTP bzw. des Substratanalogons GMPCPP beteiligt (Ren *et al.*, 2005). Dabei bildet es zum einen Wasserstoffbrückenbindungen mit dem α -Phosphat des GMPCPPs und dem O-4 der Ribose aus und positioniert zum anderen den Guaninring des GTPs parallel zur Guanidiniumgruppe des Arginins (siehe Abbildung 4.43). Die Funktion dieses Arginins in der Substratbindung kann offensichtlich nicht durch Lysin oder Serin ersetzt werden, denn die entsprechenden Mutanten R94K und R94S waren nahezu inaktiv (siehe Tabelle 4.14). Die essentielle Rolle des Arginins 94 in der Substratbindung konnte auf diesem Wege also auch biochemisch bestätigt werden.

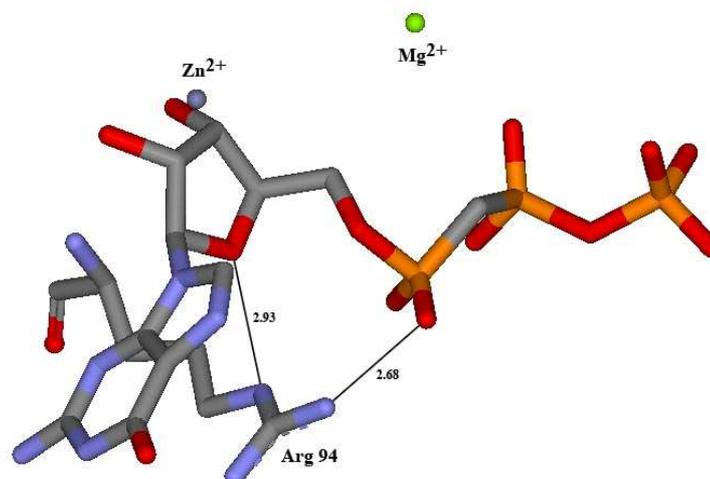


Abbildung 4.43: Struktur von EC-RibA Arginin 94 mit dem Substrat GMPCPP und den Ionen Zn^{2+} und Mg^{2+} , nach (Ren *et al.*, 2005).

Tyrosin 105 Mutanten

In der 3D-Struktur der GTP Cyclohydrolase II aus *E. coli* wurden zwei Wassermoleküle identifiziert, die Wasserstoffbrückenbindungen mit Tyrosin 105 eingehen (siehe Abbildung 4.44). Eines dieser Moleküle, H_2O 44, ist gleichzeitig Ligand des Zinkions und vollzieht entsprechend des vorgeschlagenen

Mechanismus den nukleophilen Angriff auf den Imidazolring des GTPs, wozu es zunächst durch Zn^{2+} aktiviert wird (siehe 1.4). Die Protonierung von N-7 des GTPs durch das azide Proton des Tyrosins soll dabei die Ringöffnung ermöglichen. Die entstehende Hydroxylatgruppe ist ein denkbarer Akzeptor für das Proton des aktivierten Wassermoleküls (Ren *et al.*, 2005). Ist der vorgeschlagene Mechanismus korrekt, so wäre Tyrosin 105 essentiell für die Öffnung des Imidazolrings. Wurde Tyrosin 105 in den Mutanten Y105F und Y105S durch Phenylalanin, bzw Serin ausgetauscht, so ließ sich kein Umsatz von GTP zu 2,5-Diamino-6- β -ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat mehr beobachten (siehe Tabelle 4.14). Da Phenylalanin sich nur durch die fehlende Hydroxylgruppe von Tyrosin unterscheidet, zeigen die Ergebnisse die Bedeutung dieser funktionellen Gruppe für die enzymatische Aktivität der GTP Cyclohydrolase II. Die Hydroxylgruppe des Serins ist in der Mutante Y105S vermutlich nicht richtig positioniert und kann die Rolle der funktionellen Gruppe des Tyrosins nicht übernehmen.

Die Untersuchung der Reaktionsprodukte der GTP-Umsetzung durch EC-RibA-Y105F hat eindeutig gezeigt, dass diese Mutante in der Lage ist, die Bildung von GMP zu katalysieren, nicht aber die Bildung des GTP Cyclohydrolase II-Produktes 2,5-Diamino-6- β -ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat. Auf diesem Weg konnte die Mehrstufigkeit des Reaktionsmechanismus gezeigt werden und die Erklärung für das Auftreten des Nebenproduktes GMP in bestätigt werden (vgl. 1.4). Dieses Ergebnis unterstützt außerdem die aus den strukturellen Daten gefolgerte Beteiligung von Tyrosin 105 an der Ringöffnung (Ren *et al.*, 2005) und liefert starke Hinweise auf die Bildung eines GMP-Enzym Adduktes, die von Tyrosin 105 unabhängig ist.

Die spezifische Aktivität von EC-RibA-Y105F in Bezug auf die GMP-Bildung ist mit $120 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ zwar nur etwa halb so hoch wie die von EC-RibA-Mut in Bezug auf die Bildung von 2,5-Diamino-6- β -ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat ($250 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Dieser geringere Messwert ist jedoch mit hoher Sicherheit durch den zusätzlichen Gelfiltrationsschritt bei der Aufreinigung (siehe 4.6.4) zu erklären. Der ermittelte Wert entspricht genau dem Literaturwert des Wildtypenzym (vgl. oben; (Kaiser *et al.*, 2002), welches dort nach einem ähnlichen Protokoll aufgereinigt wurde.

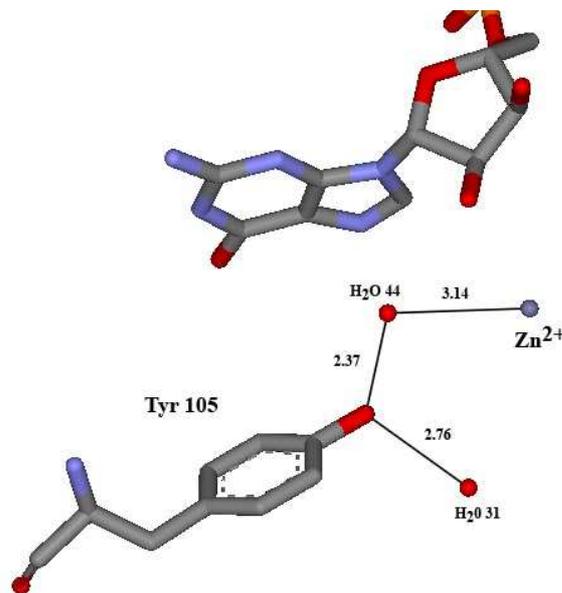


Abbildung 4.44: Struktur von EC-RibA Tyrosin 105 mit Teilen des Substrates GMPCPP, dem Zn²⁺-Ion, sowie den Wassermolekülen 31 und 44, nach (Ren *et al.*, 2005).

Glutamin 108 Mutanten

Das Glutamin 108 bildet mit seiner Aminogruppe eine Wasserstoffbrücke zum O-6 des Guaninrings des GMPCPPs aus und ist somit direkt an der Substratbindung beteiligt (siehe Abbildung 4.45). Eventuell spielt diese Aminosäure auch eine Rolle bei der Unterscheidung der Basen unterschiedlicher Nukleotide bzw. der spezifischen Bindung von Guanin-haltigen Nukleotiden (Ren *et al.*, 2005). Der Austausch des Glutamins 108 durch Glutamat in der Mutante Q108E verhinderte die enzymatische Bildung von 2,5-Diamino-6- β -ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat, während die Mutanten Q108N und Q108S eine Restaktivität von 17%, bzw. 31% im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen (siehe Tabelle 4.14). Möglicherweise kann die Aminogruppe des Asparagins, bzw. die Hydroxylgruppe des Serins als Protonendonator für die Wasserstoffbrücke fungieren und so die Funktion des Glutamins in der Substratbindung teilweise erfüllen, während Glutamat kein Proton bereitstellen kann. Die erhaltenen Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Wasserstoffbrücke zwischen dem Protein und dem O-6 des Guaninrings für die Substratbindung.

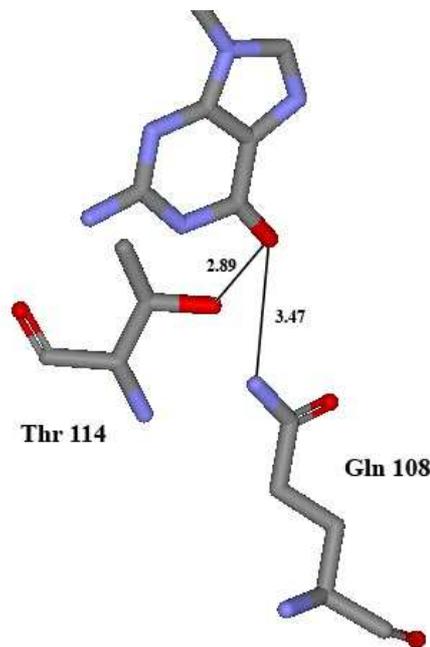


Abbildung 4.45: Struktur von EC-RibA Glutamin 108 und Threonin 114 mit Teilen des Substrates GMPCPP, nach (Ren *et al.*, 2005).

Threonin 114 Mutanten

Die Hydroxylgruppe des Threonins 114 bildet ebenfalls eine H-Brücke mit dem O-6 des Guaninrings von GMPCPP aus (siehe Abbildung 4.45). Die Threonin-Seitenkette ist so an der Bindung des Substrats beteiligt und spielt eventuell, wie auch Glutamin 108, eine Rolle in der Substratspezifität der GTP Cyclohydrolase II (Ren *et al.*, 2005). Die Mutante T114A ist nicht in der Lage, den Umsatz von GTP zu 2,5-Diamino-6- β -ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat in nachweisbaren Mengen zu katalysieren, während T114S eine enzymatische Aktivität von etwa 41% der Wildtyp-Aktivität aufweist (siehe Tabelle 4.14). Möglicherweise ist hier wie bei den Glutamin 108 Mutanten die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke mit dem Substrat für die Restaktivität entscheidend. Während also die Hydroxylgruppe des Serins ein H-Atom enthält, das Teil einer solchen Wasserstoffbrücke sein kann, enthält Alanin keine entsprechenden H-Atome, wodurch das Substrat möglicherweise nicht gebunden werden kann.

Aspartat 126 Mutanten

Aspartat 126 stabilisiert Arginin 128 durch Salzbrücken (siehe Abbildung 4.46) und verstärkt so die Nukleophilie der Guanidiniumgruppe des Arginins 128 (Ren *et al.*,

2005). Damit spielt Aspartat 126 wahrscheinlich eine indirekte Rolle im nukleophilen Angriff auf das α -Phosphat des GTPs. Wurde das Aspartat 126 in den Mutanten D126N und D126S durch Asparagin, bzw. Serin ersetzt, so ließ sich kaum noch ein Umsatz von GTP zu 2,5-Diamino-6- β -ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon 5'-phosphat beobachten (siehe Tabelle 4.14). Weder Asparagin, noch Serin tragen eine negative Ladung in ihrer Seitenkette und sind somit nicht in der Lage, eine Salzbrücke mit Arginin einzugehen. Die denkbare Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asparagin oder Serin mit Arginin 128 kann die Funktion der Salzbrücke entweder nicht ersetzen, oder tritt aufgrund struktureller Limitierungen nicht auf. Möglicherweise ist die Struktur des aktiven Zentrums auch durch den fehlenden Seitenkettenkontakt beeinträchtigt. In jedem Fall bestätigen die erhaltenen Ergebnisse die wichtige Rolle von Aspartat 126 im Reaktionsmechanismus der GTP Cyclohydrolase II.

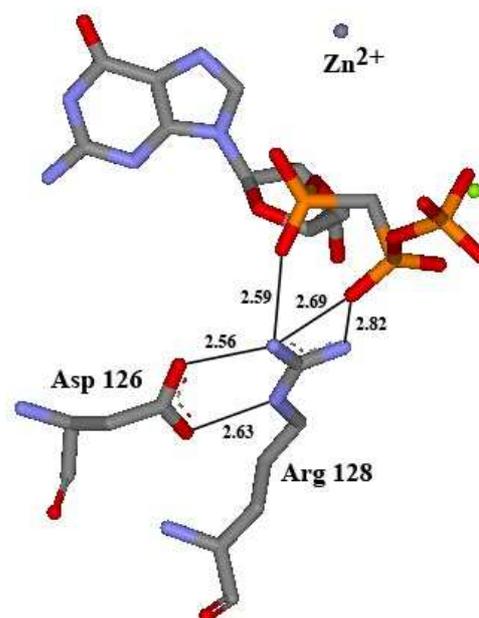


Abbildung 4.46: Struktur von EC-RibA Aspartat 126 und Arginin 128 mit dem Substrat GMPCPP, sowie dem Zn^{2+} - und dem Mg^{2+} -Ion, nach (Ren *et al.*, 2005).

Arginin 128 Mutanten

Arginin 128 bildet neben den Salzbrücken mit Aspartat 126 verschiedene H-Brücken mit dem α - und dem β -Phosphat des GMPCPPs aus (siehe Abbildung 4.46). Nach dem gegenwärtigen Modell erhöhen die Salzbrücken mit Aspartat 126 die Nukleophilie des Arginins und ermöglichen so den nukleophilen Angriff auf das

α -Phosphat des GTPs und somit den ersten Teilschritt der Enzymreaktion (Ren *et al.*, 2005). EC-RibA Mutanten, in denen Arginin 94 durch Lysin oder Serin ausgetauscht wurde, wiesen keine nennenswerte Bildung von 2,5-Diamino-6- β -ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon 5'-phosphat mehr auf (siehe Tabelle 4.14), obwohl beide Aminosäureseitenketten ebenfalls eine nukleophile Gruppe enthalten. Es lässt sich vermuten, dass durch diese beiden Aminosäuren keine ausreichend nukleophile funktionelle Gruppe in die richtige Position für einen Angriff auf das α -Phosphat gebracht werden kann. Dies unterstreicht die essentielle Bedeutung des vollständig konservierten Arginins 128 für den Reaktionsmechanismus der GTP Cyclohydrolase II und unterstützt dessen zugeordnete Rolle als Nukleophil.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Informationen über GTP Cyclohydrolasen II und 3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat Synthasen aus verschiedenen Hefen, Bakterien und Pflanzen gewonnen werden. Nach vorangehender Herstellung funktionsfähiger Expressionskonstrukte auf DNA-Ebene ist es bei allen Teilprojekten gelungen, rekombinantes Protein in ausreichender Menge durch verschiedene *E. coli*-Stämme überexprimieren zu lassen. Ebenso konnte für jedes Protein ein effizientes Reinigungsprotokoll erstellt werden. Die anschließenden Untersuchungen der Enzyme reichten von Michaelis-Menten-Kinetiken zur Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten und der K_M -Werte für die einzelnen Substrate, der Bestimmung der Zinkgehalte in den aktiven Zentren und NMR-Untersuchungen über verschiedene Methoden zur Bestimmung der Quartärstrukturen der Enzyme bis zu thermodynamischen Untersuchungen. Da kürzlich erstmals die 3-D-Struktur einer GTP Cyclohydrolase II veröffentlicht wurde (Ren *et al.*, 2005), konnten die dort postulierten Beteiligungen verschiedener Aminosäuren am Reaktionsmechanismus des Enzyms biochemisch durch eine Mutagenesestudie überprüft werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen unter anderem in Medizin und Pflanzenschutz als Grundlage für die Entwicklung von Inhibitoren gegen die untersuchten Enzyme dienen. Da zahlreiche humanpathogene Organismen kein Aufnahmesystem für Riboflavin besitzen, sind sie auf eine funktionierende Vitaminbiosynthese angewiesen. Die Inhibitoren stellen somit eine Basis für die Entwicklung neuer Antiinfektiva dar. Angesichts der rasanten Resistenzentwicklungen gegen derzeit verfügbare Wirksubstanzen ist die Explorierung neuer „Antiinfektiva-Targets“ dringend notwendig. Unter toxikologischen Gesichtspunkten ist es dabei vorteilhaft, dass die Enzyme der Riboflavinbiosynthese im Menschen nicht vorkommen.

6 Anhang

6.1 Primersequenzen

Primer	Sequenz
AFRibA1- <i>NcoI</i> -vo	5' ATA ATA ATA ACC ATG GAA GAG GTT TCA TCT CAC GTA AAA TC 3'
AF-RibA- <i>Bam</i> HI-hi	5' TAT TAT GGA TCC TCA GTC GTT GAA GCA TAT CAA GTG TCC 3'
AFRibA-CHR-hi	5' GCT CAG CTC AGC TCC ACA CTC 3'
AFRibA-CHR-vo	5' GTT TAT ATT CCC CCG ACC AAC 3'
AFRibA-H6 - <i>NdeI</i> -vo	5' ATA ATA ATA CAT ATG CAT CAT CAC CAC CAT CAT GGT GAA GAG GTT TCA TCT CAC GTA AAA TCC GG 3'
AFRibB-Rbs- <i>EcoRI</i> -vo	5' ATA ATA GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA TTA ACT ATG ATA CTC GAC TTT GAA GAG TCG TTG 3'
AFRibB-H6- <i>HindIII</i> -hi	5' TAT TAT TAT AAG CTT AAT GAT GGT GGT GAT GAT GGG ATC CGA CGA ACA GGC TCA CCT CAA CCT C 3'
BSEcoRI	5' ATA ATA GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA TTA ACT ATG 3'
CAH6R1-1	5' ATG CAT CAT CAC CAC CAT CAT GGT TCT CTT CCA CAT GTT AAA TGT CTG GCA CG 3'
CAH6R1-390-2	5' CAT TCA CTG TGG ATA CGT ACC AGA G 3'
CAH6R1-Rbs- <i>EcoRI</i> -3	5' ATA ATA GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA TTA ACT ATG CAT CAT CAC CAC CAT CAT GGT TC 3'
CARIB1A-1	5' AAC AAA AGT GGT CTG CCT GAC AGT CTA CCA CAT GTT AAA TGT CTG GCA CGT GCA CGT ATC CCA ACA ACA CAG 3'
CARIB1A-2	5' GTC AAT ATT GTT TTC ATA CAG GTG GAG GAA GAT ATC TGG GCC CTG TGT TGT TGG GAT ACG TGC ACG TGC CAG 3'
CARIB1A-3	5' CTG CCA GTT ACC ACG CCA CAA CCA CCT CCA GCA ATC ACG CAA TCA ATG CGT AAC AAA AGT GGT CTG CCT GAC AGT C 3'
CARIB1A-4	5' GAA CGC GAA CGA ATG TCC TCA CCA AAC ACA ATT GCC AGG TGT TCT TTG TTG TCA ATA TTG TTT TCA TAC AGG TG 3'
CARIB1A-5	5' GTC AAT CGT ATC CCA ATG GTG ACA CCG AAA CCG TCG ACA AAT AAT CTG CCA GTT ACC ACG CCA CAA CCA C 3'
CARIB1A-6	5' CAT ACG GTC TTG TTG AGT TTC ACC AGG ATA ATG TTT AAA CAG TGA ACG CGA ACG AAT GTC CTC ACC 3'
CARIB1A-7	5' ATC CGC ACT CCA CCT ACA GTT TCC ACA TCC CCA GAT CTG GAT GTC AAT CGT ATC CCA ATG GTG ACA C 3'
CARIB1A-8	5' CAG CAA TCG TAC GAC CAG GTG TCA GAC GAC CAA TGT AAG CAC CAC GCG TCA TAC GGT CTT GTT GAG TTT CAC C 3'
CARIB1A-9	5' CGA TCA AAC ATC CAA AAC CAT CTA CTG TAA GCG CTA GCA GCC ACG GTA TCC GCA CTC CAC CTA CAG TTT CC 3'
CARIB1A-10	5' CAG GTT ACC ATC TTT GTC AAA CTT AAG TTC ATT TGT ACC ATC TGA ATC AGC AAT CGT ACG ACC AGG TGT CAG 3'
CARIB1A-11	5' ATA ATA GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA TTA ACT ATG ACA TCG ATA AAA CAT CCA AAA CCA TCT AC 3'
CARIB1A-12	5' TAT TAT TGG ATC CGT GTA TGT CAG ACT GTC AAT GAT CAG GTT ACC ATC TTT GTC AAA CTT AAG 3'
CARIB1B-1	5' ACA GTG GAA GCC AAT CTG ATT CTG CGT CAC CCA GCT GAT GGT CGT AAC TTT TCT CTG GCC ACG GCT ATC CTG 3'
CARIB1B-2	5' GTT AGT GAG CAG TTT AAT TTC TAC GAG ACC CAG ATC AAC CAG GAT AGC CGT GGC CAG AGA AAA GTT ACG 3'
CARIB1B-3	5' CTG GGT GAA AAA CTG AAA GCA TAT AAC CTG CAG GAT CTT GGC GCC GAT ACA GTG GAA GCC AAT CTG ATT CTG 3'

CARIB1B-4	5' AAC TTC TTG GTG TTT ACC TTC AAC GGC AAC AAT CTT ATC TGG GTT GTT AGT GAG CAG TTT AAT TTC TAC 3'
CARIB1B-5	5' GGT TGT ATG GTA TAT CTG CGT CAA GAA GGC CGC GGT ATT GGT CTG GGT GAA AAA CTG AAA GCA TAT AAC 3'
CARIB1B-6	5' CTT TAC CCC AAC TCA GTG GTA CCA TTG GGA CAC GTT CCA GCA CTT TAA CTT CTT GGT GTT TAC CTT CAA C 3'
CARIB1B-7	5' GAA CAA TTT GAT GAA GCT GGT CGT ATC ATG GGT GAA GCG GGC CAT GGT TGT ATG GTA TAT CTG CGT CAA G 3'
CARIB1B-8	5' CAG ATA ACC TTC AAT TTC TTT ACT TTT GAT ACC ATT CTT ACC ATC TTT ACC CCA ACT CAG TGG TAC CAT TG 3'
CARIB1B-9	5' TAC ACC GGT GAA ACT GCA TGG AGT GCG CGC TGT GAT TGT GGT GAA CAA TTT GAT GAA GCT GGT CGT ATC 3'
CARIB1B-10	5' CTC AAG CAG ATG ACC CAT ACG CTC AAT TTT GGT GCT CAG ATA ACC TTC AAT TTC TTT ACT TTT G 3'
CARIB1B-11	5' ATA ATA ACG GAT CCA ACT CTG GTA CGT ATC CAC AGT GAA TGT TAC ACC GGT GAA ACT GCA TGG AGT G 3'
CARIB1B-12	5' TAT TAT TAT AAG CTT AGA TTT TGA TGG GTT TCT CAA GCA GAT GAC CCA TAC GCT C 3'
CARIB1-H6- <i>EcoRI-ClaI</i> -fw	5' AAT TCA TTA AAG AGG AGA AAT TAA CTA TGC ATC ACC ATC ACC ACC ATG GAT CCA CAT 3'
CARIB1-H6- <i>EcoRI-ClaI</i> -rv	5' CGA TGT GGA TCA ATG GTG GTG ATG GTG ATG CAT AGT TAA TTT CTC CTC TTT AAT G 3'
ECCY2-AgeI-1	5' ACC GTA GAG GCT AAC CAC CAG TTA GGC TTC GCC GCT GAT GAG CGC GAC TTC ACT CTT TGC GCT GAT ATG 3'
ECCY2-2	5' GGT TAA CAA GCG GAC TTC ATT GAC GCC TAG GAG TTT AAA CAT ATC AGC GCA AAG AGT GAA GTC GCG CTC 3'
ECCY2-3	5' GCT GAA TAA AAT CCG CGC GTA CGC ACT GCA GGA TCA AGG TTA CGA TAC CGT AGA GGC TAA CCA CCA GTT AG 3'
ECCY2-4	5' ATT AAT CCC TGC TTC GGT CAG AAT TTC GAC TTT TTT CGG GTT ATT GGT TAA CAA GCG GAC TTC ATT GAC 3'
ECCY2-5	5' ATT TTG CTG TAT CAC CGT CAG GAA GGT CGT AAC ATA GGC CTG CTG AAT AAA ATC CGC GCG TAC GC 3'
ECCY2-6	5' CGT TAT TGG GGT TAC GAC CTA CAA TCA ATG GTA CGC GTT CAA CAA TAT TAA TCC CTG CTT CGG TCA GAA T 3'
ECCY2-7	5' CCA GCT CGA AGC AGC GCT GAC GCA AAT TGC CGA GGA AGG CCG CGG TAT TTT GCT GTA TCA CCG TCA GGA AG 3'
ECCY2-8	5' CAG CAA ATG GCC CAT TTT CTC GGC TTT GGT ATC GAG ATA ATG TTC GTT ATT GGG GTT ACG ACC TAC AAT 3'
ECCY2-9	5' ATA ATA ATA ACC GGT GAC GCC CTG TTC AGC TTG CGC TGC GAT TGT GGC TTC CAG CTC GAA GCA GCG CTG ACG CAA 3'
ECCY2-H6- <i>HindIII</i> -10	5' TAT TAT TAT AAG CTT AAT GAT GGT GGT GAT GAT GGG ATC CTT TGT TCA GCA AAT GGC CCA TTT TCT CGG C 3'
ECC2-SplI-R94K-C	5' GGT ATT TTG CTG TAT CAC CGT CAG GAA GGT AAG AAC ATA GGC CTG CTG AAT AAA ATC CGC GCT TAC GCA CTG CA 3'
ECC2-SplI-R94K-AC	5' GTG CGT AAG CGC GGA TTT TAT TCA GCA GGC CTA TGT TCT TAC CTT CCT GAC GGT GAT ACA GCA AAA TAC CGC 3'
ECC2-SplI-R94S-C	5' GGT ATT TTG CTG TAT CAC CGT CAG GAA GGT TCG AAC ATA GGC CTG CTG AAT AAA ATC CGC GCT TAC GCA CTG CA 3'
ECC2-SplI-R94S-AC	5' GTG CGT AAG CGC GGA TTT TAT TCA GCA GGC CTA TGT TCG AAC CTT CCT GAC GGT GAT ACA GCA AAA TAC CGC 3'
ECC2-SplI-Y105F-C	5' GGT AT TTT GCT GTA TCA CCG TCA GGA AGG TCG TAA CAT AGG CCT GCT GAA TAA AAT CCG CGC GTT CGC ACT GCA 3'
ECC2-SplI-Y105F-AC	5' GTG CGA ACG CGC GGA TTT TAT TCA GCA GGC CTA TGT TAC GAC CTT CCT GAC GGT GAT ACA GCA AAA TAC CGC 3'
ECC2-SplI-Y105S-C	5' GGT ATT TTG CTG TAT CAC CGT CAG GAA GGT CGT AAC ATA GGC CTG CTG AAT AAA ATC CGC GCG TCA GCA CTG CA 3'
ECC2-SplI-	5' GTG CTG ACG CGC GGA TTT TAT TCA GCA GGC CTA TGT TAC

Y105S-AC	GAC CTT CCT GAC GGT GAT ACA GCA AAA TAC CGC 3'
ECC2-PstI-Q108E-C	5' GTA CGC ACT GGA GGA TCA AGG TTA CGA TAC CGT AGA GGC TAA CCA CCA GTT AGG CTT CGC CGC TGA TGA GCG CGA CTT CAC TCT TTG CGC TGA TAT GTT TAA ACT C 3'
ECC2-PstI-Q108E-AC	5' CTA GGA GTT TAA ACA TAT CAG CGC AAA GAG TGA AGT CGC GCT CAT CAG CGG CGA AGC CTA ACT GGT GGT TAG CCT CTA CGG TAT CGT AAC CTT GAT CCT CCA GTG C 3'
ECC2-PstI-Q108N-C	5' GTA CGC ACT GAA CGA TCA AGG TTA CGA TAC CGT AGA GGC TAA CCA CCA GTT AGG CTT CGC CGC TGA TGA GCG CGA CTT CAC TCT TTG CGC TGA TAT GTT TAA ACT C 3'
ECC2-PstI-Q108N-AC	5' CTA GGA GTT TAA ACA TAT CAG CGC AAA GAG TGA AGT CGC GCT CAT CAG CGG CGA AGC CTA ACT GGT GGT TAG CCT CTA CGG TAT CGT AAC CTT GAT CGT TCA GTG C 3'
ECC2-PstI-Q108S-C	5' GTA CGC ACT GTC GGA TCA AGG TTA CGA TAC CGT AGA GGC TAA CCA CCA GTT AGG CTT CGC CGC TGA TGA GCG CGA CTT CAC TCT TTG CGC TGA TAT GTT TAA ACT C 3'
ECC2-PstI-Q108S-AC	5' CTA GGA GTT TAA ACA TAT CAG CGC AAA GAG TGA AGT CGC GCT CAT CAG CGG CGA AGC CTA ACT GGT GGT TAG CCT CTA CGG TAT CGT AAC CTT GAT CCG ACA GTG C 3'
ECC2-PmeI-T114A-C	5' GGA TCA AGG TTA CGA TGC CGT AGA GGC TAA CCA CCA GTT AGG CTT CGC CGC TGA TGA GCG CGA CTT CAC TCT TTG CGC TGA TAT GTT CAA ACT C 3'
ECC2-PmeI-T114A-AC	5' CTA GGA GTT TGA ACA TAT CAG CGC AAA GAG TGA AGT CGC GCT CAT CAG CGG CGA AGC CTA ACT GGT GGT TAG CCT CTA CGG CAT CGT AAC CTT GAT CCT GCA 3'
ECC2-PmeI-T114S-C	5' GGA TCA AGG TTA CGA TTC CGT AGA GGC TAA CCA CCA GTT AGG CTT CGC CGC TGA TGA GCG CGA CTT CAC TCT TTG CGC TGA TAT GTT CAA ACT C 3'
ECC2-PmeI-T114A-AC	5' CTA GGA GTT TGA ACA TAT CAG CGC AAA GAG TGA AGT CGC GCT CAT CAG CGG CGA AGC CTA ACT GGT GGT TAG CCT CTA CGG CAT CGT AAC CTT GAT CCT GCA 3'
ECC2-PmeI-D126N-C	5' GGA TCA AGG TTA CGA TAC CGT AGA GGC TAA CCA CCA GTT AGG CTT CGC CGC TAA CGA GCG CGA CTT CAC TCT TTG CGC TGA TAT GTT CAA ACT C 3'
ECC2-PmeI-D126N-AC	5' CTA GGA GTT TGA ACA TAT CAG CGC AAA GAG TGA AGT CGC GCT CGT TAG CGG CGA AGC CTA ACT GGT GGT TAG CCT CTA CGG TAT CGT AAC CTT GAT CCT GCA 3'
ECC2-PmeI-D126S-C	5' GGA TCA AGG TTA CGA TAC CGT AGA GGC TAA CCA CCA GTT AGG CTT CGC CGC TTC AGA GCG CGA CTT CAC TCT TTG CGC TGA TAT GTT CAA ACT C 3'
ECC2-PmeI-D126S-AC	5' CTA GGA GTT TGA ACA TAT CAG CGC AAA GAG TGA AGT CGC GCT CTG AAG CGG CGA AGC CTA ACT GGT GGT TAG CCT CTA CGG TAT CGT AAC CTT GAT CCT GCA 3'
ECC2-PmeI-R128K-C	5' GGA TCA AGG TTA CGA TAC CGT AGA GGC TAA CCA CCA GTT AGG CTT CGC CGC TGA TGA GAA GGA CTT CAC TCT TTG CGC TGA TAT GTT CAA ACT C 3'
ECC2-PmeI-R128K-AC	5' CTA GGA GTT GAA ACA TAT CAG CGC AAA GAG TGA AGT CCT TCT CAT CAG CGG CGA AGC CTA ACT GGT GGT TAG CCT CTA CGG TAT CGT AAC CTT GAT CCT GCA 3'
ECC2-PmeI-R128S-C	5' GGA TCA AGG TTA CGA TAC CGT AGA GGC TAA CCA CCA GTT AGG CTT CGC CGC TGA TGA GTC GGA CTT CAC TCT TTG CGC TGA TAT GTT CAA ACT C 3'
ECC2-PmeI-R128S-AC	5' CTA GGA GTT GAA ACA TAT CAG CGC AAA GAG TGA AGT CCG ACT CAT CAG CGG CGA AGC CTA ACT GGT GGT TAG CCT CTA CGG TAT CGT AAC CTT GAT CCT GCA 3'
mRNA5	5' CTC CAT TTT AGC TTC CTT AGC TCC TG 3'
OSRibA- <i>Bsp</i> HI-	5' ATA ATA ATC ATG ACT GAA CAA GAT TTG GAT AGC CCA AC

vo	3'
OSRibA-CycII- <i>Bsp</i> HI-vo	5' ATA ATA ATA ATC ATG AGG CTA GTT GAA CGT TCA TCT GTT GC 3'
OSRibA- <i>Hind</i> III- hi	5' TAT TAT TAT AAG CTT AAT GCT CCC CTT TGG CAC CAT TGC TG 3'
OSRibA-Mut- <i>Hind</i> III-hi	5' TAT TAT TAT AAG CTT AGT CTC TTT TTC TCC TAT ATC TAA TC 3'
pNCO XH-SEQ	5' ATC ACG AGG CCC TTT CGT CTT CAC 3'

7 Literaturverzeichnis

- Achenbach-Richter, L., Stetter, K. O. and Woese, C. R. (1987). "A possible biochemical missing link among the archaebacteria." Nature **327**: 348-349.
- 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., Eberhardt, S., Eisenreich, W., Fischer, M., Herz, S., Illarionov, B., Kis, K., et al. (2001). "Biosynthesis of riboflavin." Vitam Horm **61**: 1-49.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K. and Richter, G. (2000). "Biosynthesis of vitamin B2 (riboflavin)." Annu Rev Nutr **20**: 153-67.
- Bacher, A., Eberhardt, S. and Richter, G. (1996). "Biosynthesis of riboflavin. in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." Cellular and molecular biology. Neidhardt, F. C. et al. (eds.), American Society for Microbiology, Washington DC **2**: 657-664.
- Bacher, A., Eisenreich, W., Kis, K., Ladenstein, R., Richter, G., Scheuring, J. and Weinkauff, S. (1993). in Bioorganic Chemistry Frontiers (Dugas, H., and Schmidtchen, F. P., eds), Springer, Berlin **3**: 147-192.
- Bacher, A., Le Van, Q., Buehler, M., Keller, P. J. and Floss, H. G. (1983a). "Biosynthesis of riboflavin. Origin of the xylene ring." Chem. Biol. Pteridines, Proc. Int. Symp. Pteridines Folic Acid Deriv.: Chem., Biol. Clin. Aspects **7**: 699-703.
- Bacher, A., Le Van, Q., Keller, P. J. and Floss, H. G. (1983b). "Biosynthesis of riboflavin. Incorporation of ¹³C-labeled precursors into the xylene ring." J. Biol. Chem. **258**: 13431-13437.
- Bacher, A. and 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**(18): 4647-52.
- Bacher, A., Mailander, B., Baur, R., Eggers, U., Harders, H. and H., S. (1975). "Studies on the biosynthesis of riboflavin." Chem. Biol. Pteridines, Proc. Int. Symp. **5**: 285-290.
- Bacher, A., Van, Q. L., Keller, P. J., Floss, H. G. B. o. r., Am., I. o. m. C.-l. p. i. t. x. r. J. and Chem. Soc. **107**, -. (1985). "Biosynthesis of riboflavin. Incorporation of multiply ¹³C-labeled precursors into the xylene ring." J. Am. Chem. Soc. **107**: 6380-6385.
- 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**: 248-54.
- Brown, G. M. and Reynolds, J. J. (1963). "Biogenesis of the Water-Soluble Vitamins." Annu Rev Biochem **32**: 419-62.
- Brown, G. M. and Williamson, J. M. (1982). "Biosynthesis of riboflavin, folic acid, thiamine, and pantothenic acid." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **53**: 345-81.
- Brown, G. M. and Williamson, J. M. (1987). "Biosynthesis of folic acid, riboflavin, thiamine and pantothenic acid in *Escherichia coli* and

- Salmonella thyphimurium (F.C. Neidhardt et al., eds.), American Society for Microbiology, Washington, DC." **1**: 521-538.
- Brown, G. M., Yim, J., Suzuki, Y., Heine, M. C. and Foor, F. (1975). "The Enzymatic Synthesis of Pterins in Escherichia coli." Chem. Biol. Pteridines, Proc. Int. Symp. **5**: 219-245.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M. (1987). "XL-blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with β -galactosidase selection." BioTechniques **5**: 376-379.
- Bult, C. J., White, O. and Olsen, G. J. (1996). "Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*." Science **273**: 1017-1140.
- Burg, A. W. and Brown, G. M. (1966). "The biosynthesis of folic acid. VI. Enzymatic conversion of carbon atom 8 of guanosine triphosphate to formic acid." Biochim. Biophys. Acta **177**: 275-278.
- Burrows, R. B. and Brown, G. M. (1978). "Presence of Escherichia coli of a deaminase and a reductase involved in biosynthesis of riboflavin." J Bacteriol **136**(2): 657-67.
- Chamberlin, M., McGrath, J. and Waskell, L. (1970). "New RNA polymerase from Escherichia coli infected with bacteriophage T7." Nature **228**(5268): 227-31.
- Cohn, E. J. and Edsall, J. T. (1943). "Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions." Am. Chem. Soc. Monograph, Reinhold, New York **90**.
- Cresswell, R. M., Neilson, T. and Wood, H. C. S. (1960). "The biosynthesis of pteridines. II. Self-condensation of 5-amino-4-(substituted amino)uracils." J. Chem. Soc.: 4776-4779.
- Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W. (1988). "High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation." Nucleic Acids Res **16**(13): 6127-45.
- Echt, S., Bauer, S., Steinbacher, S., Huber, R., Bacher, A. and Fischer, M. (2004). "Potential Anti-infective Targets in Pathogenic Yeasts: Structure and Properties of 3,4-Dihydroxy-2-butanone 4-phosphate Synthase of Candida albicans." J.Mol.Biol. **341**: 1085-1096.
- Edman, P. and Henschen, A. (1975). "Sequence determination." Protein Sequence Determination. Springer Verlag, Heidelberg.
- Fischer, M. and Bacher, A. (2005). "Biosynthesis of flavocoenzymes." Nat Prod Rep **22**: 324–350.
- Fischer, M. and Bacher, A. (2006). "Biosynthesis of vitamin B2 in plants." Physiologia Plantarum **126**: 304–318.
- Fischer, M., Eberhardt, S., Richter, G., Krieger, C., Gerstenschlager, I. and Bacher, A. (1996). "Biosynthesis of riboflavin. Bifunctional pyrimidine deaminase/reductase of Escherichia coli and Bacillus subtilis." Biochem Soc Trans **24**(1): 35S.
- Fischer, M., Romisch, W., Saller, S., Illarionov, B., Richter, G., Rohdich, F., Eisenreich, W., et al. (2004). "Evolution of vitamin B2 biosynthesis: structural and functional similarity between pyrimidine deaminases of eubacterial and plant origin." J Biol Chem **279**(35): 36299-308.

- Fischer, M., Romisch, W., Schiffmann, S., Kelly, M., Oschkinat, H., Steinbacher, S., Huber, R., et al. (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**(44): 41410-6.
- Foor, F. and Brown, G. M. (1975). "Purification and properties of guanosine triphosphate cyclohydrolase II from *Escherichia coli*." J Biol Chem **250**(9): 3545-51.
- Foor, F. and Brown, G. M. (1980). "GTP cyclohydrolase II from *Escherichia coli*." Methods Enzymol **66**: 303-7.
- Foy, H. and Mbaya, V. (1977). "Riboflavin." Prog Food Nutr Sci **2**(8): 357-94.
- Graham, T. D. E., Xu, H. and White, O. (2002). "A member of a new class of GTP cyclohydrolases produces formylaminopyrimidine nucleotide monophosphates." Biochemistry **41**: 15074-15084.
- Hagihara, T., Fujio, T. and Aisaka, K. (1995). "Cloning of FAD synthetase gene from *Corynebacterium ammoniagenes* and its application to FAD and FMN production." Appl Microbiol Biotechnol **42**(5): 724-9.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Harvey, R. A. and Plaut, G. W. (1966). "Riboflavin synthetase from yeast. Properties of complexes of the enzyme with lumazine derivatives and riboflavin." J Biol Chem **241**(9): 2120-36.
- Harzer, G., Rokos, H., Otto, M. K., Bacher, A. and Ghisla, S. (1978). "Biosynthesis of riboflavin. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine 5'-phosphate is not a substrate for riboflavin synthase." Biochim Biophys Acta **540**(1): 48-54.
- Hatakeyama, K., Inoue, Y., Harada, T. and Kagamiyama, H. (1991). "Cloning and sequencing of cDNA encoding rat GTP cyclohydrolase I. The first enzyme of the tetrahydrobiopterin biosynthetic pathway." J Biol Chem **266**(2): 765-9.
- Herz, S. (2000). "Expression of Genes of the Riboflavin and Terpen biosynthesis and Characterisation of the Resulting Proteins." Ph.D. Thesis, Technische Universität München.
- Herz, S., Eberhardt, S. and 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-phosphate synthase." Phytochemistry **53**(7): 723-31.
- Kaiser, J., Schramek, N., Eberhardt, S., Puttmer, S., Schuster, M. and Bacher, A. (2002). "Biosynthesis of vitamin B₂." Eur J Biochem **269**(21): 5264-70.
- Kamino, Y., Lin, C. K., Regue, M. and Wu, H. C. (1985). "Characterization of the *ileX*lsp operon in *Escherichia coli*: Identification of an open reading frame upstream of the *ileX* gene and potential promoter(s) for the *ileS*-lsp operon." J. Biol. Chem **260**: 5616-5620.
- Katzenmeier, G., Schmid, C., Kellermann, J., Lottspeich, F. and Bacher, A. (1991). "Biosynthesis of tetrahydrofolate. Sequence of GTP cyclohydrolase I from *Escherichia coli*." Biol Chem Hoppe Seyler **372**(11): 991-7.

- Kikuchi, S., Satoh, K. and Nagata, T. (2003). "Collection, Mapping and Annotation of Over 28,000 cDNA Clones from japonica Rice." Science **301**: 376-378.
- Kis, K., Volk, R. and Bacher, A. (1995). "Biosynthesis of riboflavin. Studies on the reaction mechanism of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase." Biochemistry **34**(9): 2883-92.
- Kitatsuji, K., Ishino, S., Teshiba, S. and Arimoto, M. (1993). "Process for producing flavin nucleotides." Eur.Pat.Appl.EP 05422240 A2 92119308.2.
- Kobayashi, M., Ohara-Nemoto, Y., Kaneko, M., Hayakawa, H., Sekiguchi, M. and Yamamoto, K. (1998). "Potential of Escherichia coli GTP cyclohydrolase II for hydrolyzing 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis." J Biol Chem **273**(41): 26394-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M. and Pelletier, S. L. (1992). "Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins." analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science (Harding, S.E., Rowe, A.J., Horton, J.C., Eds.) Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Le Van, Q., Keller, P. J., Bown, D. H., Floss, H. G. and Bacher, A. (1985). "Biosynthesis of riboflavin in Bacillus subtilis: origin of the four-carbon moiety." J. Bacteriol. **162**: 1280-1284.
- Liao, D., Calabrese, J. C., Wawrzak, Z., Viitanen, P. V. and 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. and 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.
- Maier, J., Witter, K., Guetlich, M., Ziegler, I., Werner, T. and Ninnemann, H. (1995). "Homology cloning of GTP-cyclohydrolase I from various unrelated eukaryotes by reverse-transcription polymerase chain reaction using a general set of degenerate primers." Biochem. Biophys. Res. Commun. **121**: 705-711.
- Manstein, D. J. and Pai, E. F. (1986). "Purification and characterization of FAD synthetase from Brevibacterium ammoniagenes." J Biol Chem **261**(34): 16169-73.
- McLean, J. R., Krishnakumar, S. and O'Donnell, J. M. (1993). "Multiple mRNAs from the Punch locus of Drosophila melanogaster encode isoforms of GTP cyclohydrolase I with distinct N-terminal domains." J Biol Chem **268**(36): 27191-7.
- Michaelis, L. and Menten, M. L. (1913). "Die Kinetik der Invertinwirkung." Biochem. Z. **49**: 333-369.
- Nakagawa, S., Igarashi, A., Ohta, T., Hagihara, T., Fujio, T. and Aisaka, K. (1995). "Nucleotide sequence of the FAD synthetase gene from Corynebacterium ammoniagenes and its expression in Escherichia coli." Biosci Biotechnol Biochem **59**(4): 694-702.

- Neuberger, G. and Bacher, A. (1985). "Biosynthesis of riboflavin. An aliphatic intermediate in the formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine from pentose phosphate." Biochem. Biophys. Res. Commun. **127**: 175-181.
- Neuberger, G. and 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): 1111-6.
- Nichol, C. A., Smith, G. K. and Duch, D. S. (1985). "Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin." Annu. Rev. Biochem. **54**: 729-764.
- Nielsen, P. and Bacher, A. (1981). "Biosynthesis of riboflavin. Characterization of the product of the deaminase." Biochim Biophys Acta **662**(2): 312-7.
- Persson, K., Schneider, G., Jordan, D. B., Viitanen, P. V. and Sandalova, T. (1999). "Crystal structure analysis of a pentameric fungal and an icosahedral plant lumazine synthase reveals the structural basis for differences in assembly." Protein Sci **8**(11): 2355-65.
- Plaut, G. W. (1960). "Studies on the stoichiometry of the enzymic conversion of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin." J Biol Chem **235**: PC41-2.
- Plaut, G. W. (1963). "Studies on the nature of the nature of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin." J Biol Chem **238**: 2225-43.
- Plaut, G. W., Smith, C. M. and Alworth, W. L. (1974). "Biosynthesis of water-soluble vitamins." Annu Rev Biochem **43**(0): 899-922.
- Plaut, G. W. E. (1961). "Water-soluble vitamins II (Folic acid, riboflavin, thiamine, vitamin B12)." Annu. Rev. Biochem. **30**: 409-446.
- Plaut, G. W. E. (1971). "Metabolism of water-soluble vitamins: The biosynthesis of riboflavin." Florkin, M., Stotz, E.H. (Hrsg.). Comprehensive Biochemistry, Elsevier, Amsterdam **21**: 11-45.
- Ren, J., Kotaka, M., Lockyer, M., Lamb, H. K., Hawkins, A. R. and Stammers, D. K. (2005). "GTP cyclohydrolase II structure and mechanism." J Biol Chem **280**(44): 36912-9.
- Richter, G., Fischer, M., Krieger, C., Eberhardt, S., Lutgen, H., Gerstenschlager, I. and Bacher, A. (1997). "Biosynthesis of riboflavin: Characterization of the bifunctional deaminase-reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **179**(6): 2022-8.
- Richter, G., Ritz, H., Katzenmeier, G., Volk, R., Kohnle, A., Lottspeich, F., Allendorf, D., et al. (1993). "Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, mapping, and expression of the gene coding for GTP cyclohydrolase II in *Escherichia coli*." J Bacteriol **175**(13): 4045-51.
- Richter, G., Volk, R., Krieger, C., Lahm, H. W., Rothlisberger, U. and Bacher, A. (1992). "Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, and expression of the gene coding for 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of *Escherichia coli*." J Bacteriol **174**(12): 4050-6.
- Ritz, H. (1998). "Molekularbiologische und proteinchemische Untersuchungen an bakteriellen GTP-Cyclohydrolasen." Ph.D. Thesis, Technische Universität München, München

- Ritz, H., Schramek, N., Bracher, A., Herz, S., Eisenreich, W., Richter, G. and Bacher, A. (2001). "Biosynthesis of riboflavin: studies on the mechanism of GTP cyclohydrolase II." J Biol Chem **276**(25): 22273-7.
- Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Lüttgen, H., Fischer, M., Eisenreich, W., Schuhr, C., Fellermeier, M., et al. (2000). "Biosynthesis of terpenoids: 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase from tomato." PNAS **97**: 8251-8256.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-4.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.
- Schramek, N., Bracher, A. and Bacher, A. (2001). "Biosynthesis of riboflavin. Single turnover kinetic analysis of GTP cyclohydrolase II." J Biol Chem **276**(47): 44157-62.
- Shiota, T., Palumbo, M. P. and Tsai, L. (1967). "A chemically prepared formamidopyrimidine derivative of guanosine triphosphate as a possible intermediate in pteridine biosynthesis." J. Biol. Chem. **242**: 1961-1969.
- Steinbacher, S., Schiffmann, S., Richter, G., Huber, R., Bacher, A. and 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.
- Stetter, K. O. (1988). "Archaeoglobus fulgidus gen. nov., sp. nov.: a new taxon of extremely thermophilic archaeobacteria." Syst Appl Microbiol **10**: 172-173.
- Stetter, K. O., Lauerer, G., Thomm, M. and Neuner, A. (1987). "Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers evidence for a novel branch of archaeobacteria." Science **236**: 822-824.
- Stüber, D., Matile, H. and 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." Immunological Methods IV: 121-152.
- Tabor, S. and Richardson, C. C. (1985). "A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**: 1074-1078.
- Van Holde, K. E. and Weischet, W. O. (1978). "Boundary analysis of sedimentation velocity experiments with monodisperse and paucidisperse solutes." Biopolymers **17**: 1387-1403.
- Volk, R. and Bacher, A. (1988). "Biosynthesis of riboflavin. The structure of the fourcarbon precursor." J. Am. Chem. Soc **110**: 3651-3653.
- Volk, R. and Bacher, A. (1990). "Studies on the 4-carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. Purification and properties of L-3,4-

- dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase." J Biol Chem **265**(32): 19479-85.
- Volk, R. and Bacher, A. (1991). "Biosynthesis of Riboflavin." J. Biol. Chem **266**: 20610-20618.
- Wacker, H., Harvey, R. A., Winestock, C. H. and Plaut, G. W. (1964). "4-(1'-D-Ribitylamino)-5-Amino-2,6-Dihydroxypyrimidine, the Second Product of the Riboflavin Synthetase Reaction." J Biol Chem **239**: 3493-7.
- Young, D. W. (1972). "The biosynthesis of the vitamins thiamin, riboflavin, and folic acid." Feldsher Akush **37**: 27-28.
- Zamenhof, P. J. and Villarejo, M. (1972). "Construction and properties of Escherichia coli strains exhibiting -complementation of -galactosidase fragments in vivo." J Bacteriol **110**(1): 171-8.