

Die Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus *Thermotoga maritima*: Struktur, Regulation und Evolution einer Glutaminamidotransferase

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



vorgelegt von
Felix List
aus Straubing

Dezember 2009

Promotionsgesuch eingereicht am: 09. Dezember 2009

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

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Christoph Oberprieler

1. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Sterner

2. Prüfer: Prof. Dr. Eike Brunner

3. Prüfer: Prof. Dr. Michael Thomm

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2005 bis Dezember 2009 am Lehrstuhl Biochemie II des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg unter Leitung von Prof. Dr. Reinhard Sterner durchgeführt. Von Oktober 2008 bis Dezember 2008 sowie Februar 2009 erfolgten Arbeiten im Labor von Dr. Matthias Wilmanns (EMBL Hamburg).

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Formelverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
Übersicht und Zielsetzung	1
1 Material	3
1.1 Geräte.....	3
1.2 Verbrauchsmaterialien.....	5
1.3 Chemikalien.....	6
1.4 Kits	7
1.5 Enzyme.....	7
1.6 Bakterienstämme	7
1.7 Vektoren	9
1.7.1 pET-Vektoren	9
1.7.2 pQE-Vektoren.....	11
1.7.3 pDMI,1.....	11
1.7.4 <i>E. coli</i> -Hefe-Shuttle-Vektoren	11
1.8 Oligodesoxyribonukleotide	12
1.8.1 Vektorspezifische Amplifikations- und Sequenzierungsprimer	12
1.8.2 Amplifikations- und Mutagenisierungsprimer für <i>hisF</i>	13
1.8.3 Amplifikations- und Mutagenisierungsprimer für <i>hisH</i>	13
1.8.4 Amplifikations- und Mutagenisierungsprimer für <i>trpG</i>	14
1.9 DNA- und Protein-Längenstandards	15
1.10 Puffer und Lösungen	15
1.10.1 Arbeiten mit <i>E. coli</i>	15
1.10.2 Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i>	16
1.10.3 Arbeiten mit DNA	17
1.10.4 Agarosegelelektrophorese	17

1.10.5	Arbeiten mit Proteinen.....	17
1.10.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	18
1.11	Nährmedien für <i>E. coli</i>.....	19
1.12	Nährmedien für <i>S. cerevisiae</i>.....	20
1.13	Software.....	21
2	Methoden.....	23
2.1	Vorbereitung von Geräten und Lösungen	23
2.2	Mikrobiologische Methoden.....	23
2.2.1	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> -Stämmen	23
2.2.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	23
2.2.3	Chemische Transformation (Inoue et al. 1990).....	24
2.2.4	Bestimmung der Transformationseffizienz.....	24
2.2.5	Herstellung von kompetenten <i>S. cerevisiae</i> Zellen	25
2.2.6	Li-Ac-Transfektion von <i>S. cerevisiae</i> Zellen	25
2.2.7	Qualitativer Interaktions-Assay mittels Interaktions-Marker (<i>yeast-two-hybrid</i>).....	26
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	27
2.3.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis & Falloona 1987; Saiki et al. 1988).....	27
2.3.2	Kolonie-PCR	29
2.3.3	Megaprimer-PCR (Sarkar & Sommer, 1990)	29
2.3.4	Agarosegelelektrophorese	30
2.3.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.4	Enzymatische Manipulation von dsDNA	31
2.4.1	Spaltung von dsDNA mit Restriktionsendonukleasen	31
2.4.2	Ligation von DNA-Fragmenten	32
2.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation).....	32
2.4.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	32
2.4.5	DNA-Sequenzierung	32
2.5	Proteinchemische Methoden	33
2.5.1	Expression und Anreicherung von Proteinen im analytischen Maßstab	33
2.5.2	Periplasmaaufschluss	34
2.5.3	Expression und Anreicherung von Proteinen im präparativen Maßstab	34
2.5.4	Proteinreinigung aus der unlöslichen Zellfraktion	35
2.5.5	Proteinreinigung aus der löslichen Zellfraktion	36
2.5.6	Präparative Gelfiltration.....	38
2.5.7	Ammoniumsulfatfällung	39
2.5.8	Dialyse von Protein-Lösungen	39
2.5.9	Einkonzentrieren von Protein-Lösungen.....	39
2.5.10	Lagerung von gereinigten Proteinen	39

2.5.11	Synthese von ProFAR	40
2.6	Analytische Methoden	40
2.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsspektroskopie.....	40
2.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976).....	41
2.6.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.6.4	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
2.6.5	Probenvorbereitung zur N-terminalen Sequenzierung.....	43
2.6.6	Analytische Gelfiltration.....	44
2.6.7	Fluoreszenz-Spektroskopie und Titration	44
2.6.8	Kompetitive Fluoreszenztitration	45
2.6.9	Isothermische Titrationskalorimetrie	46
2.6.10	Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe.....	47
2.7	Steady-state Enzymkinetiken.....	48
2.7.1	Die HisF-Teilreaktion	49
2.7.2	Die glutaminabhängige Gesamtreaktion.....	49
2.7.3	Die HisH-Teilreaktion	50
2.7.4	Thioesterbestimmung im <i>steady-state</i>	53
2.7.5	Hydroxylamin-Assay	53
2.8	Proteinkristallisation	54
2.9	Ermittlung geeigneter Kryolösungen.....	55
2.10	Aufnahme von Beugungsdaten und Datenprozessierung	55
2.11	Strukturlösung und Verfeinerung.....	56
3	Aktivierungsmechanismus der ImGPS Glutaminase-Untereinheit.....	57
3.1	Einleitung.....	57
3.1.1	Die Familie der Glutaminamidotransferasen	57
3.1.2	Struktur und Funktion der Imidazolglycerinphosphat-Synthase	59
3.1.3	Aktivierungsmechanismen der Glutaminase-Untereinheiten in GATasen	63
3.2	Ergebnisse und Diskussion.....	69
3.2.1	Vorarbeiten	69
3.2.2	Gerichtete Mutagenese zur Herstellung der <i>hisH</i> - und <i>hisF</i> -Genkonstrukte	70
3.2.3	Herstellung und Reinigung der HisF- und HisH-Mutanten	71
3.2.4	Funktionelle Charakterisierung der HisH- und HisF-Mutanten	74
3.2.5	Kinetischen Parameter ImGPS aus <i>S. cerevisiae</i> (His7).....	84
3.2.6	Die Rolle von D98(HisF) während der Glutaminhydrolyse	84
3.2.7	Die Rolle von Y138(HisH) und K181(HisH) während der Glutaminhydrolyse.....	88
3.3	Zusammenfassung	93
3.4	Ausblick:	95

4	HisH:HisF-ΔLoop1	97
4.1	Einleitung	97
4.2	Loop1 Konformationen in verschiedenen HisF-Strukturen	98
4.3	Heterologe Expression und Reinigung von HisF-ΔLoop1	98
4.4	Aktivitätssmessungen mit HisH:HisF-ΔLoop1	99
4.5	Kristallisation von HisH:HisF-ΔLoop1	100
4.6	Datenaufnahme und Strukturlösung.....	101
4.7	Strukturbeschreibung.....	103
4.8	Diskussion	104
4.9	Ausblick.....	105
5	NMR-Spektroskopische Untersuchungen mit HisF	107
5.1	Proteinexpression und Reinigung	107
5.2	Zuordnung von HisF und pH-Titration	108
5.3	Bindung von HisF Liganden	109
5.4	Bindung von Ammoniak und Xenon	109
6	Konstitutiv aktives TrpG	111
6.1	Einleitung	111
6.2	Mutagenese zur Herstellung der <i>trpG/trpGD</i> - und <i>hisH</i> -Konstrukte	112
6.3	Expression und Reinigung der TrpG/TrpGD- und HisH- Mutanten	113
6.4	TrpG-Mutanten mit konstitutiver Glutaminaseaktivität	115
6.5	Strukturelle Grundlagen der konstitutiven Glutaminaseaktivität	115
6.6	Kristallisation von TrpG/TrpGD.....	118
6.7	Screening nach Glutaminaseaktivität im Periplasma	120
6.8	Reaktionsmechanismus und geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Glutaminasereaktion von TrpG-T129Y	121
6.9	Diskussion und Ausblick.....	125
7	Die Evolution der Glutaminamidotransferasen	127
7.1	Bedeutung, strukturelle Grundlagen und Evolution von Protein-Protein Wechselwirkungen in GATasen.....	127

7.2	Die Anthranilat Synthase - eine GATase aus der Tryptophan-Biosynthese	129
7.3	Vergleich der Anthranilat Synthase aus <i>S. solfataricus</i> mit der Imidazolglycerinphosphat Synthase aus <i>T. maritima</i>	131
7.4	Vorarbeiten	132
7.5	Gerichtete Mutagenese zur Herstellung der <i>hisH</i>- und <i>hisF</i> Genkonstrukte	134
7.6	Heterologe Expression und Reinigung der HisH- und HisF-Mutanten	134
7.7	Fluoreszenztitration zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten	135
7.8	Analytische Gelfiltration mit HisH-b6.....	137
7.9	Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe mit HisH-b6.....	138
7.10	Native PAGE mit HisH-b6.....	139
7.11	Kompetitive Fluoreszenztitration.....	140
7.12	Anpassung der Kontaktfläche von TrpG an die Interaktion mit HisF	142
7.12.1	Gerichtete Mutagenese zur Herstellung <i>trpG/trpGD</i> -Genkonstrukte.....	143
7.13	<i>In vivo</i> Interaktionstests der TrpG/TrpGD-Mutanten mit HisF	144
7.13.1	<i>In vitro</i> Interaktionstests von TrpGD _{a1b5b6IIb7b9a5} mit HisF	144
7.14	Diskussion und Ausblick	145
8	Zusammenfassung	149
9	Literaturverzeichnis	153
10	Anhang.....	163
10.1	Glutaminseaktivität in Abwesenheit von ProFAR	163
10.2	ITC von HisH mit HisF	163
10.3	Kalibrierung der Superdex-75 (16/60) Gelfiltrationssäule	164
10.4	Syntheseversuch eines ProFAR/PRFAR Analogons	164
	Danksagung	167
	Erklärung	169

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des pET-Expressionssystems.....	10
Abbildung 2: DNA- und Protein-Längenstandards.	15
Abbildung 3: Das <i>yeast-two-hybrid</i> System detektiert Komplexbildung zwischen zwei Proteinen <i>in vivo</i>	26
Abbildung 4: Prinzip der Megaprimer-PCR	30
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Vorgehens bei der analytischen Genexpression	34
Abbildung 6: Fluoreszenztitration zur Bestimmung der Dissoziationskonstante von HisH:HisF.	45
Abbildung 7: Messung konstitutiver Glutaminase-aktivität von HisH.....	52
Abbildung 8: Schematischer Aufbau und Reaktionsschema der Glutaminamidotransferasen.	57
Abbildung 9: Bedeutung des ImGPS Komplex für die prokaryotische Histidin-Biosynthese.....	60
Abbildung 10: Faltungsschema der ImGPS (HisH:HisF) aus <i>T. maritima</i> (Douangamath <i>et al.</i> 2002).	63
Abbildung 11: Bänderdiagramm der Quartärstruktur der <i>B. subtilis</i> PLPS (Strohmeier <i>et al.</i> 2006).....	66
Abbildung 12: Konformationsänderung des Gly46-Gly47 Peptids im Oxyanion-Loch durch Komplexbildung zwischen Pdx2 und Pdx1-H170N	66
Abbildung 13: Oxyanion-Strang des aktiven Zentrums von HisH.	68
Abbildung 14: Bänderdarstellung der Kontaktfläche zwischen HisH und HisF.....	70
Abbildung 15: Reinigung des rekombinant exprimierten HisF-WT Proteins.....	72
Abbildung 16: SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) zur Analyse des Reinheitsgrades der rekombinant hergestellten HisF-Proteine sowie des Hilfsenzyms HisA.	72
Abbildung 17: Verunreinigung einer HisH-Y138A Präparation mit Chloramphenicolacetyltransferase (CAT). .	73
Abbildung 18: SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) zur Analyse des Reinheitsgrades der HisH-Proteine.	74
Abbildung 19: Bänderdiagramm der Kristallstruktur der ImGPS (HisH:HisF) aus <i>T. maritima</i> mit den katalysierten Reaktionen.	74
Abbildung 20: PRFAR- und Glutamin-Sättigungskurven von ImGPS-WT zur Quantifizierung der drei gemessenen ImGPS Reaktionen.....	75
Abbildung 21: Die Glutaminase-HisH-Teilaktivität kann über die Glutamat-Produktion in einem gekoppelten enzymatischen Test nachgewiesen werden.	78
Abbildung 22: Die Glutaminase-HisH-Teilaktivität kann über die NH ₃ -Produktion in einem gekoppelten enzymatischen Test nachgewiesen werden.	79
Abbildung 23: Glutaminase-HisH-Teilaktivität gemessen anhand der Freisetzung von Ammoniak.	79
Abbildung 24: UV-spektroskopische und ¹⁴ N-NMR Messung der NAD ⁺ stimulierten Glutaminaseaktivität von HisH:HisF.	81
Abbildung 25: Die konstitutive Glutaminase-HisH-Teilaktivität wird in einem diskontinuierlichen enzymatischen Test bestimmt.	81
Abbildung 26: Diskontinuierlicher enzymatischer Test zur Bestimmung der konstitutiven Glutaminase-HisH- Teilaktivität.	82
Abbildung 27: Bänderdiagramm des aktiven Zentrums von HisH im HisH:HisF Komplex mit wichtigen Kontaktflächenresiduen.....	85

Abbildung 28: Schematische Darstellung der beobachteten bzw. vermuteten Interaktionen von D98(HisF) mit H178(HisH) und K181 bzw K181A(HisH).	87
Abbildung 29: Vereinfachtes Reaktionsschema der Glutaminasereaktion	88
Abbildung 30: Veranschaulichung der durch die Mutationen Y138A(HisH) und K181A(HisH) verursachten Löcher an der Proteinoberfläche.	89
Abbildung 31: Superpositionierung der 3D-Strukturen von HisH:HisF und HisH-Y138A-K181A:HisF.	91
Abbildung 32: Bänderdiagramm von HisH:HisF mit $\beta\alpha$ -Loop1.	97
Abbildung 33: Gereinigtes Protein HisF- Δ Loop1.	99
Abbildung 34: PRFAR-Sättigungskurve zur Quantifizierung der ammoniumabhängigen Reaktion von HisH:HisF- Δ Loop1.	99
Abbildung 35: HisH:HisF- Δ Loop1 Protein-Kristalle.	100
Abbildung 36: Beugungsbild aus dem HisH:HisF- Δ Loop1 Datensatz	101
Abbildung 37: Bänderdiagramm von $\beta\alpha$ -Loop1 und $\beta\alpha$ -Loop2 in HisH:HisF und HisH:HisF- Δ Loop1	103
Abbildung 38: Elektronendichtekarte (1,5 σ) und Modellausschnitt am aktiven Zentrum von HisH im HisH:HisF- Δ Loop1 Komplex mit gebundenem Malat.	104
Abbildung 39: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von HisF (C. Liebold, 2009).....	108
Abbildung 40: Bänderdiagramm von HisF nach ProFAR-Bindung.	109
Abbildung 41: Bänderdiagramm von HisF mit Xenon Bindestellen.	110
Abbildung 42: Vorkommen von TrpG als Fusionsprotein mit TrpE, TrpD oder TrpC.	111
Abbildung 43: Reinigung des rekombinant exprimierten HisH-E180A Proteins.....	114
Abbildung 44: SDS-PAGE zur Analyse des Reinheitsgrades der rekombinant hergestellten HisH, TrpG und TrpGD Proteine.....	114
Abbildung 45: Sättigungskurve zur Quantifizierung der konstitutiven Glutaminaseaktivität von TrpG	115
Abbildung 46: Ausschnitt des aktiven Zentrums aus dem Strukturmodell von TrpG.	116
Abbildung 47: Ausschnitt des aktiven Zentrums aus dem Strukturmodell von TrpG-T129F sowie eine Sättigungskurve zur Quantifizierung ihrer konstitutiven Glutaminaseaktivität.	117
Abbildung 48: Proteinkristalle von verschiedenen TrpG-Mutanten.	118
Abbildung 49: Hydroxylamin-Assay zum Nachweis von Glutaminaseaktivität in Periplasmalysaten.	120
Abbildung 50: Reaktionsmechanismus der Glutaminasereaktion (Thoden <i>et al.</i> 1998).....	122
Abbildung 51: Bildung von γ -glutamyl-Hydroxamat.....	123
Abbildung 52: Farbnachweis für γ -glutamyl-Hydroxamat bei TrpG-WT und TrpG-T129Y.....	124
Abbildung 53: Ergebnis der Moleküldynamiksimulation von TrpG-T129Y.	124
Abbildung 54: Reaktion der AS (TrpE:TrpG Komplex)	129
Abbildung 55: Funktionell wichtige Bereiche der AS aus <i>S. solfataricus</i>	130
Abbildung 56: Schematischer Vergleich bekannter Quartärstrukturen des Anthranilatsynthase-Komplexes....	131
Abbildung 57: Bänderdiagramm der ImGPS aus <i>T. maritima</i> und der AS aus <i>S. solfataricus</i>	132
Abbildung 58: Position der Sequenzabschnitte a5, b5, b6, b7, b9 in HisH, die in TrpG an Stelle der dort vorkommenden Abschnitte eingesetzt wurden (modifiziert nach Häger 2005).	133
Abbildung 59: SDS-PAGE zur Analyse des Reinheitsgrades der zur Kontaktflächenanalyse hergestellten HisH- und HisF-Mutanten.	135
Abbildung 60: Titrationskurve zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von HisH mit HisF-W156F.....	136

Abbildung 61: Analytische Gelfiltrationsläufe (Superdex 75) zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen den gezeigten HisH-Mutanten und HisF.....	137
Abbildung 62: Auswertung der Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe von HisH-WT und HisH-b6.....	139
Abbildung 63: Native PAGE zeigt die Komplexbildung zwischen HisH-b6 und HisF.....	139
Abbildung 64: Kompetitive Floureszenztitration der Trp-freien HisH-Mutanten W123F und b6	140
Abbildung 65: Trp123(HisH) und Arg249(HisF) interagieren über eine Kation- π -Wechselwirkung.....	141
Abbildung 66: Position der Sequenzabschnitte in HisH, die in TrpG an Stelle der dort vorkommenden Abschnitte eingesetzt wurden (modifiziert nach Häger 2005).	142
Abbildung 67: <i>Yeast-two-hybrid</i> Test auf <i>in vivo</i> Interaktion verschiedener TrpG-Mutanten mit HisF.....	144
Abbildung 68: SDS-PAGE zur Dokumentation der heterologen Expression und Reinigung von TrpGa1b5b6IIb7b9IIa5.....	145
Abbildung 69: Zweistufiges Evolutionsmodell der GATasen.....	147

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung 12,5 %iger SDS-PAGE Gele.	42
Tabelle 2: Zusammensetzung 8,5 %iger Native-PAGE Gele.	43
Tabelle 3: Röntgenstrukturen der ImGPS und ihrer Untereinheiten	60
Tabelle 4: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Konstanten der ammoniumabhängigen HisF-Teilreaktion.	75
Tabelle 5: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Konstanten der glutaminabhängigen Gesamtreaktion.	76
Tabelle 6: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Konstanten der Glutaminase-HisH-Teilreaktion in Anwesenheit von ProFAR.	78
Tabelle 7: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Konstanten der Glutaminase-HisH-Teilreaktion in Anwesenheit von ProFAR.	80
Tabelle 8: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Konstanten der Glutaminase-HisH-Teilreaktion in Abwesenheit und Anwesenheit von ProFAR.	83
Tabelle 9: Aktivierung der Glutaminasereaktionen von HisH:HisF, HisH-Y138A:HisF und HisH-Y138A:HisF-D98A durch ProFAR.	85
Tabelle 10: Glutaminaseaktivitäten in Anwesenheit von ProFAR.	86
Tabelle 11: Wechselzahlen (k_{cat} [s^{-1}]) der Ammoniakbildung, der ammoniumabhängigen Reaktion von HisF und der glutaminabhängigen Gesamtreaktion.	89
Tabelle 12: Aktivierung der Glutaminasereaktionen von HisH:HisF, HisH-Y138A:HisF, HisH-Y138A:HisF und HisH-Y138A-K181A:HisF durch ProFAR.	92
Tabelle 13: Konzentrationsbestimmung des Thioesters im <i>steady-state</i> der Reaktion von HisH-Y138A-K181A:HisF in An- und Abwesenheit von ProFAR.	92
Tabelle 14: Konformationen von $\beta\alpha$ -Loop1 in verschiedenen HisF-Strukturen	98
Tabelle 15: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Konstanten der ammoniumabhängigen HisF-Teilreaktion.	99
Tabelle 16: Datenprozessierung von HisH:HisF-ΔLoop1	101
Tabelle 17: Verfeinerungsstatistik von HisH:HisF-ΔLoop1	102
Tabelle 18: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter der konstitutiven Glutaminaseaktivität von TrpG und TrpG-Mutanten.	117
Tabelle 19: Konzentrationsbestimmung des Thioesters im <i>steady-state</i> bei TrpG-WT und TrpG-T129Y über einen Filterbindungsassay	122
Tabelle 20: Über Fluoreszenztitration ermittelte K_D -Werte für die Bindung von HisH-Mutanten an HisF-W156F.	136
Tabelle 21: Aus den Gelfiltrationsläufen abgeleitete apparente molare Massen (MW^{app}) im Vergleich mit den berechneten molaren Massen (MW^{calc}).	137
Tabelle 22: IC_{50} und K_D -Werte aus kompetitiven Fluoreszenztitrationen.	141

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Transformationseffizienz	24
Formel 2: Berechnung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids.....	28
Formel 3: Berechnung der optimalen Anlagerungstemperatur der Primer in einer PCR-Reaktion.....	28
Formel 4: Bestimmung der DNA-Konzentration.....	32
Formel 5: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten nach Pace <i>et al</i> (1995)	41
Formel 6: Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten	41
Formel 7: Berechnung der Proteinkonzentration mit Hilfe des spezifischen Extinktions-koeffizienten	41
Formel 8: quadratischer Fit zur Auswertung der Fluoreszenztitrationen.....	45
Formel 9: Zusammenhang zwischen IC_{50} und K_D	46
Formel 10: Vereinfachter Zusammenhang zwischen IC_{50} und K_D	46
Formel 11: Berechnung des Sedimentationskoeffizienten.....	47
Formel 12: Berechnung des apparenten Sedimentationskoeffizienten s_{app}	47
Formel 13: Umrechnung von s_{app} auf Standardbedingungen ($s_{20,W}$)	48

Abkürzungsverzeichnis

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

A	Adenosin
A_x $0,1\% A_x$	Absorption bei x nm spezifischer Extinktionskoeffizient bei x nm
Amp	Ampicillin
APAD ⁺	3-Acetylpyridinadenindinucleotid
APS	Ammoniumperoxosulfid
AS	Anthranilat-Synthase
ATP	Adenosintriphosphat
bla	β -Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
c	Konzentration
C α	zentrales C-2 Kohlenstoffatom von Aminosäuren
C	<i>Crude extract</i> (lösliche Fraktion eines Zellextrakts)
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CPS	Carbamoylphosphat-Synthetase
d	Schichtdicke
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
f	Verdünnungsfaktor
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GC%	GC-Gehalt von Nukleotidsequenzen
GdmCl	Guanidiniumchlorid
His ₆ -Tag	Anhang von 6 Histidinen an ein Protein
HisA	Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid-Isomerase
hisF	Gen für die Synthase-Untereinheit der Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus <i>Thermotoga maritima</i>
HisF	Synthase-Untereinheit der Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus <i>Thermotoga maritima</i>
hisH	Gen für die Glutaminase-Untereinheit der Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus <i>Thermotoga maritima</i>
HisH	Glutaminase-Untereinheit der Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus <i>Thermotoga maritima</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ImGP	Imidazolglycerinphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

K	Gleichgewichtskonstante;
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KP	Kaliumphosphat-Puffer
kU	<i>kiloUnits</i> = 1000 U
<i>lacZ</i>	Gen für die β -Galactosidase
LB	Luria-Bertani (-Medium)
LMW	<i>LowMolecularWeight</i> Protein-Längenstandard
MCS	multiple Klonierungsstelle
mM	Millimolar
MW	molekulare Masse eines Proteins
mwco	<i>molecular weight cut off</i>
NAD ⁺	β -Nicotinamidadenindinucleotid
n _{Kolonien}	Anzahl der Kolonien
n _{seq}	Anzahl sequenziertener Gene
n _T	Anzahl an transformierten Zellen
NTN	N-terminales Nukleophil
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
P	Pellet (unlösliche Fraktion eines Zellextraktes)
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PLPS	Pyridoxalphosphat-Synthase
PRFAR	N'-[5'phosphoribosylformimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid
ProFAR	N'-[5'phosphoribulosylformimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woeseii</i>
R	Gaskonstante (8,314 J · mol ⁻¹ · K ⁻¹)
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
SV	Säulenvolumen
T	Temperatur; Thymidin
T _A	Annealing-Temperatur eines <i>Primers</i>
T _E	Transformationseffizienz
T _M	Schmelztemperatur eines Oligonukleotids
<i>Tag</i>	fusionierter Anhang an ein Protein
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
U	<i>Unit</i>
üN	über Nacht
UV	Ultraviolet
V	Volt
Vol	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen

wt	Wildtyp
(w/v)	Masse pro Volumen
ϵ_x	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
λ	Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

Übersicht und Zielsetzung

Die Enzymfamilie der Glutaminamidotransferasen (GATasen) ist im Zuge der Biosynthesen von Nukleotiden, Aminosäuren, Aminozuckern, Coenzymen und Antibiotika für den Einbau von Stickstoff verantwortlich. GATasen bestehen aus einer Glutaminase, an deren aktivem Zentrum durch die Hydrolyse von Glutamin Ammoniak erzeugt wird. Dieser gelangt durch einen vom Lösungsmittel abgeschirmten Kanal zum aktiven Zentrum der Synthase, wo er mit einem jeweils spezifischen Substrat zu einem oder mehreren Produkten reagiert. Während sich die Strukturen und Hydrolysemechanismen die Glutaminasen sehr ähnlich sind, unterscheiden sich die Synthasen in der Regel stark voneinander. Gemeinsam ist den verschiedenen GATasen dass die Aktivität der Glutaminase jeweils streng reguliert und an die Bindung des Synthase-Substrates gekoppelt ist.

Die strukturelle Grundlage der Kopplung von Glutaminase- und Synthaseaktivitäten wird seit mehr als drei Jahrzehnten an verschiedenen Modellenzymen aus der GATase Familie untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Aktivierungsmechanismus am Beispiel der Imidazolglycerinphosphat Synthase (ImGPS), einem 1:1 Komplex aus der Glutaminase HisH und der Synthase HisF, durch Mutationsanalysen an der Kontaktfläche der beiden Untereinheiten untersucht und mit Hilfe von Röntgenstrukturen der ImGPS interpretiert (Kapitel 3).

Einen Ansatzpunkt zur Untersuchung der Signaltransduktion im HisH:HisF Komplex bot der Loop $\beta 1\alpha 1$ (Loop1), der am aktiven Zentrum der Synthase HisF liegt und in verschiedenen Röntgenstrukturen in zwei unterschiedlichen Konformationen auftritt. In der geschlossenen Konformation kommt er über dem aktiven Zentrum von HisF zu liegen, während er in der offenen vom aktiven Zentrum weggeklappt vorliegt. Es wurde postuliert, dass Loop1 auf Grund seiner Lage und Flexibilität an der Weiterleitung eines Substrat-Bindungssignals von HisF zu HisH beteiligt sein könnte. Um dieser Hypothese nachzugehen, sollte die Deletionsmutante HisF- Δ Loop1 hergestellt, ihre Aktivität bestimmt und ihre Röntgenstruktur aufgeklärt werden (Kapitel 4).

Um durch Synthase-Liganden induzierte Konformationsänderungen zu identifizieren, müssen die Strukturen der apo- und der holo-Form der ImGPS verglichen werden. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, eine Röntgenstruktur der ImGPS mit gebundenem Synthase-Liganden zu erhalten. Um diesbezügliche Informationen zu erhalten, wurden NMR-Titrationsexperimente mit isotopenmarkiertem HisF durchgeführt (Kapitel 5).

Die zu HisH verwandte Glutaminase TrpG und die Synthase TrpE bilden den Anthranilat-Synthase Komplex. In einer früheren Arbeit wurden konstitutiv aktive TrpG-Mutanten erzeugt, die auch in Abwesenheit von TrpE Glutamin hydrolysieren. Mit Hilfe enzymkinetischer Untersuchungen und Moleküldynamik-Simulationen sollte der Reaktionsmechanismus dieser Mutanten aufgeklärt und aus den Ergebnissen Einblicke in den Aktivierungsmechanismus von Glutaminasen abgeleitet werden (Kapitel 6).

Auf Grund der in früheren Arbeiten postulierten engen evolutiven Verwandtschaft der beiden Glutaminasen TrpG und HisH sollte es möglich sein, die zur Synthase ausgerichtete Kontaktfläche von TrpG durch die von HisH zu ersetzen und damit einen stabilen TrpG:HisF Mischkomplex auszubilden. Da entsprechende Versuche einer früheren Arbeit fehlgeschlagen waren, sollten zunächst für die Interaktion zwischen HisH und HisF wichtige Aminosäurereste identifiziert werden, um anschließend das Kontaktflächendesign an TrpG zu optimieren (Kapitel 7).

1 Material

1.1 Geräte

Autoklaven

München 25

MMM, München

VE-40

SYSTEC GmbH, Wettenberg

Brutschränke

BINDER GmbH, Tuttlingen

Chromatographieanlagen:

ÄKTA™ basic better

GE HEALTHCARE, München

ÄKTA™ purifier 10

GE HEALTHCARE, München

FPLC LCC-501 plus

GE HEALTHCARE, München

verwendete Säulen:

HisTrap HP 5 ml

GE HEALTHCARE, München

HisTrap FF Crude 1 ml

GE HEALTHCARE, München

Superdex 75 HR 10/30

GE HEALTHCARE, München

Superdex 200 pg HiLoad 16/60

GE HEALTHCARE, München

Superdex 200 pg HiLoad 26/60

GE HEALTHCARE, München

Cell Densitiy Meter Ultrospec 10

GE HEALTHCARE, München

Computer

Dell Optiplex Systems

Elektroporator 2510

EPPENDORF, HAMBURG

Fluoreszenz-Spektrometer Cary Eclipse

VARIAN, Darmstadt

Gasbrenner Gasprofi 2SCS

WLD Tec GmbH, Göttingen

Gefrierschrank -80 °C

MDF-U72V, SANYO, Tokyo, Japan

Gefrierschrank -20 °C

LIEBHERR, Nussbaumen

Gelelektrophoresekammern:

Agarose-Elektrophorese-Apparatur

HOEFER Pharmacia Biotech, USA

SDS-Elektrophoresekammer

Mighty Small II

HOEFER Pharmacia Biotech, USA

Multi Gel Caster Gelgießstand

GE HEALTHCARE, München

Glaspipetten & Glaswaren

SCHOTT, Mainz

FISCHER SCIENTIFIC, Schwerte

NOVOGLAS, Bern, Schweiz

Hamilton Mikroliterspritze, 25 µl	HAMILTON, Bansduz, Schweiz
Heizblock-Thermostat HBT-2 131	HLC, Bovenden
Inkubationsschüttler:	
GFL 3033	GFL, Burgwedel
Certomat H	BRAUN Biotech, Melsungen
Certomat BS-1	BRAUN Biotech, Melsungen
Kühlschrank Privileg de luxe (8 °C)	PRIVILEG, Fürth
Magnetrührer:	
MR0, MR2000	HEIDOLPH, Kehlheim
MR1, MR3001 (beheizbar)	HEIDOLPH, Kehlheim
Microliterpipetten: Research 10, 100, 1000	EPPENDORF, Hamburg
Mikrowelle HMT 842C	BOSCH, Nürnberg
Multi-Doc-It Digital Imaging System	UVP Inc., USA
Netzgeräte:	
Power Supply EPS 301	GE HEALTHCARE, München
Power Pack P25	BIOMETRA, Göttingen
PCR-Geräte:	
Mastercycler personal	EPPENDORF, Hamburg
Mastercycler gradients	EPPENDORF, Hamburg
Peristaltikpumpe Miniplus 2	GILSON Medical Electronics, Frankreich
pH-Meter inolab Level1	INOLAB, Weilheim
Pipettus-accu	HIRSCHMANN, Laborgeräte, Eberstadt
Quarzküvetten:	
101-QS (Schichtdicke 10 mm)	HELLMA GmbH & Co. KG, Müllheim
105-QS (Schichtdicke 10 mm)	HELLMA GmbH & Co. KG, Müllheim
Schütteltisch Rocking Platform	BIOMETRA, Göttingen
Überkopfrotierer Eurostar digital	IKA Labortechnik AG
Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage	MILLIPORE, Eschborn
Ultraschallgerät Branson Sonifier 250D	HEINEMANN, Schwäbisch Gmünd
UV-Leuchttisch Reprostar	CAMAG Chemie Erzeugnisse, Berlin
UV-Vis Spektralphotometer Cary 100 Bio	VARIAN, Darmstadt
UV-Vis Spektralphotometer V650	JASCO GmbH, Groß-Umstadt
UV-Vis Biophotometer	EPPENDORF, Hamburg
Vakuumpumpe ME 2C	VACUUMBRAND, Wertheim

Vortex Genie 2	SCIENTIFIC IND., Bohemia, USA
Waagen:	
MC1	SARTORIUS, Göttingen
SI-114	DENVER INSTRUMENT, Göttingen
Wasserbad 1003	GFL, Burgwedel
Zentrifugen:	
Centrifuge 5810R	EPPENDORF, Hamburg
Centrifuge 5415D	EPPENDORF, Hamburg
Centrifuge 5415R	EPPENDORF, Hamburg
Sorvall RC 2B, 5C plus mit SS34- bzw. GS3-Rotoren	DU PONT Instruments, Bad Homburg

1.2 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschlauch: Visking, Typ 27/32, 14 kDa	ROTH GmbH +Co, Karlsruhe
Einwegspritzen Omnifix® 2 ml, 5 ml und 60 ml	BRAUN Biotech, Melsungen
Elektroporationsküvetten 2 mm	PEQLAB, Erlangen
Faltenfilter	MACHEREY-NAGEL, Düren
Filterpapier	Whatman, Maidstone, England
Konzentratoren:	
Amicon Ultra 4 bzw. 15 (mwco: 10 kDa)	Millipore, Bedford, USA
Kunststoffküvetten: ½ Mikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Kunststoffrörchen:	
15 ml, 50 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Falcon 15 ml bzw. 50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Membranfilter ME24 Ø47 mm; 0,2 µm	SCHLEICHER&SCHUELL, Dassel
Nitrocellulosefilter (Ø13 mm;Cat#:VSWP01300)	MILLIPORE, Eschborn
NAP5, NAP10 und NAP25 Säulen	GE HEALTHCARE, München
Nickel-Sepharose	GE HEALTHCARE, München
Nitril Untersuchungshandschuhe	VWR, Leuven, Belgien
Parafilm „M“ Laboratory Film	PECHINEY, Plastic Packaging, Menasha, USA
Pasteurpipetten	HIRSCHMANN, Ebermannstadt

PCR-Gefäße 0,2 ml	PEQLAB, Erlangen
Petrischalen 94/16	GREINER bio-one, Nürtingen
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	SARSTEDT, Nümbrecht
PVDF Membran Immobilon –P	Millipore, Bedford, USA
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	ROTH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel 2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Spritzenfilter Porengröße 0,22 µm, 0,45 µm	RENNER GmbH, Daunstadt

1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien besaßen den höchstmöglichen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen:

AMERSHAM PHARMACIA Biotech	(Freiburg)
BIO101 Inc.	(Carlsbad, USA)
BIORAD LABORATORIES	(München)
BIOZYM	(Hess. Oldendorf)
BOEHRINGER MANNHEIM	(Mannheim)
DIFCO	(Dreieich)
FLUKA	(Neu-Ulm)
GERBU Biotechnik GmbH	(Gailberg)
GIBCO/BRL	(Eggestein)
MERCK	(Darmstadt)
LUCERNA-CHEM AG	(Luzern, Schweiz)
NATIONAL DIAGNOSTICS	(Simerville, NJ, USA)
OXOID	(Wesel)
RIEDEL-DE HAEN	(Seelze)
ROCHE DIAGNOSTICS	(Mannheim)
ROTH	(Karlsruhe)
SERVA	(Heidelberg)
SIGMA-ALDRICH	(Deisenhofen)

1.4 Kits

Biorad-Lösung für Bradford Test	Biorad Laboratories GmbH, München
Gel Filtration Calibration Kit	GE Healthcare, München
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
NucleoBond®PC100/500 DNA-Extraction Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
NucleoSpin®Extract II	MACHEREY-NAGEL, Düren

1.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	NEW ENGLAND BIOLABS, Bad Schwalbach
T4-DNA-Ligase	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
	MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot
DNA-Polymerasen:	
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
GoTaq® DNA-Polymerase	PROMEGA, Mannheim
Thrombin (from bovine plasma)	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Glutamat Dehydrogenase	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Phosphoenolpyruvat-Kinase	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen

1.6 Bakterienstämme

E. coli DH5α (Hanahan 1983)

F⁻, *endA1*, *hsdR17* (r_k⁻m_k⁻), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA* (Nal^r), *relA1*, Δ(*lacZYA-argF*)
U169, Φ80, *lacZΔM15*

Derivat des *E. coli* Stammes K12, der für Klonierungen verwendet wird.

E. coli 5α (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt am Main)

fhuA2, Δ(*argF-lacZ*)U169, *phoA*, *glnV44*, Φ80, Δ(*lacZ*)M15, *gyrA96*, *recA1*, *relA1*,
endA1, *thi-1*, *hsdR17*

Bei diesen Zellen handelt es sich um ein *E. coli* DH5α Derivat. Durch die Deletion des Gens *fhuA2* fehlt der Eisen-Hydroxamat-Aufnahme-Rezeptor auf der Zelloberfläche, was verhindert, dass der Bacteriophage T1, der an diesen Rezeptor bindet, die Zellen befällt. Somit sind diese Zellen resistent gegen T1-Phagen.

***E. coli* XL1 Blue MRF'** (Stratagene)

$\Delta(mcrA)183$ $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ $endA1$ $supE44$ $thi-1$ $recA1$ $gyrA96$ $relA1$
 lac [F' $proAB$ $lacIqZ\Delta M15$ Tn10 (Tet^r)]

In *XL1 Blue MRF'* Zellen sind alle in *E. coli* K12 bekannten Restriktionsendonukleasen auf Genomebene inaktiviert.

***E. coli* Turbo** (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt am Main)

F', $proA^+B^+$, $lacI^q$, $\Delta(lacZ)M15/fhuA2$, $\Delta(lac-proAB)$, $glnV$, $galR(zgb-210::Tn10)$,
Tet^s, $endA1$, $thi-1$, $\Delta(hsdS-mcrB)5$

E. coli Turbo Zellen sind wie *E. coli* 5α-Zellen T1-phagenresistent. Diese Resistenz ist mit einem langsameren Zellwachstum verbunden. Dieser Nachteil wird bei *E. coli* Turbo Zellen kompensiert, wodurch sie innerhalb von 8 h Inkubation bei 37 °C sichtbare Kolonien bilden können.

***E. coli* KK8** = W3110trpEA2 (Schneider et al., 1981)

$trpR$, $tma2$, $\Delta trpEA2$

Expressionsstamm mit deletiertem Trp-Operon, der zur Expression Konstrukten mit T5-Promotor verwendet wird.

***E. coli* SG200+50** (Casabandan et al., 1976)

$lonA^-(Tn5)$, F, $\Delta lacU169$, $ara\Delta 139$, $rpsL$, $relA$, $thiA$, $flbB$

Expressionsstamm, der zur Expression von Konstrukten mit T5-Promotor verwendet wird.

***E. coli* BL21 (DE3)** (Studier & Moffatt 1986)

$hsdS$, gal , [λcl , $ts857$, $cnd1$, $hsdR17$, $recA1$, $endA1$, $gyrA96$, $thi1$, $relA1$]

Diese Zellen tragen auf ihrem Chromosom ein Gen für die T7 RNA-Polymerase, die zur Genexpression im pET-System verwendet wird.

***E. coli* T7 Express** (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt am Main)

$fhuA2$ $lacZ::T7gene1$ lon $ompT$ gal $sulA11$ dcm R(zgb-210::Tn10--Tet^S) $endA1$
 $\Delta(mcrC-mrr)114::IS10$ R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2

Bei diesen Zellen handelt es sich um ein *E. coli* BL21(DE3) Derivat. Durch die Deletion des Gens *fhuA2* fehlt der Eisen-Hydroxamat-Aufnahme-Rezeptor, wodurch diese Zellen resistent gegen den Bacteriophagen T1 sind. Zusätzlich enthalten die Zellen eine Tetrazyklin-Resistenz.

***E. coli* T7 Express Rosetta** (Lehrstuhl Sternер)

fhuA2 lacZ::T7gene1 lon ompT gal sulA11 dcm R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2) [argU argW glyT ileX, leuW metT proL thrT thrU tyrU Cam^r]

Diese Expressionszellen wurden hier am Lehrstuhl hergestellt. Es handelt sich um *E. coli* T7 Express Zellen, die zusätzlich das pRARE Plasmid aus *E. coli* Rosetta(DE)3pLysS enthalten, wodurch die Expression von Genen mit seltenen Codonen in einem T1-phagenresistenten *E. coli* Stamm ermöglicht wird. Neben der Tetrazyklinresistenz erhalten die Zellen durch das pRARE-Plasmid zusätzlich eine Chloramphenicolresistenz.

***E. coli* B834 (DE3)** (Merck, Nottingham UK)

F' ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met (DE3)

Bei diesen Zellen handelt es sich um eine Methionin-auxotrophe Mutante der *E. coli* BL21 (DE3) Zellen. Der Stamm wird zur Markierung von Proteinen mit Seleno-Methionin verwendet.

***S. cerevisiae* AH109** (James *et al.* 1996)

MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1-His3, GAL2-ADE2, met2::GAL7-lacZ

Dieser Hefestamm ist auxotroph für die Biosynthese von Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin. Die Reportergene stehen unter Kontrolle des GAL4 Transkriptionsfaktors.

1.7 Vektoren

1.7.1 pET-Vektoren

Gene, die in die multiple Klonierungsstelle (MCS) von pET-Vektoren (NOVAGEN, *plasmid for expression by T7 RNA Polymerase*) eingefügt wurden, werden durch die RNA-Polymerase

des Phagen T7 (Studier & Moffatt 1986) transkribiert. Die Expression der Gene erfolgt in speziellen *E. coli*-Stämmen (BL21(DE3)), die eine chromosomal Kopie der T7 RNA-Polymerase besitzen (Abbildung 1). Die Expression des T7 RNA-Polymerasegens erfolgt unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotor-Operators und wird durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Das zur Unterdrückung der Expression erforderliche Gen für den *lac*-Repressor (*lacI*) liegt auf dem Plasmid und wird konstitutiv exprimiert.

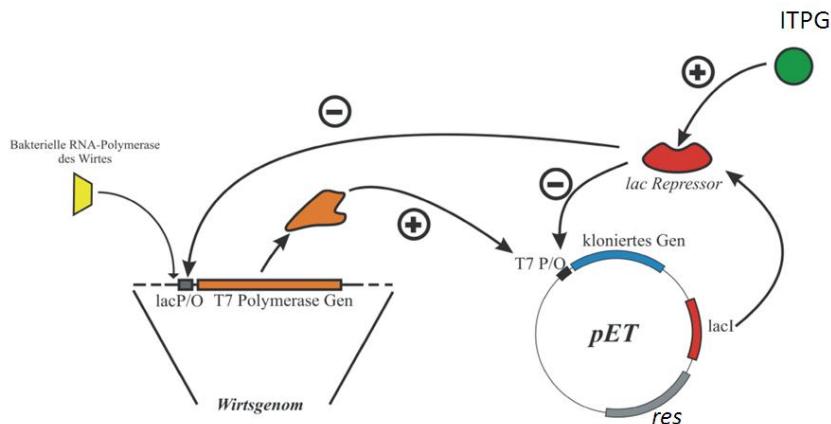


Abbildung 1: Schematische Darstellung des pET-Expressionssystems.

P/O: Promotor und Operator

+/- : Aktivierung /Repression von Expression

res: Resistenzgen

Die pET21a(+-) und pET24a(+-) Vektoren sind so konstruiert, dass unmittelbar stromabwärts der multiplen Klonierungsstelle sechs Histidin-Codone liegen. Das hergestellte Protein trägt dadurch C-terminal einen His₆-Tag, der eine Aufreinigung durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie ermöglicht. Beim pET28a(+-) Vektor liegen stromaufwärts zusätzlich eine Thrombinschnittstelle und sechs Histidin-Codone, die zur Expression eines N-terminalen His₆-Tags führen. Dieser kann ebenfalls zur Reinigung von rekombinanten Proteinen mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie genutzt und anschließend falls gewünscht proteolytisch abgespalten werden. Ein in pET11c kloniertes Protein wird ohne Tags exprimiert. Der pET26b(+-) Vektor enthält stromaufwärts des klonierten Gens die *pelB*-Sequenz. Durch dieses N-terminale Signalpeptid wird das exprimierte Protein in das Periplasma sekretiert.

Nach Transformationen mit dem pET11c- oder pET21a(+-) Vektor kann mittels der enthaltenen Ampicillin-Resistenz (*bla*) auf plasmidtragende *E. coli* Zellen selektiert werden. Im Falle von pET24a(+-), pET26b(+-) oder pET28a(+-) Vektoren erfolgt die Selektion über die erworbene Kanamycin-Resistenz (*kan*).

1.7.2 pQE-Vektoren

Die kommerziellen pQE-Expressionsplasmide (QIAGEN) gehören zur pDS-Plasmidfamilie (Bujard *et al.*, 1987) und basieren im Gegensatz zu pET-Plasmiden auf einem T5-Promotor Transkriptions-Translationssystem. Das Promotor/Operator-Element besteht aus einem Phagen T5-Promotor und zwei *lac*-Operator-Sequenzen, welche die Wahrscheinlichkeit der *lac*-Repressor-Bindung erhöhen und so die Unterdrückung des leistungsstarken T5-Promotors garantieren. Dieser wird von der *E. coli*-eigenen RNA-Polymerase erkannt, wodurch ein inseriertes Gen in allen *E. coli* Expressionsstämmen transkribiert werden kann. Als Terminatorsequenzen stehen t_0 des Phagen Lambda und T1 aus dem *E. coli rrnB* Operon zur Verfügung. Eine synthetische Ribosomenbindestelle RBSII vor der multiplen Klonierungsstelle (MCS) ermöglicht die effiziente Translation der transkribierten mRNA.

Der pQE-70 Vektor (QIAGEN) besitzt stromabwärts der MCS einen His₆-Tag, wodurch das exprimierte Protein diesen C-terminal bei Klonierung über die Restriktionsschnittstellen *Sp**H*I und *Bam*H_I trägt. Dies wurde zur Reinigung von Proteinen über Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie genutzt, die im tryptophanoperonfreien *E. coli* KK8-Stamm exprimiert wurden. Die Selektion plasmidtragender *E. coli* Zellen erfolgt über eine Ampicillin-Resistenz (*bla*).

1.7.3 pDMI,1

Der Vektor pDMI,1 (Certa *et al.* 1986) ist kommerziell als pREP4-Vektor von der Firma QIAGEN erhältlich. Aufgrund seines konstitutiv exprimierten Lac-Repressor-Gens (*lacI*) ist der pDMI,1-Vektor für die Inhibition des Lac-Promotor/Operatorsystems und damit für die unterdrückte Expression eines in den pQE70- (bzw. pDS56/RBS/*Sp**H*I) Vektor klonierten Gens in der gleichen Zelle verantwortlich. Eine gezielte Induktion ist durch Zugabe von 0,5 mM IPTG (Endkonzentration) möglich. Der pDMI,1-Vektor besitzt ein p15-Replikon und das Kanamycin-Resistenzgen (*kan*) als Selektionsmarker.

1.7.4 *E. coli*-Hefe-Shuttle-Vektoren

1.7.4.1 pGAD424

Der *E. coli*-Hefe-Shuttle-Vektor pGAD424 (Bartel *et al.* 1993) ist ein Beute- (*prey*) Vektor aus dem CLONTECH Matchmaker *yeast-two-hybrid* System. Für Klonierungen in *E. coli* ist eine MCS mit Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen (*Eco*RI, *Sma*I,

*Bam*HI, *Sal*II, *Pst*I & *Bgl*II), ein ColE1 ori und ein Ampicillinresistenzgen (*bla*) vorhanden. Das *in frame* einklonierte Gen wird in *S. cerevisiae* als Fusionsprotein mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) hergestellt und über das Nukleus-Translokationssignal der Alkohol-Dehydrogenase (T_{ADH}) in den Zellkern transportiert. Zur Selektion in *S. cerevisiae* ist ein 2μ ori und das Gen für die 3-Isopropylmalat-Dehydrogenase (*leu2*) vorhanden, welches *leu*-defiziente Hefestämme komplementieren kann.

1.7.4.2 pAS2.1

Der *E. coli*-Hefe-Shuttle-Vektor pAS2.1 (Harper *et al.* 1993) ist ein Köder- (*bait*) Vektor aus dem CLONTECH Matchmaker *yeast-two-hybrid* System. Für Klonierungen in *E. coli* ist eine MCS mit verschiedenen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen (*Nde*I, *Nco*I, *Sfi*I, *Eco*RI, *Xma*I, *Sma*I, *Bam*HI, *Sal*II & *Pst*I), ein ColE1 ori und ein Ampicillinresistenzgen (*bla*) vorhanden. Das *in frame* einklonierte Gen wird in *S. cerevisiae* als Fusionsprotein mit der Gal4-DNA-Bindedomäne (DBD) hergestellt und über das Nukleus-Translokationssignal der Alkohol-Dehydrogenase (T_{ADH}) in den Zellkern transportiert. Zur Selektion in *S. cerevisiae* ist ein 2μ ori und das Gen für die Phosphoribosylanthranilat-Isomerase (*trp1*) vorhanden, welches *trp*-defiziente Hefestämme komplementieren kann.

1.8 Oligodesoxyribonukleotide

Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen sind unterstrichen. Bei Mutationsprimern sind diejenigen Basen, die von der Originalsequenz abweichen, **fett** markiert. Wurde ein Primer von Dritten zur Verfügung gestellt, erfolgt die Angabe der Person in Klammern.

1.8.1 Vektorspezifische Amplifikations- und Sequenzierungsprimer

T7 Promotor

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

T7 Terminator

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

CyRI (*Eco*RI)

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

CyPstI (*Pst*I)

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

5'pGAD_AD (M. Häger)

5' - TAC CAC TAC AAT GGA TG -3'

3'pGAD_AD (M. Häger)

5' - TTG AAG TGA ACT TGC GGG G -3'

5'BspHIsektag (zur Umklonierung von pET26b mit pelB-Sequenz in pQE60)

5' -GC TTC ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GCT GGT CTG-3'

1.8.2 Amplifikations- und Mutagenisierungsprimer für hisF**5'tmhisF-NdeI (J. Claren)**5' - AGC CAT ATG CTC GCT AAA AGA ATA ATC GCG -3'**3'hisF-BamHI (T. Seitz)**5' - GTG GTG GGA TCC TCA CAA CCC CTC CAG -3'**5'tmhisF-V48A**5' -ATA GAC GAA CTC **GCT** TTT CTG GAT ATC-3'**5'tmhisF-F77A**5' -ATC GAC ATT CCG **GCT** ACT GTT GGA GGA G-3'**5'hisF-D98A (K. Babinger)**5' -CGT GGT **GCG** GCC AAG GTG AGC**5'hisF-K99A**5' -CGT GGT GCG GAC **GCG** GTA AGC ATA-3'**5'tmhisF-L169A**5' -GCA GGA GAG ATC **GCT** CTC ACC AGT ATC G-3'**1.8.3 Amplifikations- und Mutagenisierungsprimer für hisH****5'pDS-hisH NcoI**5' -ATG GCC ATG GAT atg agg atc gga ata atc-3'**5'pDS-hisH SphI (S. Beismann-Driemeyer)**5' -GGT GTG ATA GCA TGC GTA TCG G-3'**3'pDS-hisH HindIII (S. Beismann-Driemeyer)**5' -CTA CCA AGC TTC TGA AGA GAT CTA TCG-3'**5'hisH NdeI**5' -GGA ATT CCA TAT GAG GAT CGG AAT AAT C-3'**3'hisH BamHI STOP (M. Häger)**5' -GAA TGG ATC CGC TAT CGC CGG GAC AA**5'hisH-W123A**5' -CTT CCC CAC ATG GGC **GCG** AAC GAG GTG ATC TTC-3'**5'hisH-W123K**5' -CTT CCC CAC ATG GGC **AAG** AAC GAG GTG ATC TTC-3'**5'hisH-Y138A-hin (M. Häger)**5' -AAC GGG TAT TAC **GCC** TTC GTC CAC ACC-3'**3'hisH-E180L**5' -GAT TTT TGA ACT CTT **CAG** GGG ATG GAA CTG AAA-3'**3'hisH-E180A**

5' -GAT TTT TGA ACT CTT **CGC** GGG ATG GAA CTG AAA-3'

3'hisH-E180A-K181N

5' -GAT TTT TGA ACT **GTT CGC** GGG ATG GAA CTG AAA-3'

5'hisHK181Au (K. Babinger)

5' -CAT CCC GAA **CGC AGT** TCA AAA ATC-3'

3'hisH-K181S

5' C GAT TTT TGA ACT **GCT** TTC GGG ATG GAA CTG-3'

3'hisH-K181N

5' C GAT TTT TGA ACT **GTT** TTC GGG ATG GAA CTG-3'

3'hisH-K181S-S182V

5' -C TTC GAT TTT TGA **CAC GCT** TTC GGG ATG GAA CTG-3'

3'hisH-S182V

5' -CT TCC GAT TTT TGA **CAC** CTT TTC GGG ATG-3'

1.8.4 Amplifikations- und Mutagenisierungsprimer für *trpG*

5'TrpG_NcoI

5' -ATG GCC ATG GAT atg aaa aga gtg atc gtt-3'

5'TrpG_Eco_Nde_ATG (M. Häger)

5' -GCG CGA ATT CCA TAT GAA ACG TGT GAT -3'

3'TrpG_Bam_STOP (M. Häger)

5' -CGC GGG ATC CGT CAC TTT ACC TGA AT-3'

3'tmTrpG L126G

5' -CCG CGT AGC AAC **GCC** TGG ATT TTT CAC-3'

3'tmTrpG V127Y

5' -GTA CCG CGT AGC **ATA** GAG TGG ATT TTT C-3'

3'tmTrpG T129Y

5' -TGA ATG GTA CCG **ATA** AGC AAC GAG TGG-3'

5'tmTrpG T129A

5' -CCA CTC GTT GCT **CGC** CGG TAC CAT TC-3'

5'tmTrpG T129F

5' -CCA CTC GTT GCT **TTT** CGG TAC CAT TCA-3'

5'tmTrpG T131Y

5' -CTC GTT GCT ACG CGG **GTC** CAT TCA CTC GTT GTT-3'

3'tmTrpG S175A

5' -TTC GGT CAG CAC **CGC** TTC TGG ATG AAA-3'

5'tmTrpG-Q19R-E23R(a1)

5' -C ATC GTT **CGC** TAC ATC GGT **CGC** GTA GAA CC-3'

3'TrpG_a5_181-185 (M. Häger)

5' -CTT TAT GAT TCT CTT TCC **TAT TTT CGA CGA CTT TTC** TGG ATG AA-3'

5'tmTrpG-b5b6II

5'-GGA AAG ATC GTG CAT **CTG AGG AGC AGA AGA** CTT CCC CAC **ATG GGC TGG**
AAC GAG ATC GTA CAC AAC GGA-3'

5'TrpG_b7_135-140 (M. Häger)

5'-GTG AAA AAT CCA **GGC TAT** GCT **TAT** CGG **GTC** CAT TCA CTC GTT GTT-3'

3'tmTrpG-b9II

5'-TCC CAT GAT CTC **AAT TTC GCC ATC ATA TTC** ACT TTT GGC
 GG-3'

1.9 DNA- und Protein-Längenstandards

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurde der GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot) (Abbildung 2a), zur Größenbestimmung von Proteinen bei SDS-PA Gelen bzw. bei *Western-BLOTS* wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker (MBI FERMENTAS) (Abbildung 2b) verwendet.

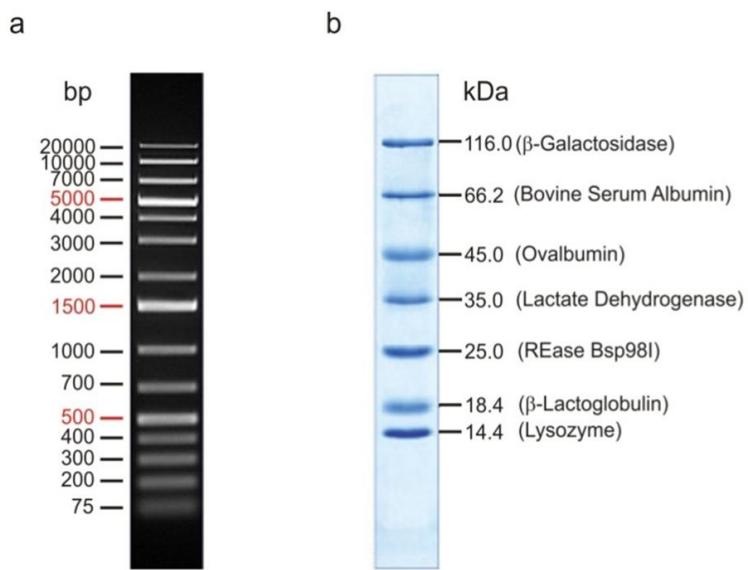


Abbildung 2: DNA- und Protein-Längenstandards.

- (a) GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (MBI FERMENTAS) für Agarosegele.
 (b) Unstained Protein Molecular Weight Marker (MBI FERMENTAS) für SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid).

1.10 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben wurden die verwendeten Puffer sterilfiltriert und bei Raumtemperatur gelagert. Es wurde MILLIPORE bzw. bidestilliertes Wasser verwendet.

1.10.1 Arbeiten mit *E. coli*

Antibiotika

Die langfristige Lagerung der gelösten Antibiotika erfolgte nach Sterilfiltration bei -20 °C, die kurzfristige Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Ampicillin (1000 x): 150 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser gelöst.
 Chloramphenicol (1000 x): 30 mg/ml Chloramphenicol in 100 % EtOH gelöst.
 Kanamycin (1000 x): 75 mg/ml Kanamycin in Wasser gelöst

Glucose-Stammlösung: 20 % (w/v) Glucose in Wasser gelöst.
IPTG-Stammlösung: 1 M IPTG in Wasser gelöst, bei -20 °C gelagert.
KCl-Stammlösung: 1 M KCl in Wasser gelöst, bei -20 °C gelagert.
MgCl₂-Stammlösung: 1 M MgCl₂ in Wasser gelöst, bei -20 °C gelagert.
MgSO₄-Stammlösung: 1 M MgSO₄ in Wasser gelöst, bei -20 °C gelagert

5× M9⁻-Salze

64 g Na₂HPO₄·7H₂O, 15 g KH₂PO₄, 2,5 g NaCl, 5,0 g NH₄Cl, in Wasser gelöst, autoklaviert und bei RT gelagert.

TFB I-Puffer:

100 mM KCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerol. Die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden bei 4 °C gelagert. Der Puffer wurde direkt vor der Verwendung frisch angesetzt.

TFB II-Puffer:

100 mM Tris/HCl pH 7,0, 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂. Die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden bei 4 °C gelagert. Der Puffer wurde direkt vor der Verwendung frisch angesetzt.

1.10.2 Arbeiten mit *S. cerevisiae*

LiAc/PEG-Puffer

10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, 40 % PEG, pH 7,5
 [8 ml 50 % PEG (in H₂O gelöst, gegebenenfalls zum Lösen auf 50 °C erwärmen); 1 ml 1 M LiAc (pH 7,5 mit Salzsäure einstellen, autoklavieren); 1 ml 10× TE (100 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5, autoklaviert)]

LiAc-Puffer

10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7,5 [Herstellung: siehe LiAc/PEG-Puffer]

TE-Puffer (1×)

10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5, autoklaviert

fish sperm carrier DNA (10 mg/ml; ROCHE)

Denaturierung in 20 min kochendem Wasser, danach sofort auf Eis abkühlen, bei -20 °C lagern, für jede Benutzung erneut denaturieren.

1.10.3 Arbeiten mit DNA

PCR-dNTP-Lösung (2 mM)

Je 2 mM dNTP (N = A, C, G und T) in Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

1.10.4 Agarosegelektrophorese

Agarose (1%)

5 g Agarose wurden in 500 ml 0,5× TBE gelöst, aufgekocht und bei 60 °C gelagert.

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid

Sukrose Farbmarker

60 % (w/v) Sukrose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF in 0,5× TBE gelöst

TBE (5×)

445 mM Borsäure, 12,5 mM EDTA, 445 mM Tris (resultierender pH-Wert: 8,15)

1.10.5 Arbeiten mit Proteinen

Aufschlusspuffer für Expressionen im analytischen Maßstab

50 mM KP pH 7,5

Aufschlusspuffer für Expressionen im präparativen Maßstab

50 mM KP pH 7,5 oder 50 mM Tris/HCl pH 7,8

Dialyse- und Lagerungspuffer

10 mM / 50 mM KP pH 7,5 oder 50 mM Tris/HCl pH 7,8

EDTA-Stammlösung

500 mM EDTA wurden unter Zugabe von KOH-Plätzchen in 500 ml Wasser gelöst und anschließend mit 1 M KOH der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Lagerung bei RT.

Kaliumphosphatpuffer (KP)

1 M K₂HPO₄ (Base) und 1 M KH₂PO₄ (Säure), durch Mischen wurde der gewünschte pH-Wert eingestellt (i.d.R. pH 7,5).

Puffer zur Solubilisierung und Rückfaltung von HisF

1 M, 2 M und 6 M Guanidiniumhydrochlorid in 10 mM KP pH 7,5

Puffer für Gelfiltration

50 mM KP, 300 mM KCl, pH 7,5

Puffer für Ionenaustauschchromatografie

Laufpuffer: 50 mM KP pH 7,5

Elutionspuffer: 50 mM KP pH 7,5, 3 M NaCl

Puffer für Metallchelat-Affinitätschromatografie

Laufpuffer: 50 mM KP pH 7,5 oder 50 mM Tris/HCl pH 7,8, 500 mM NaCl, 15 mM Imidazol

Elutionspuffer: 50 mM KP pH 7,5 oder 50 mM Tris/HCl pH 7,8, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol

Puffer zur Regenerierung der HisTrap FF Crude Säule

20 mM KP, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 7,4

250 mM NiCl₂ pH 4,05

1.10.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Ammoniumpersulfat (APS)-Stammlösung (10%)

10 % (w/v) APS in Wasser gelöst und steril filtriert. Gelagert wurde die Stammlösung bei -20 °C.

Coomassie Färbelösung

0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 und R250, 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig, filtriert, bei RT lichtgeschützt gelagert.

Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung für den Blot zur N-terminalen Sequenzierung

45 % (v/v) Methanol, 9 % (v/v) Essigsäure, 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, filtriert, bei RT lichtgeschützt gelagert.

Coomassie Brilliant Blue-Entfärbelösung für das N-terminale Sequenzieren

50 % Methanol, 40 % Millipore H₂O, 10 % Essigsäure

SDS-PAGE Trengelpuffer

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

SDS-PAGE Sammelgelpuffer

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

SDS-PAGE Laufpuffer (resultierender pH-Wert: 8,5)

0,1 % (w/v) SDS, 0,025 M Tris, 0,2 M Glycin

SDS-PAGE Laufpuffer für N-terminales Sequenzieren

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

SDS-PAGE Probenpuffer (2×):

2 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) Glycerin, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,01 % (w/v)

Bromphenolblau, 1,25 M Tris/HCl pH 6,8

1.11 Nährmedien für *E. coli*

Zur Sterilisation wurden die Medien für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Bei Selektivmedien wurden die entsprechenden Antibiotika nachträglich, bei handwarmer Temperatur, in Form von sterilfiltrierten 1000-fach konzentrierten Stammlösungen zugegeben.

Luria-Bertani-(LB)-Medium

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1,0 % (w/v) NaCl, 1,0 % (w/v) Trypton

LB-Agar

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

SOB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,05 % (w/v) NaCl, 2,0 % (w/v) Trypton

Nach dem Autoklavieren wurden 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂ und 2,5 mM KCl (jeweils steril filtriert) hinzugefügt.

SOC-Medium

SOB-Medium plus Zugabe von zusätzlich 20 mM Glukose (steril filtriert) nach dem Autoklavieren.

M9⁻-Medium

Zu 750 ml sterilem H₂O wurden zugegeben:

200,0 ml 5× M9 Salze, 2,0 ml MgSO₄ (1 M), 20,0 ml Glukose (20 %), 0,1 ml CaCl₂ (1M)

M9⁻-Agar

M9⁻-Medium plus 1,5 % (w/v) Bacto-Agar

¹⁵NH₃ Minimalmedium

7,5 g Na₂HPO₄•2H₂O, 3 g KH₂PO₄, 0,5 g NaCl, 0,25 g MgSO₄•7H₂O, 0,014 g CaCl₂•H₂O ad 1 l (autoklavieren)

Anschließend zugeben: 1 g $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ + 10 g Glukose + 10 ml Spurenelemente

Spurenenlemente:

9 ml 10 fach SL4, 10 ml SL6, 81 ml H_2O (steril filtrieren)

10fach SL4:

500 mg EDTA, 200 mg $\text{Fe}(\text{II})\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ad 90 ml H_2O (frisch ansetzen)

SL6: 100 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 mg H_3BO_3 , 200 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$,
20 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 30 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ad 1 l H_2O

L-Seleno-Methionin Minimalmedium

100 ml M9 Salze, 10 ml Spurenelemente, 20 ml Glukose 20 % (w/v),
1 ml MgSO_4 (1M), 300 μl CaCl_2 (1M), 1 ml Biotin (1mg/ml, frisch),
1 ml Thiamin (1mg/ml, frisch), Aminosäure-Mix ad 1 l H_2O (steril)

Spurenelemente:

5 g EDTA, 0,83 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 84 mg ZnCl_2 , 13 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg H_3BO_3 , 1,6 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Aminosäure-Mix:

Je 40 mg aller Standard L-Aminosäuren außer Methionin.

L-Seleno-Methionin (T) Stammlösung (Se-Met):

25 mg/ml Se-Met in sterilem H_2O

Die Zugabe von 1 ml Se-Met erfolgt direkt nach dem Animpfen des Mediums

1.12 Nährmedien für *S. cerevisiae*

YPD-Vollmedium

20 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, mit Wasser auf 950 ml auffüllen, nach dem Autoklavieren 50 ml 40 % steril filtrierte Glukose-Stammlösung zugeben.

YPDA-Vollmedium

YPD-Vollmedium zuzüglich 30 mg Adenin nach dem Autoklavieren.

YPD-Agar

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

SD (*synthetic dropout*) Minimalmedium

6,7 g YNB (*yeast nitrogen base*, mit Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren, ohne Dextrose), 0,61 g CSM-Ade-His-Leu-Trp (*complete supplement mixture*, enthält alle Nukleotide und Aminosäuren außer Adenin, Histidin, Leucin und Tryptophan), ergibt SD-TLHA-Minimalmedium; bei Bedarf wurden je 20 mg Adenin, Histidin, Leucin

und Tryptophan zugegeben (z. B. zur Herstellung von SD-TL), mit Wasser auf 950 ml aufgefüllt und nach dem Autoklavieren 50 ml 40 % steril filtrierte Glukose-Stammlösung zugegeben.

SD (*synthetic dropout*) Selektivagar

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

Bei Bedarf wurden je 20 mg Adenin, Histidin, Leucin und Tryptophan zugegeben.

1.13 Software

ÄKTA Unicorn Version 5.01 (318)	© GE HEALTHCARE
Cary Eclipse Version 1.1 (175)	© VARIAN Australia Pty. Ltd. 2002
Cary Win UV Version 3.0 (182)	© VARIAN Australia Pty. Ltd. 2002
CCP4 (iMOSFLM, Scala, Truncate, Matthews_Coef, Baverage, WinCoot)	COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4. 1994
Corel Draw Version 12	© 2003 COREL Corp.
Deep View Swiss PDB Version 3.7	© Guex & Peitsch 1997
Endnote Version X2	© 2000 WINTERTREE Software Inc.
Povray Raytrace 3.6	Persistence of Vision Team
Spectra Manager 2	JASCO GmbH, Groß-Umstadt
SigmaPlot 11.0	© 2004/2006 SPSS INC.

Frei zugängliche, servergestützte Anwendungen

DaliLite	http://www.ebi.ac.uk/DaliLite
MCoffee	http://www.igs.cnrsmrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi
Swiss Model	www.swissmodel.com
Modeller	http://modbase.compbio.ucsf.edu/ModWeb20-html/modweb.html
Molprobity	http://molprobity.biochem.duke.edu/
I-Tasser	http://zhang.bioinformatics.ku.edu
Polyview	http://polyview.cchmc.org/index_old.html

2 Methoden

2.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Glaswaren und hitzestabile Verbrauchsmaterialien, wie z.B. Pipettenspitzen, wurden ebenso autoklaviert und anschließend bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet. Hitzelabile Lösungen wurden in Stammlösungen angesetzt und je nach Volumen durch einen Membranfilter der Porengröße 0,2 µm mittels einer Vakuumpumpe oder durch einen Spritzenfilter der Porengröße 0,22 µm filtriert. Puffer für die analytische oder präparative Gelfiltration wurden mindestens 30 min im Exsikkator entgast.

2.2 Mikrobiologische Methoden

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

Alle verwendeten *E. coli* Stämme wurden bei 37 °C unter Schütteln bei 150 rpm (1 Liter Kultur) bzw. 220 rpm (5, 10 bzw. 50 ml Kultur) angezogen. Die Anzucht erfolgte in der Regel in LB-Medium. Bei plasmidtragenden Stämmen wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum (150 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Chloramphenicol, 75 µg/ml Kanamycin) aus einer tausendfach konzentrierten, sterilfiltrierten Stammlösung zugegeben. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurde die Zellsuspension auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und üN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur kurzzeitigen Lagerung wurden die Platten oder Suspensionen gut verschlossen und im Kühlschrank bei 8 °C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden Glycerinkulturen hergestellt, welche bei -80 °C aufbewahrt wurden. Hierzu wurde ein Aliquot einer üN-Kultur im Verhältnis 1:1 in 87 % Glycerin in einem sterilen Schraubdeckelgefäß aufgenommen.

2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (Inoue et al. 1990)

Zur Präparation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde 1 Liter LB-Medium mit dem entsprechenden Stamm auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 angezogen. Die Kultur wurde 15 min auf Eis gekühlt, in 50 ml-

Röhrchen überführt und durch Zentrifugation (EPPENDORF Centrifuge 5810R, 4.000 rpm, 10 min, 4 °C) geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in 100 ml eiskaltem TFBII-Puffer resuspendiert, erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert und das erhaltene Pellet in 10 ml eiskaltem TFBII-Puffer aufgenommen. Sofort nach der Resuspendierung wurden 100 µl Aliquots der Zellsuspension in Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis überführt und bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Chemische Transformation (Inoue et al. 1990)

Zur Transformation chemisch kompetenter Zellen wurde ein Aliquot der Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit etwa 100 ng Plasmid-DNA (maximales Volumen: 20 µl) versetzt. Nach fünf-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für 30 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Danach wurde der Ansatz nochmals für fünf Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 µl LB- oder SOC-Medium folgte eine Kur von 30 min bei 37 °C im Brutschrank, um die Antibiotikaresistenz auszubilden. Bei Transformation eines gereinigten Plasmids wurden 100 µl der Zellsuspension auf Selektivagar ausplattiert. Bei Transformation eines Ligationsansatzes wurde die komplette Zellsuspension kurz abzentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5415D, 4.000 rpm, 2 min, RT), in ca. 100 µl LB-Medium resuspendiert und anschließend ausplattiert.

2.2.4 Bestimmung der Transformationseffizienz

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz (T_E) wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen wie oben beschrieben mit 100 ng pUC18-Plasmid-DNA transformiert. Nach dem Kuren wurden je 100 µl einer Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) auf Selektivagar ausplattiert. Die Transformationseffizienz wurde folgendermaßen berechnet:

$$T_E = \frac{n_{\text{Kolonien}} \cdot f}{m_{\text{DNA}}}$$

Formel 1: Berechnung der Transformationseffizienz.

T_E : Transformationseffizienz (Kolonien pro µg DNA)

n_{Kolonien} : Anzahl der Kolonien

f : Verdünnungsfaktor

m_{DNA} : eingesetzte DNA-Menge [µg]

2.2.5 Herstellung von kompetenten *S. cerevisiae* Zellen

Zur Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* Hefezellen wurden 5 ml YPD Medium mit einer frisch gewachsenen Einzelkolonie angeimpft, diese durch kräftiges Vortexen im Medium resuspendiert und unter Schütteln mit 220 rpm bei 30 °C inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde eine 50 ml YPD-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und etwa 5 h bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert. Zur Zellernte wurde die Suspension abzentrifugiert (EPPENDORF 5810R, 4.000 rpm, 5 min, RT). Nach einem Waschschritt mit 25 ml H₂O und erneute Zentrifugation (EPPENDORF 5810R, 4.000 rpm, 5 min, RT), wurde das Zellpellet in 800 µl LiAc-Puffer resuspendiert und bei 4 °C zur Verwendung innerhalb von einer Woche gelagert.

2.2.6 Li-Ac-Transfektion von *S. cerevisiae* Zellen und Überprüfung mittels Auxotrophie-Marker

Die Transfektion des auxotrophen Hefestammes AH109 erfolgte nach der Li-Ac-Methode (Ito *et al.* 1983). Dazu wurde ein 20 µl Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis mit einem Gemisch aus 1 µg Plasmid-DNA und 60 µg denaturierter *fish sperm carrier* DNA versetzt und gründlich gevortext. Bei Kotransfektion mit zwei Plasmiden wurden jeweils 0,5 µg DNA eingesetzt. Danach wurden 80 µl LiAc/PEG-Puffer zugegeben, erneut kräftig gevortext, gefolgt von einer Schüttelinkubation der Zellen für 1 h bei 30 °C und 220 rpm. Nach Zugabe von 15 µl DMSO wurde der Transformationsansatz für 15 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, für 2 min auf Eis inkubiert und für 10 s bei 13200 rpm (EPPENDORF 5415D) pelletiert, in 30 µl YPDA resuspendiert und 1 h mit 220 rpm bei 30 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit H₂O wurden die Zellen in einem Volumen von 15 µl H₂O aufgenommen und Aliquots auf SD-Selektivagar ausplattiert, bei 30 °C inkubiert und mehrfach täglich auf Zellwachstum kontrolliert. Gewöhnlich waren nach 3–5 Tagen deutlich sichtbare Kolonien herangewachsen.

Eine erfolgreiche Transfektion mit den verwendeten Plasmiden pGAD424 und pAS2-1, die *leu2* (3-Isopropylmalat-Dehydrogenase) bzw. *trp1* (Phosphoribosylanthranilat-Isomerase) kodieren, ermöglicht den Zellen Wachstum auf Platten ohne die Auxotrophie-Marker Leucin (L) und Tryptophan (T). Die Transformationseffizienzen erreichten bis zu 10⁵ pro µg eingesetzter DNA.

2.2.7 Qualitativer Interaktions-Assay mittels Interaktions-Marker (*yeast-two-hybrid*)

Das *yeast-two-hybrid* System ist ein *in vivo* Assay zur qualitativen Analyse von Protein-Protein-Interaktionen und wurde erstmals 1989 beschrieben (Fields & Song 1989). Basierend auf dem ursprünglichen System sind zahlreiche Variationen entwickelt worden.

Das Prinzip des *yeast-two-hybrid* Systems beruht auf der Beobachtung, dass der eukaryotische Transkriptionsfaktor GAL4 aus zwei funktionell unabhängigen Domänen, der DNA-bindenden Domäne (DBD) und der Aktivierungsdomäne (AD) besteht, und die räumliche Nähe der AD zum Transkriptionsstart eines Gens ausreicht, um dessen Transkription durch die RNA-Polymerase zu initialisieren (Brent & Ptashne 1985; Hope & Struhl 1986). Zum Test auf Interaktion werden die beiden zu analysierenden Proteine auf zwei verschiedene Vektoren (pGAD424 bzw. pAS2.1, siehe 1.7.4) als Fusionsproteine mit der DBD bzw. der AD kloniert. Dabei wird das mit der DBD fusionierte Protein als Köder (*bait*) bezeichnet und das an AD fusionierte Protein als Beute (*prey*) (Abbildung 3).

Findet keine Interaktion zwischen Köder und Beute statt, bindet das Fusionsprotein DBS-Köder zwar an die UAS (*upstream activation sequence / upstream activation site of transcription*), ohne jedoch das Fusionsprotein AD-Beute rekrutieren zu können. Bei Interaktion von Köder und Beute kommt die AD dagegen in räumliche Nähe der an die UAS bindenden DBD und kann somit die RNA-Polymerase II aktivieren, was zur Transkription der Reportergene führt.

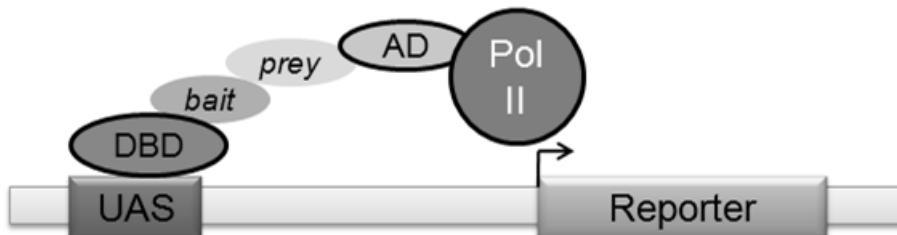


Abbildung 3: Das *yeast-two-hybrid* System detektiert Komplexbildung zwischen zwei Proteinen *in vivo* (modifiziert nach Claren 2008).

Der Köder (*bait*) bildet ein Fusionsprotein mit der DNA-bindenden Domäne (DBD) von GAL4, die an die Transkriptionsaktivierungsdomäne bindet (UAS, *upstream activation sequence*). Die Beute (*prey*) liegt als Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne (AD) von GAL4 vor, welche die RNA-Polymerase II (Pol II) bindet. Durch Komplexbildung von Köder und Beute wird die RNA-Polymerase II in räumliche Nähe der UAS gebracht, was zur Expression der Reportergene führt.

Die Reportergene, auch Interaktionsmarker genannt, kodieren meist für Enzyme aus Aminosäurestoffwechselwegen, die es den Zellen ermöglichen, auf entsprechenden Minimalmedien zu wachsen oder für Enzyme, die bei Zugabe entsprechender Substrate ins Medium eine Farbreaktion katalysieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die

Interaktionsmarker *his3* (Imidazolglycerinphosphat-Dehydratase, ermöglicht Wachstum auf Medium ohne Histidin) und *ade2* (Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase, vermittelt Wachstum auf Medium ohne Adenin) verwendet.

Nach frischer Kotransfektion mit den Plasmiden pGAD424 und pAS2.1 wurden die Zellen zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion auf SD-TL Agar und zum Nachweis von Köder-Beute Interaktion auf SD-Selektivagar (SD-TLHA) ausplattiert, bei 30 °C inkubiert und mehrfach täglich auf Koloniebildung kontrolliert. Gewöhnlich waren auf den Kontrollplatten nach 3–5 Tagen deutlich sichtbare Kolonien herangewachsen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis & Faloona 1987; Saiki *et al.* 1988)

Die Polymerasekettenreaktion (Mullis & Faloona 1987; Saiki *et al.* 1988) ermöglicht die Vervielfältigung definierter DNA-Fragmente *in vitro*. Dies geschieht über zyklisches Wiederholen von Denaturierung der doppelsträngigen DNA, gefolgt von Anlagerung (*Annealing*) zweier Primer (synthetische Oligonukleotide, die das zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren) und enzymatischer DNA-Synthese (*Extension*). Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgt exponentiell. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50-200 µl in einem Thermocycler (Deckeltemperatur 110 °C) durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten mit je 5–100 ng zu amplifizierender DNA-Matrize, 0,025 U/µl GoTaq® DNA-Polymerase, 5× Green GoTaq® Reaktionspuffer [(enthält 7,5 mM MgCl₂ (Endkonzentration: 1,5 mM MgCl₂) und Auftragspuffer)], je 0,2 mM dNTPs und jeweils 1 µM der beiden Primer. Zur fehlerfreien Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde zu diesem Ansatz noch 2,5 U *Pwo*-Polymerase zugegeben, da diese im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase eine 3' → 5'-*Proofreading*-Aktivität besitzt. Ein Standard PCR-Programm setzte sich wie folgt zusammen:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1. Denaturierung	95	5 min
2. Denaturierung	95	30 s
3. Primer-Anlagerung	T _A	30 s
4. Extension	72	1 min/kb
5. Finale Extension	72	10 min

Die Schritte 2 bis 4 wurden 32-mal wiederholt.

Aus der berechneten Schmelztemperatur der beiden Primer (Formel 2) wurde die optimale Anlagerungstemperatur T_A nach Formel 3 ermittelt.

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

Formel 2: Berechnung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids.

T_M : Schmelztemperatur des Primers [°C]

%GC: GC-Gehalt des Primers [%]

n: Anzahl der Nukleotide des Primers

$$T_A = \left(\frac{T_{M1} + T_{M2}}{2} \right) - 3^{\circ}\text{C}$$

Formel 3: Berechnung der optimalen Anlagerungstemperatur der Primer in einer PCR-Reaktion.

T_A : Annealing-Temperatur [°C]

T_{M1} & T_{M2} : Schmelzpunkte der eingesetzten Primer

Die optimale Annealing-Temperatur wurde zum Teil auch experimentell bestimmt. Hierfür wurden mehrere PCR-Ansätze im Gradienten-Cycler (EPPENDORF Mastercycler gradients) parallel angesetzt. Mittels Agarosegelektrophorese konnte anschließend ermittelt werden, welche Annealing-Temperatur die höchste Ausbeute an spezifischem Amplifikationsprodukt lieferte. Die Spanne des Gradienten lag zumeist im Bereich einer Anlagerungstemperatur zwischen 50 °C und 70 °C.

Führte eine PCR auch nach einem Gradienten nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen, wurde eine *touchdown*-PCR durchgeführt. Hierbei wurde die T_A während der PCR schrittweise von 60 °C auf 45 °C erniedrigt:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	95	5
2. Denaturierung	95	30 s
3. Primer-Anlagerung	T_A	30 s
4. Extension	72	1 min / kb
5. Finale Extension	72	10
7. Lagerung	16	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden jeweils siebenmal mit $T_A = 60, 55, 50, 47$ und 45 °C wiederholt.

Dieses Vorgehen kann hilfreich sein, wenn die beiden verwendeten Primer sehr unterschiedliche T_M -Werte besitzen. Darüber hinaus wird durch die anfängliche hohe Anlagerungstemperatur die Spezifität der PCR-Amplifikation erhöht, während in den späten Runden eine große Menge an Produkt gebildet wird.

2.3.2 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung der korrekten Insertion eines Gens in die multiple Klonierungsstelle eines Vektors wurde ein Insert-*Screening* mittels Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden auf Selektivplatten gewachsene Einzelkolonien dem PCR-Ansatz hinzugefügt und bei dem Denaturierungsschritt von 95 °C aufgeschlossen. Hierzu wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze von der Platte gepickt und kurz auf dem Boden des PCR-Gefäßes verstrichen. Die enthaltene DNA diente in den folgenden Amplifikationsrunden als Matrize. Als Primer wurden in der Regel genflankierende Plasmidprimer, Klonierungsprimer oder eine Mischung aus beiden eingesetzt. Das Volumen des Ansatzes betrug jeweils 20 µl. Im Ansatz waren je 0,25 U GoTaq® DNA-Polymerase, Green GoTaq® Reaktionspuffer, 0,1 mM dNTPs und je 0,5 µM der beiden Primer enthalten. Die Amplifikation erfolgte mittels Standard-Protokoll (siehe 2.3.1).

2.3.3 Megaprimer-PCR (Sarkar & Sommer, 1990)

Die Megaprimer-PCR ist eine Form der DNA-Manipulation mit der gerichtet Punktmutationen eingeführt werden können. In einer ersten PCR wird der Megaprimer hergestellt, indem mit Hilfe eines genflankierenden Primers und eines Primers, der die Mutation enthält, ein Fragment (der Megaprimer) amplifiziert wird. Je nach Lage der Mutation wird die Mutation über einen fehlerhaften 3'-Primer in Kombination mit einem genflankierenden 5'-Primer, oder über einen fehlerhaften 5'-Primer in Kombination mit einem genflankierenden 3'-Primer eingeführt. Der Megaprimer wurde mittels präparativer Gelelektrophorese gereinigt und diente zusammen mit dem das Gen auf der gegenüberliegenden Seite flankierenden Primer zur Amplifikation des gesamten Gens in einer zweiten PCR (Abbildung 4).

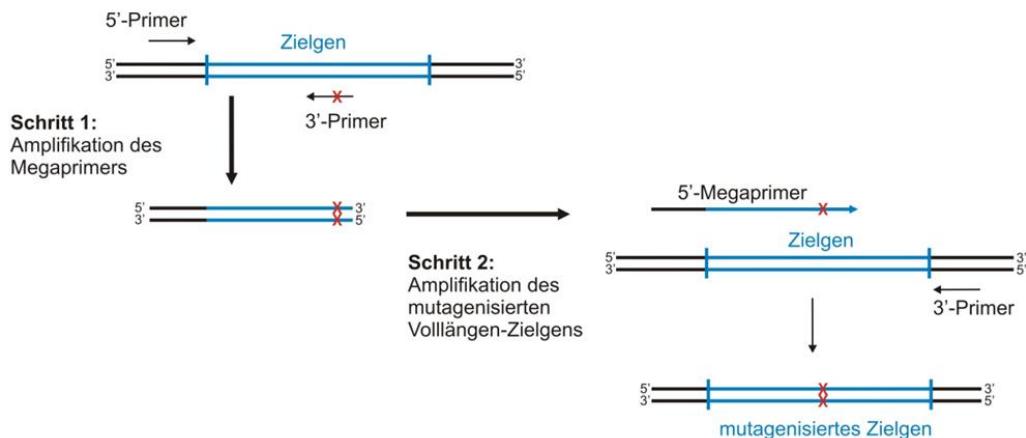


Abbildung 4: Prinzip der Megaprimer-PCR (modifiziert nach Seitz 2009).
Gezielte Mutationen werden im 1.Schritt durch zum Zielgen komplementäre fehlerhafte Primer eingeführt.

Die erste und zweite PCR wurden mittels Standardprotokoll durchgeführt (siehe 2.3.1), wobei jedoch bei der Amplifikation des Volllängen-Zielgens die Dauer der Primer-Anlagerung auf 1 min erhöht wurde. Die optimale Anlagerungs-Temperatur des Megaprimer wurde wenn nötig experimentell ermittelt. Enthielt eine Zielsequenz mehrere Austausche, dann wurden diese entweder auf einem Mutationsprimer kombiniert oder durch mehrere Runden Megaprimer-PCR eingeführt, wobei immer mit dem kürzesten Megaprimer begonnen wurde.

Zur Klonierung von TrpGD-Mutanten wurde anstelle eines genflankierenden 3'-Primers der auf den pET-Vektoren bindende T7-Terminator Primer verwendet. Damit konnte die *Xba*I-Schnittstelle (Ivens, 1996) zur Klonierung genutzt werden.

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Im Agarosegel werden DNA-Fragmente ihrer Länge entsprechend aufgetrennt. Durch Zugabe des DNA-interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoffs Ethidiumbromid werden die Banden im Gel unter UV-Licht sichtbar (Sharp *et al.* 1973). Zur Herstellung eines Agarosegels wurde 1 % (w/v) Agarose in 0,5 % TBE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf 50 – 60 °C wurden 0,2 µl der Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml) pro ml Agarose hinzugegeben, die Lösung in eine Gelkammer gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt, der nach dem Erstarren wieder entfernt wurde. Das fertige Gel wurde mit 0,5 % TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden nun bei Bedarf mit 10 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 190 V für etwa 20 min durchgeführt. Die negativ geladene DNA wandert durch die angelegte

Spannung zur Anode, wobei verschieden lange DNA-Fragmente durch das Agarosenetz unterschiedlich stark gebremst werden.

Mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm wurden die DNA-Fragmente detektiert und mit Hilfe des Imager Multi-Doc-It Digital Imaging System die Gele dokumentiert. Als Größenstandard wurden 5 µl des GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder von Fermentas verwendet.

2.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm wurden gewünschte Fragmentbanden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe des Nucleospin® II-Kits von Macherey-Nagel laut Anleitung des Herstellers. Die isolierte DNA wurde in 30 µl Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.4 Enzymatische Manipulation von dsDNA

2.4.1 Spaltung von dsDNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die spezifische Spaltung von dsDNA wurden Restriktionsendonukleasen vom TypII verwendet (Sambrook *et al.* 1989; Wilson & Murray 1991), die eine palindromische Erkennungssequenz besitzen. Diese erzeugen einzelsträngige Überhänge, sogenannte *sticky-ends* mit 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden. Für analytische Spaltungen wurde etwa 1 µg DNA mit 20 U von jedem Restriktionsenzym für 2 bis 3h in einem Volumen von ca. 20 µl in entsprechendem Puffer bei 37 °C inkubiert. Für präparative Spaltungen zur späteren Ligation von Fragmenten wurde die gesamte Menge an erhaltenem PCR-Produkt bzw. 2 µg Vektor-DNA mit 10 – 30 U von jedem Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von je 50 µl verdaut. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 2 h bzw. üN. Die Reaktionen wurden in dem jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Der Anteil der Restriktionsenzyme im Reaktionsansatz sollte nicht mehr als 10 % des Volumens betragen, da die glycerinhaltige Lösung, in der die Enzyme gelagert werden, deren Aktivität beeinflussen kann. Die Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und für die Ligation aus dem Gel aufgereinigt.

2.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wurden geschnittener Vektor und DNA-Fragment in einem abgeschätzten molaren Verhältnis von 1 zu 3 gemischt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 U T4-DNA-Ligase im entsprechenden Puffer üN bei 16 °C im Thermocycler oder 1 h bei RT. Danach wurden kompetente *E. coli* Zellen mit dem Ansatz chemisch transformiert.

2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation)

Die analytische Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte entweder mit Hilfe des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas. Dazu wurden aus einer frischen üN Kultur 5 ml Zellsuspension abzentrifugiert (EPPENDORF 5810R, 4000 rpm, 5 min, RT). Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte anschließend nach den Angaben des Herstellers. Zur Elution wurden stets 50 µl steriles Wasser verwendet. Die gewonnene DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.4.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz entspricht eine OD₂₆₀ von 1 (mit 0,1% A₂₆₀ = 20 cm²mg⁻¹ und einer Küvetten-Schichtdicke von 1 cm) einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml dsDNA (bzw. 35 µg/ml RNA oder 33 µg/ml ssDNA). Dadurch kann die DNA-Konzentration wie folgt berechnet werden:

$$c_{dsDNA} = \frac{A_{260} \cdot 50 \cdot f}{1000}$$

Formel 4: Bestimmung der DNA-Konzentration.

c_{dsDNA}: Konzentration an doppelsträngiger DNA [µg/µl]

A₂₆₀: Absorption bei 260 nm

f: Verdünnungsfaktor

Eine saubere DNA-Lösung sollte oberhalb von 300 nm keine messbare Absorption zeigen und einen OD₂₆₀/OD₂₈₀ Quotienten von mindestens 1,8 aufweisen.

2.4.5 DNA-Sequenzierung

Alle in dieser Arbeit klonierten Gene oder Teilgene wurden vollständig mit vektorspezifischen bzw. genflankierenden Primern sequenziert. Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen erfolgte durch die Firma Geneart (Regensburg). Es wurde das

Kettenabbruch-Verfahren von Sanger (Sanger *et al.* 1977) verwendet. Bei diesem Verfahren werden verschiedene fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynukleotide zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden in der *Thermal Cycle Sequencing* Reaktion (Sears *et al.* 1992; Slatko 1994) eingesetzt. Dadurch entstehen 3'-terminal fluoreszenzmarkierte Einzelstrang-Abbruchfragmente, die gelektrophoretisch aufgetrennt werden können. Die Nukleotidsequenz kann anschließend einfach abgelesen werden. Die abgegebenen Proben mit einem Gesamtvolumen von 8 µl enthielten zwischen 150 und 300 ng DNA und jeweils 10 pmol eines Sequenzierungsprimers, wodurch die DNA linear amplifiziert wurde. Die im ABI Format erhaltenen Sequenzen wurden mit den Programm Sequencher (Gene Codes) analysiert.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Expression und Anreicherung von Proteinen im analytischen Maßstab

Um zu überprüfen, ob sich die klonierten Gene überexprimieren lassen und in welcher Fraktion des Zellextraktes sich das rekombinante Protein anschließend befindet, wurde eine Expression im analytischen Maßstab durchgeführt („Probeexpression“).

Nach Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen mit den entsprechenden Vektoren wurden 5 ml LB-Selektivmedium mit 50 µl des Transformationsansatzes angeimpft und bei 37 °C mit 220 rpm üN geschüttelt. Anschließend wurden 10 ml LB-Selektivmedium mit dieser Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft, in der Regel bei 37 °C mit 220 rpm geschüttelt und bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 1,0 mit 0,5 mM IPTG üN induziert.

Standardmäßig wurden danach von jeder Kultur 2 ml Zellsuspension entnommen, welche zur Präparation der unlöslichen (Pellet P) und löslichen Zellfraktion (*crude extract* C), sowie einer Hitzeschrittfraktion (Hitzeschritt H) verwendet wurden (Abbildung 5).

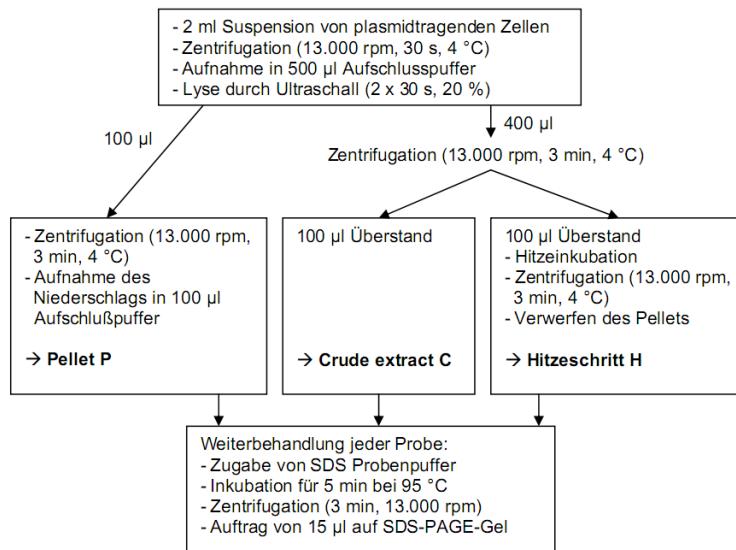


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Vorgehens bei der analytischen Genexpression

Die mit SDS-Probenpuffer versetzten Proteinfraktionen wurden je für 5 min bei 95 °C inkubiert und davon je 10 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.5.2 Periplasmaaufschluss

Der Periplasmaaufschluss erfolgte durch einen osmotischen Schock (Ausubel *et al.* 1989). Dazu wurde das Pellet einer 50 ml üN Expressionskultur in 30 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,8, 20 % Sukrose, 1 mM EDTA resuspendiert und für 10 min bei RT langsam gerührt. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor, 7500 rpm, 30 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Zur Freisetzung des Periplasmaintehls wurde das Pellet in 5 ml eiskaltem 5 mM MgSO₄ resuspendiert und langsam für 10 min auf Eis gerührt. Die verbliebenen Zellen wurden durch Zentrifugation (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor, 13000 rpm, 30 min, 4 °C) pelletiert und die Periplasmafraktion im Überstand einem Aktivitätstest unterzogen.

2.5.3 Expression und Anreicherung von Proteinen im präparativen Maßstab

Zur Aufreinigung der Proteine wurden 2-4 l LB- oder Minimal-Medium (je 1 l in einem 3 l Glaskolben; wegen der Gefahr des Glasbruchs bei der Expression mit Se-Met in 500 ml Plastikkolben) mit den entsprechenden Antibiotika mit einer frischen Vorkultur einer Einzelkolonie auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 150 rpm im Schüttler inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Inkubationstemperatur für 30 min

auf 30 °C (27 °C bei Minimalmedium mit SeMet) herabgesetzt und mit 0,5 mM IPTG üN induziert.

Die Zellen wurden nach üN Inkubation geerntet (Sorvall RC5B plus, GS3 Rotor, 4000 rpm, 30 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde mit KP-Puffer (50 mM, pH 7,5) gewaschen, ggf. das Nassgewicht bestimmt und falls nötig bei -20 °C gelagert. Zum Zellaufschluss wurden die vereinigten Zellpellets in 25 ml Aufschlusspuffer (50 mM KP pH 7,5 oder 50 mM Tris/HCl pH 7,8) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf Eis sonifiziert (Amplitude: 70 %, 3min mit 2 s Ultraschall/2 s Pause, Makrospitze). Nach Zentrifugation (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor, 15000 rpm, 30 min, 4 °C) wurde der lösliche Überstand zur weiteren Entfernung von Schwebeteilchen nach Bedarf mit Hilfe von Spritzenfiltern (Porengröße: 0,45 µm) filtriert, um anschließend weiterverarbeitet werden zu können.

2.5.4 Proteinreinigung aus der unlöslichen Zellfraktion

$^{1\text{H}}{^{13\text{C}}}$ doppelmarkiertes HisF wurde zur Erhöhung der Ausbeute aus der unlöslichen Fraktion (Pellet P) des Zellextraktes (*inclusion bodies*) gereinigt. Nach Solubilisierung in chaotroper Lösung wurde das Protein über anschließende Rückfaltung schrittweise in eine lösliche Form überführt (Kleemann, 1995). Dazu wurde das Pellet nach zweimaligem Waschen mit 10 mM KP pH 7,5 in 20 ml 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl), 10 mM KP pH 7,5 aufgenommen und 30 min bei RT unter ständigem Rühren inkubiert. Anschließend wurden 20 ml 1 M GdmCl, 10 mM KP, pH 7,5 zugegeben und die Lösung weitere 30 min bei RT unter ständigem Rühren inkubiert. Nach Abzentrifugation (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor, 13000 rpm, 15 min, 4 °C) ungelöster Bestandteile wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 70 ml 2 M GdmCl, 10 mM KP pH 7,5 gemischt. Daraufhin wurde die Lösung dreimal gegen 5 l 50 mM KP pH 7,5 dialysiert, wodurch das GdmCl praktisch vollständig entfernt und damit die Rückfaltung des Proteins abgeschlossen wurde. Zur Abtrennung von erneut ausgefallenem Protein wurde nach der Dialyse der Inhalt des Dialyseschlauches abzentrifugiert (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor, 19000 rpm, 30 min, 4 °C). Die weitere Reinigung des bereits stark angereicherten $^{1\text{H}}{^{13\text{C}}}$ -HisF erfolgte über einen Anionenaustausch-Chromatographie (siehe 2.5.5.3).

2.5.5 Proteinreinigung aus der löslichen Zellfraktion

2.5.5.1 Hitzeschritt

Für alle gereinigten Proteine wurde ein Hitzeschritt wie angegeben durchgeführt:

- HisF und HisF-Mutanten: 15 min bei 75 °C
- HisH und HisH-Mutanten: 20 min bei 70 °C
- TrpG und TrpG-Einzelmutanten: 15 min bei 70 °C
- TrpG-Sequenzabschnitts Mutanten: 20 min bei 60° C

Durch die anschließende Zentrifugation (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor, 13000 rpm, 30 min, 4 °C) wurden die ausgefallenen Wirtsproteine abgetrennt und das rekombinante Protein aus dem Überstand weiter angereichert.

2.5.5.2 Metallchelat-Affinitätschromatographie

Die Metallchelat-Affinitätschromatografie wurde mit der Säule HisTrap™ FF crude (GE HEALTHCARE; CV: 5 ml; max. Druck: 0,3 MPa) durchgeführt. Diese Säule besteht aus Sepharose 6 (FastFlow) Medium und dem daran gebundenem Chelator Iminodiaktische Säure (IDA). IDA besitzt sechs Koordinationsstellen, wobei an drei Koordinationsstellen Metallionen (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} oder Fe^{3+}) immobilisiert werden können, während die anderen drei zur Komplexierung von Stickstoff- und Schwefelatomen von Histidinen, Tryptophanen oder Cysteinen zur Verfügung stehen. Rekombinante Proteine, die gentechnisch mit einem N- oder C-terminalem His₆-Tag fusioniert wurden, binden nach Beladung der Säule mit Metallionen (in dieser Arbeit wurde stets Ni^{2+} verwendet) sehr spezifisch an die Säule, da die Metallionen zusätzliche Koordinationsstellen für die Histidine bereitstellen. Die Elution von gebundenem Protein erfolgt durch einen Imidazolgradienten, wobei die Imidazolmoleküle mit den chemisch äquivalenten Histidinseitenketten des Proteins um die Bindestellen an der Säule konkurrieren. Die Beladung der Säule mit Nickelionen erfolgte nach Angaben des Herstellers und wurde bei Bedarf durchgeführt.

Die Reinigung wurde an der Chromatografie-Anlage ÄKTA™ Purifier 10 (GE HEALTHCARE) nach folgender Methode durchgeführt:

Flussrate: 4 ml/min

Equilibrierung: 2 CV Laupuffer^a

Beladen: 20 – 30 ml Proteinlösung (Aufschlusspuffer mit 15 mM Imidazol)

Waschen: 5 CV Laupuffer^a

Eluieren: 5 CV Gradient von 15–500 mM Imidazol mit Elutionspuffer^b; es wurden Fraktionen à 2 ml gesammelt.

Reinigung der Säule: 5 CV Elutionspuffer^b

Equilibrierung: 5 CV Laufpuffer^a

Spülen und Lagerung der Säule: 5 CV H₂O; 3 CV 20 % Ethanol

^a: 50 mM KP, pH 7,5 oder 50 mM Tris/HCl pH 7,8, 500 mM NaCl, 15 mM Imidazol.

^b: 50 mM KP, pH 7,5 oder 50 mM Tris/HCl pH 7,8, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol.

Die Elution der Proteine wurde über die Absorption bei 260 und 280 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE. Saubere Fraktionen wurden vereinigt und in der Regel gegen 5 l 50 mM KP, pH 7,5 oder 50 mM Tris/HCl pH 7,8 dialysiert.

2.5.5.3 Anionenaustausch-Chromatographie

Alle Proteine ohne His₆-Tag wurden nach dem Hitzeschritt einer Anionenaustausch-Chromatographie unterzogen. Die Anionenaustausch-Chromatografie beruht auf der kompetitiven Wechselwirkung von geladenen Molekülen, wobei Proteine mit Salzionen um die Positionen auf einer Ionenaustauschmatrix konkurrieren. Zuerst bindet das geladene Molekül an die fixierten Ladungen des Trägermaterials. Im Anschluss daran erfolgt die Verdrängung und Elution des Proteins entweder durch eine steigende Salzkonzentration oder durch die Änderung des pH-Werts. Die Ladung eines Proteins wird hauptsächlich von den Aminosäuren mit geladenen Seitenketten bestimmt. So sind im sauren und neutralen pH-Bereich die Aminogruppen von Lys, Arg und His protoniert und das Protein zeigt ein kationisches Verhalten, während im neutralen und basischen Bereich die Carboxygruppen der Seitenketten von Asp und Glu negative Ladungen tragen und somit das Protein als Anion vorliegt. Die Gesamtladung eines Proteins ist deswegen von der Aminosäurezusammensetzung und vom pH-Wert der umgebenden Lösung abhängig. Bei Trägermaterialien, die selbst positive Ladungen aufweisen und Anionen zu binden vermögen, spricht man von Anionenaustauschern, während man bei negativ geladenen Trägermaterialien, welche Kationen binden können, von Kationenaustauschern spricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Anionenaustauschersäule MonoQ 16/10 (GE HEALTHCARE; CV: 20 ml) gearbeitet.

Die Reinigung wurde an der Chromatografie-Anlage ÄKTA™ Purifier 10 (GE HEALTHCARE) nach folgender Methode durchgeführt:

Flussrate: 5 ml/min

Equilibrierung: 4 CV Laufpuffer^a

Beladen:	ca. 20-30 ml Proteinlösung in 50 mM KP pH 7,5
Waschen:	10 CV Laupuffer ^a
Eluieren:	15 CV Gradient von 0–1,5 M NaCl mit Elutionspuffer ^b ; es wurden Fraktionen à 4 ml gesammelt.
Reinigung der Säule:	3 CV Elutionspuffer ^b
Equilibrierung:	3 CV Laupuffer ^a
Spülen und Lagerung der Säule:	5 CV H ₂ O; 3 CV 20 % Ethanol

^a: 50 mM KP pH 7,5 oder 50 mM Tris/HCl pH 7,8

^b: 50 mM KP pH 7,5, 3 M NaCl oder oder 50 mM Tris/HCl pH 7,8, 3 M NaCl

Die Elution der Proteine wurde über die Messung der Absorption bei 260 und 280 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE. Saubere Fraktionen wurden vereinigt und gegen 5 1 50 mM KP pH 7,5 oder oder 50 mM Tris/HCl pH 7,8 dialysiert.

2.5.6 Präparative Gelfiltration

Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Ausschluss-Chromatographie. Die auf die Säule aufgetragenen Moleküle wandern bei konstanter Flussrate durch das poröse Säulenmaterial. Kleine Moleküle wandern aufgrund des für sie größeren Diffusionsraumes langsamer als große Moleküle. Aufgetragene Proteine werden somit der Größe nach aufgetrennt. Die präparative Gelfiltration wurde bei 4 °C an einer FPLC LCC-501 - Anlage (GE HEALTHCARE) durchgeführt. Die verwendete Säulen Superdex 75 pg HiLoad 26/60 bzw. Superdex 200 pg HiLoad 26/60 (GE HEALTHCARE; Säulenvolumen 320 ml) bestehen aus quervernetzter Agarose und Dextran mit einer Partikelgröße von 24 - 44 µM. Die aufgetragene Probe betrug nicht mehr als 10 ml und wurde gegebenenfalls einkonzentriert. Die Elution der Proteinlösung erfolgte durch Spülen der Säule mit 1,5 CV Laupuffer und wurde über die Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Die präparative Gelfiltration wurde als finaler Reinigungsschritt für Proteine genutzt, die noch DNA-Kontaminationen enthielten oder im Fall von HisH zur Abtrennung der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT). Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 4 ml gesammelt. Die Analyse der Fraktionen erfolgte über SDS-PAGE.

2.5.7 Ammoniumsulfatfällung

Mit Nukleinsäuren verunreinigte Proteine wurden einer Ammoniumsulfatfällung (ASF) unterzogen. Bei der Ammoniumsulfatfällung werden Proteine ausgesalzen. Das Fällungsreagenz interagiert dabei mit dem Protein und verändert so die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel (Lottspeich & Zorbas, 1998). HisH und HisF wurden durch 80, TrpGD durch 60 und TrpG durch 50 % Ammoniumsulfat-Sättigung ausgefällt wobei Nukleinsäuren im Überstand zurück blieben (Häger 2005). Die entsprechende Menge an Ammoniumsulfat wurde spatel spitzenweise auf Eis und unter langsamem Rühren zugegeben. Alternativ wurde eine 4 M NH_4SO_4 -Lösung als 100 %ige Lösung definiert und das entsprechende Volumen in die Proteinlösung getropft. Die entstandene Suspension wurde 20 min bei 4 °C abzentrifugiert (Sorvall RC5B plus, SS34 Rotor, 13000 rpm) und das Pellet mit dem Protein in dem gewünschten Puffervolumen resuspendiert. Der Erfolg der ASF wurde durch SDS-PAGE und Absorptionsspektroskopie überprüft. Das Ammoniumsulfat wurde mittels Dialyse entfernt.

2.5.8 Dialyse von Protein-Lösungen

Falls bei einer Proteinlösung der Puffer gewechselt oder Salze entfernt werden mussten, wurde gegen einen ausreichenden Volumenüberschuss des Puffers bei 4 °C unter ständigem Rühren dialysiert. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch (Visking) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 12-14 kDa verwendet, welcher das Protein zurückhält, während niedermolekulare Substanzen die Membran passieren können.

2.5.9 Einkonzentrieren von Protein-Lösungen

Die Proteinlösungen wurden mit Hilfe der Amicon® Zentrifugenröhren (Amicon Ultra 4 bzw. 15; molekulare Ausschlussgrenze: 10 kDa oder 30 kDa) über eine semipermeable Membran nach Herstellerangaben (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 4000 rpm, 4 °C) einkonzentriert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach dem Volumen des einzukonzentrierenden Proteins.

2.5.10 Lagerung von gereinigten Proteinen

Die gereinigten und konzentrierten Proteine wurden in flüssigen Stickstoff getropft und die gefrorenen Kugelchen bei -80 °C gelagert.

2.5.11 Synthese von ProFAR

Das Substrat von HisF, PRFAR (N'-[5'-phosphoribulosylformimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonukleotid), ist sehr labil und kann daher nicht gelagert werden. Deshalb wurde PRFAR stets mittels HisA *in situ* aus ProFAR (N'-[(5'-phosphoribosyl)formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid) synthetisiert (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Darüber hinaus wurde ProFAR als Substratanalogon verwendet. Auch ProFAR ist nur bedingt stabil (Henn-Sax *et al.* 2002), lässt sich jedoch synthetisieren und für eine begrenzte Zeit bei -80°C lagern. ProFAR wurde in Anlehnung an Davisson *et al.* (1994) enzymatisch aus ATP und PRPP, den Ausgangsstoffen der Histidin-Biosynthese, mit den Proteinen ATP-Phosphoribosyl-Transferase (HisG) und Phosphoribosyl-ATP-Pyrophosphohydrolase: Phosphoribosyl-AMP-Cyclohydrolase (HisIE) aus *E. coli* hergestellt. Der abgedunkelte Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 ml enthielt 50mM KP, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,7, 2 mM PRPP, 0,66 mM ATP und 16 mM MgCl₂. Unter ständigem Rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von etwa 2 mg HisG-IE gestartet. Die Synthese konnte spektroskopisch verfolgt werden, da die Absorption von ATP bei 290 nm deutlich niedriger ist als die von ProFAR. Sobald keine Veränderung des Spektrums mehr beobachtet werden konnte, wurde das ProFAR aus dem Reaktionsansatz über eine Anionenaustausch-Chromatographie mit der Poros HQ-20-Säule (CV von 7,9 ml) gereinigt. Als Laufpuffer diente 50mM Tris-Acetat pH 8,0, die Elution erfolgte über einen Acetat-Gradienten (0-1M, 15CV). Die Konzentration von ProFAR wurde über die Absorption bei 300 nm bestimmt ($\epsilon_{300} = 6069 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Klem & Davisson, 1993) und die Reinheit über den Quotienten A₂₉₀/A₂₆₀ abgeschätzt, der zwischen 1,1 und 1,2 liegen sollte (Smith & Ames, 1964). Fraktionen mit sauberem und hochkozentriertem (bis 780 µM) ProFAR wurden vereinigt und in Aliquots bei -80 °C gelagert. Die Ausbeute der ProFAR-Synthese lag bei ca. 60 %.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsspektroskopie

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sowie Disulfidbrücken (Cystine) absorbieren UV-Licht in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 300 nm. Aus der Aminosäuresequenz kann nach Pace *et al.* (1995) der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{280} berechnet werden (Formel 5):

$$\varepsilon_{280} = \sum Trp \cdot 5500 + \sum Tyr \cdot 1490 + \sum Cystine \cdot 125$$

Formel 5: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{280} \cdot [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$ nach Pace *et al* (1995)

Bei bekannter molarer Masse lässt sich daraus der spezifische Extinktionskoeffizient ($^{0,1\%}A_{280}$) berechnen (Formel 6):

$$^{0,1\%}A_{280} = \frac{\varepsilon_{280}}{MW}$$

Formel 6: Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0,1\%}A_{280} \cdot [\text{cm}^2/\text{mg}]$
 MW molare Masse

Damit kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes Gesetzes die Proteinkonzentration durch Extinktionsmessung bei 280 nm bestimmt werden (Formel 7):

$$A_{280} = ^{0,1\%}A_{280} \cdot c \cdot d$$

$$\rightarrow c = A_{280} / (^{0,1\%}A_{280} \cdot d)$$

Formel 7: Berechnung der Proteinkonzentration mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0,1\%}A_{280}$.

A_{280} gemessene Absorption bei 280 nm

c Konzentration [mg/ml]

d Schichtdicke der Küvette [cm]

$^{0,1\%}A_{280}$ spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [cm^2/mg]

Es wurden Spektren von 240–340 nm aufgenommen, wobei sich das Absorptionsmaximum des Proteins bei 278 nm befinden sollte. Der Quotient A_{280}/A_{250} sollte mindestens 1,8 betragen und es sollte keine Absorption oberhalb von 300 nm auftreten, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch auf Aggregatbildung zurückgehende Lichtstreuung ausschließen zu können. Bei deutlicher Absorption oberhalb von 300 nm wurde als erste Näherung eine lineare Zunahme der Lichtstreuung mit abnehmender Wellenlänge angenommen und die ermittelte Proteinkonzentration entsprechend korrigiert.

2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)

Der Bradfordtest ist ein Assay zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts von wässrigen Lösungen. Er beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren *Coomassie Brilliant Blue G250*-Lösung bei Bindung des Farbstoffes an Proteine von 465 auf 595 nm verschiebt (Bradford, 1976). Es handelt sich um eine unspezifische Bindung des Farbstoffes vorwiegend an kationische, nichtpolare und hydrophobe Seitenketten. Die Intensitätszunahme der Farbreaktion ist über einen Bereich von 0,2 - 1,4 mg Protein pro ml Lösung annähernd

linear. Es wurde der Protein-Assay Kit von BIO-RAD verwendet. Dabei wurden 200 µl des Coomassie-Reagenz mit 800 µl der Proteinlösung vermischt und nach ca. 5 min die Absorption der Lösung bei 595 nm gemessen. Als Referenz wurde eine Kalibrierungsgerade mit HisF WT erstellt. Es ist zu beachten, dass der Assay durch SDS (> 0,1 %) und starke Basen beeinflusst werden kann. Der Bradford Assay wurde bei den Trp-freien HisF Mutanten HisF-W156F und HisF-D98A-W156F angewendet, um die über Absorptionsspektroskopie bestimmte Konzentration zu verifizieren.

2.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

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

Tabelle 1: Zusammensetzung 12,5 %iger SDS-PAGE Gele.

Die Mengenangaben gelten für 13 Gele.

	<i>Trenngel (12,5 %)</i>	<i>Sammelgel (6 %)</i>
Trenn-/Sammelgel-Puffer	19,5 ml	7,38 ml
Acrylamid-SL (30 %)	26,2 ml	5,9 ml
H₂O	31,58 ml	15,95 ml
TEMED	89 µl	29 µl
APS (10%)	195 µl	89 µl

Die Proben wurden mit 2 x oder 5 x SDS- Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese wurde bei 50 mA und 300 V durchgeführt. Anschließend wurden die Gele mit SDS-PAGE-Färbelösung gefärbt, wobei die Nachweisgrenze des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 200–500 ng Protein/mm² beträgt. Die Gele wurden mindestens 5 min in der Färbelösung geschwenkt und im Anschluss durch wiederholtes Aufkochen in Wasser die Hintergrundfärbung entfernt.

2.6.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE) wird dem Gel und dem Probenpuffer kein Detergens zugesetzt, so dass die native Konformation und der Assoziationszustand der Proteine erhalten bleiben. Die Trennung der Proteine erfolgt anders als bei der SDS-PAGE, nicht ausschließlich nach der Größe, sondern ist daneben abhängig von der Nettoladung (isoelektrischer Punkt, pI). Im Rahmen dieser Arbeit wurde native PAGE zur Analyse der Bildung eines Komplexes zwischen HisF und HisH herangezogen. Dazu wurden 8,5%ige native Polyacrylamidgele mit Trenn- und Sammelgelen eingesetzt. Je 10 μ l der Proteinlösungen wurden mit 3 μ l nativem Probenpuffer versetzt und mit einer Hamiltonspritze in die Probentaschen des Gels aufgetragen. Um die Proteine in nativem Zustand zu halten, wurde die Elektrophorese bei 4°C durchgeführt. Bei einer Spannung von 150V und 40mA betrug die Dauer der Elektrophorese etwa 3-4h. Das Färben der Gele erfolgte analog zur SDS-PAGE.

Tabelle 2: Zusammensetzung 8,5 %iger Native-PAGE Gele.
Die Mengenangaben gelten für 4 Gele.

	<i>Trenngel (8,5 %)</i>	<i>Sammelgel (5 %)</i>
Nativer Trenngel-Puffer	9,25 ml	-
Nativer Sammelgel-Puffer	-	12,5 ml
Acrylamid-SL (30 %)	15 m	8,3 ml
Saccharose (60 %)	5,75 mll	-
H₂O	20 ml	29,2 ml
TEMED	22 μ l	50 μ l
APS (40%)	55,3 μ l	65,2 μ l

2.6.5 Probenvorbereitung zur N-terminalen Sequenzierung

Das zu analysierende Protein wurde über SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurde ein Glycin freier Laupuffer verwendet. Anschließend wurde das Protein im Elektroblotverfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Western Blotting Membran (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH) übertragen (Towbin *et al.*, 1979).

Zur Anfärbung des geblotteten Proteins wurde die Membran für 2 min in die Färbelösung für die N-terminale Sequenzierung gelegt. Danach wurde die Membran in die Entfärbelösung überführt, bis der Hintergrund farblos war. Die Proteine waren noch als Banden sichtbar. Die Membran wurde an der Luft getrocknet und die ausgeschnittene Bande in der Arbeitsgruppe von Prof. Rainer Deutzmann (Universität Regensburg) sequenziert. Die zyklische

Sequenzierung erfolgte vollautomatisch an einem Sequenzer von Applied Biosystems nach der Methode von Edmann (Edman & Begg 1967).

2.6.6 Analytische Gelfiltration

Mit Hilfe der analytischen Gelfiltration lässt sich die apparente molare Masse und somit auch der Oligomerisierungsgrad eines Proteins abschätzen. Das Trennprinzip entspricht dem der präparativen Gelfiltration (siehe 2.5.6), wobei ein linearer Zusammenhang zwischen der Elutionsdauer und dem Logarithmus der molaren Masse besteht. Es wurde die Säule Superdex 75 HR 10/30 (GE HEALTHCARE) mit einem Volumen von 24 ml an der Chromatographie-Anlage ÄKTA Basic 10 better (GE HEALTHCARE) verwendet. Auf die mit Laupuffer (50 mM KP pH 7,5, 300 mM NaCl) äquilibrierte Säule wurden 50 – 500 µl Proteinlösung über einen Superloop aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0,5 ml/min und wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm und 260 nm verfolgt. Mit Hilfe einer Kalibrierungsgerade, die mit Proteinen bekannter Größe erstellt wurde, konnte die apparente molare Masse (MW_{app}) der analysierten Proteine ermittelt werden.

2.6.7 Fluoreszenz-Spektroskopie und Titration

Absorbiert ein Molekül Licht bestimmter Wellenlänge, so wird es von einem energetischen Grundzustand in einen angeregten Zustand transferiert. Die Rückkehr in den Grundzustand kann unter anderem durch die Emission eines Photons geschehen. Dieser Vorgang ist als Fluoreszenz messbar. Die Energie eines emittierten Photons ist geringer als die eines absorbierten, was einer Verschiebung zu größerer Wellenlänge, also einer Rotverschiebung, entspricht. Die Fluoreszenz von Proteinen beruht im Wesentlichen auf den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, wobei das Tryptophan eine größere Rolle spielt. Aromatische Seitenketten absorbieren maximal bei einer Wellenlänge von etwa 280 nm. Nach Anregung bei 295 nm ist die Fluoreszenzemission ausschließlich auf Tryptophane zurückzuführen. Die Fluoreszenz von Tryptophan zeigt eine Abhängigkeit von der Polarität der Umgebung. Eine stark polare Umgebung bewirkt eine Rotverschiebung der Emission zu einem Maximum bei ca. 350 nm gegenüber einem Maximum bei 325 nm in unpolarer Umgebung. Über die Messung von Fluoreszenzspektren kann also eine Aussage über den Grad der Lösungsmittlexposition eines Tryptophans in einem Protein gemacht werden. Da die Bindung von HisF an His zur Abschirmung von W123 in HisH führt, kann darüber die Komplexbildung verfolgt werden (Abbildung 6).

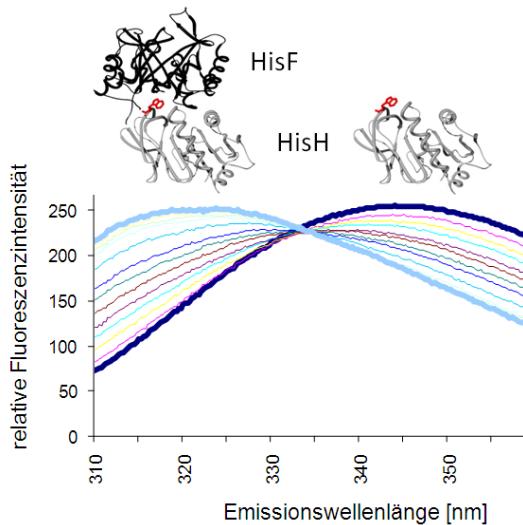


Abbildung 6: Fluoreszenztitration zur Bestimmung der Dissoziationskonstante verschiedener HisH:HisF Komplexe.

Es wurden 10 μM HisH in 50 mM KP pH 7,5 vorgelegt (dunkelblaues Spektrum) und in 1 μM Schritten HisF-W156F zutitriert. Gezeigt ist die durch Abschirmung von HisH-Trp123 (rot) bedingte Veränderung des Emissionsspektrums. Nach Zugabe von 10 μM HisF-W156F, d.h. in Anwesenheit äquimolarer Mengen beider Proteine (hellblaues Spektrum) die minimale Fluoreszenz bei 360 nm erreicht, was der Ausbildung eines 1:1 Komplexes entspricht. Der isoemissive Punkt der Titration liegt bei 333 nm.

Die Messungen wurden am Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse (Varian, Darmstadt) in einer vierseitig geschliffenen Quarzküvette durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde bei 295 nm angeregt und das emittierte Signal in einem Bereich von 310 bis 360 nm aufgenommen. Die Spaltbreite betrug bei der Excitation und der Emission jeweils 5 nm. Nach Vorlage von HisH wurden ansteigende Mengen an Trp-freiem HisF zugegeben und aus der Abnahme des Fluoreszenzsignals bei 360 nm Titrationskurven erstellt. An diese wurde eine quadratische Gleichung (Formel 8) angepasst. Dadurch wurde die Dissoziationskonstante K_D der Interaktion berechnet (Reinstein *et al.* 1990).

$$F = F_0 + \frac{1}{2} (F_{\max} - F_0) \cdot \left(1 + \frac{(x + K)}{p} - \sqrt{\left(1 + \frac{(x + K)}{p} \right)^2 - \frac{4x}{p}} \right)$$

Formel 8: Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenz F von der zutitrierten Ligandenmenge x , der Dissoziationskonstante K und der Konzentration des vorgelegten Proteins p . F_0 , F_{\max} : Fluoreszenz in Abwesenheit des zutitrierten Interaktionspartners bzw. in Anwesenheit sättigender Konzentrationen.

2.6.8 Kompetitive Fluoreszenztitration

Mit der kompetitiven Fluoreszenztitration wurde die Affinität Trp-freier HisH-Mutanten ($\text{HisH}_{\Delta\text{Trp}}$) für HisF-W156F bestimmt. Dazu wurde das jeweilige $\text{HisH}_{\Delta\text{Trp}}$ -Protein als kompetitiver Inhibitor zu HisH eingesetzt. Da HisH und HisF-W156F in äquimolaren Mengen vorliegen, $\text{HisH}_{\Delta\text{Trp}}$ aber mit HisH um HisF-W156F konkurriert, steht für die Komplexierung von HisH weniger HisF-W156F zur Verfügung und die Fluoreszenzänderung wird um den

Anteil von gebildetem HisH_{ΔTrp}:HisF-W156F Komplex kleiner. Die Auftragung steigender Inhibitorkonzentrationen gegen die jeweils gemessene Fluoreszenzsignaländerung liefert die Konzentration an Inhibitor, bei der noch die Hälfte der eingesetzten HisH-Konzentration von HisF-W156F gebunden wird. Die so gewonnene mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) kann über Formel 9 mit den K_D-Werten der beiden Komplexe in Beziehung gesetzt werden (Goodrich & Kugel 2006):

$$IC_{50} = K_{D(HisH_{\Delta Trp}:HisF)} \left(1 + \frac{[HisH]}{K_{D(HisH:HisF)}} \right)$$

Formel 9: Zusammenhang zwischen IC₅₀ und K_D

Da im Fall von HisH:HisF die eingesetzte Konzentration von HisH (1 μM) weit über dem K_{D(HisH:HisF)} (5 nM) liegt, vereinfacht sich Formel 9 zu:

$$IC_{50} = \frac{K_{D(HisH_{\Delta Trp}:HisF)} [HisH]}{K_{D(HisH:HisF)}}$$

und damit:

$$K_{D(HisH_{\Delta Trp}:HisF)} = \frac{IC_{50} \cdot K_{D(HisH:HisF)}}{[HisH]}$$

Formel 10: Vereinfachter Zusammenhang zwischen IC₅₀ und K_D

2.6.9 Isothermische Titrationskalorimetrie

Mit Hilfe der isothermischen Titrationskalorimetrie (ITC) lassen sich durch Messen der Wärmetonung (Pierce *et al.* 1999) Informationen über Protein-Protein Interaktionen gewinnen. Dabei wird die durch eine Komplexbildung verursachte Wärmeänderung durch ein Kalorimeter gemessen. Das Instrument kompensiert automatisch die Temperaturänderungen während der Titration im Vergleich zu einer Referenzzelle. Diese Kompensationsenergie wird direkt als Energiewert in Titrationskurven aufgezeichnet. Dadurch können die Dissoziationskonstante K_D, die Bindungsenthalpie ΔH und die Stöchiometrie einer Protein-Protein-Interaktion in einem einzelnen Experiment bestimmt werden.

Das Titrationsexperiment in der vorliegenden Arbeit wurde an einem VP-ITC Gerät (MICROCAL, Freiburg) am Institut für organische Chemie der Universität Regensburg durchgeführt. Dazu wurden zunächst sowohl HisF als auch HisH im gleichen Dialysebehälter gegen 50 mM KP pH 7,5 dialysiert und anschließend entgast. Die Titration wurde durchgeführt indem zu 1,8 ml HisH (30 μM) in 58 Schritten insgesamt 300 μl HisF (310 μM)

injiziert wurden. Die Datenanalyse der Titrationskurven wurde mit der ITC-Origin Software (MICROCAL, Freiburg), die dem Gerät beiliegt, ausgeführt, wobei eine 1:1 Komplexstöchiometrie angenommen wurde.

2.6.10 Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe

Mittels analytischer Ultrazentrifugation kann der Sedimentationskoeffizient bestimmt werden, welcher für jedes Protein, abhängig von der molaren Masse, seiner Dichte und seiner Form charakteristisch ist (Howlett *et al.* 2006). Dazu wird die Ultrazentrifuge mit verhältnismäßig hohen Umdrehungszahlen betrieben, wodurch Proteine in den radial ausgerichteten Sektorzellen bis zum Zellenboden wandern. Im Verlauf der Zentrifugation kommt es zur Ausbildung einer Trennlinie zwischen reinem Lösungsmittel ohne Makromoleküle und demjenigen Lösungsmittelanteil, in dem noch sedimentierende Proteine enthalten sind. Diese Grenzlinie wandert mit der Zeit, wobei ihre Wanderungsgeschwindigkeit die Sedimentationsgeschwindigkeit der Makromoleküle widerspiegelt. Die Sedimentation wird in regelmäßigen Zeitabständen über die Messung des Absorptionsverlaufes in der Sektorzelle verfolgt. Der Sedimentationskoeffizient s entspricht dem Quotienten aus der Sedimentationsgeschwindigkeit und der Zentrifugalbeschleunigung:

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

Formel 11: Berechnung des Sedimentationskoeffizienten.

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

r: Abstand des Meßpunktes zum Rotationszentrum [cm]

t: Zeit [s]

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

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

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

Formel 12: Berechnung des appertenen Sedimentationskoeffizienten s_{app} .

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

Die Umrechnung von s_{app} auf Standardbedingungen ($T = 293,15$ K, Lösungsmittel = Wasser) erfolgt nach Formel 13:

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

Formel 13: Umrechnung von s_{app} auf Standardbedingungen ($s_{20,W}$)

T: Temperatur [K]

η : relative Viskosität

\bar{v} : partielle spezifisches Volumen des Proteins [cm³/g]

ρ : Dichte des Lösungsmittels [g/cm³]

Die Werte für die Temperaturabhängigkeiten der Viskosität, des partiellen spezifischen Volumens und der Lösungsmitteldichte lassen sich ebenfalls aus Tabellen entnehmen.

$\frac{\eta_{T,LM}}{\eta_{T,W}}$ wurde als 1,015 und $\frac{1 - \bar{v}_{20,W} \cdot \rho_{20,W}}{1 - \bar{v}_{T,LMW} \cdot \rho_{T,LM}}$ als 1 angenommen. Die Durchführung erfolgte an einer Beckman Spinco Model E in einem An-G Rotor mit einer Geschwindigkeit von 52000 rpm unter Verwendung von 12 mm Doppel-sektorzellen mit Saphir-Fenstern. Für die Bestimmung von T wurde die Temperatur im Gerät vor und nach dem Lauf bestimmt und gemittelt. Die Detektion erfolgte bei 277 nm. Die Proteine wurden zuvor durch Dialyse in einem gemeinsamen Dialysebehälter in den gleichen Puffer (50 mM KP pH 7,5) gebracht, der auch als Referenz diente, und vor dem Sedimentationslauf zentrifugiert (Eppendorf 5415 D, 13000 Upm, 20 min, 4 °C). Die Proteinkonzentration lag bei 0,2 mg/ml.

2.7 *Steady-state* Enzymkinetiken

Zur funktionellen Charakterisierung von HisH:HisF wurden enzymkinetische Messungen unter *steady-state* Bedingungen bei 25 °C durchgeführt und die katalytischen Parameter K_M und k_{cat} bestimmt. Es wurden die HisF-Teilreaktion (ammoniumabhängige Synthase-Reaktion), die Gesamtreaktion (glutaminabhängige Synthase-Reaktion) und die HisH-Teilreaktion (Glutaminase-Reaktion) gemessen. Um sicher zu gehen, dass die charakterisierte Untereinheit vollständig im Komplex vorliegt, wurde jeweils die andere Untereinheit im Überschuss (i.d.R. in der doppelten Konzentration) zugegeben. Angegeben ist jeweils die Konzentration der vermessenen Untereinheit. Die katalytischen Parameter konstitutiv aktiver TrpG-Mutanten wurden ebenfalls über die Glutaminase-Reaktion bestimmt.

Die HisF-Teilreaktion und die Gesamtreaktion wurden bei 25 °C über den Abfall der Absorption bei 300 nm verfolgt und quantifiziert ($\Delta\varepsilon_{300} (\text{PRFAR} - \text{AICAR}) = 5,637 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Klem & Davidson, 1993). Da das Substrat PRFAR sehr labil ist, wurde es *in situ* aus dem stabileren ProFAR mittels HisA hergestellt (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). HisA wurde im Überschuss zugesetzt (0,6 µM) und die Reaktion nach einigen Minuten durch Zugabe des jeweils untersuchten HisH:HisF Komplexes gestartet. Die tatsächlich im

Reaktionsansatz enthaltene Menge PRFAR wurde über den Absorptionsunterschied zwischen Beginn und Ende der Messung bestimmt. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt. Die Messung der Glutaminase-Reaktion erfolgte mit verschiedenen Methoden (siehe 2.7.3).

2.7.1 Die HisF-Teilreaktion

Bei der Charakterisierung der von HisF katalysierten Teilreaktion dienen Ammoniumsalze als Quelle für Ammoniak. Für die ammoniumabhängige Reaktion ist die Anwesenheit von HisH im Prinzip nicht erforderlich, dennoch wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit der Gesamtreaktion und der HisH-Teilreaktion alle Messungen mit dem HisH:HisF Komplex durchgeführt. Als Ammoniakquelle diente NH_4^+ Acetat (100mM), welches in 50mM Tris Acetat bei pH 8,5 rund 17 mM Ammoniak entspricht (Henderson-Hasselbalch-Gleichung). Es wurden unter Sättigung mit Ammoniak und in Anwesenheit unterschiedlicher PRFAR-Konzentrationen Anfangsgeschwindigkeiten bestimmt und daraus Sättigungskurven erstellt. Daraus wurden wiederum die Michaelis-Konstante K_M^{PRFAR} und die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} ermittelt. Aus letzterer wurde bei bekannter Konzentration an aktiven Zentren ($[E_0]$) die Wechselzahl bestimmt: $k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E_0]$.

Typische Versuchsbedingungen im Überblick:

100 mM NH_4^+ Acetat (sättigend)
0-50 μM ProFAR
0,5 μM His A
in 50 mM Tris Acetat pH 8.5

Die Messungen wurden in der Regel mit 0,1 μM HisH:HisF gestartet, bei HisH:HisF-ΔLoop1 mit 10 μM .

2.7.2 Die glutaminabhängige Gesamtreaktion

Die Gesamtreaktion ist die physiologische Reaktion des HisH:HisF Komplexes. Glutamin wird von HisH zu Glutamat und Ammoniak hydrolysiert, welcher zu HisF wandert und dort mit dem Substrat PRFAR zu ImGP und AICAR umgesetzt wird.

Es wurden unter Sättigung mit Glutamin und in Anwesenheit unterschiedlicher PRFAR-Konzentrationen Anfangsgeschwindigkeiten gemessen und daraus Sättigungskurven erstellt. Daraus wurde wiederum K_M^{PRFAR} und V_{max} bzw. k_{cat} ermittelt.

Typische Versuchsbedingungen im Überblick:

5 mM Glutamin (sättigend)
 0-50 μM ProFAR
 0,5 μM His A
 in 50 mM Tris Acetat pH 8.0

Die Messungen wurden in der Regel mit 0,1 μM HisH:HisF gestartet, bei HisH:HisF-D98A mit 20 μM .

2.7.3 Die HisH-Teilreaktion

Die von HisH katalysierte Teilreaktion, ist die Glutaminasereaktion, d.h. die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und Ammoniak. Die Glutaminaseaktivität sowohl von isoliertem HisH als auch des apo HisH:HisF Komplexes aus *T. maritima* ist extrem gering und wird erst durch die Bindung eines Liganden an HisF im kontinuierlichen Assay zuverlässig messbar (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Neben dem HisA-Substrat ProFAR hat sich auch das HisF-Produkt ImGP als wirksamer Ligand erwiesen (Klem & Davisson, 1993; Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001).

2.7.3.1 Glutamatbestimmung: HisH- und TrpG-Aktivität

Da die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und Ammoniak nicht mit einer Absorptionsänderung verbunden ist, wurde der Reaktion die Glutamat-Dehydrogenase (GDH)-Reaktion nachgeschaltet. Durch die GDH wird Glutamat zu α -Ketoglutarat oxidiert. Die damit einhergehende Reduktion von NAD^+ zu NADH kann durch einen Anstieg der Absorption bei 340 nm verfolgt werden. Es wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion in Abhängigkeit von der Glutaminkonzentration gemessen und daraus Sättigungskurven erstellt. Daraus wurden wiederum K_M^{Gln} und V_{max} bzw. k_{cat} ermittelt. Wegen der relativ großen Streuung wurden alle Messungen dreimal wiederholt.

Typische Versuchsbedingungen im Überblick:

40 μ M ProFAR (sättigend)
0 - 5 mM Glutamin
10 mM NAD⁺ (5 mM NAD⁺ bei TrpG)
1 mg/ ml GDH
in 50 mM Tricine/KOH pH 8.0

Die Messungen wurden in der Regel mit 1 μ M HisH:HisF bzw. 5 μ M TrpG-Mutante (10 μ M TrpG-T129F) gestartet. Glutamin unterliegt einer langsamen und spontanen Hydrolyse und ist damit immer zu einem kleinen Teil mit Glutamat verunreinigt. Daher wurde HisH:HisF erst zugegeben, nachdem die Basislinie keine oder nur noch eine sehr geringe Steigung aufwies. Diese Vorinkubationsphase konnte je nach Menge des zugegebenen Glutamins bis zu 90 min betragen. Eine auch danach noch verbliebene Reststeigung der Basislinie wurde von der Anfangssteigung abgezogen.

2.7.3.2 Ammoniakbestimmung

Durch eine Umkehr der gekoppelten GDH-Reaktion kann die Produktion des Ammoniaks verfolgt werden. Dabei wird NADH zu NAD⁺ oxidiert und α -Ketoglutarat reagiert mit Ammoniak zu Glutamat. In diesem Fall wurden nur Anfangsgeschwindigkeiten in Anwesenheit sättigender Glutamin-Konzentrationen bestimmt. Wege der relativ großen Streuung wurden alle Messungen dreimal wiederholt.

Typische Versuchsbedingungen im Überblick:

40 μ M ProFAR (sättigend)
10 mM Glutamin
0,3 mM NADH
2 mg/ ml GDH
10 mM α -Ketoglutarat
in 50mM Tricine/KOH, pH 8.0

Die Messungen wurden in der Regel mit 1 μ M HisH:HisF gestartet, nachdem die Basislinie keine oder nur noch eine minimale Steigung aufwies. Anders als beim Glutamat-Nachweis war dies bereits nach wenigen Minuten der Fall.

2.7.3.3 Diskontinuierliche Glutamatbestimmung

Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, dass NAD^+ , ebenso wie ProFAR, PRFAR und ImGP die Glutaminaseaktivität durch Bindung an das aktive Zentrum von HisF stimuliert. Daher musste zur Bestimmung der k_{cat} -Werte der konstitutiven Glutaminaseaktivität ein diskontinuierlicher Assay angewandt werden. Bei diesem Assay sind Glutamatbildung durch den HisH:HisF Komplex und Glutamatbestimmung durch die GDH mit Hilfe eines Ultrafiltrationsschritts voneinander getrennt (Abbildung 7). Dadurch wird verhindert, dass die Quantifizierung der konstitutiven Glutaminaseaktivität durch NAD^+ bzw. des ebenfalls verwendeten 3-Acetylpyridine adenine dinucleotide (APAD $^+$) verfälscht wird.

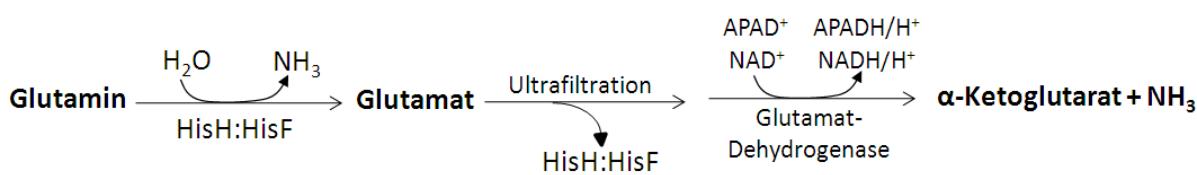


Abbildung 7: Messung konstitutiver Glutaminase-aktivität von HisH mit einem diskontinuierlichen enzymatischen Test.

Das von HisH:HisF gebildete Glutamat wird über einen Ultrafiltrationsschritt vom HisH:HisF Komplex abgetrennt und anschließend von der GDH unter Reduktion von APAD $^+$ zu APADH/H $^+$ oder NAD $^+$ zu NADH/H $^+$ in α -Ketoglutarat und Ammoniak umgesetzt. Die Menge des gebildeten APADH (NADH) wird anhand der Absorptionsänderung bei 363 nm (340 nm) berechnet [$(\Delta\epsilon_{363} (\text{APADH-APAD}^+) = 8900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}; \Delta\epsilon_{340} (\text{NADH-NAD}^+) = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$].

Typischer diskontinuierlicher Glutaminaseassay:

Im ersten Schritt des Assays wurden zwischen 0,5 und 10 μM HisH:HisF mit 10 mM Glutamin bei 25 °C in einem 500 μl Ansatz inkubiert. Nach drei verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 150 μl Aliquots entnommen und der HisH:HisF Komplex mittels eines Zentrifugationsschrittes (Eppendorf 5415D, 10900 rpm, 2 min, RT) durch Ultrafiltration über einen 10 kDa Filter (Rotispi 10, Roth) abgetrennt. Vom Ultrafiltrat wurden 100 μl mit 650 μl GDH-Reaktionsansatz (Endkonzentrationen: 0,7 mM APAD $^+$ oder 10 mM NAD $^+$, 0,75 mg/ml GDH in 50 mM Tris/Acetat pH 8,0) für mindestens 1 h bei 37 °C in 1ml Plastikküvetten inkubiert. Von den Küvetten mit GDH-Reaktionsansatz wurde vor Ultrafiltratzugabe die Grundabsorption bestimmt. Diese wurde um die Verdünnung durch die Dialysatzugabe korrigiert und von der Absorptionsmessung nach dem Inkubationsschritt abgezogen. Die Auswerung erfolgte durch Absorptionsmessung bei 340 nm (NAD $^+$) bzw. 363 nm (APAD $^+$). Die in den Küvetten enthaltene Glutamatkonzentration wurde bei Verwendung von NAD $^+$ über eine parallel angefertigte Eichgerade (0 – 100 μM Glutamat) bzw. bei Verwendung von APAD $^+$ über den molaren differentiellen Extinktionskoeffizienten $\Delta\epsilon_{363} (\text{APADH-APAD}^+) =$

8900 M⁻¹cm⁻¹ berechnet (siehe Abbildung 51). Alle Messungen wurden wegen der relativ großen Streuung dreimal wiederholt.

2.7.4 Thioesterbestimmung im *steady-state*

Von HisH-Y138A-K181A und TrpG-T129Y wurde die Thioesterkonzentration im *steady-state* mit Hilfe von ¹⁴C-markiertem Glutamin bestimmt.

In 100 µl 50 mM Tricine/KOH pH 8,0 wurden 30 µM HisH:HisF Komplex bzw. 80 µM TrpG-T129Y mit 25 µl ¹⁴C-Glutamin (spezifische Aktivität 262 mCi/mmol) und 2 mM Glutamin gemischt. Die Ansätze wurden für 10 s (HisH) bzw. 4 min (TrpG) bei 25 °C inkubiert und die Reaktion in 1 ml 5 %iger Trichloressigsäure über zwei Glasmikrofilter (Whatman GF/C 2-4 cm) in einer Vakuumapparatur durch Präzipitation des Enzym-Thioester Komplexes abgestoppt. Die Inkubationszeiten wurden für HisH-Y138A-K181A so gewählt, dass beim Abstoppen noch sättigende Glutaminkonzentrationen vorlagen. Nach zweiminütiger Inkubation wurde die Lösung über den Filtern abgesaugt und die Filter mit 30 ml eiskalter 1 N HCl gewaschen. Der jeweils obere Filter wurde in 20 ml Szintillationsröhren überführt und 10 min bei 60 °C getrocknet. Nach der Zugabe von jeweils 5 ml Szintillationscocktail (Lumasafe Plus, Lumac LSC) wurden die Röhren 1 h bei RT zum Abklingen der Chemilumineszenz inkubiert und anschließend mit einem Szintillationszähler (Packard Tri-Carb 29000 TR) ausgewertet. Als Kontrolle gegen unspezifische Glutaminbindung am Filter wurde ein Ansatz ohne Enzym parallel verarbeitet. Die Thioesterkonzentration wurde über die Aktivität des im Ansatz enthaltenen Glutamins (1.387.500 cpm/mM) berechnet.

2.7.5 Hydroxylamin-Assay

Während der Glutaminasereaktion von TrpG erfolgt die Spaltung des Thioesterintermediats in der Regel durch den nukleophilen Angriff von Wasser. Hydroxylamin stellt ein stärkeres Nukleophil als Wasser dar und reagiert daher sehr schnell mit dem Thioester unter Bildung von γ -glutamyl-Hydroxamat. Die Geschwindigkeit der Thioesterspaltung durch Hydroxylamin entspricht dadurch der Thioesterbildungsraten (Chaparian & Evans 1991).

Eine 4 M Hydroxylaminlösung wurde mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Die Lösung ist auf Eis wenige Stunden haltbar und wurde für jeden Versuchstag frisch angesetzt. Für die Farbreaktion mit γ -glutamyl-Hydroxamat wurde eine Detektionslösung aus 80 % TCA, 6 N HCl und 10 % FeCl₃ in 0,02 N HCl (1:1:1) vorbereitet.

10 μ M TrpG oder TrpG-T129Y wurden mit 500 mM Hydroxylamin und 50 mM Glutamin in 900 μ l 50 mM KP pH 7,5 bei RT inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden 80 μ l Aliquots entnommen und mit 20 μ l Detektionslösung gequencht. Der fertige Reaktionsansatz wurde 5 min zentrifugiert (Eppendorf 5415D, 14000 rpm, RT) und die Absorption des Überstandes bei 540 nm bestimmt. Zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden wurden 0 – 5 mM kommerziell erhältliches γ -glutamyl-Hydroxamat analog mit Detektionslösung umgesetzt und vermessen.

2.8 Proteinkristallisation

Die Kristallisationsansätze mit HisH:HisF- Δ Loop1 und TrpG/TrpGD/TrpEGD erfolgten nach der Dampfdiffusionsmethode (McPherson,1982) im sitzenden Tropfen an der *high-throughput crystallization facility* am EMBL Hamburg bei 19 °C (Mueller-Dieckmann 2006). Der Kristallisationsverlauf wurde dabei über mehrere Wochen durch eine automatische Kamera verfolgt. Für jeden Ansatz wurde 1 μ l Proteinlösung (12 mg/ml) mit 1 μ l Mutterlösung gemischt. Getestet wurden folgende Kombination aus kommerziell erhältlichen Kristallisations-Sets mit je 96 verschiedenen Bedingungen und Proteinen:

Emerald Cryo (Emerald Biosystems)^{1,2}

Crystal Screen (Hampton Research)^{1,2}

JCSG (Jena Bioscience)^{1,2}

Jena 1-4 (Jena Bioscience)^{1,2}

Jena 5-8 (Jena Bioscience, 48 Bedingungen)^{1,2,8,9}

Jena 9-10 (Jena Bioscience, 48 Bedingungen)^{8,9}

QIA-Classic (Qiagen)^{3,4,5,6,7,8,9}

QIA-Classic II (Qiagen)^{3,4,5,6,7,8,9}

QIA-PEG (Qiagen)^{5,6,8,9}

QIA-PEG-II (Qiagen)^{5,6,8,9}

QIA-pHclear (Qiagen)^{5,6}

QIA-pHclear-II (Qiagen)^{8,9}

QIA-Optisalt (Qiagen) Grundlage: QIA-Classic Bedingung #48³

QIA-Optisalt (Qiagen) Grundlage: QIA-Classic Bedingung #16⁹

¹TrpG-wt, ²TrpG-T129F, ³HisH:HisF- Δ Loop1, ⁴HisH:HisF-D98A, ⁵TrpGD+20 mM DON, ⁶TrpGD-T129Y+20 mM DON, ⁷TrpEGD, ⁸TrpGD-T129Y+20 mM DON, ⁹Se-Met-TrpGD.

Die Kristallisationsbedingungen für TrpGD-T129Y und SeMet-TrpGD wurden zusätzlich durch ein manuell zusammengestellten Set verfeinert.

2.9 Ermittlung geeigneter Kryolösungen

Proteinkristalle sind gegenüber Röntgenstrahlen empfindlich. Um Strahlenschäden zu verringern hat sich die Datenaufnahme bei 100 K bewährt. Durch das Tiefkühlen kann mit einem Kristall ein vollständiger Datensatz gesammelt werden. Weitere Vorteile des Tiefkühlens sind eine größere mechanische Belastbarkeit und die Möglichkeit die Kristalle in flüssigem Stickstoff einzulagern. Das Tiefkühlen von Kristallen ist aber auch mit Problemen verbunden. Proteinkristalle bestehen typischerweise zu 50 % aus Wasser. Wird der Kristall zu langsam abgekühlt, wird flüssiges Wasser in Eis überführt. Dieser Vorgang ist mit einer starken Volumenänderung verbunden und verringert dabei die Qualität des Kristalls. Durch sehr schnelles Abkühlen entsteht eine amorphe Form von Wasser und die Bildung von Eis wird verhindert. Allerdings kann auch schnelles Abkühlen das Kristallgitter noch negativ beeinflussen, da die Abkühlung im Kristall nicht vollständig gleichmäßig verläuft. Lösungsmittel und Kristallgitter dehnen sich dabei ungleichmäßig aus, was zu einer verringerten Beugungsqualität und erhöhten Mosaizität führt (Rodgers, 1994; Garman & Schneider, 1997). Durch die Verwendung geeigneter Kryolösungen, die hauptsächlich die Bildung von Eis verhindern, können die beschriebenen Effekte reduziert werden.

Zum Testen möglicher Kryolösungen wurden Kristallisationslösungen mit dem jeweiligen Kryoprotektant hergestellt und von der tiefgekühlten Kryolösung ein Beugungsbild aufgenommen. Zeigte das Beugungsbild keine Eisringe (scharfe oder diffuse Ringe bei einer Auflösung von 3,44 Å, 3,67 Å oder 3,90 Å) war die Kryolösung geeignet, um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern.

2.10 Aufnahme von Beugungsdaten und Datenprozessierung

Einzelne Kristalle wurden mit Hilfe einer Nylonschleife aus dem Kristallisationsansatz entnommen, in eine Kryolösung überführt, in flüssigem Stickstoff oder im Kühlstrahl der Kryoanlage am Röntgendiffraktometer verglast und auf dem Goniometerkopf im Schnittpunkt des Röntgenstrahls mit der Rotationsachse montiert. Die Anzahl der Beugungsbilder sowie die Rotation des Kristalls pro Bild richteten sich nach der Symmetrie des Kristalls und der Qualität der einzelnen Streupunkte. Die Beugungsdaten für die Struktur von HisH:HisF-ΔLoop1 wurden an der Beamline ID14-2 am ESRF in Grenoble, mit einem ADSC Quantum 4 Detektor aufgenommen. Der Datensatz von HisH:HisF-ΔLoop1 bestand aus 360 Beugungsbildern mit einer Rotation von 0,5° pro Bild und wurde mit einem Detektorabstand von 225,8 mm aufgenommen. Die Indizierung und Integration der Daten erfolgte mit dem

Programm iMOSFLM (Leslie 1998). Dieser Schritt summiert alle Einzelbilder zu einem Datensatz auf und liefert anhand der Symmetrie der Beugungspunkte auf einzelnen Bildern unter anderem die Raumgruppe und die Dimensionen der Einheitszelle. Die integrierten Daten wurden mit den Programmen SCALA und TRUNCATE (CCP4 1994) reduziert. Bei diesem Schritt werden für mehrfach aufgenommene Datenpunkte mittlere Intensitäten bestimmt und Strukturfaktoren ermittelt.

2.11 Strukturlösung und Verfeinerung

Auf Basis der Raumgruppe, der Größe der Einheitszelle und der molaren Masse von HisH:HisF-ΔLoop1 erfolgte die Berechnung der Packungsdichte mit dem Programm MATTHEWS_COEF (Matthews 1968). Mit diesen Daten und dem wildtypischen HisH:HisF Komplex (KetteAB, 1gpw) als Suchmodell wurde mit dem Programm PHASER (McCoy 2007) ein molekularer Ersatz durchgeführt. Dafür wurden die Beugungsdaten von 3-10 Å verwendet. Danach folgten mehrere Runden aus manuellem Modellbau mit dem Programm COOT (Emsley & Cowtan 2004) und Verfeinerung nach der *maximum-likelihood* Methode mit dem Programm REFMAC5 (Murshudov *et al.* 1997).

3 Aktivierungsmechanismus der ImGPS Glutaminase-Untereinheit

3.1 Einleitung

3.1.1 Die Familie der Glutaminamidotransferasen

Glutaminamidotransferasen (GATasen) spielen eine entscheidende Rolle im zellulären Stoffwechsel. Sie sind für den Einbau von Stickstoff in Form von Ammoniak während der Biosynthesen von Nukleotiden, Aminosäuren, Aminozuckern, Coenzymen und Antibiotika verantwortlich (Zalkin 1993). Mitglieder dieser Enzymfamilie bestehen aus mindestens einer Glutaminase- und einer Synthase-Domäne, die entweder auf derselben oder auf verschiedenen Polypeptidketten (Untereinheiten) lokalisiert sein können. Freier Ammoniak liegt in der Zelle bei physiologischem pH-Wert zum größten Teil als nicht reaktives Ammoniumion vor. Daher wird an der Glutaminaseuntereinheit durch Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat naszierender Ammoniak erzeugt, der vom Lösungsmittel abgeschirmt durch einen Kanal zum aktiven Zentrum der Synthase transferiert wird (Abbildung 8) (Huang *et al.* 2001). Abgesehen von der obligaten Interaktion zwischen Synthase und Glutaminase können sich GATasen in ihrer Quartärstruktur erheblich voneinander unterscheiden. Die Spannbreite reicht von einfachen heterodimeren Komplexen (Imidazolglycerinphosphat-Synthase) (Douangamath *et al.* 2002) über tetramere (Anthranilat-Synthase) (Knöchel *et al.* 1999) bis hin zu dodecameren Anordnungen (PLP-Synthase) (Zein *et al.* 2006).

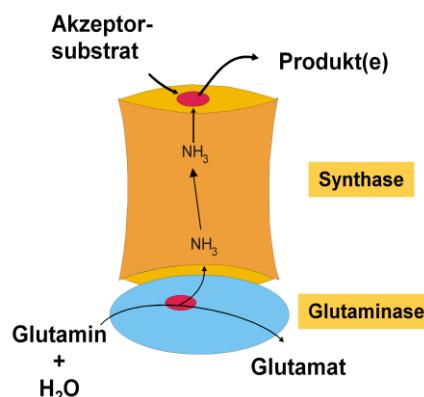


Abbildung 8: Schematischer Aufbau und Reaktionsschema der Glutaminamidotransferasen.

Die Synthase ist in orange dargestellt, die Glutaminase in blau. Die aktiven Zentren sind in rot angedeutet. Stöchiometrie und Quartärstruktur des dargestellten Komplexes entsprechen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Imidazolglycerinphosphat-Synthase.

Entsprechend den aktiven Zentren ihrer Glutaminasen, werden GATasen in zwei Klassen eingeteilt. Klasse I GATasen besitzen eine Glutaminase mit α/β -Hydrolase-ähnlicher Faltung, deren Kern ein offenes siebensträngiges, gemischtes β -Faltblatt bildet (Ollis *et al.* 1992). Das aktive Zentrum besteht aus einer katalytischen Triade (Cys-His-Glu), welche die Hydrolyse des Glutamins über zwei tetraedrische Übergangszustände und ein Glutamyl-Thioesterintermediat katalysiert (Thoden *et al.* 1999). Zu dieser Klasse zählen beispielsweise Imidazolglycerinphosphat-Synthase (ImGPS) (Chaudhuri *et al.* 2001; Douangamath *et al.* 2002), Anthranilat-Synthase (AS) (Knöchel *et al.* 1999; Morollo & Eck 2001; Spraggon *et al.* 2001), 4-amino-4-deoxychorismat-Synthase (ADCS) (Parsons *et al.* 2002), Carbamoylphosphat-Synthetase (CPS) (Thoden *et al.* 1997), Guanosin-5'-Monophosphat-Synthase (GMPS) (Tesmer *et al.* 1996), Formylglycinamid-Synthetase (FGAS) (Anand *et al.* 2004), Cytidin 5'-triphosphat-Synthetase (CTPS) (Goto *et al.* 2004) und Pyridoxalphosphat-Synthase (PLPS) (Bauer *et al.* 2004; Strohmeier *et al.* 2006; Zein *et al.* 2006). Die Ähnlichkeiten der Glutaminasedomänen in Klasse I GATasen können so weit reichen, dass eine einzelne Glutaminase „amphibolaren“ Charakter besitzt. So können sich beispielsweise Glutaminasen aus *Pseudomonas acidovorans*, *Bacillus subtilis* und *Acinetobacter calcoaceticus* mit unterschiedlichen Synthasedomänen sowohl zum AS Komplex als auch zum ADCS Komplex zusammenlagern (Sawula & Crawford 1972; Kane 1977; Buvinger *et al.* 1981; Zalkin 1993; Zwick 2007).

GATasen der Klasse II enthalten ebenfalls eine Glutaminase mit α/β -Hydrolase-ähnlicher Faltung, die anstelle einer katalytischen Triade jedoch ein katalytisch essentielles Cystein am N-terminalen Ende der Polypeptidkette besitzt. Das Cystein, das auch als N-terminales Nukleophil (NTN) bezeichnet wird, wird in diesem Fall durch die α -Aminogruppe aktiviert (Brannigan *et al.* 1995). Vertreter der Klasse II GATasen sind zum Beispiel die Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase (GPAT), die Glucosamin-6-Phosphat-Synthase (GLMS) sowie die Asparagin- und die Glutamat-Synthase (AsnB, GLTS) (Kim *et al.* 1996; Nakatsu *et al.* 1998; Binda *et al.* 2000).

Anders als die Glutaminasen weisen die Synthasen der 16 bisher bekannten GATasen keine Gemeinsamkeiten im katalytischen Mechanismus und eine Vielzahl verschiedener Faltungsmuster auf (Massiere & Badet-Denisot 1998; Zalkin & Smith 1998; Zhu *et al.* 2005). Trotz der großen Variabilität der Synthasen laufen die Reaktionen der beiden aktiven Zentren in fast allen GATasen koordiniert ab (Guillon *et al.* 1992; Mareya & Raushel 1994; Bera *et al.* 1999; Beismann-Driemeyer & Sterner 2001). In der Regel wird die Glutaminaseaktivität erst durch die Bindung des Substrats oder eines Substratanalogons an das aktive Zentrum der

Synthase-Untereinheit induziert. Dadurch wird die unnötige Hydrolyse von Glutamin verhindert (Massiere & Badet-Denisot 1998). Eine Ausnahme stellt die PLPS aus *B. subtilis* dar, bei der nur die Komplexbildung der Untereinheiten für die Glutaminsäaktivität essentiell ist, die Bindung eines Liganden an die Synthase jedoch keinen weiteren Einfluß auf die Glutaminaseaktivität hat (Raschle *et al.* 2005). *In vitro* können die meisten GATasen auch externen Ammoniak in Form von Ammoniumsalzen als Amiddonor verwenden.

3.1.2 Struktur und Funktion der Imidazolglycerinphosphat-Synthase

Die Imidazolglycerinphosphat-Synthase (ImGPS) gehört zu den Klasse I GATasen. Bei Prokaryoten besteht sie aus zwei Untereinheiten, der Glutaminase HisH und der Synthase HisF (Klem & Davisson 1993), die zusammen den HisH:HisF Komplex bilden. In Hefe dagegen sind die beiden Untereinheiten auf einer Polypeptidkette lokalisiert (His7) (Künzler *et al.* 1993). Der HisH:HisF Komplex katalysiert den fünften und sechsten Schritt der Histidin-Biosynthese und liegt damit im Zentrum des sogenannten „his-core“ (Papaleo *et al.* 2009), der die Enzyme HisA (Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid-Isomerase), HisH:HisF sowie HisB (Imidazolglycerinphosphat-Dehydratase) einschließt. Während der Reaktion wird am aktiven Zentrum von HisF N⁴-[5'-phosphoribulosylformimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid (PRFAR) mit dem durch HisH aus Glutamin erzeugten Ammoniak zu Imidazolglycerinphosphat (ImGP) und 5'-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid (AICAR) umgesetzt (Abbildung 9). Da AICAR in die *de novo* Synthese von Purin eingeht (Winkler 1987), werden durch das Schlüsselenzym ImGPS Stickstoff- (Glutamin/Glutamat), Histidin- (ImGP) und Nukleotid-Stoffwechsel (AICAR) miteinander verknüpft.

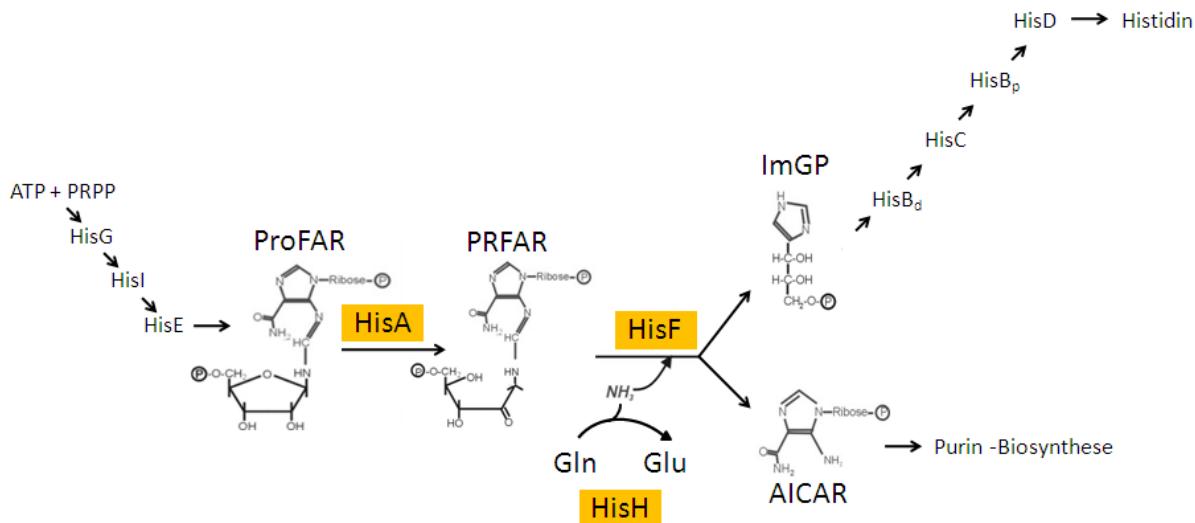


Abbildung 9: Bedeutung des ImGPS Komplex für die prokaryotische Histidin-Biosynthese.

Die für diese Arbeit relevanten Metaboliten ProFAR, PRFAR, Glutamin, Glutamat, ImGP und AICAR sowie die Enzyme HisA, HisH und HisF sind hervorgehoben.

Aus den Organismen *Saccharomyces cerevisiae*, *Thermotoga maritima*, *Pyrobaculum aerophilum* und *Thermus thermophilus* sind Röntgenstrukturen der ImGPS oder ihrer Untereinheiten in der apo-Form sowie mit verschiedenen Liganden bekannt (Tabelle 3).

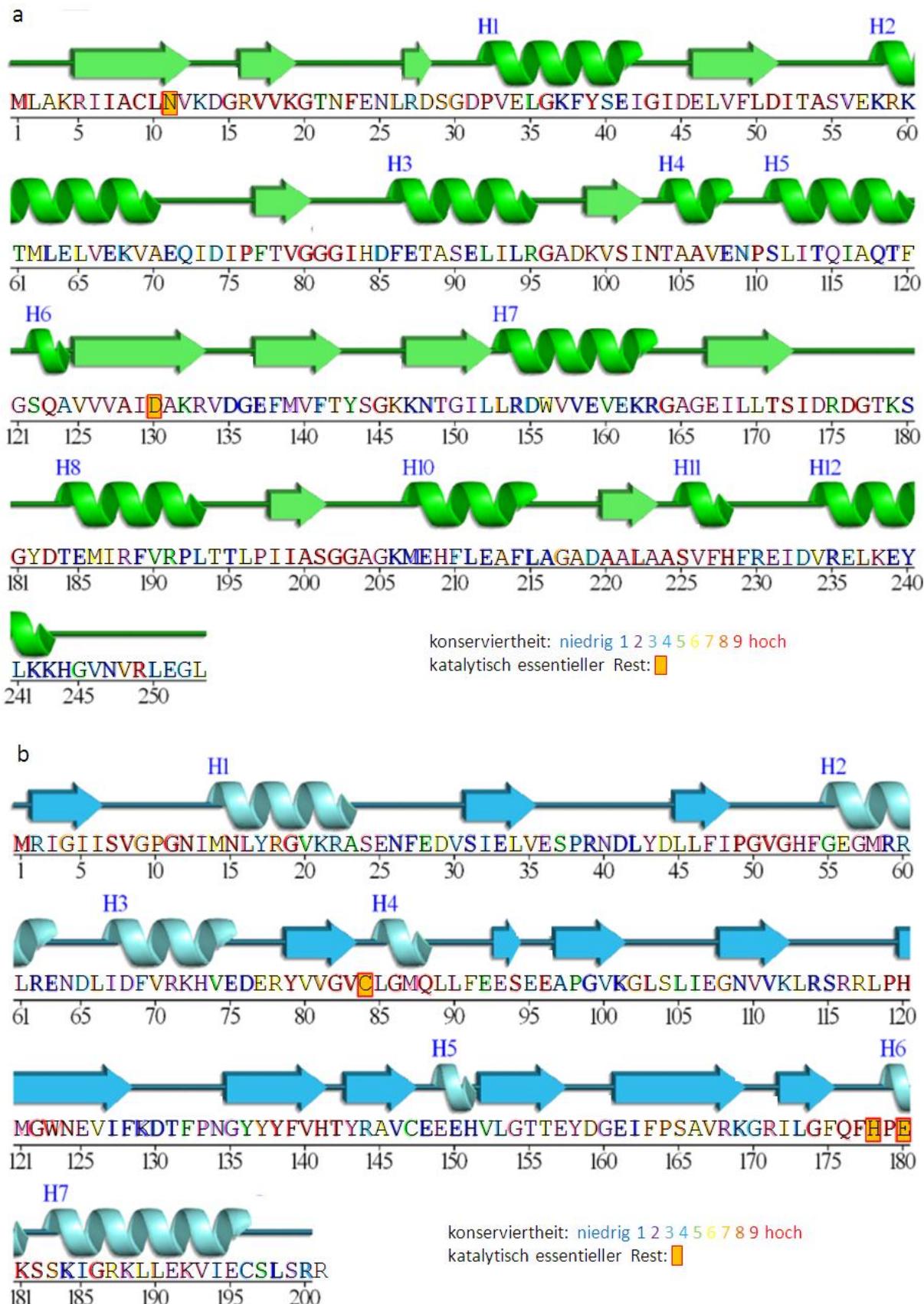
Tabelle 3: Röntgenstrukturen der ImGPS und ihrer Untereinheiten

Nr	Protein	Organismus	Liganden	Pdb
1	HisF	<i>Thermotoga maritima</i>	PO_3^{2-}	1thf
2	HisF	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	PO_3^{2-} , Glycerin	1h5y
3	HisH	<i>Thermotoga maritima</i>	PO_3^{2-}	1kxj
4	HisH	<i>Thermotoga maritima</i>	Acetat	1k9v
5	HisH:HisF	<i>Thermotoga maritima</i>	PO_3^{2-}	1gpw
6	HisH:HisF	<i>Thermotoga maritima</i>	Glutamin	2ck6
7	HisH:HisF	<i>Thermotoga maritima</i>	Glutamat	2ck7
8	HisH:HisF	<i>Thermotoga maritima</i>	Glutamin + Glutamat	2ck8
9	HisH:HisF	<i>Thermotoga maritima</i>	DON	
10	HisH-Y138A-K181A:HisF	<i>Thermotoga maritima</i>	apo	2wjz
11	HisH:HisF-ΔLoop1	<i>Thermotoga maritima</i>	Malat, Cl^-	
12	His7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SO_4^{2-} , Acivicin	1jvn
13	His7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SO_4^{2-} , DON	1ox4
14	His7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Acivicin + PRFAR	1ox5
15	His7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SO_4^{2-}	1ox6
16	HisH:HisF	<i>Thermus thermophilus</i>	apo	1ka9

1: (Lang *et al.* 2000), 2: (Banfield *et al.* 2001), 3: (Korolev *et al.* 2002), 4,5: (Douangamath *et al.* 2002), 6-10: (Vega *et al.* unveröffentlichte Daten), 11: diese Arbeit 12: (Chaudhuri *et al.* 2001), 13-15: (Chaudhuri *et al.* 2003), 16: (Omi *et al.* 2002)

Sämtliche Strukturen lassen sich jeweils sehr gut superpositionieren und weisen hohe Sequenzidentitäten auf (Banfield *et al.* 2001; Chaudhuri *et al.* 2001) (Abbildung 10a,b). Ferner wurde auf Basis von NMR-Messungen eine Zuordnung der HisF-Untereinheit aus *Thermotoga maritima* veröffentlicht (Lipchock & Loria 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der ImGPS aus *T. maritima* gearbeitet. Das Enzym stellt einen 1:1 Komplex aus HisF (253 AS; 27,7 kDa) und HisH (201 AS; 23,1 kDa) dar. Die katalytische Aktivität des Enzyms wurde in einer früheren Arbeit charakterisiert (Beismann-Driemeyer & Sterner 2001) und seine Röntgenstruktur in der apo-Form gelöst (Lang *et al.* 2000). Des Weiteren wurden in vor und parallel zu dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten die Strukturen mit gebundenem Glutamin, Glutamat und Glutamin plus ProFAR aufgeklärt (Vega *et al.* unveröffentlichte Daten) (Tabelle 3). Auf diese Strukturen wird bei der Diskussion der im Rahmen dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse zurückgegriffen.

HisF weist eine $(\beta\alpha)_8$ -barrel Faltung auf, ein Faltungstyp der erstmals für die Triosephosphat-Isomerase (TIM) aus *Gallus gallus* beschrieben wurde und daher auch als TIM-barrel bekannt ist (Banner *et al.* 1975). Das $(\beta\alpha)_8$ -barrel besteht aus einem achtsträngigen parallelen β -Faltblatt, das von acht Helices umgeben wird. Der C-Terminus eines β -Stranges ist dabei über einen $\beta\alpha$ -Loop mit der darauffolgenden α -Helix verbunden. Der C-Terminus dieser α -Helix ist über einen $\alpha\beta$ -Loop wiederum mit dem N-Terminus des folgenden β -Stranges verknüpft (Gerlt & Raushel 2003) (Abbildung 10c). Am C-terminalen Ende der β -Stränge 1 und 5 liegen die für die HisF Reaktion katalytisch essentiellen Reste Asp11 und Asp130 (Beismann-Driemeyer & Sterner 2001). Auf der gegenüberliegenden Seite, d.h. am N-terminalen Ende des β -barrels befindet sich die Kontaktfläche zu HisH, welches die für Klasse I Glutaminasen typische α/β -Hydrolasefaltung (Ollis *et al.* 1992) mit der katalytischen Triade Cys-His-Glu besitzt. Die Öffnung des β -barrels hin zu HisH und damit der ca 20 Å lange Ammoniakkanal zwischen den beiden aktiven Zentren wird in der apo-Form des Enzyms durch ein Salzbrückennetzwerk aus den Aminosäuren Arg5, Glu46, Lys99 und Glu167 unterbrochen (Douangamath *et al.* 2002) (Abbildung 10d).



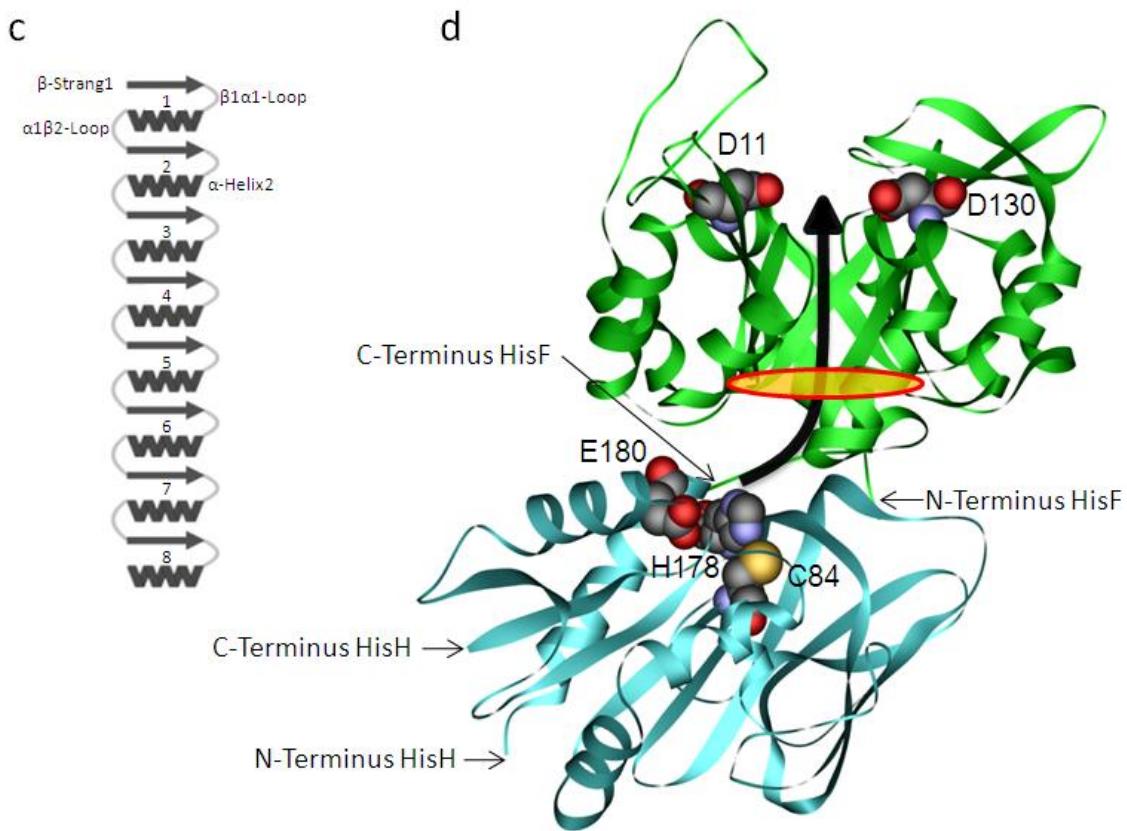


Abbildung 10: Faltungsschema der ImGPS (HisH:HisF) aus *Thermotoga maritima* (Douangamath *et al.* 2002).

(a) Sekundärstruktur (PDBSum) und Konservierungsgrad (ConSurf-HSSP) von HisF (grün) und (b) HisH (blau). (c) Topologische Darstellung der rechtsgängigen $\beta\alpha$ -Supersekundärstruktur von HisF. (d) Bänderdiagramm der ImGPS, die katalytisch essentiellen Reste sind jeweils als Kugelmodelle dargestellt. HisF: Asp11, Asp130; HisH: Cys84, His178, Glu180. Der Ammoniakpfad durch den Kanal ist als schwarzer Pfeil dargestellt. Die Lage des Salzbrückenclusters ist rot umrandet.

3.1.3 Aktivierungsmechanismen der Glutaminase-Untereinheiten in GATasen

Wie bereits erwähnt, sind die Aktivitäten der Glutaminase- und Synthase-Untereinheiten in GATasen koordiniert. Dabei führt die Bindung des Akzeptor-Substrates und die Synthase-Untereinheit zu Konformationsänderungen, welche die Abschirmung der aktiven Zentren, die Aktivierung der katalytischen Reste oder die Ausbildung des Ammoniakkannals zur Folge haben (Isupov *et al.* 1996; Krahn *et al.* 1997; Muchmore *et al.* 1998; Larsen *et al.* 1999; van den Heuvel *et al.* 2002; van den Heuvel *et al.* 2003; van den Heuvel *et al.* 2004; Schmitt *et al.* 2005; Nakamura *et al.* 2006; Oshikane *et al.* 2006; Dossena *et al.* 2007; Mouilleron *et al.* 2008; Floquet *et al.* 2009). Ein möglicher Weg um solche Aktivierungsmechanismen aufzuklären und die ihnen zugrunde liegenden Konformationsänderungen sichtbar zu machen, ist der Vergleich von 3D-Strukturen in der aktiven (holo) und inaktiven (apo) Form der Enzyme.

Derartige Untersuchungen wurden bisher sowohl bei Klasse I Glutaminasen (ImGPS, CPS, PLPS) als auch bei Klasse II Glutaminasen (GPAT, GLMS, GLTS) durchgeführt. Da die zweite Gruppe nicht über eine katalytische Triade entsprechend der ImGPS verfügt, können dort gewonnene Erkenntnisse nicht ohne Weiteres auf GATasen mit katalytischen Triaden übertragen werden. Im Weiteren wird daher nur auf den Aktivierungsmechanismus von Klasse I Glutaminasen eingegangen.

3.1.3.1 Carbamoylphosphat-Synthetase

Der am besten untersuchte Vertreter der Klasse I Glutaminasen ist die CPS. Vergleichbar mit der ImGPS bildet die CPS ein Heterodimer, bestehend aus einer kleinen Glutaminase- und einer großen Synthase-Untereinheit, die allerdings zwei aktive Zentren beinhaltet, aus (Thoden *et al.* 1997). Während der dreiteiligen CPS-Reaktion wird aus Glutamin, Bicarbonat und zwei Molekülen ATP über die Intermediate Carboxyphosphat, Ammoniak und Carbamat, Carbamoylphosphat gebildet (Anderson & Meister 1965).

Die 3D-Struktur der CPS zeigt, dass ihre drei Reaktionszentren etwa 100 Å voneinander entfernt liegen und durch einen Kanal miteinander verbunden sind. Der Ammoniak, der in der kleinen Glutaminaseuntereinheit durch die Hydrolyse von Glutamin entsteht, diffundiert durch einen ersten Teilkanal zum 46 Å entfernten aktiven Zentrum in der N-terminalen Hälfte der großen Untereinheit und reagiert dort mit dem Zwischenprodukt Carboxyphosphat, das aus ATP und Bicarbonat entsteht, zu Carbamat. Dieses diffundiert weiter durch den zweiten Kanalabschnitt zum aktiven Zentrum der C-terminalen Hälfte der großen Untereinheit und wird dort durch ATP zu Carbamoylphosphat phosphoryliert (Thoden *et al.* 1997). Verschiedene Ergebnisse lassen vermuten, dass das aktive Zentrum der Glutaminase und das N-terminale aktive Zentrum der großen Untereinheit durch allosterische Wechselwirkungen koordiniert werden (Thoden *et al.* 1998). So wird durch die Bindung von ATP und Bicarbonat der zweite Teilschritt der Glutaminasereaktion, die Thioesterhydrolyse, um den Faktor 1000 beschleunigt. Da durch ATP oder ADP-Analoga keine Aktivierung erfolgt, ist das instabile Intermediat Carboxyphosphat vermutlich der entscheidende allosterische Effektor (Miles *et al.* 1998).

Wichtige Einblicke in die allosterische Interaktion erbrachte die Aufklärung der 3D-Struktur der CPS Mutante C248D (Thoden *et al.* 2004), deren Glutaminaseaktivität in Abwesenheit von ATP und Bicarbonat gegenüber dem WT um den Faktor 40 erhöht ist (Mareya & Raushel 1994). Es wurde vermutet, dass dieser Austausch die aktive Konformation der Glutaminase stabilisiert. Die Kristallstruktur der Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine weniger rigide Struktur in der Nähe von Position 248, sowie konformationelle Änderungen der direkt

benachbarten Aminosäurereste. Änderungen der unmittelbar an der Glutamin-Hydrolyse beteiligten Reste fielen jedoch relativ gering aus. Daraus wurde geschlossen, dass der Austausch C248D entweder nur zu einer unvollständigen Aktivierung führt oder die entsprechenden Konformationsänderungen zu gering ausfallen, um sie mit Röntgenkristallographie beobachten zu können. Alternativ wurde auch die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass es erst nach der Bindung von Glutamin zur Ausbildung der aktiven Konformation kommt (Thoden *et al.* 2004).

Mit Hilfe von Moleküldynamik-Simulationen und Mutationsstudien wurde der Weg des naszierenden Ammoniaks genauer untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der Ammoniak nach seiner Bildung dem Verlauf eines energetischen Gefälles folgt. Zunächst wird der Ammoniak durch Wasser am aktiven Zentrum der Glutaminase protoniert, um in diesem Zustand zwei wassergefüllte Kammern zu durchqueren. Vor einer anschließenden hydrophoben Passage, wird der Ammoniak wieder deprotoniert. Davor muss der Ammoniak ein Netzwerk aus einem Cystein- und zwei Alanin- Resten überwinden, wodurch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Ammoniaktransports definiert wird. Durch die Bildung des Intermediats Carboxyphosphat wird das Netzwerk erweitert und die Passage des Ammoniaks um etwa 2 kcal/mol erleichtert. Die Erweiterung des Netzwerks ist an die durch Carboxyphosphat induzierte Verschiebung einer α -Helix gekoppelt. Es wurde postuliert, dass die Bewegung dieser α -Helix Teil der allosterischen Aktivierung der Glutaminase ist (Fan *et al.* 2008; Fan *et al.* 2009).

3.1.3.2 Pyridoxalphosphat-Synthase

Der Pyridoxalphosphat-Synthase Komplex besteht aus 12 Synthase (Pdx1) und 12 Glutaminase (Pdx2) Untereinheiten. Die Synthasen lagern sich zu zwei übereinanderliegenden Ringen aus jeweils 6 Synthase-Untereinheiten zusammen und bilden so einen Zylinder mit zwei Ebenen. Die Glutaminase-Untereinheiten lagern sich von außen an den Zylinder an (Abbildung 11)

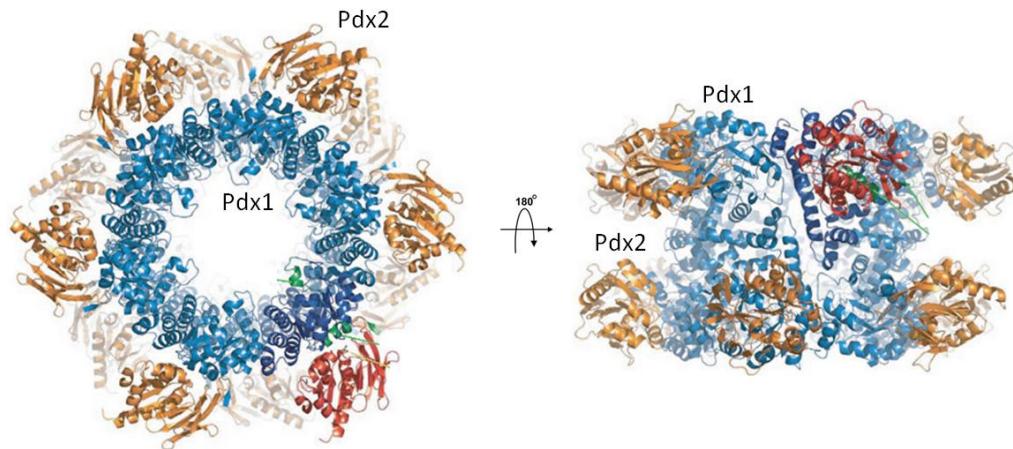


Abbildung 11: Bänderdiagramm der Quartärstruktur der *B. subtilis* PLPS (Strohmeier *et al.* 2006).
Zur Orientierung wurde eine Glutaminase-Untereinheit rot markiert.

Die Untersuchung des Aktivierungsmechanismus der PLPS aus *B. subtilis* gestaltete sich im Gegensatz zu anderen Glutaminasen als vergleichsweise einfach, da hier die Komplexbildung zwischen Glutaminase und Synthase ausreichend ist, um die Glutaminase zu aktivieren. Die Bindung von Substraten an die Synthase hat keinen Einfluss auf die Glutaminaseaktivität (Raschle *et al.* 2005). Ein entscheidender funktionaler Abschnitt in der Glutaminaseuntereinheit (Pdx2) ist die Oxyanion-Region, die während der Katalyse die negative Ladung am Glutaminamidsauerstoff stabilisiert. In der autonomen Pdx2-Struktur ist das Stickstoffatom von Gly47 nicht in Richtung des aktiven Zentrums orientiert und kann daher keinen Beitrag zur Stabilisierung des tetrahedralen Übergangszustandes leisten (Abbildung 12a). Im Komplex mit der Synthase-Untereinheit (Pdx1, inaktive H170N Mutante) und Glutamin zeigt das Stickstoffatom von Gly47 dagegen in Richtung des Substrates. Durch diese Neuausrichtung, an der die α -Helix von Pdx1 maßgeblich beteiligt ist, wird das Oxyanion-Loch komplettiert (Strohmeier *et al.* 2006) (Abbildung 12b).

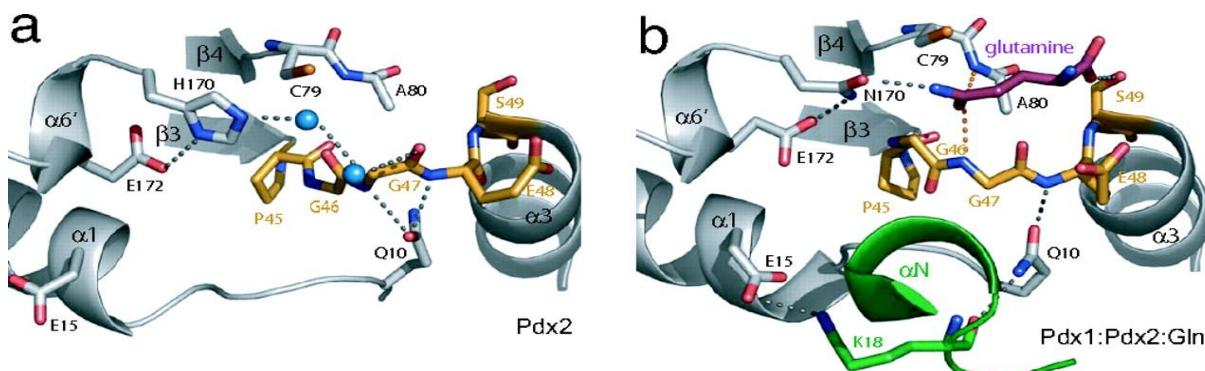


Abbildung 12: Konformationsänderung des Gly46-Gly47 Peptids im Oxyanion-Loch durch Komplexbildung zwischen Pdx2 und Pdx1-H170N (Strohmeier *et al.* 2006).

(a): Bänderdiagramm der Kristallstruktur von Pdx2. Dargestellt sind die Reste der katalytischen Triade C79-H170-E172 (grau) und der Sequenzabschnitt P45-S49 (gelb). Wassermoleküle sind als blaue Kugeln gezeigt.
(b): Bänderdiagramm der Kristallstruktur von Pdx2 im Komplex mit Pdx1-H170N. Dargestellt sind die Reste des

aktiven Zentrums (grau), der Sequenzabschnitt P45-S49 (gelb), das Substrat Glutamin (violett) und die interagierende Helix α N von Pdx1-H170N (grün). Wasserstoffbrücken sind als unterbrochene Linien gezeigt.

Die Ausbildung der Oxyanion-Region durch eine Konformationsänderung des Gly46-Gly47 Peptids ist also im Kontext der PLPS der aktivierende Schlüsselschritt (Wilmouth *et al.* 2001; Barrette-Ng *et al.* 2002).

3.1.3.3 Imidazolglycerinphosphat-Synthase

Für die ImGPS wurde ebenfalls ein allosterischer Aktivierungsmechanismus vorgeschlagen, dem ein in der apo-Form des Enzyms unvollständig ausgebildetes Oxyanion-Loch zu Grunde liegt. In HisH setzt sich das Oxyanion-Loch aus einem nukleophilen Ellbogen mit dem konservierten Motiv Gly-X-Cys-X-Gly und dem Oxyanion-Strang zusammen. Der nukleophile Ellbogen verdankt seinen Namen außergewöhnlichen ϕ und ψ -Winkeln und beinhaltet das katalytische Cystein. Der Oxyanion-Strang wird durch das konservierte Pro48-Gly49-Val50-Gly51 (PGVG) Motiv gebildet (Chittur *et al.* 2001). Ausgehend von der 3D-Struktur der Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus Hefe (His7) mit gebundenem Glutamin-Analogon Acivicin wurde postuliert, dass das Oxyanion-Loch in einer katalytisch inaktiven Form vorliegt. Ausschlaggebend dafür ist die Orientierung des Carbonylsauerstoffs von Gly49 in dem konservierten PGVG, der in Richtung des katalytischen Cys83 zeigt (Abbildung 13a) (Chaudhuri *et al.* 2001). Bei den 3D-Strukturen der inaktiven Konformationen von CPS und AS, zeigt an entsprechender Stelle eine Rückgratamidgruppe aus dem PGVG Motiv in Richtung des katalytischen Cysteins. Es wurde daher postuliert, dass die Bindung des Aktzeptorsubstrats PRFAR am aktiven Zentrum der Synthase zu einer Neuausrichtung von Gly49 in Richtung des gebundenen Glutamins und damit zur Ausbildung eines funktionellen Oxyanion-Loches, welches den tetraedrischen Übergangszustand stabilisieren kann, führt. Zur Überprüfung dieser Theorie wurde His7 in Anwesenheit von PRFAR kristallisiert. Die 3D-Struktur zeigt auf Grund von Einschränkungen durch die Kristallpackung nur einen präkatalytischen Komplex, bei dem das Oxyanion-Loch unverändert ist und welcher keine weiteren Hinweise zur Aktivierung der Glutaminase liefert (Chaudhuri *et al.* 2003). Anhand der Kristallstruktur von HisH:HisF aus *T. maritima* mit gebundenem Glutamin zeigte sich, dass das Oxyanion-Loch – anders als bis dahin angenommen – über das Stickstoffatom von Gly52 gebildet werden kann (Vega *et al.* unveröffentlichte Daten) (Abbildung 13b).

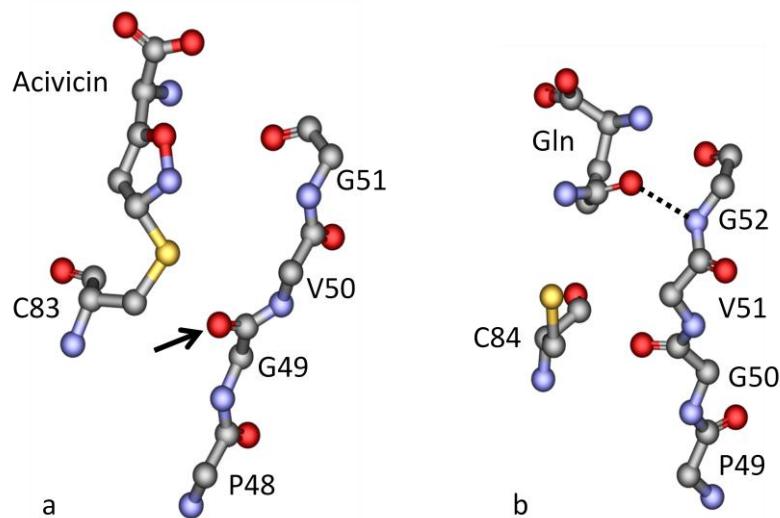


Abbildung 13: Oxyanion-Strang des aktiven Zentrums von HisH.

(a): Ausschnitt aus der Struktur von His7 mit an C83 gebundenem Acivicin. Der Oxyanion-Strang PGVG ist als Rückgrat dargestellt. Der durch einen Pfeil markierte Carbonylsauerstoff von G49 zeigt in Richtung von C83 (Pfeil). (b): Ausschnitt aus der Struktur von HisH mit gebundenem Glutamin. Der Oxyanion-Strang ist als Rückgrat dargestellt. Das Oxyanion-Loch wird über eine als gestrichelte Linie angedeutete Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoffatom von G52 und der Amidcarbonylgruppe am reaktiven Ende des Glutamins vervollständigt.

Über umfangreiche Mutationsstudien, molekulardynamische Berechnungen und NMR-spektroskopische Experimente (Myers *et al.* 2003; Myers *et al.* 2005; Amaro *et al.* 2007; Lipchock & Loria 2008; Lipchock & Loria 2009) konnten weitere Hinweise gefunden werden, die für eine allosterische Kommunikation zwischen den aktiven Zentren der Synthase und der Glutaminase sprechen. Dazu zählen zum Einen die durch PRFAR-Bindung induzierte Verschiebung der Domänen bzw. Untereinheiten relativ zueinander (Chaudhuri *et al.* 2003; Amaro *et al.* 2007; Lipchock & Loria 2009; Vega *et al.* unveröffentlichte Daten) und zum Anderen die durch Glutamin induzierte Öffnung des Salzbrückennetzwerks am N-terminalen Ende des $(\beta\alpha)_8$ -barrels durch eine Konformationsänderung von Lys99 (Vega *et al.* unveröffentlichte Daten). Eine zusammenhängende Kette von Aminosäureresten über die eine vollständige Aktivierungskaskade weitergeleitet wird, konnte bisher allerdings nicht identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeiten sollten daher Reste an der Kontaktfläche zwischen HisH und HisF identifiziert werden, die an der Aktivierung der Glutaminase beteiligt sind bzw. deren Anwesenheit konstitutive Glutaminaseaktivität verhindert. Zu diesem Zweck wurden ausgewählte Reste in beiden Enzymen mittels gerichteter Mutagenese ausgetauscht, durch heterologe Genexpression in *E. coli* hergestellt, gereinigt und enzymologisch charakterisiert. Die Aufklärung des Glutaminaseaktivierungsmechanismus wird insbesondere dadurch erschwert, dass es bisher nicht gelungen ist, die 3D-Struktur einer ImGPS im aktivierte

Zustand zu lösen. Kristallisationsversuche waren bislang wegen der Instabilität des Substrates PRFAR nur teilweise erfolgreich. eine in einer früheren Dissertation (Häger 2005) beschriebene ImGPS-Mutante mit konstitutiver Glutaminaseaktivität, also eine im Komplex mit HisF auch ohne PRFAR bzw. seines Analogons ProFAR permanent aktiven Glutaminaseuntereinheit HisH, eröffnete nun die Möglichkeit die Kristallstruktur des ImGP-Komplexes mit HisH im aktivierte Zustand zu lösen.

3.2 Ergebnisse und Diskussion

3.2.1 Vorarbeiten

Der HisH:HisF Komplex aus *T. maritima* gehört nach der Einteilung von Orfan zu den „Hetero-Oligomeren“ (permanent hetero-oligomerer Komplex) (Ofran & Rost 2003). Die Untereinheiten binden dabei mit hoher Affinität in einer 1:1 Stöchiometrie aneinander. Zwischen den beiden aktiven Zentren besteht eine wechselseitige funktionale Abhängigkeit. Dies äußert sich darin, dass die Glutaminaseaktivität von HisH durch die Bindung des Substrates PRFAR (bzw. seines Analogons ProFAR oder des Produkts ImGP) aktiviert wird. Der bei der Glutaminasereaktion entstehende Ammoniak stellt das zweite Substrat für die Synthasereaktion dar und gelangt durch einen Kanal zum aktiven Zentrum von HisF (Chaudhuri *et al.* 2001; Douangamath *et al.* 2002).

Zu Beginn dieser Arbeit standen aus einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Matthias Wilmanns (EMBL Hamburg) neben der publizierten ImGPS 3D-Struktur des apo-Enzyms bereits ImGPS-Strukturen mit dem HisH-Substrat Gln sowie dem HisF-Produkt ImGP zusammen mit Gln zur Verfügung. Zusätzlich konnten 3D-Strukturen der Mutante HisH:HisF-D11N mit dem HisH-Produkt Glu und dem HisF-Produkt AICAR gelöst werden (Vega *et al.* unveröffentlichte Daten). Die durch die Bindung der verschiedenen Liganden induzierten Strukturänderungen an der Kontaktfläche zwischen HisH und HisF wurden von Häger (2005) im Detail zusammengefasst:

Die Bindung von Glutamin führt zur Öffnung des Salzbrückennetzwerkes durch eine Konformationsänderung von K99(HisF). Dabei bildet K99(HisF) über sein ϵ NH₂-Gruppe eine neue Interaktion mit der Hydroxylgruppe von Y138(HisH) aus. Außerdem hat die Bindung von Glutamin eine Rotation des HisF-Rückgrates um etwa 5° relativ zur apo-Struktur zur Folge, wodurch sich der lösungsmittelzugängliche Spalt zwischen dem Salzbrückennetzwerk und dem aktiven Zentrum von HisH vergrößert. Der Rest Q123(HisF) bewegt sich als Folge

der Glutaminbindung um 2 Å im Vergleich mit der apo-Struktur und bildet einen Teil der Substratbindetasche. D98(HisF) interagiert zum Einen mit gebundenem Glutamat und bildet zum Anderen mit K181(HisH) die einzige konservierte Salzbrücke über die Grenzfläche der beiden Enzyme aus.

Auf Grund dieser Erkenntnisse wurden die Reste D98(HisF), K99(HisF), Q123(HisF), Y138(HisH), K181(HisH) sowie Y138-K181(HisH) an der Kontaktfläche zu Alaninen mutiert, um ihre Bedeutung für die funktionale Interaktion zwischen den aktiven Zentren zu untersuchen. Abbildung 14 zeigt die Lage der ausgetauschten Reste.

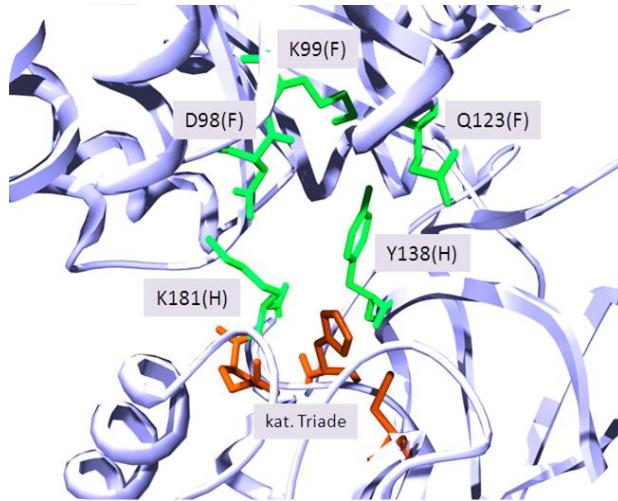


Abbildung 14: Bänderdarstellung der Kontaktfläche zwischen HisH und HisF.

Die zu Alanin mutierten Reste sind grün dargestellt. Zur Orientierung ist die katalytische Triade in rot gezeigt.

Zusätzlich wurden drei Reste im Ammoniakkanal von HisF (V48, F77 und L169) durch Alanine ersetzt um eine mögliche Rolle im Ammoniaktransport zu untersuchen.

Die ImGPS-Mutanten HisH:HisF-Q123A und HisH-Y138A:HisF wurden bereits in einer früheren Arbeit funktionell charakterisiert (Häger 2005). Während die Aktivität der Mutante HisH:HisF-Q123A nur geringfügige Unterschiede zum WT aufwies, zeigte die Mutante HisH-Y138A:HisF konstitutive Glutaminaseaktivität, also eine im Komplex permanent aktive Glutaminase in Abwesenheit von HisF-Liganden.

3.2.2 Gerichtete Mutagenese zur Herstellung der *hisH*- und *hisF*-Genkonstrukte

Die entsprechenden Mutationen wurden über Megaprimer-PCRs (2.3.3) mit Hilfe der in Kapitel 1.8 aufgelisteten Primer in das *hisH* bzw. *hisF* Gen eingeführt. Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit benutzten *hisF* und *hisH* Genkonstrukte mit ihren Restriktionsschnittstellen und Expressionsplasmiden aufgelistet.

pET11c <i>hisF</i> WT	(<i>NdeI/BamHI</i>)*	pDS <i>hisH</i> WT	(<i>SphI/HindIII</i>)*
pET11c <i>hisF</i> -D98A	(<i>NdeI/BamHI</i>)**	pDS <i>hisH</i> -Y138A	(<i>SphI/HindIII</i>)*
pET11c <i>hisF</i> -D98N	(<i>NdeI/BamHI</i>)**	pDS <i>hisH</i> -K181A	(<i>SphI/HindIII</i>)**
pET24a <i>hisF</i> -K99A	(<i>NdeI/BamHI</i>)	pDS <i>hisH</i> -Y138A-K181A	(<i>SphI/HindIII</i>)
pET11c <i>hisF</i> Q123A	(<i>NdeI/BamHI</i>)*	pET21a <i>hisA</i> wt	(<i>NdeI/NotI</i>)****
pet24a <i>hisF</i> V48A	(<i>NdeI/BamHI</i>)	pet24a <i>hisF</i> L169A	(<i>NdeI/BamHI</i>)
pet24a <i>hisF</i> F77A	(<i>NdeI/BamHI</i>)		

*(Häger 2005), **(Karin Babinger, unveröffentlichte Daten),

***Hilfsenzym für kinetische Messungen (Claren 2008)

3.2.3 Herstellung und Reinigung der HisF- und HisH-Mutanten

Von Zellen mit den verschiedenen Konstrukten wurden zunächst stets zwei einzelne Kolonien für eine analytische Probeexpression (siehe 2.5.1) in einem Volumen von 10 ml angezogen, um die Menge und Löslichkeit der produzierten Proteine zu kontrollieren.

Da die rekombinant hergestellten HisF- und HisH-Enzyme aus dem hyperthermophilen Bakterium *T. maritima* stammen, wurde nach präparativer Expression (siehe 2.5.3) als erster Reinigungsschritt der lösliche Zellextrakt erhitzt (siehe 2.5.5.1) und dadurch ein großer Teil der Wirtsproteine denaturiert und ausgefällt. Die weitere Aufreinigung der HisF- und HisH-Mutanten erfolgte über Ionenaustausch-Chromatographie (siehe 2.5.5.3) und, je nach Bedarf, über Ammoniumsulfat Fällung (ASF) (siehe 2.5.7) oder präparative Gelfiltration (2.5.6). Das Hilfsenzym HisA wurde über einen Hitzeschritt und mit Hilfe seines His₆-Tags über Metallaffinitäts-Chromatographie (siehe 2.5.5.2) gereinigt.

3.2.3.1 Heterologe Expression und Reinigung der HisF-Mutanten

Die Expression der *hisF*-Konstrukte erfolgte in frisch transformierten BL21(DE3) oder BL21(DE3)Rosetta Zellen üN in LB-Medium und wurde mit IPTG induziert. Der Verlauf einer Reinigung ist in Abbildung 15 exemplarisch für HisF-WT gezeigt.

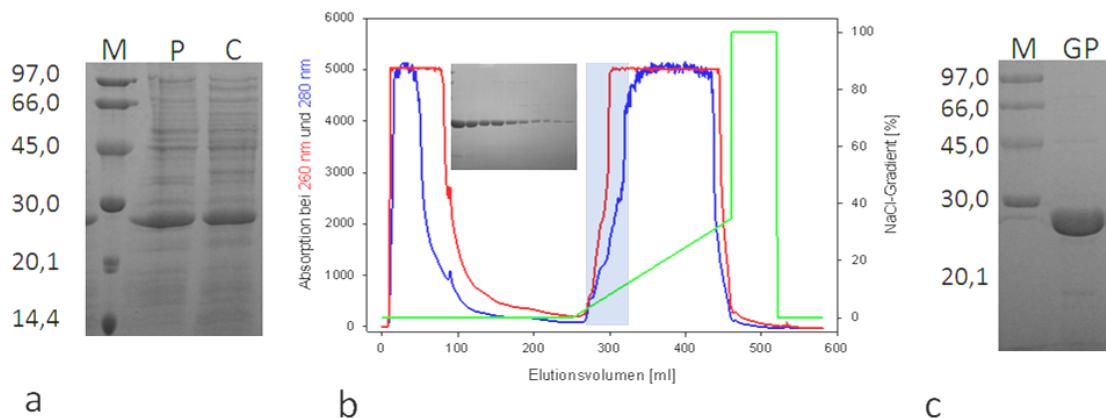


Abbildung 15: Reinigung des rekombinant exprimierten HisF-WT Proteins.

(a): SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) der Probeexpression. M: Markerproteine mit molaren Massen in kDa; P: unlösliche Zellfraktion (b): Elutionsprofil der Reinigung über Anionenaustauscher-Chromatographie, aufgenommen über die Messung der Absorption bei 260 nm (rot) und 280 nm (blau). Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 0 – 1,5 M NaCl (grün). Der Elutionsbereich ist blau hinterlegt und die SDS-PAGE der Elutionsfraktionen als Insert abgebildet (c): SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) der vereinigten Elutionsfraktionen. M: Markerproteine mit molaren Massen in kDa; GP: gereinigtes Protein.

Die Löslichkeit der HisF-Proteine lag bei ca. 50% (Abbildung 15a). Die Ausbeuten nach der Anionenaustauscher-Chromatographie (Abbildung 15c, 16) schwankten zwischen 20 und 60 mg gereinigtes Protein pro Liter Zellkultur. Etwaige DNA-Verunreinigungen wurden durch eine ASF mit 80 % Sättigung oder mittels präparativer Gelfiltration entfernt. Die Reinheit der Proteine wurde nach der Dialyse über SDS-PAGE abgeschätzt und lag in der Regel bei über 90 %.

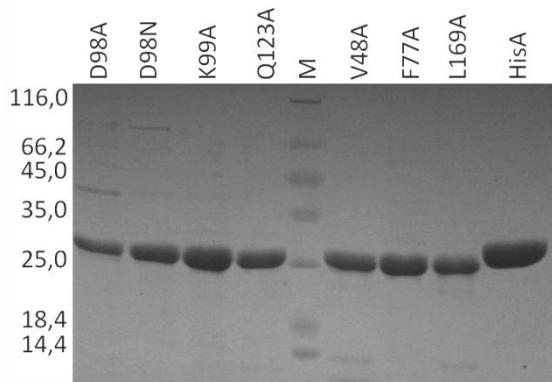


Abbildung 16: SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) zur Analyse des Reinheitsgrades der rekombinant hergestellten HisF-Proteine sowie des Hilfsenzyms HisA.

M: Markerproteine mit molaren Massen in kDa.

Gereinigtes Protein wurde in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80 °C gelagert.

3.2.3.2 Heterologe Expression und Reinigung der HisH-Mutanten

Die Expression der *hisH*-Konstrukte erfolgte in frisch transformierten SG200+50 oder KK8 Zellen üN in LB Medium und wurde mit IPTG induziert. Die Reinigung verlief analog zu den *hisF*-Konstrukten. In manchen Fällen wurde zusammen mit HisH ein zweites Protein

kogereinigt (Abbildung 17a). Beide Banden wurden durch N-terminale Sequenzierung identifiziert. Bei Bande 1 (Sequenz: MEXXITGYTX) handelt es sich um die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT), die als Resistenzgen auf dem pDS Vektor codiert ist. Die Sequenz von Bande 2 (MRIGIISVGP) entspricht dem N-Terminus der HisH-Sequenz. Zur Entfernung der CAT haben sich zwei Methoden bewährt. Zum Einen bildet die CAT im nativen Zustand ein Trimer (75 kDa) und kann daher über Gelfiltration von HisH (23 kDa) getrennt werden (Abbildung 17b). Zum Anderen kann die hohe Löslichkeit von HisH in 80 % Ammoniumsulfat genutzt werden, um die CAT nach Ausfällung mit 60 % Ammoniumsulfat abzutrennen (Abbildung 17c). Bei beiden Methoden gehen allerdings bis zu 50 % des HisH-Proteins verloren.

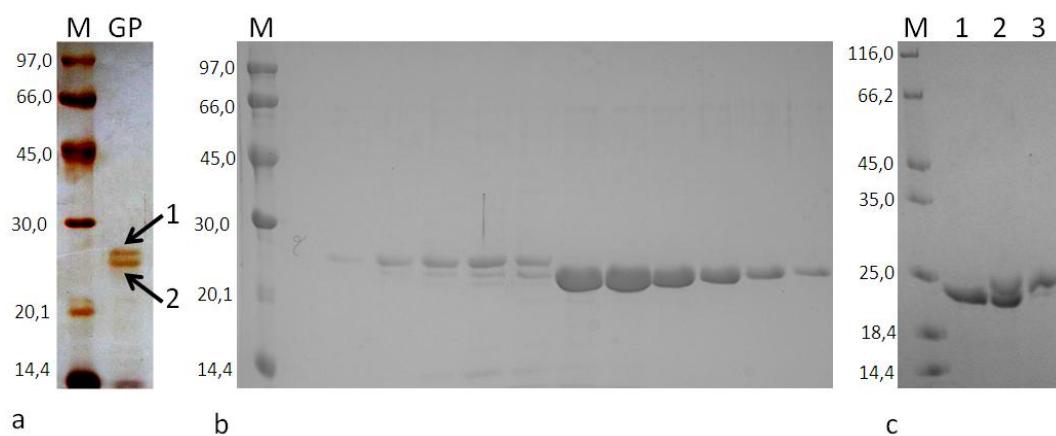


Abbildung 17: Verunreinigung einer HisH-Y138A Präparation mit Chloramphenicolacetyltransferase (CAT).

(a): SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid, Silberfärbung); GP: gereinigtes Protein. Pfeil 1 zeigt auf die CAT, Pfeil 2 auf HisH-Y138A. (b): SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) der Elutionsfraktionen nach Trennung von CAT und HisH-Y138A durch préparative Gelfiltration (Superdex 75). (c): Trennung von CAT und HisH-Y138A durch fraktionierte Ammoniumsulfat (ASF)-Fällung. 1: Pellet bei 80 % ASF; 2: Proteinlösung vor der Fällung; 3: Pellet bei 60 % ASF. M: Proteinmarker mit molaren Massen in kDa.

Die Gesamtausbeute der HisH-Reinigungen war stark von der Anzahl der Reinigungsschritte abhängig. In der Regel konnten zwischen 5 und 40 mg HisH Protein pro Liter Zellkultur gereinigt werden. Die Reinheit der Proteine wurde nach der Dialyse über SDS-PAGE abgeschätzt und lag bei über 90 % (Abbildung 18).

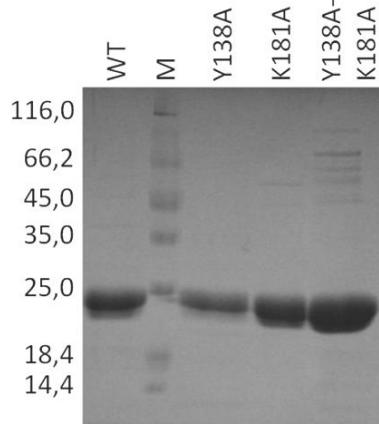


Abbildung 18: SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) zur Analyse des Reinheitsgrades der HisH-Proteine.
M: Proteinmarker mit molaren Massen in kDa.

Gereinigtes Protein wurde in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Funktionelle Charakterisierung der HisH- und HisF-Mutanten durch Enzymkinetiken im Fließgleichgewicht

Zur funktionellen Charakterisierung der HisH- und HisF-Mutanten wurden Aktivitätsmessungen im Fließgleichgewicht (*steady-state*) durchgeführt (Abbildung 19).

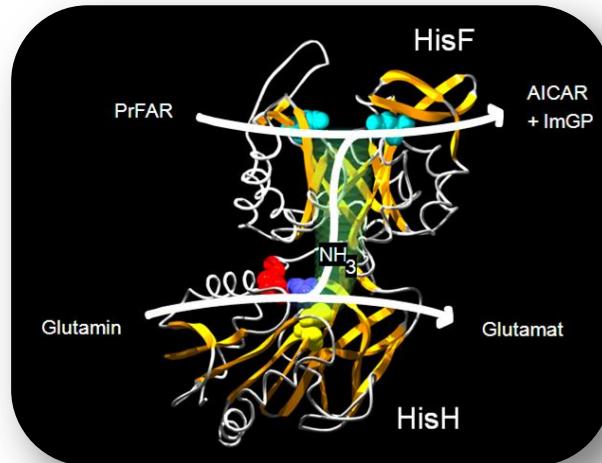


Abbildung 19: Bänderdiagramm der Kristallstruktur der ImGPS (HisH:HisF) aus *T. maritima* (Douangamath *et al.* 2002) mit den katalysierten Reaktionen.

Die katalytisch essentiellen Reste sind jeweils als Kugelmodelle dargestellt. HisF: Asp11, Asp130: hellblau. HisH: Cys84: gelb, His178: blau, Glu180: rot. Der Ammoniakkanal ist in grün symbolisiert.

Für jede Mutante wurden im ImGPS-Komplex die ammoniumabhängige HisF-Teilreaktion, die glutaminabhängige Gesamtreaktion sowie die Glutaminase-HisH-Teilreaktion unter *steady-state* gemessen und die katalytischen Parameter k_{cat} und K_M bestimmt (siehe 2.7).

Exemplarisch ist für jeden Test in Abbildung 20 eine Sättigungskurve für ImGPS-WT gezeigt.

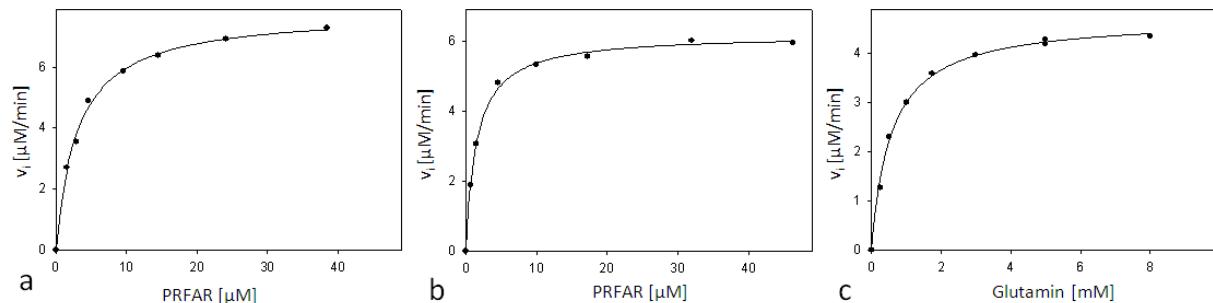


Abbildung 20: PRFAR- und Glutamin-Sättigungskurven von ImGPS-WT zur Quantifizierung der drei gemessenen ImGPS Reaktionen.

Aufgetragen ist jeweils die Anfangsgeschwindigkeit v_i bei 25 °C gegen die Konzentration des Substrates. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis eines hyperbolischen *Fits* durch das Programm Sigma Plot. (a): ammoniumabhängige Reaktion: Der Umsatz von PRFAR erfolgte durch 0,1 μM HisF und 0,2 μM HisH in 50 mM Tris Acetat pH 8,5 mit 100 mM Ammoniumacetat (entspricht ca. 17 mM Ammoniak). Das HisF-Substrat wurde als ProFAR zugegeben und durch 0,6 μM HisA *in situ* zu PRFAR umgesetzt. (b): Gesamtreaktion: Der Umsatz von PRFAR erfolgte durch 0,1 μM HisF und 0,2 μM HisH in 50 mM Tris Acetat pH 8,0 mit 5 mM Glutamin. Es wurde ProFAR zugegeben und durch 0,6 μM HisA *in situ* zu PRFAR umgesetzt. Die Reaktionen a und b wurden spektroskopisch bei 300 nm verfolgt. (c): Glutaminasereaktion: Der Umsatz von Glutamin erfolgte durch 2 μM HisF und 1 μM HisH in 50 mM Tricine KOH pH 8,0 in Anwesenheit von 40 μM ProFAR. Die Glutamatbildung wurde über die gekoppelte GDH-Reaktion verfolgt (2.7.3.1).

3.2.4.1 Ammoniumabhängige Reaktion

Für die ammoniumabhängige HisF-Teilreaktion (2.7.1) wurde der Umsatz von PRFAR zu AICAR spektroskopisch bei 300 nm verfolgt. Dazu wurde als Amiddonor Ammoniak in sättigenden Konzentrationen in Form von Ammoniumacetat in den Reaktionspuffer gegeben. Da PRFAR schnell spontan hydrolysiert (Klem & Davisson 1993) wurde es *in situ* mit dem Hilfsenzym HisA aus dem Vorläufer ProFAR hergestellt. Nach Aufnahme vollständiger Umsatzkurven wurde die tatsächlich umgesetzte Menge PRFAR über die gesamte Absorptionsänderung und die Anfangsgeschwindigkeit über die Anfangssteigung mit Hilfe des differentiellen Extinktionskoeffizienten ($\Delta\epsilon_{300}$ (PRFAR-AICAR) = 5637 M⁻¹cm⁻¹) berechnet. Tabelle 4 zeigt die aus den resultierenden Sättigungskurven abgeleiteten katalytischen Parameter.

Tabelle 4: Steady-state enzymkinetische Konstanten der ammoniumabhängigen HisF-Teilreaktion.

Die Messungen erfolgten bei 25 °C in 50 mM Tris Acetat pH 8,5 mit 100 mM Ammoniumacetat. Die Konzentration an ProFAR, das *in situ* zu PRFAR umgewandelt wurde, wurde variiert.

	k_{cat} [s ⁻¹]	K_M^{PRFAR} [μM]	k_{cat} / K_M^{PRFAR} [M ⁻¹ s ⁻¹]	(k_{cat}/K_M) Mutante /WT
HisF*	2,4	3,9	$6 \cdot 10^5$	
HisF ^{1*}	2,2	1,7	$1,2 \cdot 10^6$	
HisH:HisF	$1,2 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,6$	$(3,3 \pm 0,1) \cdot 10^5$	1
HisH:HisF ²	8,1	17	$4,8 \cdot 10^5$	
HisH:HisF-D98A	$2,3 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,7$	$(1,2 \pm 0,5) \cdot 10^6$	3,6

HisH:HisF-D98A ³	2,4	2,5	$1 \cdot 10^6$	
HisH:HisF-K99A	$0,2 \pm 0,02$	$6,2 \pm 1,8$	$(3,2 \pm 1,0) \cdot 10^5$	0,1
HisH:HisF-Q123A	$0,6 \pm 0,1$	$3,3 \pm 1,5$	$(1,8 \pm 0,7) \cdot 10^5$	0,55
HisH:HisF-Q123A ²	0,5	4,9	$1 \cdot 10^5$	
HisH-Y138A:HisF	$1,4 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,8$	$(7,8 \pm 0,4) \cdot 10^5$	2,4
HisH-Y138A:HisF ²	1,9	2,9	$6,6 \cdot 10^5$	
HisH-K181A:HisF	$1,7 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$	$(1,8 \pm 0,4) \cdot 10^6$	5,5
HisH-Y138A:HisF-D98A	$2,5 \pm 0,1$	$2,2 \pm 1,0$	$(1,1 \pm 1,0) \cdot 10^6$	3,3
HisH-Y138A-K181A:HisF-D98A	$0,9 \pm 0,1$	$0,24 \pm 0,14$	$(3,6 \pm 2,3) \cdot 10^6$	10,9

Werte mit Standardabweichung sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. *Messungen wurden in Abwesenheit von HisH durchgeführt. Daten aus ¹Beismann-Driemeyer und Sterner 2001; ²Häger 2005; ³Karin Babinger, unveröffentlichte Daten.

Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, dass die K_M^{PRFAR} - und k_{cat} -Werte früherer Messungen für wildtypisches HisF, HisH:HisF-D98A, HisH:HisF-Q123A und HisH-Y138A:HisF im Wesentlichen reproduziert werden konnten. Lediglich die von Häger (2005) ermittelten WT-Werte liegen aus ungeklärten Gründen deutlich über den in dieser Arbeit gemessenen. Da die Werte von Häger (2005) auch deutlich über den HisF-Werten von Beismann-Driemeyer & Sterner (2001) liegen, wurden sie als Ausreißer behandelt und nicht in die weitere Interpretation einbezogen.

Im Allgemeinen führen die Mutationen nur zu moderaten Änderungen von Wechselzahl, Michaelis-Konstante und katalytischem Effizienzparameter. Daraus kann geschlossen werden, dass die Mutationen keinen Einfluss auf das aktive Zentrum von HisF haben.

3.2.4.2 Glutaminabhängige Gesamtreaktion

Für die glutaminabhängige Gesamtreaktion (siehe 2.7.2) wurde anstelle von Ammoniumsalzen Glutamin als Amiddonor in sättigenden Konzentrationen zugegeben. Ansonsten wurde genauso verfahren wie bei der ammoniumabhängigen Reaktion. Tabelle 5 zeigt die aus den Sättigungskurven abgeleiteten katalytischen Parameter.

Tabelle 5: Steady-state enzymkinetische Konstanten der glutaminabhängigen Gesamtreaktion.

Die Messung erfolgte bei 25 °C in 50 mM Tris Acetat, pH 8,0 mit 5 mM Glutamin. Die Konzentration an ProFAR, das *in situ* zu PRFAR umgewandelt wurde, wurde variiert.

	k_{cat} [s ⁻¹]	K_M^{PRFAR} [μM]	$k_{\text{cat}} / K_M^{\text{PRFAR}}$ [M ⁻¹ s ⁻¹]	(k_{cat} / K_M) Mutante / WT
HisH:HisF	$1,1 \pm 0,1$	$2,0 \pm 1,2$	$(5,5 \pm 0,3) \cdot 10^5$	1
HisH:HisF ¹	0,8	1,5	$5,3 \cdot 10^5$	
HisH:HisF ²	1	3,5	$2,9 \cdot 10^5$	
HisH:HisF-D98A ^a	$>> 3,8 \cdot 10^{-3}$	$>> 50$	$7,5 \cdot 10^1$	$<< 1,5 \cdot 10^{-4}$
HisH:HisF-D98A ^{a3}	$>> 4,2 \cdot 10^{-3}$	$>> 50$	$8,3 \cdot 10^1$	$<< 1,5 \cdot 10^{-4}$
HisH:HisF-K99A	$0,1 \pm 0,03$	$1,5 \pm 0,1$	$(7 \pm 3) \cdot 10^4$	0,12

HisH:HisF-Q123A	$0,1 \pm 0,02$	$1,3 \pm 0,4$	$(8 \pm 5) \cdot 10^4$	0,14
HisH:HisF-Q123A ²	$> 0,17$	6,6	$2,5 \cdot 10^4$	
HisH-Y138A:HisF	$0,8 \pm 0,06$	$0,2 \pm 0,06$	$(4,0 \pm 0,7) \cdot 10^6$	7,3
HisH-Y138A:HisF ²	0,7	0,2	$6,9 \cdot 10^6$	
HisH-K181A:HisF	$0,9 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,06$	$(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^6$	2,7
HisH-Y138A:HisF-D98A	$0,1 \pm 0,01$	$2,6 \pm 0,3$	$(4 \pm 0,3) \cdot 10^4$	0,07
HisH-Y138A-K181A:HisF	$0,13 \pm 0,01$	n.b.	n.b.	

Werte mit Standardabweichung sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. ^a innerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs von PRFAR (0-50 μ M) stieg die Anfangsgeschwindigkeit linear mit der Substratkonzentration an, weshalb nur der Effizienzparameter berechnet werden konnte. n.b.: nicht bestimmt. Daten aus ¹Beismann-Driemeyer und Sterner 2001; ²Häger 2005; ³Karin Babinger, unveröffentlichte Daten.

Tabelle 5 zeigt, dass abgesehen von der Mutante HisH:HisF-Q123A die Werte früherer Messungen reproduziert werden konnten. Dabei ist zu beachten, dass HisH:HisF-Q123A von Häger (2005) nicht unter Glutaminsättigung vermessen wurde, weshalb die Werte nicht direkt vergleichbar sind.

In der Mutante HisH:HisF-D98A erhöhte sich K_M^{PRFAR} so stark, dass im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich die Anfangsgeschwindigkeit linear mit der PRFAR-Konzentration zunahm. Aus der gemessenen Steigung wurde ein k_{cat}/K_M^{PRFAR} berechnet, der um vier Größenordnungen unterhalb des WT-Wertes lag. Dieser Effekt wurde durch den Y138A(HisH) Austausch teilweise kompensiert, da in der Doppelmutante HisH-Y138A:HisF-D98A die katalytische Effizienz nur noch 14-fach unterhalb der des WTs lag. Die Doppelmutante HisH-Y138A-K181A zeigte eine derart starke Erniedrigung des K_M^{PRFAR} , dass der Wert nicht mehr zuverlässig bestimmt werden konnte. Die Gründe für die stark veränderten K_M^{PRFAR} -Werte sind unklar, da die Reste weit vom aktiven Zentrum von HisF entfernt liegen. Die k_{cat} - und K_M^{PRFAR} -Werte der anderen Mutanten weichen dagegen maximal um einen Faktor 10 von den Parametern des WTs ab, d.h. ihr Einfluss auf die Aktivität ist als moderat einzustufen.

3.2.4.3 Glutaminase-HisH-Teilreaktion in Anwesenheit von ProFAR

Die Glutaminase-Teilreaktion von wildtypischem HisH (siehe 2.7.3) wird nur dann mit messbarer Geschwindigkeit katalysiert, wenn ein Ligand an das aktive Zentrum von HisF gebunden hat (Beismann-Driemeyer & Sterner 2001). Für die hier durchgeföhrten Messungen wurde das Substratanalogon ProFAR in sättigenden Konzentrationen eingesetzt, da das eigentliche Substrat PRFAR schnell hydrolysiert (Klem & Davisson 1993). Die Hydrolyse von Glutamin liefert kein spektroskopisches Signal im UV-Vis Bereich. Daher wurde die Bildung des Glutamats über die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) an die Reduktion von NAD^+ gekoppelt und über den Anstieg der Absorption bei 340 nm verfolgt (siehe 2.7.3.1).

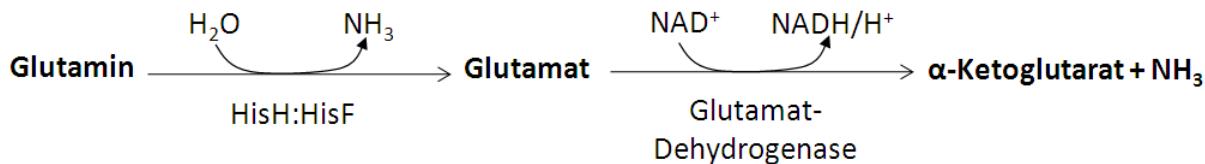


Abbildung 21: Die Glutaminase-HisH-Teilaktivität kann über die Glutamat-Produktion in einem gekoppelten enzymatischen Test nachgewiesen werden.

Das von HisH gebildete Glutamat wird von der GDH unter Reduktion von NAD^+ zu NADH in α -Ketoglutarat und Ammoniak umgesetzt. Die NADH -Bildungsrate wird anhand der Absorptionszunahme bei 340 nm berechnet ($\Delta\epsilon_{340}$ (NADH-NAD^+) = 6300 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Tabelle 6 zeigt die aus den Sättigungskurven abgeleiteten katalytischen Parameter der Glutaminase-HisH-Teilreaktion.

Tabelle 6: Steady-state enzymkinetische Konstanten der Glutaminase-HisH-Teilreaktion in Anwesenheit von ProFAR.

Die Messungen der Glutamatbildung erfolgten bei 25 °C in 50 mM Tricine/KOH pH 8,0 mit 40 μM ProFAR.

	k_{cat} [s^{-1}]	K_M^{Gln} [mM]	$k_{cat} / K_M^{\text{Gln}}$ [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	(k_{cat}/K_M) Mutante / WT
HisH:HisF	$0,08 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,3$	$(1,3 \pm 0,4) \cdot 10^2$	1
HisH:HisF ¹	0,1	0,5	$0,2 \cdot 10^3$	
HisH:HisF ²	0,22	3,7	$0,06 \cdot 10^3$	
HisH:HisF-D98A ^a			$(< 1 \pm 0,8) \cdot 10^1$	$< 0,12$
HisH:HisF-K99A	$0,02 \pm 0,003$	$1,0 \pm 0,2$	$(2 \pm 0,2) \cdot 10^1$	0,15
HisH:HisF-Q123A	$0,02 \pm 0,004$	$1,0 \pm 0,7$	$(2 \pm 0,6) \cdot 10^1$	0,15
HisH:HisF-Q123A ²	0,1	31,4	3	
HisH-Y138A:HisF	$3,0 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,03$	$(10,0 \pm 3) \cdot 10^3$	77
HisH-Y138A:HisF ²	0,5	11	$4,5 \cdot 10^1$	
HisH-K181A:HisF	$2,4 \pm 0,2$	$0,37 \pm 0,05$	$(6,5 \pm 0,9) \cdot 10^3$	50
HisH-Y138A:HisF-D98A	$0,01 \pm 0,004$	$0,6 \pm 0,3$	$(2 \pm 0,8) \cdot 10^1$	0,15
HisH-Y138A-K181A:HisF	$2,4 \pm 0,4$	$0,16 \pm 0,07$	$(15 \pm 0,23) \cdot 10^3$	115

Werte mit Standardabweichung sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. ^aEventuell vorhandene Aktivität liegt unterhalb der Empfindlichkeit des Assays, deshalb wurde als Obergrenze die katalytische Effizienz der schlechtesten Mutante angegeben. Daten aus ¹Beismann-Driemeyer und Sterner 2001; ²Häger 2005.

Die Daten für den wildtypischen Komplex stimmen mit denen von Beismann-Driemeyer und Sterner (2001) überein. Der Vergleich mit Häger (2005) zeigt dagegen, dass die dort bestimmten K_M^{Gln} -Werte deutlich über den in dieser Arbeit gemessenen liegen. Weiterhin ist der k_{cat} -Wert für HisH-Y138A:HisF um den Faktor 6 niedriger. Der Grund für die Abweichungen ist nicht bekannt. Der in dieser Messreihe bestimmte k_{cat} -Wert für HisH-Y138A:HisF wird durch die Messungen mit dem diskontinuierlichen Assay (siehe unten) bestätigt, weshalb die Daten von Häger (2005) für die weitere Diskussion ignoriert wurden.

Während die K_M^{Gln} -Werte aller Mutanten vergleichbar sind, treten bei den k_{cat} -Werten drastische Unterschiede auf. Für die Mutante HisH:HisF-D98A lag die Glutaminaseaktivität unterhalb der Nachweisgrenze des Assays. Wie schon bei der Gesamtreaktion war die Doppelmutante HisH-Y138A:HisF-D98A auch im Glutaminaseassay deutlich aktiver, wobei die katalytische Effizienz nur etwa 7-fach unterhalb der des WTs lag. Die Mutanten mit den HisH Austauschen Y138A, K181A und Y138A-K181A zeigten einen stark erhöhten k_{cat} -Wert.

In der Glutaminasereaktion wird neben Glutamat auch Ammoniak gebildet. Dieser lässt sich durch die Umkehr der gekoppelten GDH Reaktion ebenfalls nachweisen (Abbildung 22).

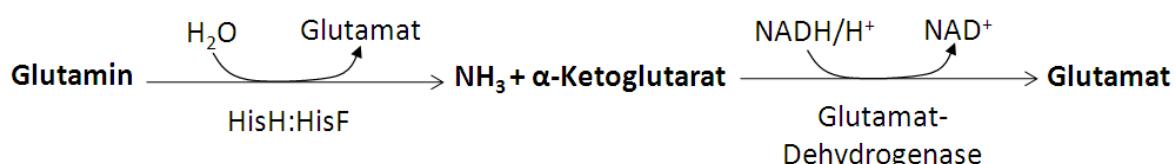


Abbildung 22: Die Glutaminase-HisH-Teilaktivität kann über die NH_3 -Produktion in einem gekoppelten enzymatischen Test nachgewiesen werden.

Der von HisH gebildete Ammoniak wird von der GDH unter Oxidation von NADH zu NAD^+ mit α -Ketoglutarat zu Glutamat umgesetzt. Die NAD^+ -Bildungsrate wird anhand der Absorptionsabnahme bei 340 nm berechnet ($\Delta\epsilon_{340} (\text{NADH-NAD}^+) = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

In Abbildung 23 sind exemplarisch Umsatzkurven mit wildtypischem Komplex und HisH-K181A:HisF gezeigt.

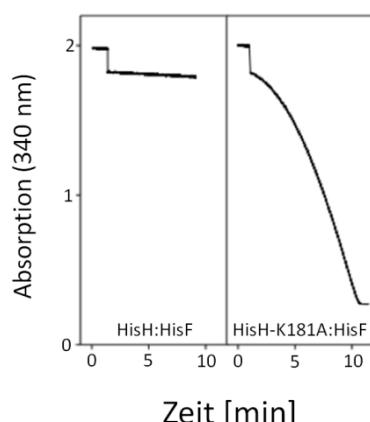


Abbildung 23: Glutaminase-HisH-Teilaktivität gemessen anhand der Freisetzung von Ammoniak.

Exemplarisch sind die Kurven von HisH:HisF und HisH-K181A:HisF gezeigt. Die Messung der Ammoniakbildung erfolgte bei 25 °C in 50 mM Tricine/KOH pH 8,0 mit 40 μM ProFAR. Sowohl ProFAR als auch Glutamin lagen in sättigenden Konzentrationen vor. Die maximale Umsatzrate wurde jeweils nach der *lag*-Phase im steilsten Bereich der Kurve gemessen.

Bei diesen Messungen, die alle unter Sättigung mit ProFAR und Glutamin durchgeführt wurden, war zu Beginn eine deutliche *lag*-Phase zu erkennen. Diese wurde nicht ausgewertet,

sondern stattdessen die anschließende Maximalgeschwindigkeit bestimmt. Tabelle 7 zeigt, die abgeleiteten k_{cat} -Werte der Glutaminase-HisH-Teilreaktion.

Tabelle 7: Steady-state enzymkinetische Konstanten der Glutaminase-HisH-Teilreaktion in Anwesenheit von ProFAR.

Die Messung der Ammoniakbildung erfolgte bei 25 °C in 50 mM Tricine/KOH pH 8,0 mit 40 µM ProFAR. Sowohl ProFAR als auch Glutamin lagen in sättigenden Konzentrationen vor.

	$k_{cat} [s^{-1}]$
HisH:HisF	$0,04 \pm 0,02$
HisH:HisF-D98A	keine messbare Aktivität
HisH:HisF-K99A	$0,009 \pm 0,002$
HisH:HisF-Q123A	$0,01 \pm 0,003$
HisH-Y138A:HisF	$2,2 \pm 0,3$
HisH-K181A:HisF	$3,3 \pm 0,2$
HisH-Y138A-K181A:HisF	$1,9 \pm 0,02$

Die anhand des freigesetzten Ammoniaks ermittelten k_{cat} -Werte passen gut zu den Werten aus dem Glutamatnachweis, liegen aber abgesehen von der Mutante HisH-K181A etwas darunter.

3.2.4.4 Glutaminase-HisH-Teilreaktion in Abwesenheit von ProFAR – Konstitutive Glutaminaseaktivität

Die Mutante HisH-Y138A:HisF zeigte konstitutive Glutaminaseaktivität. Dies bedeutet, dass auch ohne den HisF-Liganden ProFAR Glutamin hydrolysiert wurde (Häger 2005). Eine ähnliche Beobachtung wurde mit der Mutante HisH-K181A:HisF gemacht. In Kombination bewirken die beiden Austausche einen mehr als additiven Aktivitätszuwachs. Kontrollmessungen deuteten jedoch darauf hin, dass die in Abwesenheit von ProFAR detektierte Glutaminaseaktivität durch das im Assay vorhandene NAD^+ stimuliert wird. Diese Vermutung konnte durch die Detektion des freigesetzten NH_3 über ^{14}N -NMR Messungen bestätigt werden (Christoph Liebold, Universität Regensburg) (Abbildung 24).

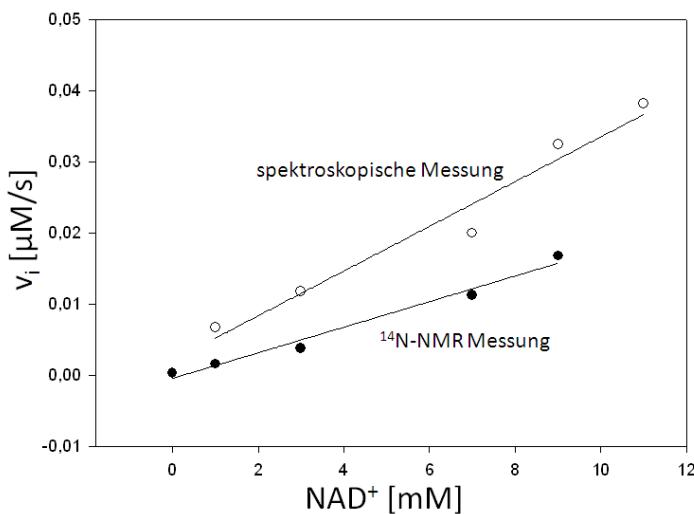


Abbildung 24: UV-spektroskopische und ¹⁴N-NMR Messung der NAD⁺ stimulierten Glutaminaseaktivität von HisH:HisF.

○:UV-spektroskopische Messung über den GDH-Assay (siehe Abbildung 21) in 50 mM Tricine/KOH pH 8,5; 1 μM HisH:HisF Komplex; 5 mM Glutamin. Die NAD⁺ Konzentration wurde von 1 bis 11 mM variiert. ●: ¹⁴N-NMR Messung in 50 mM Tricine/KOH pH 8,5; 45 μM HisH:HisF Komplex, 100 mM Glutamin. Die NAD⁺-Konzentration wurde von 0 bis 9 mM variiert.

Damit wurde zusätzlich zu ProFAR und ImGP, mit NAD⁺ durch zwei unabhängige Methoden, eine dritte Substanz identifiziert, die in der Lage ist die Glutaminasereaktion zu stimulieren. Daher musste zur Bestimmung der konstitutiven Glutaminaseaktivität ein diskontinuierlicher Assay etabliert werden. Bei diesem Assay werden Glutamatbildung durch den HisH:HisF Komplex und Glutamatbestimmung durch die GDH mit Hilfe eines Ultrafiltrationsschritts voneinander getrennt (Abbildung 25). Dadurch wird verhindert, dass NAD⁺ bzw. das NAD⁺-Analogon APAD⁺ die Glutaminaseaktivität stimulieren.

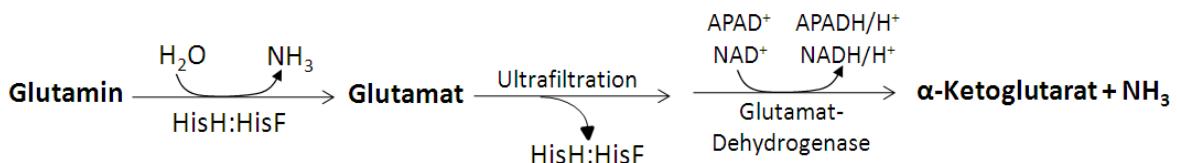


Abbildung 25: Die konstitutive Glutaminase-HisH-Teilaktivität wird in einem diskontinuierlichen enzymatischen Test bestimmt.

Das von HisH:HisF gebildete Glutamat wird über einen Ultrafiltrationsschritt vom HisH:HisF Komplex abgetrennt und anschließend von der GDH unter Reduktion von APAD⁺ zu APADH oder NAD⁺ zu NADH in α -Ketoglutarat und Ammoniak umgesetzt. Die Menge des gebildeten APADH (NADH) wird anhand der Absorptionsänderung bei 363 nm (340 nm) berechnet ($\Delta\epsilon_{363}$ (APADH-APAD⁺) = 8900 M⁻¹cm⁻¹; $\Delta\epsilon_{340}$ (NADH-NAD⁺) = 6300 M⁻¹cm⁻¹).

In Abbildung 26a sind die Auswirkungen der unterschiedlichen Redoxpotentiale von NAD⁺/NADH (-316 mV) und APAD⁺/APDAH (-248 mV) (Wohlfarth & Diekert 1991) auf die Auswertung des diskontinuierlichen Assays anhand von Eichgeraden gezeigt. Da bei NAD⁺/NADH/H⁺ das Gleichgewicht auf der oxidierten Seite liegt, besteht bereits ab einer

Konzentration von 30 μM keine Identität mehr zwischen der Menge an eingesetztem Glutamat und der Menge an aus NAD^+ erzeugtem NADH. Dagegen ist die 1:1 Stöchiometrie mit APAD^+ wegen der günstigeren Gleichgewichtslage bis mindestens 100 μM Glutamat gegeben. Die Auswertung der Messungen mit APAD^+ konnte daher über den differentiellen molaren Extinktionskoeffizienten ($\Delta\epsilon_{363}(\text{APADH-APAD}^+) = 8900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) erfolgen, während für NAD^+ eine Eichgerade erstellt werden musste. Abbildung 26b zeigt den linearen Zusammenhang zwischen Inkubationszeit vor und der Glutamatbestimmung mit APAD^+ nach der Ultrafiltration.

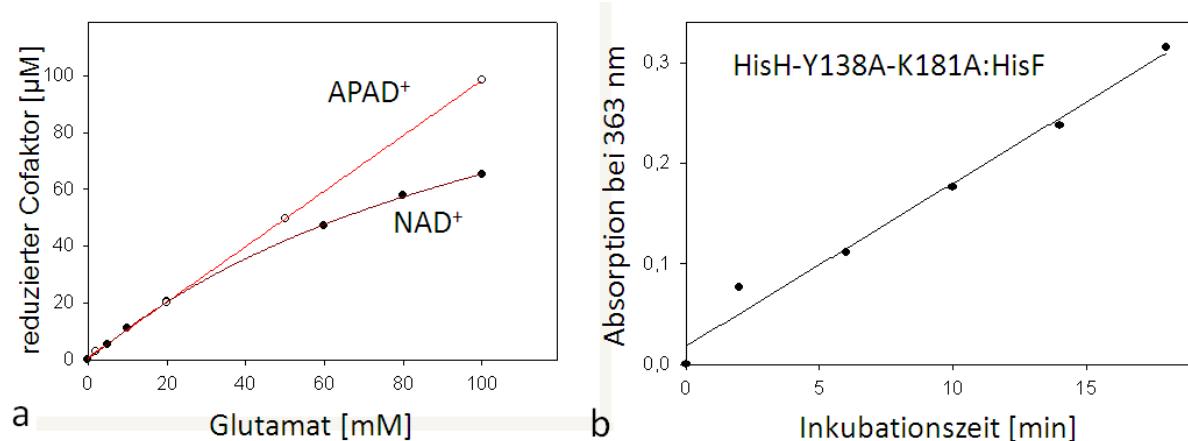


Abbildung 26: Diskontinuierlicher enzymatischer Test zur Bestimmung der konstitutiven Glutaminase-HisH-Teilaktivität.

(a): Unterschiedliche Redoxpotentiale von NAD^+/NADH und $\text{APAD}^+/\text{APADH}$ beeinflussen den Verlauf der Eichgeraden für den diskontinuierlichen Assay. Die Kurven zeigen die Menge an reduzierten Cofaktoren, berechnet über die jeweiligen molaren differentiellen Extinktionskoeffizienten, in Abhängigkeit von der eingesetzten Glutamatkonzentration. (b): linearer Zusammenhang zwischen Inkubationszeit und Absorptionsänderung im diskontinuierlichen Assay mit HisH-Y138A-K181A:HisF. Ansatz: Schritt 1:0,25 μM HisH-Y138A-K181A, 0,5 μM HisF, 10 mM Glutamin in 50 mM Tris/Acetat. Schritt 2: 1mg/ml GDH 0,8 mM APAD^+ (Verdünnungsfaktor von Schritt 1 zu Schritt 2: 7,5).

Zur Bestimmung der k_{cat} -Werte wurden jeweils nach drei Inkubationszeiten Aliquots aus den Ansätzen entnommen und die gebildete Glutamatmenge bestimmt. Zur Kontrolle des diskontinuierlichen Assays wurden auch Messungen in Gegenwart von ProFAR durchgeführt und die ermittelten k_{cat} -Werte mit jenen aus dem kontinuierlichen Assay verglichen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 gezeigt. Da die Resultate mit den beiden Cofaktoren sehr ähnlich waren, wurden jeweils die Mittelwerte aus beiden Messreihen gebildet. Die Werte für APAD^+ und NAD^+ sind getrennt im Anhang (siehe 9.1) aufgelistet.

Tabelle 8: Wechselzahlen der Glutaminase-HisH-Teilreaktion in Abwesenheit und Anwesenheit von ProFAR.

Die Messungen erfolgten bei 25 °C in 50 mM Tricine/KOH pH 8,0 mit Hilfe des diskontinuierlichen Assays. Die Konzentration an Glutamin betrug in allen Ansätzen 10 mM.

	$k_{cat} [min^{-1}]$	$k_{cat} [s^{-1}] (ProFAR)$
HisH:HisF	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,026
HisH-Y138A:HisF	1,3 ± 0,3	3,2 ± 0,5
HisH-K181A:HisF	1,7 ± 0,25	7,3 ± 0,9
HisH-Y138A-K181A:HisF	132 ± 68	
HisH-Y138A:HisF-D98A	0,07 ± 0,04	

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen, aus jeweils sechs Messungen in Abwesenheit von ProFAR, drei davon mit APAD⁺ und drei mit NAD⁺, und aus drei Messungen mit NAD⁺ in Anwesenheit von ProFAR.

Im Fall des wildtypischen Komplexes und HisH-Y138A:HisF stimmen die k_{cat} -Werte des diskontinuierlichen Assays in Anwesenheit von ProFAR sehr gut mit jenen aus dem kontinuierlichen Assay überein (vgl. Tabellen 6 und 7). Für die Mutante HisH-K181A:HisF ergab sich ein im diskontinuierlichen Assay fast dreimal höherer k_{cat} -Wert. Der Grund dafür ist unklar. Die in Abwesenheit von ProFAR ermittelten k_{cat} -Werte waren generell um eine Größenordnung niedriger. Nichtsdestoweniger lagen die durch Y138A(HisH) und K181A(HisH) verursachten konstitutiven Glutaminaseaktivitäten 43-fach bzw. 57-fach über der entsprechenden Aktivität des WTs. Im Fall der Doppelvariante erhöht sich dieser Faktor auf 4400. Zusätzlich zu den besprochenen Austauschen wurde die Glutaminaseaktivität in Abwesenheit von ProFAR bei den Mutanten HisH:HisF-V48A, HisH:HisF-F77A und HisH:HisF-L169A vermessen, bei denen große Reste am Anfang (F77) bzw. innerhalb des Ammoniakanals (V48, L169) durch Alanin ersetzt wurden. Keine der Mutanten zeigte jedoch konstitutive Glutaminaseaktivität.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Austausche Q123A(HisF) und K99A(HisF) in allen drei untersuchten Reaktonen nur zu moderaten Veränderungen der katalytischen Parameter führen, wogegen die Austausche D98A(HisF), Y138A(HisH), K181A(HisH) und Y138A-K181A(HisH) die katalytische Effizienz des HisH:HisF Komplexes, sowohl in der Gesamtreaktion als auch in der HisH-Teilreaktion drastisch beeinflussten. Im Folgenden konzentriert sich diese Arbeit daher auf die zweite Gruppe von Austauschen.

3.2.5 Vergleich der kinetischen Parameter mit den entsprechenden Werten der ImGPS aus *S. cerevisiae* (His7)

Die Reste D98(HisF), Q123(HisF), Y138(HisH) und K181(HisH) entsprechen den Resten D359, Q397, Y144 und K196 in His7 aus *S. cerevisiae*. Der Einfachheit halber wird im Folgenden die Nummerierung aus *T. maritima* beibehalten. In His7 wurden neben anderen, die Austausche D98A, Q123A, K181A, (Myers *et al.* 2005) sowie Y138F (Amaro *et al.* 2005) charakterisiert. Die Glutaminaseaktivität wurde bei den His7 Enzymen anstelle von ProFAR mit PRFAR stimuliert. Im Allgemeinen stimmen die Daten für die His7-Mutanten mit den im vorigen Kapitel für den HisH:HisF Komplex beschriebenen Resultaten überein. In der ammoniumabhängigen Reaktion waren auch im His7-Kontext bei keiner Mutante wesentliche Unterschiede zum WT festzustellen. Durch den Austausch D98A wurde die Stimulation der Glutaminaseaktivität durch PRFAR fast vollständig unterbunden. Dazu passend war die katalytische Effizienz der glutaminabhängigen Gesamtreaktion um den Faktor 10000 reduziert. Daraus wurde geschlossen, dass D98 ein wichtiger Rest für die Weiterleitung des PRFAR-Bindungssignals ans aktive Zentrum der Glutaminase ist. Der Austausch K181A führte zu einer 10-fachen Stimulation der Glutaminaseaktivität in Abwesenheit und einer 4-fachen Stimulation in Anwesenheit von PRFAR bei praktisch unveränderter Gesamtaktivität. Damit sind die Effekte weniger gravierend als im HisH:HisF Komplex, weisen aber die gleiche Tendenz auf. Anders als der in dieser Arbeit untersuchte Austausch Y138A, entsprachen die kinetischen Parameter der Mutante His7-Y138F weitgehend denen des wildtypischen Enzyms

3.2.6 Die Rolle von D98(HisF) während der Glutaminhydrolyse

Der Rest D98(HisF) sitzt am N-terminalen Ende von β -Strang 4 an der Kontaktfläche zu HisH und bildet zusammen mit K181(HisH) die einzige konservierte Salzbrücke über die Kontaktfläche zwischen HisH und HisF aus (Abbildung 27).

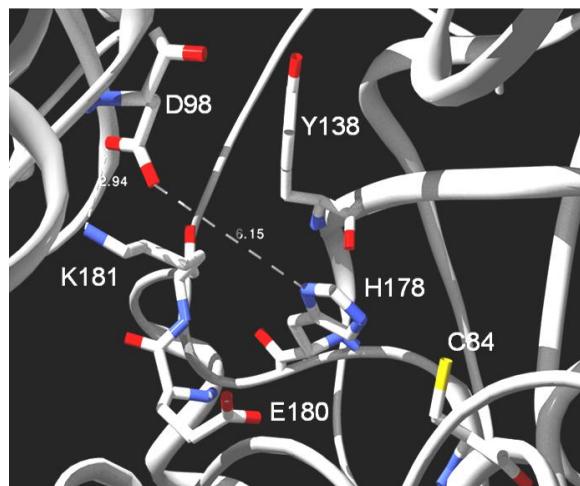


Abbildung 27: Bänderdiagramm des aktiven Zentrums von HisH im HisH:HisF Komplex mit wichtigen Kontaktflächenresiduen.

Hervorgehoben sind die Aminosäurereste D98(HisF), Y138A(HisH) und K181(HisH) sowie die Reste der katalytischen Triade aus HisH C84, H178 und E180. Abstandsmessungen sind in Å angegeben und als unterbrochene Linien dargestellt.

Die kinetischen Messungen belegen, dass D98(HisF) eine entscheidende Rolle für die Aktivität der Glutaminase HisH spielt. So führte der Austausch D98A(HisF) zu einer Verringerung der Katalyse bis unterhalb der Nachweigrenze des Assays. In Gegenwart der aktivierenden Mutation Y138A(HisH), konnte der Beitrag des Austausches D98A(HisF) jedoch quantifiziert werden. Wie Tabelle 9 zeigt, reduziert der Austausch D98A(HisF) den Aktivierungsfaktor der Glutaminaseaktivität durch ProFAR vor dem Y138A(HisH) Hintergrund auf weniger als ein Zehntel. Dies stimmt mit den kinetischen Parametern der His7-D98A Mutante überein (Myers *et al.* 2005). Eine mögliche, durch ProFAR induzierte Konformationsänderung könnte also durch D98(HisF) über die Kontaktfläche hinweg weitergeleitet werden.

Tabelle 9: Aktivierung der Glutaminasereaktionen von HisH:HisF, HisH-Y138A:HisF und HisH-Y138A:HisF-D98A durch ProFAR, gezeigt anhand der Wechselzahlen k_{cat} [min⁻¹].

	ohne ProFAR (Tabelle 8)	mit ProFAR (Tabelle 6)	Aktivierungsfaktor
HisH:HisF	0.03	6	200
HisH-Y138A:HisF	1.3	180	138
HisH-Y138A:HisF-D98A	0.07	0.6	9

Zum Einen bildet D98(HisF) eine Salzbrücke über seine Carboxylatgruppe zur ε-Aminogruppe von K181(HisH) aus, zum Anderen hat der zweite Carboxylatsauerstoff den doppelten Abstand einer Wasserstoffbrückenbindung zu H178(HisH) in der katalytischen Triade (Abbildung 27). In der 3D-Struktur der ImGPS mit gebundenem Glutamat ist die Carboxylatgruppe des Reaktionsproduktes zwischen D98(HisF) und H178(HisH) verankert

(Vega *et al.* unveröffentlichte Daten). In Moleküldynamik-Simulationen mit der apo-Struktur (1gpwAB) kommt an entsprechender Stelle ein Wassermolekül zu liegen (mündliche Mitteilung Marco Bocola).

Eine vergleichbare Situation findet sich in der *SARS coronavirus main proteinase*, einer Cys-Protease, in der die katalytische Triade ebenfalls durch ein Wassermolekül vervollständigt wird (Tan *et al.* 2005). Das betreffende Wassermolekül wird dabei durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Asp187 und dem katalytischen Histidin fixiert. Zusätzlich bildet Asp 187 eine Salzbrücke zu einem benachbarten Arginin aus und nimmt damit eine analoge Position zu D98 in HisH:HisF ein.

Um genauere Hinweise darauf zu erhalten, in welcher Weise die Seitenkette von D98(HisF) an einer Wasser-vermittelten Interaktion mit Aktivierung von H178(HisH) beteiligt sein könnte, wurden die ProFAR-stimulierten Glutaminaseaktivitäten von HisH:HisF, HisH:HisF-D98N, HisH-K181A:HisF-D98N und HisH-Y138A:HisF-D98N miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Glutaminaseaktivitäten in Anwesenheit von ProFAR.

Der Umsatz von Glutamin erfolgte durch 2 μ M HisF und 1 μ M HisH in 50 mM Tricine KOH, pH 8,0 in Anwesenheit von 40 μ M ProFAR und 5 mM Glutamin.

	<i>HisH:HisF</i>	<i>HisH:HisF-D98N</i>	<i>HisH-K181A:HisF-D98N</i>	<i>HisH-Y138A:HisF-D98N</i>
k_{cat} [min ⁻¹]	4,8	0,02	1,1	0,03

Die Glutamatbildung wurde über eine gekoppelte GDH-Reaktion verfolgt (siehe Abbildung 21). Der Wert für HisH:HisF wurde aus Tabelle 7 übernommen.

Die Interaktion der drei Aminosäurereste D98(HisF), H178(HisH) und K181A(HisH), sowie durch die Austausche D98N(HisF) und K181A(HisH) vermutlich auftretende Umlagerungen sind in Abbildung 28 schematisch dargestellt.

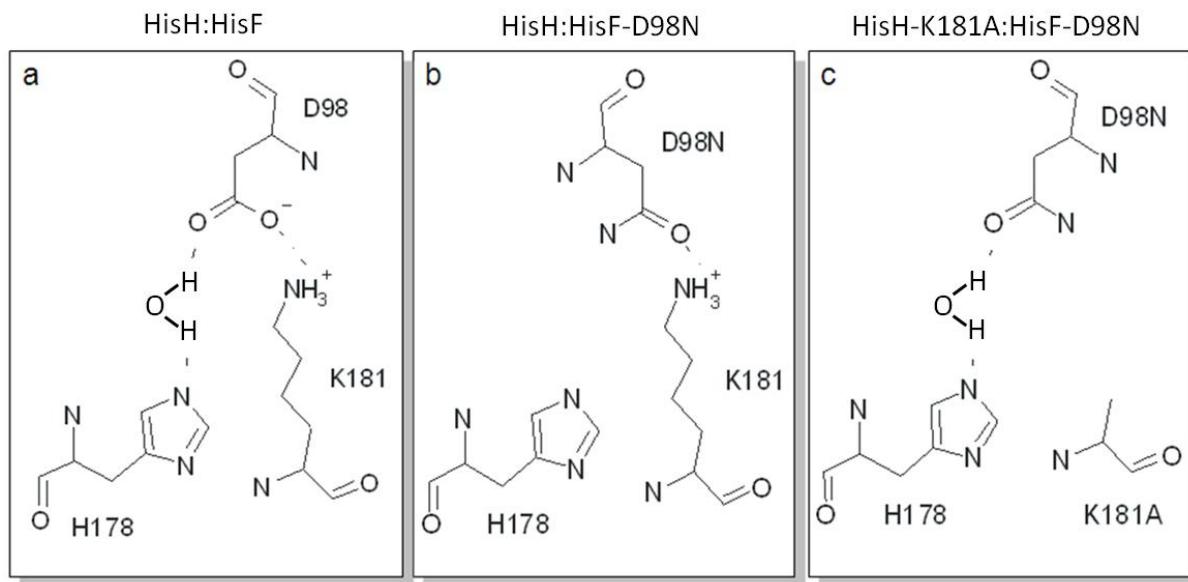


Abbildung 28: Schematische Darstellung der beobachteten bzw. vermuteten Interaktionen von D98(HisF) mit H178(HisH) und K181 bzw. K181A(HisH).

Das eingezeichnete Wasser-Molekül wurde in einer Moleküldynamik-Simulation beobachtet.

Unter der Annahme, dass die Seitenkette von D98N(HisF) weiterhin mit K181(HisH) interagiert, steht der Carbonylsauerstoff nicht mehr für die wasser-vermittelte Interaktion mit H178(HisH) zu Verfügung (Abbildung 28b). Dies würde erklären, warum der k_{cat} -Wert im Vergleich zur wildtypischen Situation um den Faktor 240 abnimmt (Tabelle 10). Durch die zusätzliche Mutation K181A(HisH) steht erneut ein Carbonylsauerstoff für die Interaktion mit H178(HisH) zur Verfügung (Abbildung 28c) und ein großer Teil der Glutaminaseaktivität wird entsprechend wieder hergestellt. Um auszuschließen, dass der Austausch K181A(HisH) nicht auf eine andere Weise zur Wiederherstellung der Aktivität führt, wurde der Austausch D98N(HisF) auch in Kombination mit Y138A(HisH) vermessen. Obwohl Y138A(HisH) die Glutaminaseaktivität vergleichbar stark wie K181A(HisH) beschleunigt, entsprach der k_{cat} -Wert hier dem von HisH:HisF-D98N (Tabelle 10).

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der aktivierende Effekt von ProFAR maßgeblich durch D98(HisF) auf HisH übertragen wird. D98(HisF) bildet eine konservierte Salzbrücke mit K181(HisH) und kann, wie die Ergebnisse andeuten, über seinen freien Carboxylsauerstoff mit Hilfe eines Wassermoleküls oder dem Glutaminaseprodukt Glutamat mit H178(HisH) aus der katalytischen Triade interagieren und dadurch die Glutaminaseaktivität stimulieren.

3.2.7 Die Rolle von Y138(HisH) und K181(HisH) während der Glutaminhydrolyse

Die Reste Y138(HisH) und K181(HisH) liegen an der Kontaktfläche zu HisF. K181(HisH) liegt neben den Resten der katalytischen Triade E180(HisH) und H178(HisH). Die Seitenkette von K181A(HisH) bildet eine konservierte Salzbrücke mit D98(HisF) aus (Abbildung 27).

Die Doppelmutante Y138A-K181A(HisH) besitzt eine, gegenüber dem WT, um vier Größenordnungen erhöhte konstitutive Glutaminaseaktivität. Einen Erklärungsansatz hierfür liefert ein neuartiger Aktivierungsmechanismus, unabhängig von einer allosterischen Kaskade, der auf dem Einschluss von Ammoniak innerhalb des HisH:HisF Komplexes beruht (Vega *et al.* unveröffentlichte Daten). Dabei wird davon ausgegangen, dass sich der gebildete Ammoniak im aktiven Zentrum der Glutaminase anreichert und mit dem Thioesterintermediat zurück zum tetrahedralen Intermediat reagiert (Abbildung 29).

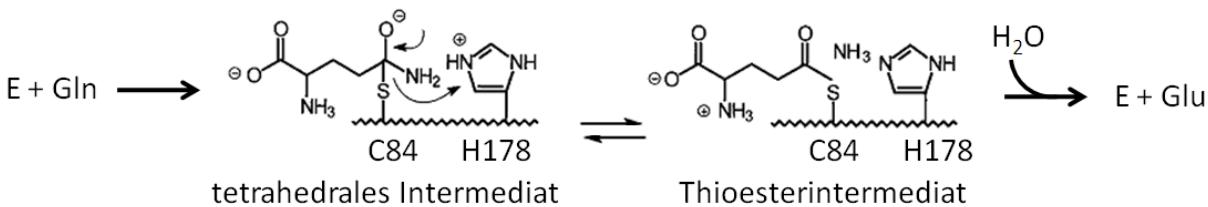


Abbildung 29: Vereinfachtes Reaktionsschema der Glutaminasereaktion (modifiziert nach Miles *et al.* 1998).

Diese Rückreaktion von naszierendem Ammoniak mit dem Thioesterintermediat wurde auch für die CPS diskutiert (Miles *et al.* 1998). Durch die Reaktion mit dem Akzeptorsubstrat PRFAR wird der gebildete Ammoniak verbraucht und die Glutaminase kann ihre Katalyse fortsetzen. Bei Bindung des Substratanalogons ProFAR wird nur eine geringe Aktivierung der Glutaminase erreicht, was auf kleinere Konformationsänderungen am aktiven Zentrum von HisF zurückzuführen sein könnte, die ein Abdiffundieren des Ammoniaks durch den Kanal ermöglichen. In diesem Modell führen die Austausche Y138A(HisH) und K181A(HisH) zum Abdiffundieren des Ammoniaks ins Lösungsmittel, da durch die Mutationen sterisch anspruchsvolle Reste am Interface zu HisF durch Alanine ersetzt werden und dadurch „Löcher“ zum Lösungsmittel hin entstehen (Abbildung 30).

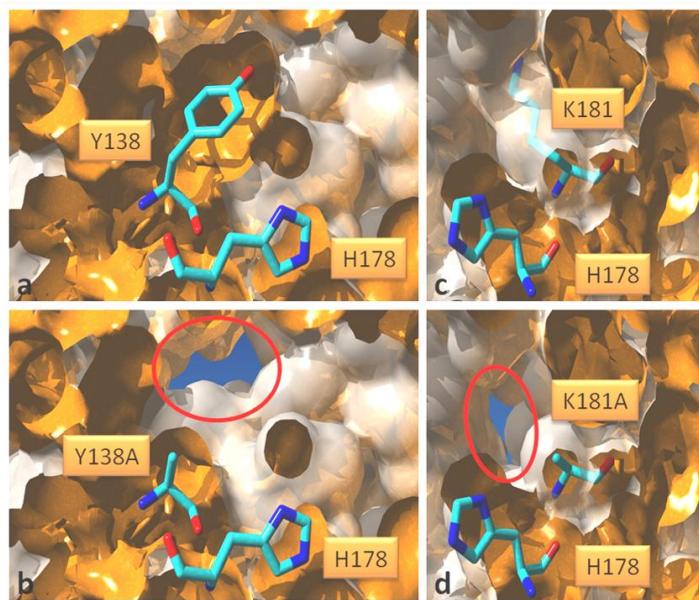


Abbildung 30: Veranschaulichung der durch die Mutationen Y138A(HisH) und K181A(HisH) verursachten Löcher an der Proteinoberfläche.

Die ImGPS van-der-Waals Oberfläche wurde in der Ebene der katalytischen Triade aufgeschnitten. Es sind jeweils die mutierte Aminosäure und H178(HisH) aus der katalytischen Triade gezeigt. Die roten Kreise markieren die durch die Alaninaustausche entstandenen Zugänge zum Lösungsmittel. (a,c): HisH:HisF, (b): HisH-Y138A:HisF, (d): HisH-K181A:HisF

Anschaulich lassen sich die Auswirkungen der beiden Alaninaustausche anhand der gemessenen Ammoniakproduktion im Vergleich zur Geschwindigkeit der Gesamtreaktion und der ammoniumabhängigen HisF-Reaktion zeigen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Wechselzahlen (k_{cat} [s^{-1}]) der Ammoniakbildung, der ammoniumabhängigen Reaktion von HisF und der glutaminabhängigen Gesamtreaktion

	Ammoniakbildung (i.A. von ProFAR) (Tabelle 7)	Ammoniumabhängige Reaktion (Tabelle 4)	Glutaminabhängige Gesamtreaktion (Tabelle 5)
HisH:HisF	0,04	1,2	1,1
HisH-Y138A:HisF	2,2	1,4	0,8
HisH-K181A:HisF	3,3	1,7	0,9
HisH-Y138A-K181A:HisF	1,9	0,9	0,1

Tabelle 11 zeigt, dass die Ammoniakbildungsrates bei allen Mutanten nahezu identisch und viel höher als beim WT ist. Die ammoniumabhängigen Reaktion ist bei WT und den Mutanten gleich schnell, somit wird das aktive Zentrum von HisF durch die Austausche nicht beeinträchtigt. Die deutlich verringerte Geschwindigkeit der Gesamtreaktion der Doppelmutante deutet an, dass weniger von dem gebildeten Ammoniak am aktiven Zentrum von HisF angelangt und umgesetzt wird als beim WT. Dieser Vergleich lässt den Schluss zu, dass der Ammoniak auf dem Weg von der Glutaminase zur Synthase „verloren geht“ bzw. durch die „Löcher“ an der Kontaktfläche abdiffundiert.

Eine ähnliche Beobachtung wurde für die PLPS aus *Arabidopsis thaliana* gemacht, bei der der Austausch eines Leucinrestes gegen Alanin in der Nähe des aktiven Zentrums der Glutaminase am Beginn des Ammoniakkanals in Anwesenheit von Akzeptorsubstrat zur Beschleunigung der Glutaminhydrolyse (Faktor 3) und gering verschlechterter Gesamtaktivität (minus 15 %) führt (Tambasco-Studart *et al.* 2007). Als Folge des Leucin zu Alanin Austausches wurde ein undichter Ammoniakkanal postuliert (Flicker *et al.* 2007). Wie in der ImGPS, könnte auch bei der PLPS eine mögliche Abdiffusion des Ammoniaks ins Lösungsmittel für die gesteigerte Glutaminaseaktivität der Mutante verantwortlich sein. Die Gesamtaktivität der PLPS-Mutante ist wie bei den ImGPS Mutanten HisH-Y138A:HisF und HisH-K181A:HisF (Tabelle 11) nur leicht beeinträchtigt, woraus sich schließen lässt, dass bei beiden Enzymen durch den Kanal noch ausreichende Mengen Ammoniak an das aktive Zentrum der Synthase gelangen.

Die Charakterisierung von Mutanten der Glucosamin-6-phosphat-Synthase (GLMS) deckte ebenfalls Zusammenhänge zwischen undichtem Ammoniakkanal und Glutaminaseaktivität auf. So führen die Austausche eines Tryptophans im putativen Ammoniakkanal gegen Alanin, Leucin oder Phenylalanin zum Austritt von Ammoniak ins Lösungsmittel. Die Glutaminaseaktivität in Abwesenheit von Liganden steigt dabei im Vergleich zum WT um den Faktor 3-4 (Floquet *et al.* 2007).

Da die Reste Y138(A)(HisH) und K181(A)(HisH) nahe am aktiven Zentrum von HisH liegen, ist es denkbar, dass mutationsbedingte Konformationsänderungen zur Aktivierung der Glutaminase führen. Deshalb wurde im Rahmen der Kooperation mit Dr. Matthias Wilmanns (EMBL Hamburg) von Dr. Adelia Razeto die Mutante HisH-Y138A-K181A:HisF in Anwesenheit von Glutamin und Glutamat kristallisiert und die Röntgenstruktur mit einer Auflösung von 2,6 Å aufgelöst. Interessanterweise entspricht die Form der Kristalle mit Glutamin und Glutamat gemessen an der Einheitszelle der Form der wildtypischen Kristalle in Gegenwart von Glutamat. WT-Kristalle mit Glutamin besitzen dagegen eine andere Kristallform und Einheitszelle (Vega *et al.* unveröffentlichte Daten). Diese Beobachtung bestätigt den Umsatz von Glutamin im Kristallisationsansatz von HisH-Y138A-K181A:HisF. In Abbildung 31 sind überlagerte Strukturausschnitte von HisH:HisF und HisH-Y138A-K181A:HisF gezeigt.

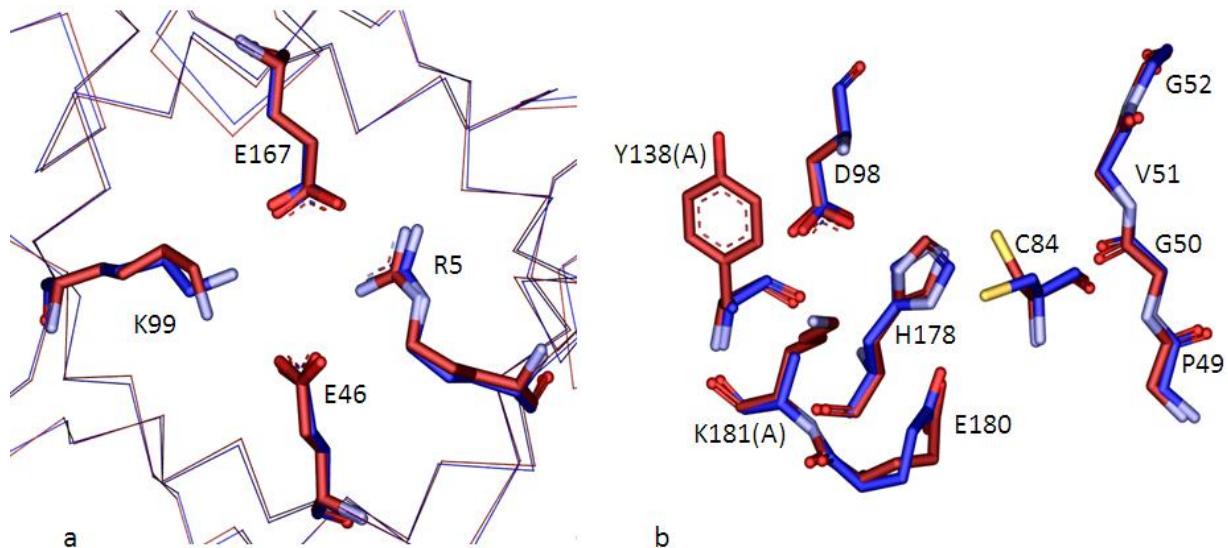


Abbildung 31: Superpositionierung der 3D-Strukturen von HisH:HisF (rot) und HisH-Y138A-K181A:HisF (blau).

(a): Ausschnitt aus dem Proteinrückgrat mit den Resten des Salzbrückennetzwerkes in HisF. (b): Ausschnitt aus dem aktiven Zentrum von HisH. Der Oxyanion-Strang (P49-G52) ist nur als Verlauf des Rückgrats abgebildet.

Es wird deutlich, dass das Salzbrückennetzwerk (Abbildung 31a), der Verlauf des Oxyanion-Stranges (P49 bis G52), die Reste der katalytischen Triade (C84, H178, E180) sowie D98 ihre Konformation durch die Austausche Y138A(HisH) und K181A(His) nur minimal ändern. Die Reste C84 und H178 liegen in den beiden Strukturen in verschiedenen Rotameren vor (Abbildung 31b). Da jedoch auch innerhalb der WT-Strukturen, die aus jeweils drei HisH:HisF Heterodimeren bestehen, an diesen beiden Positionen verschiedene Rotamere vorkommen, scheidet dieser Unterschied als Grund für die Aktivierung sehr wahrscheinlich aus. Die hohe konstitutive Glutaminaseaktivität der Mutante HisH-Y138A-K181A:HisF ist also nicht auf Konformationsänderungen am aktiven Zentrum zurückzuführen.

Um weitere Einblicke in den Mechanismus der Glutaminhydrolyse des WTs im Vergleich zur Doppelmutante zu erhalten, wurde der Einfluß von ProFAR auf die Reaktion näher untersucht. Die Glutaminasereaktion kann vereinfacht in zwei Schritte eingeteilt werden, die Bildung des Thioesterintermediats und dessen Hydrolyse (Abbildung 29). Die Gesamtgeschwindigkeit wird dabei durch den langsameren (ratenlimitierenden) Schritt bestimmt. Die Beschleunigung dieses Schrittes durch einen Aktivierungsprozess führt solange zu einer Erhöhung der Glutaminaseaktivität, bis ein anderer Schritt ratenlimitierend wird. Ein Vergleich der Glutaminaseaktivitäten der Mutanten in An- und Abwesenheit von ProFAR und der daraus berechneten Aktivierung ist in Tabelle 12 gezeigt.

Tabelle 12: Aktivierung der Glutaminasereaktionen von HisH:HisF, HisH-Y138A:HisF, HisH-Y138A:HisF und HisH-Y138A-K181A:HisF durch ProFAR (siehe Tabelle 9) anhand der Wechselzahlen (k_{cat} [min^{-1}]).

	ohne ProFAR (Tabelle 8)	mit ProFAR (Tabelle 6)	Aktivierungsfaktor
HisH:HisF	0,03	6	200
HisH-Y138A:HisF	1,3	180	138
HisH-K181A:HisF	1,7	144	85
HisH-Y138A-K181A:HisF	134	140	1

Beim WT und den Einzelmutanten wird der ratenlimitierende Schritt durch ProFAR beschleunigt, wogegen bei der Doppelmutante HisH-Y138A-K181A:HisF keine Aktivierung erkennbar ist. Daraus kann geschlossen werden, dass entweder die durch ProFAR beschleunigte Teilreaktion im Kontext der Doppelmutante nicht mehr dem ratenlimitierenden Schritt entspricht oder die ProFAR-Bindung generell keinen Einfluss mehr auf die Glutaminaseaktivität hat. Um zwischen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde die Konzentration des Thioesterintermediats im *steady-state* bestimmt (siehe 2.7.4).

Dazu wurde HisH-Y138A-K181A:HisF parallel in An- und Abwesenheit von ProFAR mit radioaktivem Glutamin inkubiert, die Reaktion mit TCA gequencht und der Reaktionsansatz über einen Filter abgezogen. Da der Thioester unter diesen Bedingungen säurestabil ist (Chaparian & Evans 1991; Lusty 1992), enthält das im Filter verbleibende Präzipitat des Enzym-Thioester-Komplexes den im *steady-state* vorhandenen Thioester. Mit Hilfe eines Szintillationszählers wurde anschließend die Menge an Radioaktivität im Filter gemessen und daraus die Thioesterkonzentration berechnet.

Tabelle 13: Konzentrationsbestimmung des Thioesters im *steady-state* der Reaktion von HisH-Y138A-K181A:HisF in An- und Abwesenheit von ProFAR.

	mit ProFAR	ohne Ligand
gelabelte Enzymfraktion [%]	$18,3 \pm 3,1$	$3,5 \pm 0,7$

Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen dar.

Die deutliche Zunahme der Thioesterkonzentration in Anwesenheit von ProFAR zeigt, dass die ProFAR-Bindung den ersten Teilschritt der Reaktion, die Bildung des Thioesterintermediats in der Doppelmutante, beschleunigt. ProFAR zeigt jedoch keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der gesamten Glutaminasereaktion in der Doppelmutante. Der ratenlimitierende Schritt der Glutaminasereaktion der Doppelmutante muss deshalb im zweiten Teilschritt, der Hydrolyse des Thioesterintermediats liegen. Unter der Annahme, dass ProFAR im WT ebenso die Thioesterbildung beschleunigt, dabei aber anders als im Fall der

Doppelmutante auch die gesamte Glutaminasereaktion beschleunigt wird, kann man davon ausgehen, dass durch die beiden Mutationen der ratenlimitierende Schritt verändert wurde.

3.3 Zusammenfassung

Es wurden die Auswirkungen folgender Alaninsubstitutionen auf die kinetischen Parameter der drei ImGPS-Reaktionen im HisH:HisF Komplex untersucht: Q123A(HisF), K99A(HisF), Y138A(HisH), K181A(HisH) und Y138A-K181A(HisH). Alle Mutanten ließen sich vergleichbar mit den wildtypischen Proteinen in großer Ausbeute exprimieren und reinigen (siehe 3.2.3).

Zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus der Glutaminase wurde neben den bereits verwendeten Tests ein diskontinuierlicher Glutaminaseassay etabliert. Dies war nötig, da für NAD⁺ gezeigt wurde, dass es die Glutaminase HisH stimuliert (siehe 3.2.4.4). Neben ProFAR und ImGP ist NAD⁺ damit der dritte Glutaminase-stimulierende HisF-Ligand. Auf Grund der Strukturähnlichkeit der drei Aktivatoren lässt sich vermuten, dass auch andere Metaboliten mit einem Nukleotidgerüst in der Lage sind an HisF zu binden.

Die Austausche Q123A(HisF) und K99A(HisF) führten nur zu moderaten Abweichungen der katalytischen Parameter im Vergleich zum WT (siehe 3.2.4).

Der Austausch D98A(HisF) verlangsamte die Glutaminaseaktivität signifikant und beeinträchtigte vor dem Hintergrund des Austauschs Y138A(HisH) die aktivierende Wirkung der ProFAR-Bindung. Ferner konnte gezeigt werden, dass zwischen dem Rest D98(HisF) und dem Rest H178(HisH) aus der katalytischen Triade eine entfernte Wechselwirkung besteht, über die ein mögliches ProFAR-Bindungssignal übertragen wird (siehe 3.2.6).

Die Austausche Y138A(HisH) und K181A(HisH), wie auch deren Kombination, führen zu stark erhöhter induzierter, sowie zu hoher konstitutiver Glutaminaseaktivität. In Anwesenheit/Abwesenheit von ProFAR zeigten die Einzelmutanten Y138A(HisH) und K181A(HisH) eine bis zu einem Faktor 20/50 erhöhte Glutaminaseaktivität im Vergleich zum WT. Die Glutaminaseaktivität der Doppelmutante Y138A-K181A(HisH) entspricht bereits ohne ProFAR der der mit ProFAR gesättigten Einzelmutanten und kann durch den Liganden nicht weiter stimuliert werden (siehe 3.2.7).

Die gelöste 3D-Struktur der Doppelmutante ist im Bereich der katalytisch essentiellen Reste von HisH und dem Oxyanion-Strang mit den wildtypischen 3D-Strukturen identisch, wodurch eine durch die beiden Alaninaustausche hervorgerufene Konformationsänderung als Ursache für die hohe Glutaminaseaktivität ausgeschlossen werden kann. Diese Beobachtung

unterstützt eine Hypothese, nach der an der Glutaminase gebildeter Ammoniak die Glutaminasereaktion inhibiert, solange er am aktiven Zentrum verbleibt. Durch das Entfernen der sterisch anspruchsvollen Reste Y138 und K181 an der Kontaktfläche von HisH kann der gebildete Ammoniak ins Lösungsmittel abdiffundieren und so seine Rückreaktion mit dem Thioester und die damit verbundene Inhibition der Glutaminasereaktion aufgehoben werden. Die Doppelmutante HisH-Y138A-K181A:HisF zeigt in An- und Abwesenheit von ProFAR die gleiche Umsatzrate. Da sich jedoch die Thioesterkonzentration im *steady-state* durch die Anwesenheit von ProFAR ändert, kann man davon ausgehen, dass der durch ProFAR initiierte Aktivierungsprozess noch abläuft, aber nicht länger den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beeinflusst (siehe 3.2.7).

Zusammenfassend sind zwei Mechanismen denkbar, die zur Aktivierung der Glutaminase führen.

(1) Die Ergebnisse der Versuche mit Mutanten von D98(HisF) lassen sich gut mit einer allosterischen Signalweiterleitung erklären. Eine solche Kaskade, die von einem Synthase-Liganden angestoßen wird und an deren Ende die Ausbildung einer katalytisch essentiellen Konformationsänderung steht, wurde bereits für andere GATase-Systeme postuliert. Auch NMR-Experimente (siehe Kapitel 5) deuten auf die Existenz einer allosterischen Kaskade bei der ImGPS hin.

Bisher ist es jedoch trotz intensiver Untersuchungen nur für wenige Proteine gelungen eine solche Kaskade im Detail aufzuklären, wie zum Beispiel für den Acetylcholin Rezeptor (Purohit *et al.* 2007).

(2) Der zweite denkbare Mechanismus funktioniert nach einem Prinzip ähnlich der klassischen Produktinhibition (Frieden & Walter 1963). Durch die Abgrenzung des Reaktionsraumes vom Lösungsmittel würde der aus Glutamin gebildete Ammoniak unmittelbar mit dem Thioesterintermediat zurückreagieren und dadurch die Glutamatbildung inhibieren. Durch die Reaktion des Ammoniaks mit PRFAR bzw. durch seine Diffusion ins Lösungsmittel würde die Inhibition aufgehoben. Mit Hilfe dieser Theorie können die aktivierenden Effekte des Doppelaustauschs Y138A-K181A(HisH) erklärt werden. Innerhalb dieses Modells würde ein vom Lösungsmittel abgeschlossener Ammoniaktunnel, wie er in vielen GATasen vorkommt, nicht nur den Verlust von Ammoniak verhindern, sondern gleichzeitig auch einen einfachen Regulationsmechanismus für die Glutaminhydrolyse darstellen.

Beide Mechanismen könnten bei der Aktivierung der wildtypischen ImGPS eine Rolle spielen. Durch Bindung des HisF-Substrats PRFAR könnte die wildtypische Glutaminase demnach auf zwei Stufen aktiviert werden. Zum Einen könnte das Bindungssignal von PRFAR zur allosterischen Aktivierung der katalytischen Triade führen und zum Anderen der Verbrauch von Ammoniak in der Reaktion mit PRFAR sicher stellen, dass die Produktinhibition am aktiven Zentrum der Glutaminase aufgehoben wird.

3.4 Ausblick:

Mit Hilfe von radioaktiv markiertem Glutamin war es möglich bei der ImGPS-Mutante HisH-Y138A-K181A:HisF den Einfluss von ProFAR auf die Thioesterkonzentration im *steady-state* zu verfolgen. Diese Versuche sollten fortgesetzt werden, um den ratenlimitierenden Schritt von wildtypischer und konstitutiv aktiver ImGPS zu bestimmen. Dadurch ließen sich die Effekte durch ProFAR und PRFAR bzw. durch die Alaninaustausche Y138A(HisH) und K181A(HisH) jeweils einer Teilreaktion zuordnen. Dies würde helfen, die Mechanismen der beiden Aktivierungswege besser zu verstehen und mit den Ergebnissen anderer GATasen zu vergleichen.

Ein weiterer wichtiger Schritt zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus von Glutaminaseuntereinheiten ist der Vergleich von 3D-Strukturen im inaktiven apo-Zustand mit Strukturen, die durch einen Synthaseliganden aktiviert wurden. Für die ImGPS ist es bisher nicht gelungen eine 3D-Struktur mit gebundenem Liganden im aktiven Zustand zu erhalten. Dieses Ziel sollte mit Hilfe von Hochdurchsatz-Kristallisationsscreenings weiter verfolgt werden. Da NAD⁺ die Glutaminase ebenfalls aktiviert aber wesentlich stabiler als ProFAR oder PRFAR ist, kommt NAD⁺ ebenfalls als Ligand für die Kokristallisation mit HisF in Frage. Ein weiterer vielversprechender Ligand ist ein hydrolysestables PRFAR-Analogon z.B. 3deaza-PRFAR. Da eine enzymatische Synthese aus 3deaza-ATP bisher nicht erfolgreich war (Anhang 9.4) wäre hier ein organisch-synthetischer Ansatz der logische nächste Schritt. Mit den aus einer Ligand-gebundenen ImGPS 3D-Struktur gewonnenen Informationen sollte es möglich sein, die Frage zu beantworten, ob es sich bei dem Ligand induzierten Aktivierungsmechanismus tatsächlich um eine klassische allosterische Kaskade handelt oder ein indirekter, an die Entfernung von NH₃ gekoppelter Mechanismus wahrscheinlicher ist.

4 HisH:HisF-ΔLoop1

4.1 Einleitung

Der Vergleich von HisF-Strukturen aus *T. maritima* in isolierter (1thf) und in mit HisH komplexierter Form (1gpw) zeigt, dass der $\beta\alpha$ -Loop1, der β -Strang1 mit α -Helix1 verbindet, zwei verschiedene Konformationen einnehmen kann. Weiterhin befindet sich in $\beta\alpha$ -Loop1 eine Trypsin-Schnittstelle (nach Arg27), die abhängig von der Komplexierung mit HisH unterschiedlich anfällig für Proteolyse ist (Beismann-Driemeyer & Sterner 2001). Die Struktur von HisH:HisF in 1gpw zeigt $\beta\alpha$ -Loop1 in einer Konformation oberhalb des aktiven Zentrums (geschlossene Konformation). In der Struktur 1thf ist der $\beta\alpha$ -Loop1 dagegen nach außen vom aktiven Zentrum weggeklappt (offene Konformation) (Abbildung 32). In der Struktur von HisF aus *P.aerophilum* (1h5y) legt sich der Loop als Deckel über das aktive Zentrum und bildet über einen konservierten Lysinrest eine Wasserstoffbrücke zu einem dort gebundenen Glycerin-Molekül aus (Banfield *et al.* 2001). Auf Grund dieser Befunde wurde vermutet, dass $\beta\alpha$ -Loop1 das aktive Zentrum von HisF komplettiert oder/und an der Kommunikation zwischen den aktiven Zentren von HisF und HisH beteiligt sein könnte (Beismann-Driemeyer & Sterner 2001; Chaudhuri *et al.* 2003).

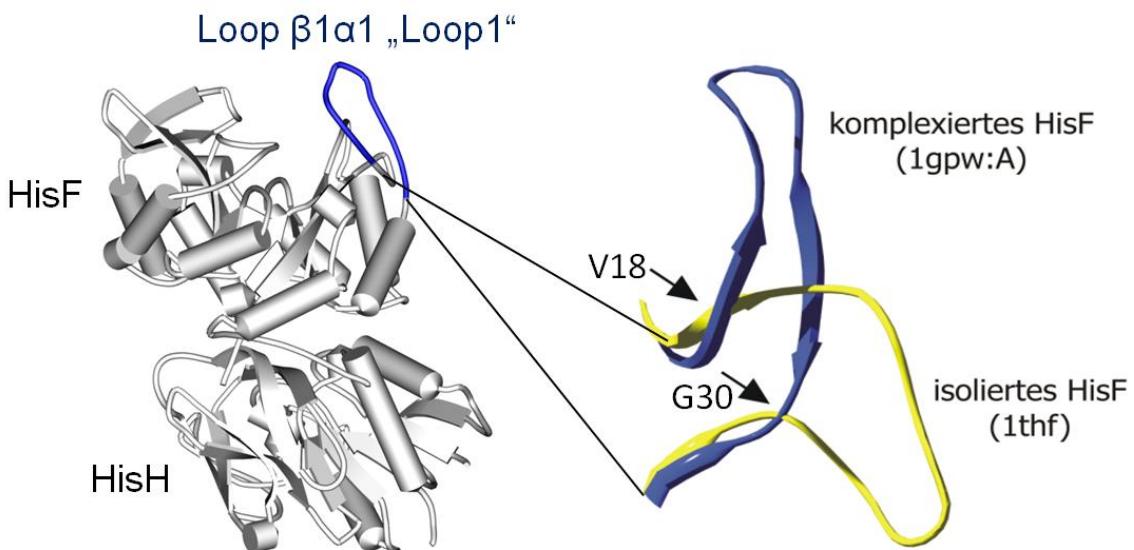


Abbildung 32: Bänderdiagramm von HisH:HisF mit $\beta\alpha$ -Loop1.

Der Loop ist vergrößert und die Konformation in isoliertem und mit HisH komplexiertem HisF dargestellt. Die Pfeile markieren den ersten und letzten Rest des in HisF-ΔLoop1 deletierten Bereichs.

Zur Beantwortung der Frage nach der Funktion von Loop1 wurde bereits in einer früheren Arbeit die Mutante HisF-ΔLoop1 kloniert und gereinigt (Mohrlüder 2003). In dieser Mutante

wurden die Aminosäuren Val18 bis einschließlich Gly30 deletiert (Abbildung 32). Tryptischer-Verdau sowie Nah- und Fern-UV CD Spektroskopie zeigten keine wesentlichen Unterschiede zwischen HisF WT und HisF-ΔLoop1. Die mit Hilfe von Gelfiltrationsläufen nachgewiesene Komplexbildung mit HisH war ebenfalls nicht beeinträchtigt (Mohrlüder 2003).

4.2 Loop1 Konformationen in verschiedenen HisF-Strukturen

Seit dem Jahr 2003 hat sich die Zahl der gelösten HisF-Strukturen erhöht, was einen weiterführenden Vergleich der Konformationen von βα-Loop1 ermöglicht. Tabelle 14 zeigt, dass es unabhängig von der Bindung an HisH zu offenen und geschlossenen Konformationen dieses Loops kommen kann.

Tabelle 14: Konformationen von βα-Loop1 in verschiedenen HisF-Strukturen

<i>pdb-code</i>	<i>Organismus</i>	<i>Monomer/Komplex 1</i>	<i>Monomer/Komplex 2</i>	<i>Monomer/Komplex 3</i>
1thf (HisF)	<i>T. maritima</i>	offen	-	-
1h5y (HisF)	<i>P.aerophilum</i>	geschlossen	geschlossen	-
1gpw (HisH:HisF)	<i>T. maritima</i>	geschlossen	geschlossen	ungeordnet
2ck7 (HisH:HisF)	<i>T. maritima</i>	offen	offen	geschlossen
2ck8 (HisH:HisF)	<i>T. maritima</i>	offen	ungeordnet	ungeordnet
2wjz (HisH:HisF)	<i>T. maritima</i>	offen	offen	ungeordnet
1ka9 (HisH:HisF)	<i>T. thermophilus</i>	offen	-	-

In allen weiteren Strukturen (Tabelle 3) ist der Loop1 ungeordnet.

In der apo-Form liegen verschiedene Loop-Konformationen vor bzw. ist Loop1 nicht aufgelöst (2ck7, 1gpw). Die Konformation von Loop1 scheint durch HisF-Liganden in der geschlossenen Form stabilisiert zu werden wie anhand der Struktur aus *P. aerophilum* (1h5y) mit gebundenem Glycerin zu erkennen ist.

4.3 Heterologe Expression und Reinigung von HisF-ΔLoop1

Zur Kristallisation und enzymatischen Charakterisierung von HisH:HisF-ΔLoop1 wurden HisF-ΔLoop1 und HisH wie unter 3.2.3 beschrieben, getrennt voneinander exprimiert und gereinigt. Die Ausbeute an HisF-ΔLoop1 betrug 60 mg/l Kultur. Die Reinheit des Proteins wurde nach der Dialyse anhand eines SDS-Gels abgeschätzt und war größer 95 % (Abbildung 33).

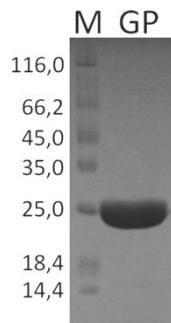


Abbildung 33: Gereinigtes Protein (GP) HisF-ΔLoop1.
SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid); M: Markerproteine mit molaren Massen in kDa.

4.4 Aktivitätsmessungen mit HisH:HisF-ΔLoop1

Um die Auswirkung der Loopdeletion auf die HisF-Aktivität zu untersuchen, wurde die ammoniumabhängige Reaktion vermessen (siehe 2.7.1). In Abbildung 34 ist die resultierende Sättigungskurve dargestellt.

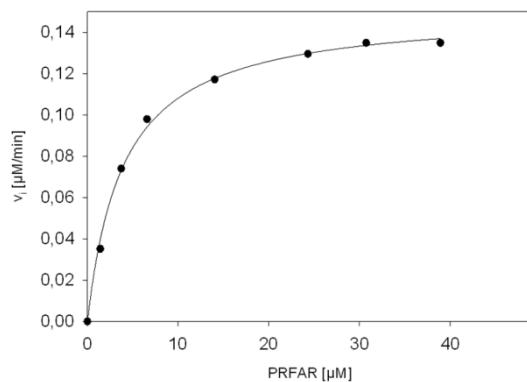


Abbildung 34: PRFAR-Sättigungskurve zur Quantifizierung der ammoniumabhängigen Reaktion von HisH:HisF-ΔLoop1.

Aufgetragen ist jeweils die Anfangsgeschwindigkeit v_i bei 25 °C gegen die Konzentration des Substrates. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis eines hyperbolischen *Fits* durch das Programm Sigma Plot. Der Umsatz von PRFAR erfolgte durch 10 μM HisH:HisF-ΔLoop1 in 50 mM Tris Acetat pH 8,5 mit 100 mM Ammoniumacetat (entspricht ca. 17 mM Ammoniak). Das HisF-Substrat wurde als ProFAR zugegeben und durch 0,6 μM HisA *in situ* zu PRFAR umgesetzt.

Tabelle 15 zeigt die aus der Sättigungskurve abgeleiteten katalytischen Parameter der ammoniumabhängigen Reaktion von HisH:HisF-ΔLoop1 im Vergleich mit dem wildtypischen Komplex.

Tabelle 15: Steady-state enzymkinetische Konstanten der ammoniumabhängigen HisF-Teilreaktion.

Die Messungen erfolgten bei 25 °C in 50 mM Tris Acetat pH 8,5 mit 100 mM Ammonium Acetat. Die ProFAR Konzentration, die *in situ* zu PRFAR umgewandelt wurde, wurde variiert.

	K_M^{PRFAR} [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat} / K_M^{PRFAR} [M ⁻¹ s ⁻¹]	(k_{cat}/K_M) Mutante /WT
HisH:HisF	$3,6 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,1$	330 ± 10	1
HisH:HisF-ΔLoop1	$9,8 \pm 5,8$	$0,0012 \pm 0,0008$	$0,12 \pm 0,05$	$3,6 \cdot 10^{-4}$

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Während der K_M^{PRFAR} durch die Deletion nur leicht erhöht wird, nimmt der k_{cat} um den Faktor 1000 ab. Dies deutet darauf hin, dass die Substratbindung durch die Deletion weitgehend unbeeinträchtigt bleibt, während die Katalyse wesentlich weniger effizient abläuft.

4.5 Kristallisation von HisH:HisF-ΔLoop1

HisH und HisF-ΔLoop1 wurden in äquimolaren Mengen gemischt und der Komplex über Gelfiltration von überschüssigem Monomer abgetrennt. Die für den WT gefundenen Kristallisationsbedingungen (Lang *et al.* 2000; Douangamath *et al.* 2002) sowie leicht abweichende Protein-, Salz- und Fällungsmittelkonzentrationen, führten weder für HisH:HisF-ΔLoop1 noch für HisF-ΔLoop1 in Abwesenheit von HisH zu Proteinkristallen.

Neue Kristallisationsbedingungen wurden für den HisF-ΔLoop1:HisH Komplex (12 mg/ml) an der *high-throughput crystallization facility* wie in Kapitel 2.8 beschrieben am EMBL Hamburg gesucht (Mueller-Dieckmann 2006). Nach 24 h waren erste Nadelbündel mit 0,1 mm Länge in 4 M Natriumformiat sichtbar. Durch weitere *Screens* mit der Qiagen *EasyXtal Opti-Salts Suite (sitting drop)* und den Hampton Research *Additiv Screens 1+2 (hanging drop)* wurden in verschiedenen Bedingungen größere Kristalle gewonnen, die Beugungsbilder bis maximal 10 Å Auflösung lieferten. Dies zeigte eindeutig, dass es sich bei den getesteten Kristallen um Proteinkristalle handelt.

Nach etwa sechs Wochen bildeten sich Kristalle bis 0,2 mm Länge in 0,1 M Bis Tris pH 5,5; 2 M Ammoniumsulfat (Bedingung 1) (Abbildung 35a) und Kristalle bis 0,8 mm Länge in 0,5 M Ammoniumsulfat, 0,1 M Tri-Natriumacetat pH 5,6; 1,0 M Lithiumsulfat (Bedingung 2) (Abbildung 35b).

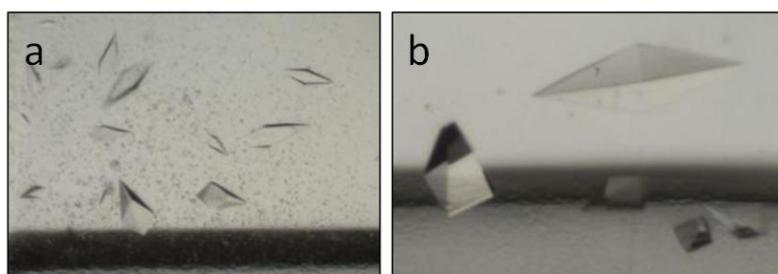


Abbildung 35: HisH:HisF-ΔLoop1 Protein-Kristalle.

Kristallisationsbedingungen: (a) 0,1 M Bis-Tris pH 5,5; 2 M Ammoniumsulfat (b) Tri-Natriumacetat pH 5,6; 0,5 M Ammoniumsulfat, 0,1 M; 1,0 M Lithiumsulfat

4.6 Datenaufnahme und Strukturlösung

Für HisH:HisF-ΔLoop1 Kristalle aus Bedingung 1 stellte sich 25 % Glycerin als geeignetes Kryoprotektant heraus (siehe 2.9). Allerdings konnten die Kristalle nur kurz in die Kryolösung eingetaucht werden, da sie schnell zu schmelzen begannen. Kristalle aus diesem Kristallisationspuffer streuten an der *beamline* X11 am DESY Hamburg bis maximal 2,6 Å (siehe 2.10).

Für HisH:HisF-ΔLoop1 Kristalle aus Bedingung 2 wurde 0,5 M Natriummalonat als Kryoprotektant zugefügt (Holyoak *et al.* 2003). Da die Kristalle in dieser Kryolösung stabil blieben, wurde ein Teil der Kristalle in der Kryolösung für 30 Minuten mit 5 mM ProFAR *gesoakt*. Von einem mit ProFAR *gesoakten* Kristall wurden Röntgenbeugungsdaten an der *beamline* ID14-2 am ESRF in Grenoble bis zu einer Auflösung von 1,6 Å erhalten (Abbildung 36).

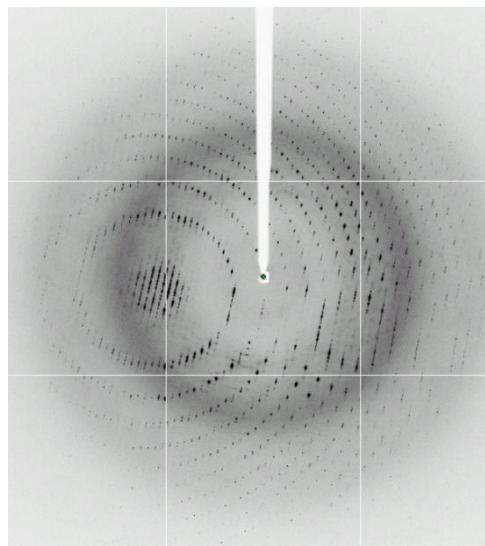


Abbildung 36: Beugungsbild aus dem HisH:HisF-ΔLoop1 Datensatz

Die Raumgruppe der Einheitszelle wurde als $P4_32_12$ bestimmt (siehe 2.10). Die maximale Auflösung betrug 1,6 Å. Die Statistiken der Datenprozessierung sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Datenprozessierung von HisH:HisF-ΔLoop1

Raumgruppe	$P4_32_12$
Elementarzelle, Å bzw. °	$a = b = 64,12$ $c = 261,46$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$
Datensammlung:	
Wellenlänge, Å	0.95350
Auflösungsbereich ^a , Å	42,84 – 1,59 (1,67 – 1,59)
Zahl der gemessenen Reflexe ^a	1032340 (150885)

Zahl der unabhängigen Reflexe ^a	74795 (10738)
Multiplizität ^a	13,8 (14,1)
Vollständigkeit ^a , %	99,3 (99,7)
Mosaizität	0,27
$R_{\text{sym}}^{\text{a}}$, %	7,0 (36,7)
Durchschnittliche $I/\sigma(I)$ ^a	26,6 (7,9)

^a Schale mit der höchsten Auflösung in Klammern

Als Maß für die Packungsdichte wurde der Matthew-Parameter (V_M) zu $2,7 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ bestimmt. Anhand dieses Wertes wurde über die Größe der Elementarzelle des Proteinkristalls sowie die Raumgruppe, die Anzahl der Proteinmoleküle pro asymmetrischer Einheit abgeschätzt. Für den hier untersuchten triklinischen Kristall ergab sich ein Heterodimer pro asymmetrische Einheit bei einem Lösungsmittelgehalt von 54 %.

Die Struktur von HisH:HisF-ΔLoop1 wurde über molekularen Ersatz mit Hilfe des Programms PHASER (McCoy 2007) gelöst (siehe 2.11). Dafür wurde als Suchmodell ein Heterodimer aus der HisH:HisF apo-Struktur (1gpwAB), sowie die zugehörigen experimentellen Daten von 3 bis 10 Å verwendet. Nach mehreren Runden aus manuellem Modellbau mit dem Programm WinCOOT (Emsley & Cowtan 2004) und Verfeinerung nach der *maximum-likelihood* Methode mit dem Programm REFMAC5 (Murshudov *et al.* 1997) konvergierte der kristallographische R-Faktor bei 16,2 % ($R_{\text{free}} = 19,3\%$). Die Verfeinerungsstatistik ist in Tabelle 17 gezeigt. Die stereochemische Qualität der verfeinerten Struktur wurde mit Molprobity (Davis *et al.* 2007) überprüft.

Tabelle 17: Verfeinerungsstatistik von HisH:HisF-ΔLoop1

<i>Auflösungsbereich [Å]</i>	42,8 – 1,6
Zahl der Reflexe	71005
Reflexe (test set)	3578
R-Faktor [%] / R_{free} [%]	16,2 / 19,3
<i>Anzahl Atome</i>	
Protein Kette A	1803
Protein Kette B	1611
Solvans	288
Ligand	10
<i>Mittlerer B Faktor in Å²</i>	
Proteinatome Kette A	8,8
Proteinatome Kette B	9,4
Solvansatome	20,5
Ligandenatome	26,6
<i>R.m.s.-Abweichung</i>	

Bindungslängen [Å]	0,023
Bindungswinkel [°]	1,9
<i>Ramachandran plot</i>	
bevorzugt	394
erlaubt	17
verboten	0

4.7 Strukturbeschreibung

Abgesehen von einigen wenigen Resten an der Proteinoberfläche, war der Großteil der Seitenketten klar durch die Elektronendichtheckarte definiert. Der $\text{RMSD}_{\text{C}_\alpha}$ für HisF-ΔLoop1 und HisF (1gpw, Kette A) beträgt 0,88 Å und zeigt damit, dass die beiden Strukturen abgesehen von den Änderungen am aktiven Zentrum praktisch identisch sind.

Ab dem katalytischen Asp11 ist bereits keine Elektronendichte mehr vorhanden, um die Seitenketten im Modell eindeutig zu platzieren. Die Deletion der Aminosäuren 18 bis 30 führt dazu, dass das Ende von β -Strang1 flexibel wird und damit die C-terminale Wasserstoffbrücke zum benachbarten β -Strang2 verloren geht. In Folge dessen wird auch das Ende von β -Strang2 zusammen mit Loop2 so flexibel, dass keine Elektronendichte mehr für das Rückgrat in diesem Bereich erkennbar ist.

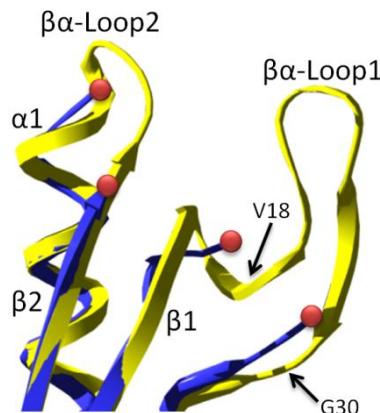


Abbildung 37: Bänderdiagramm von $\beta\alpha$ -Loop1 und $\beta\alpha$ -Loop2 in HisH:HisF (gelb) und HisH:HisF-ΔLoop1 (blau).

Die Pfeile in der HisF-WT Struktur markieren die Stellen, an denen der $\beta\alpha$ -Loop deletiert wurde. Die roten Kreise markieren jeweils die letzten aufgelösten Reste in $\beta\alpha$ -Loop1 (K13, D31) und $\beta\alpha$ -Loop2 (D51, K58) der HisF-ΔLoop1 Struktur (Zählweise nach HisF-WT).

Die Elektronendichte der drei C-terminalen Reste war ebenfalls nicht definiert. Im aktiven Zentrum ließ sich keine Dichte für einen Liganden finden.

In HisH sind ebenfalls einige Seitenketten an der Proteinoberfläche nicht klar definiert und es fehlt die Dichte für die beiden C-terminalen Aminosäuren. Der $\text{RMSD}_{\text{C}_\alpha}$ für HisH aus dem

HisH:HisF-ΔLoop1 Komplex und HisH (1gpwB) beträgt 0,55 Å und zeigt, dass die Loopdeletion in HisF keinen strukturellen Einfluss auf die Glutaminaseuntereinheit hat. Am aktiven Zentrum ist in der Glutaminbindetasche ist deutlich die Dichte für ein Malat-Molekül aus der Kryolösung zu erkennen (Abbildung 38). Das Malat liegt in derselben Bindetasche wie Glutamin in der wildtypischen Struktur (2ck6) (Abbildung 38, Ausschnitt). Durch die Bindung von Malat wurde die Lage des katalytisch essentiellen Cys84 leicht verändert und in einer alternativen Konformation fixiert.

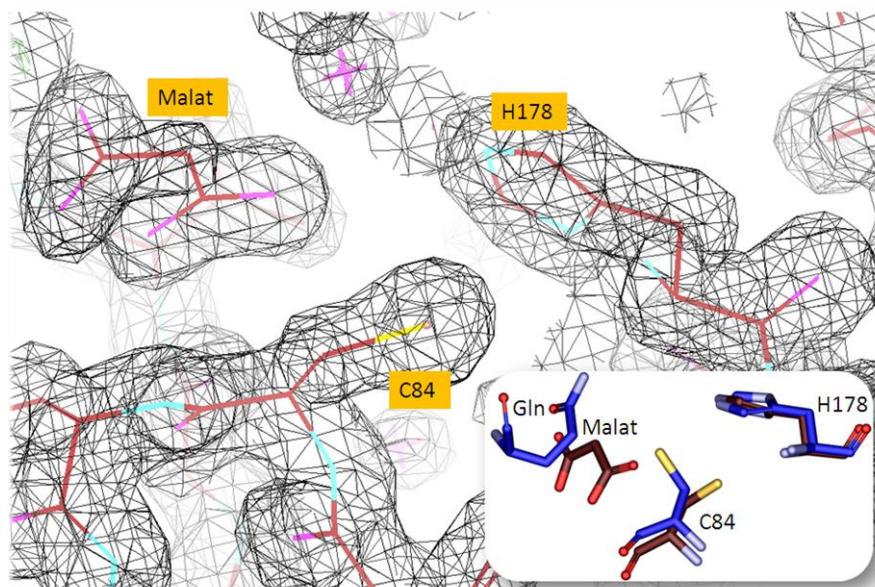


Abbildung 38: Elektronendichtheckarte (1,5σ) und Modellausschnitt am aktiven Zentrum von HisH im HisH:HisF-ΔLoop1 Komplex mit gebundenem Malat.

Markiert sind zwei Reste der katalytischen Triade, C84 und H178. Bildausschnitt: Überlagerung der Reste C84 und H178 aus der HisH:HisF WT Struktur mit gebundenem Glutamin (blau) und der HisH:HisF-ΔLoop1 Struktur mit gebundenem Malat (rot).

4.8 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, einen ImGPS Komplex in einer Geometrie zu kristallisieren, die nur ein Heterodimer pro asymmetrische Einheit beinhaltet und gleichzeitig die 3D-Struktur in einer bisher nicht erreichten Auflösung von 1,6 Å zeigt. Die Bindung eines Malat-Molekuls am aktiven Zentrum von HisH belegt, dass die Substratbindetasche nicht hoch spezifisch für Glutamin ist. Auf Grund dieser Beobachtung könnte Malat einen bisher nicht charakterisierten potentiellen kompetitiven Glutaminaseinhibitor darstellen.

Basierend auf Strukturvergleichen kann ausgeschlossen werden, dass die Komplexierung von HisF mit HisH eine definierte Konformation von βα-Loop1 stabilisiert. Die Deletion des Loops führt zu Destabilisierungen in der direkten Umgebung des entfernten Bereichs. Der

Rückgratcarbonylsauerstoff von Asp11 bildet in der wildtypischen Struktur mit dem Rückgrat-NH von Val18, der ersten deletierten Aminosäure, eine Wasserstoffbrücke aus. Diese Interaktion geht durch die Loopdeletion verloren und bedingt dadurch vermutlich die Delokalisation von Asp11. Da Asp11 ein katalytisch essentieller Aminosäurerest ist, kann damit die Abnahme des k_{cat} -Wertes um den Faktor 1000 erklärt werden. Zusätzlich führt die Deletion von $\beta\alpha$ -Loop1 zur Delokalisation von $\beta\alpha$ -Loop2, welcher an der Katalyse jedoch nicht beteiligt ist. Da bisher keine Struktur von HisF mit gebundenem ProFAR oder PRFAR erhalten werden konnte, sind die an der Substratbindung beteiligten Reste nicht bekannt. Da K_M^{PRFAR} im Vergleich zu HisF-WT jedoch unverändert bleibt, kann eine wichtige Rolle von $\beta\alpha$ -Loop1 oder der benachbarten delokalisierten Residuen bei der Substratbindung ausgeschlossen werden.

4.9 Ausblick

Die Deletion von $\beta\alpha$ -Loop1 in HisF hat destabilisierende Auswirkungen auf die unmittelbare Umgebung des Loops, durch die auch das katalytisch essentielle Asp11 betroffen ist. Durch die Deletion eines kleineren Loopbereichs könnte Asp11 in seiner katalytischen Position verankert bleiben und die aus der Deletion entstehenden Folgen auf die HisF-Aktivität direkt dem Loop zugeordnet werden. Des Weiteren bleibt zu bestimmen, ob die Deletion von $\beta\alpha$ -Loop1 in seiner momentanen Form Auswirkungen auf die Glutaminaseaktivität hat. Da der K_M^{PRFAR} von HisH:HisF-ΔLoop1 im Vergleich zum WT nicht signifikant verschlechtert ist, könnte die Aktivierung von HisH ähnlich effektiv wie beim WT verlaufen, falls der Loop nicht an der potentiellen Signalübermittlung beteiligt ist. Denkbar ist auch, dass nur ein Teil der Glutaminasereaktion betroffen ist. So könnte zum Beispiel die Thioesterbildung unverändert, aber die Thioesterhydrolyse stark verlangsamt sein. Dies könnte über Experimente mit radioaktivem Glutamin überprüft werden. Auf Grund der unerwarteten Bindung von Malat am aktiven Zentrum von HisH sollte dessen Wirkung als kompetitiver Inhibitor der Glutaminasereaktion getestet werden.

5 NMR-Spektroskopische Untersuchungen mit HisF

Neben den in Kooperation mit Dr. Matthias Wilmanns (EMBL Hamburg) durchgeführten röntgenkristallographischen Untersuchungen wurde von Christoph Liebold aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eike Brunner (Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg; ab 2007 Professur für Bioanalytische Chemie der technischen Universität Dresden) im Rahmen einer Kooperation HisF mittels der NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die Resultate dieser Untersuchungen sollen hier nur kurz aufgelistet werden, da sie Teil der Dissertation von Christoph Liebold sind und dort im Detail besprochen werden.

5.1 Proteinexpression und Reinigung

Für die Zuordnung von Resten wurde sowohl ^{13}C - ^{15}N - als auch ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markiertes HisF hergestellt. Die Expression erfolgte in „*E. coli* OD2 CN“ (CN) bzw. „*E. coli* OD2 CDN“ (CDN) Medium der Firma Silantes (siehe 2.5.3). Das *E. coli* Wachstum in diesen Medien entspricht etwa dem in M9 Minimalmedium mit zugesetzten 0,2% Glukose. Aus einem Liter konnten 2 g (CN) bzw. 1,6 g (CDN) Zellen (Nassgewicht) gewonnen werden. Nach dem Zellaufschluss befanden sich etwa 60 % (CN) bzw. 90 % (CDN) von HisF in der löslichen Fraktion. Lösliches Protein wurde über einen Hitzeschritt, Anionenaustausch-Chromatographie und präparativer Gelfiltration analog zu nativem HisF gereinigt (siehe 3.2.3.1). Der unlösliche Teil wurde zunächst über ein Rückfaltungsprotokoll (siehe 2.5.4) in Lösung gebracht und im Anschluss entsprechend dem löslichen Teil über Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt. Mit CN-Medium konnten aus der löslichen Fraktion 37 mg und aus der unlöslichen 12 mg HisF gewonnen werden. Die Analyse der NMR-Spektren von HisF aus beiden Fraktionen zeigte identische Signale (mündliche Mitteilung C. Liebold). Mit CDN-Medium konnten 47 mg löslich exprimiertes Protein gereinigt werden.

Die Anlagerung von Ammoniak/Ammonium an den Ammoniakkanal in HisF wurde mit ^{15}N -markiertem HisF untersucht. Die Expression erfolgte dazu in 11 Minimalmedium mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (siehe 1.11). Das Protein wurde analog zu nativem Protein aus dem löslichen Überstand mit einer Gesamtausbeute von ca. 30 mg gereinigt.

Für NMR-Experimente wurden die Proteine ohne Anzeichen von Proteinaggregation auf 0,5 bis 1,2 mM einkonzentriert.

5.2 Zuordnung von HisF und pH-Titration

Als Grundlage für weitere Experimente wurden zunächst die Signale eines ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums von HisF den jeweiligen Aminosäuren zugeordnet. Dazu wurden die Wechselwirkungen der Atomkerne sequentiell benachbarter Aminosäuren ausgenutzt: in dreidimensionalen Experimenten wurde Magnetisierung über die J-Kopplung von den H-N-Paaren der Amidgruppe auf die C_α -Atome der eigenen und der vorangegangenen Aminosäure übertragen. Ein analoges Experiment wurde auch für die C_β -Atome durchgeführt. Aus dem Vergleich der ^{13}C -Verschiebungen von eigener und Vorgängeraminoäure konnte die sequentielle Zuordnung erschlossen werden.

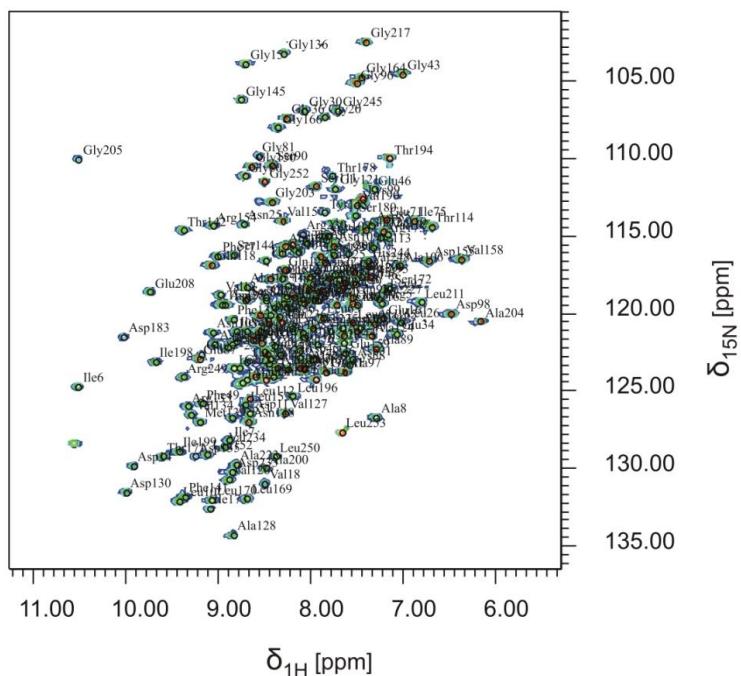


Abbildung 39: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von HisF (C. Liebold, 2009)

Mit Hilfe der Zuordnung konnte der katalytisch essentielle Rest Asp11 im aktiven Zentrum von HisF pH-titriert und ein pK_S von 6,8 ermittelt werden (mündliche Mitteilung C. Liebold). Eine derart deutliche pK_S -Verschiebung ist für katalytische Reste nicht ungewöhnlich (Nielsen & McCammon 2003) und deckt sich mit der Rolle von Aps11 im postulierten Reaktionsmechanismus von HisF als allgemeine Säure oder Base (Beismann-Driemeyer & Sterner 2001). Der erhöhte pK_S wurde allerdings nur in Phosphatpuffer festgestellt. Weder in Tris-Puffer, noch in Anwesenheit von Sulfat konnte das Resultat bestätigt werden. In Anwesenheit der Liganden ImGP bzw. ProFAR war das Signal von Asp11 nicht mehr zu detektieren, so dass eine Titration nicht möglich war. Daher bleibt offen, ob die Bindung von

Liganden den pK_S -Wert tatsächlich erhöht oder ob die Veränderung im Ladungszustand von Phosphat ($pK_{S2} = 7,2$) im Laufe der Titration dem Asp11-Signal aufgeprägt wurde.

5.3 Bindung von HisF Liganden

Zur Detektion von strukturellen Veränderungen der Synthaseuntereinheit HisF durch die Bindung eines Liganden wurden Titrationen mit ProFAR, ImGP und NAD^+ durchgeführt. Die Bindung von ProFAR führte zu Verschiebungen der Signale über das gesamte Protein. Bei sättigenden ProFAR-Konzentrationen konnte eine Aufspaltung mehrerer Signale beobachtet werden, was jeweils zwei verschiedenen Konformationszuständen entspricht. Da die aufgespaltenen Signale von Aminosäuren stammen, die über das gesamte Protein verteilt sind (Abbildung 40), kann davon ausgegangen werden, dass ProFAR eine globale Konformationsänderung in HisF induziert.

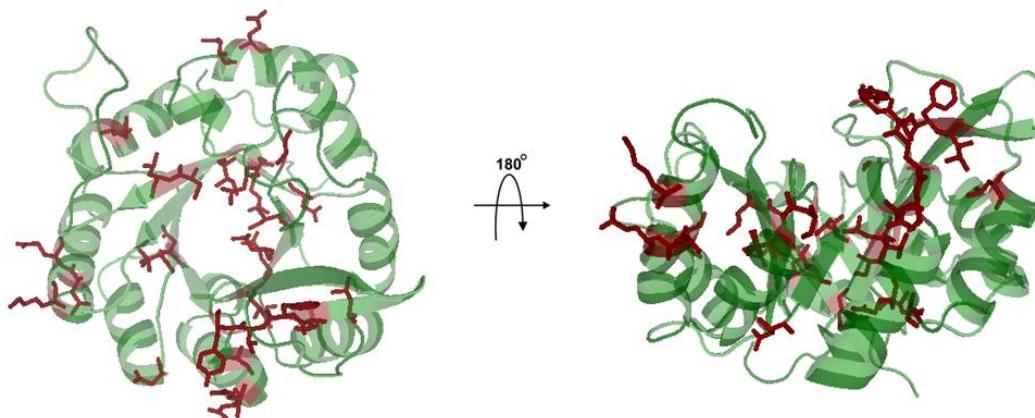


Abbildung 40: Bänderdiagramm von HisF (grün) nach ProFAR-Bindung.

Die Aminosäuren, deren Signale sich in Anwesenheit sättigender ProFAR-Konzentrationen in zwei Signale aufspalten sind in rot dargestellt (C. Liebold 2009).

In Anwesenheit von NAD^+ und ImGP war anders als in Anwesenheit von ProFAR keine Aufspaltung in mehrere Signale zu beobachten.

5.4 Bindung von Ammoniak und Xenon

Durch Änderungen in der chemischen Verschiebung einzelner Aminosäuren konnten Bindepunkte des Substrates Ammoniak und des Edelgases Xenon, das als Sonde für hydrophobe Kavitäten dient, bestimmt werden (Schoenborn & Nobbs 1966; Corda *et al.* 2004). Als Ammoniakbindepunkt konnte eine bereits von Amaro *et al* (2005) durch Moleküldynamik-Simulationen beschriebene Kavität innerhalb des Ammoniakkanaals nahe

dem Salzbrückencluster (Arg5, Glu46, Lys99 und Glu167) identifiziert werden. Für Xenon wurden Änderungen in den chemischen Verschiebungen von Aminosäuren in der Umgebung von drei mit dem Programm HOLLOW (Ho & Gruswitz 2008) gefunden Kavitäten beobachtet: zwei seitliche und eine zentrale innerhalb des β -barrels, die mit der der Lage der oben erwähnten Bindestelle für Ammoniak übereinstimmt.

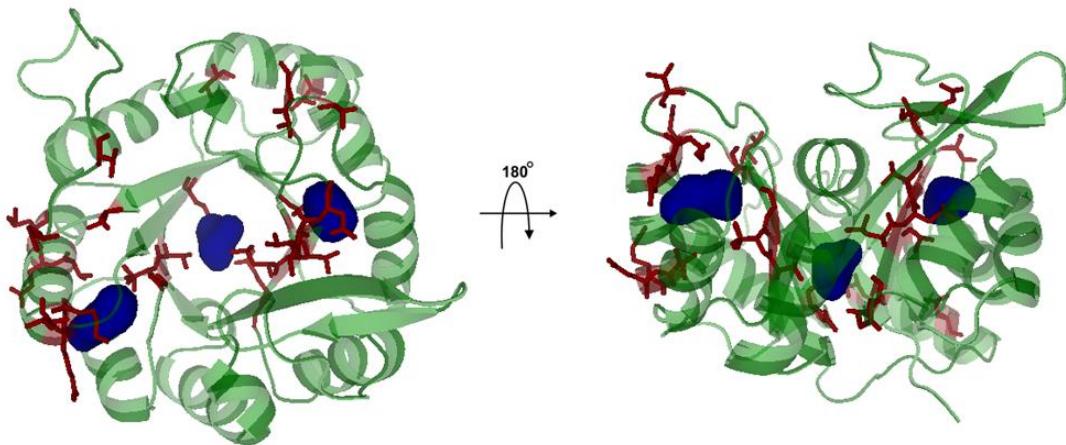


Abbildung 41: Bänderdiagramm von HisF (grün) mit Xenon Bindestellen.

Die Aminosäuren, deren chemische Verschiebungen sich durch die Anwesenheit von Xenon verändern sind in rot dargestellt. Blaue Bereiche veranschaulichen die mit dem Programm HOLLOW identifizierten Kavitäten in HisF (C. Liebold 2009).

Xenon-bindende Kavitäten werden mit erhöhter Flexibilität und der Möglichkeit für den internen Transport von Substraten in Verbindung gebracht (Brunori et al, 2004). Im Falle von HisF wäre eine Beteiligung am intramolekularen Ammoniaktransport denkbar. Dafür spricht, dass durch Xenonzugabe Veränderungen am Salzbrückennetz (Glu46, Glu167), im Kanal (Leu169) und an den Resten, die als Stationen des Ammoniaktransportes postuliert wurden (Thr78, Ser201; Amaro *et al.* 2003,2005), auftreten.

6 Konstitutiv aktives TrpG

6.1 Einleitung

Die Glutaminase-Untereinheit TrpG bildet zusammen mit der Synthase-Untereinheit TrpE die Anthranilat Synthase (AS), die als Vertreter der GATasen den ersten Schritt in der Biosynthese des Tryptophans katalysiert (Details zur Struktur und Funktion der AS finden sich in Kapitel 7.2). In *T. maritima* wie auch *E. coli* und *S. typhimurium* ist TrpG mit dem Enzym Anthranilat-Phosphoribosyl-Transferase (TrpD) fusioniert, das für den darauf folgenden Schritt in der Tryptophan-Biosynthese verantwortlich ist (Hwang & Zalkin 1971; Grieshaber & Bauerle 1974; Yanofsky *et al.* 1981). In *N. crasse* oder *S. cerevisiae* liegt TrpG dagegen als Fusionsprotein mit TrpC vor (Hutter *et al.* 1986). Abbildung 42 zeigt die genomische Organisation von TrpG in verschiedenen Organismen. Im Folgenden wird mit TrpG oder TrpGD immer das Protein aus *T. maritima* bezeichnet, falls nicht anders angegeben.

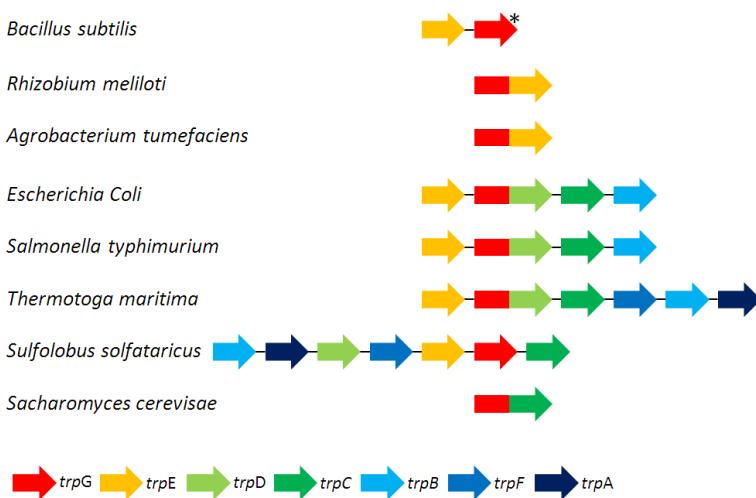


Abbildung 42: Vorkommen von TrpG als Fusionsprotein mit TrpE, TrpD oder TrpC.

Gezeigt ist die genomische Organisation von *trpG* und dessen Lage innerhalb eines ggf. vorhandenen Tryptophan-Operons in verschiedenen Organismen. Erstellt nach Angaben der STRING-Datenbank (<http://string.embl.de>). * amphibolare Glutaminase, die die Funktion von TrpG und PabA besitzt.

Das TrpGD Fusionsprotein aus *T. maritima* lässt sich durch Trypsin in die beiden stabilen Domänen TrpG (Aminosäuren 1-197) und TrpD (Aminosäuren 198-542) spalten. Mittels Gelfiltration wurde im Anschluss an die Spaltung gezeigt, dass die katalytisch aktiven monofunktionalen Proteine TrpG und TrpD nicht mehr miteinander interagieren (Ivens 1998). Zur Ausbildung des AS Komplexes mit TrpE aus *T. maritima* ist nur TrpGD, nicht jedoch monofunktionelles TrpG in der Lage (List 2005).

Typischerweise wird die Aktivität der Glutaminase-Untereinheit von GATasen streng reguliert. Sowohl die obligatorische Komplexbildung mit einer Synthase-Untereinheit, als auch ein essentielles Signal durch einen Synthaseliganden stellen sicher, dass Glutamin nicht unnötig hydrolysiert wird (Massiere & Badet-Denisot 1998). Durch vier Aminosäureaustausche innerhalb eines Abschnitts in der Nähe des aktiven Zentrums von TrpG konnte jedoch die konditionale in eine konstitutive Glutaminaseaktivität umgewandelt werden (Häger 2005), d.h. durch diese Mutante TrpG-b7 (L126G-V127Y-T129Y-Y131V) wird auch in Abwesenheit von TrpE kontinuierlich Glutamin hydrolysiert. (Der entsprechend an der Kontaktfläche mutierte Abschnitt b7 sowie die sowie die hinter den Austauschen stehenden Überlegungen sind in Kapitel 7.4 näher beschrieben.) Anders als bei der für HisH-Y138A:HisF, HisH-K181A:HisF und HisH-Y138A-K181A:HisF gefundenen konstitutiven Glutaminaseaktivität (siehe 3.2.4.4) ist bei TrpG-b7 die Komplexbildung mit der Synthase für die katalytische Aktivität nicht mehr notwendig. Um herauszufinden, welche der vier Mutationen für den Effekt verantwortlich ist, wurden die Austausche der Mutante TrpG-b7 vereinzelt und die Glutaminaseaktivitäten der Einzelmutanten bestimmt. Zusätzlich wurde versucht, die beobachtete konstitutive Glutaminaseaktivität auf andere Glutaminasegerüste wie TrpG aus *S. solfataricus* oder HisH zu übertragen.

6.2 Gerichtete Mutagenese zur Herstellung der *trpG/trpGD*- und *hisH*-Genkonstrukte

Die entsprechenden Mutationen wurden über Megaprimer-PCRs (siehe 2.3.3) mit Hilfe der in Kapitel 1.8 aufgelisteten Primer in das *trpG* bzw. *hisH* Gen eingeführt. Die Klonierungen wurden so durchgeführt, dass Konstrukte in pET28a um einen N-terminalen und in pET24a um einen C-terminalen His₆-Tag verlängert werden. Im Folgenden sind die verwendeten *trpG*, *trpGD* und *hisH* Genkonstrukte mit ihren Restriktionsschnittstellen und Expressionsplasmiden aufgelistet:

pET11c <i>trpG</i> WT*	(<i>NdeI/BamHI</i>)*	pET28a <i>trpG-S175A</i>	(<i>NdeI/BamHI</i>)
pET21a <i>trpG-L126G</i>	(<i>NdeI/BamHI</i>)	pET21a <i>trpG-V127Y</i>	(<i>NdeI/BamHI</i>)
pET28a <i>trpG-T129Y</i>	(<i>NdeI/BamHI</i>)	pET28a <i>trpG-T129F</i>	(<i>NdeI/BamHI</i>)
pET21a <i>trpG-T129A</i>	(<i>NdeI/BamHI</i>)	pET28a <i>trpG-Y131V</i>	(<i>NdeI/BamHI</i>)
pET21a <i>trpGD</i> WT**		pET21a <i>trpGD T129Y</i>	(<i>NdeI/XhoI</i>)
pDS <i>hisH</i> WT*	(<i>SphI/HindIII</i>)*	pET24a <i>hisH-E180A</i>	(<i>NdeI/BamHI</i>)
pET24a <i>hisH-E180L</i>	(<i>NdeI/BamHI</i>)	pQE70 <i>hisH-S182V</i>	(<i>SphI/HindIII</i>)

pQE70 <i>hisH</i> -K181N	(<i>SphI/HindIII</i>)	pQE70 <i>hisH</i> -K181S	(<i>SphI/HindIII</i>)
pQE70 <i>hisH</i> - E180A-K181N	(<i>SphI/HindIII</i>)	pQE70 <i>hisH</i> - K181S-S182V	(<i>SphI/HindIII</i>)
*(Häger 2005), **(Ivens 1996)			

6.3 Heterologe Expression und Reinigung der TrpG/TrpGD- und HisH-Mutanten

Von Zellen mit den verschiedenen Konstrukten wurden zunächst stets zwei einzelne Kolonien für eine analytische Probeexpression (siehe 2.5.1) in einem Volumen von 10 ml angezogen, um die Menge und Löslichkeit der Proteine zu kontrollieren. Die präparative Expression der Konstrukte erfolgte für pDS- und pQE-Vektoren in frisch transformierten KK8-Zellen, für pET-Vektoren in frisch transforinierten BL21(DE3)Rosetta Zellen, üN in LB-Medium und wurde mit IPTG induziert (siehe 2.5.3). Für die Markierung mit L-Seleno-Methionin (SeMet) wurde TrpGD in dem Methionin-auxotrophen Stamm B834(DE3) in M9 Minimalmedium mit SeMet exprimiert (siehe 1.11 und 2.5.3). Da die hergestellten rekombinanten Enzyme aus dem hyperthermophilen Bakterium *T. maritima* stammten, wurde nach präparativer Expression als erster Reinigungsschritt der lösliche Zellextrakt erhitzt (siehe 2.5.5.1) und dadurch ein großer Teil der Wirtsproteine denaturiert und ausgefällt. Die weitere Aufreinigung der Enzyme ohne His₆-Tag erfolgte über Anionenaustausch-Chromatographie (siehe 2.5.5.3) und, je nach Bedarf, zur Abtrennung von DNA über Ammoniumsulfatfällung (siehe 2.5.7) oder präparative Gelfiltration (siehe 2.5.6). Die weitere Aufreinigung der Enzyme mit His₆-Tag erfolgte mit Hilfe von Metallchelat-Affinitätschromatographie (siehe 2.5.5.2). Der Verlauf einer Reinigung über Metallchelat-Affinitätschromatographie ist in Abbildung 43 exemplarisch für HisH-E180A gezeigt.

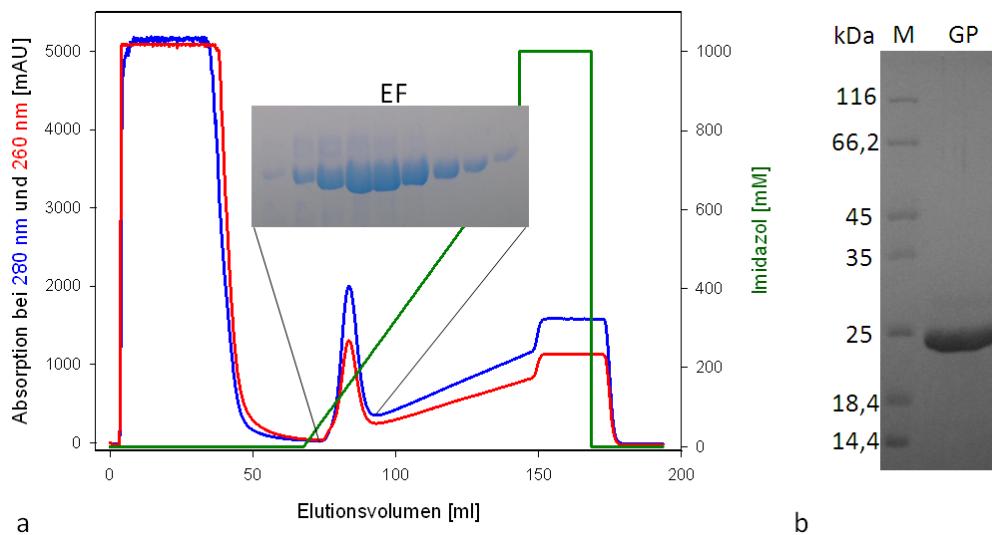


Abbildung 43: Reinigung des rekombinant exprimierten HisH-E180A Proteins.

(a): Das Elutionsprofil wurde über die Absorption bei 260 nm (rot) und 280 nm (blau) aufgenommen. Die Elution erfolgte über einen Imidazolgradienten von 0 – 1000 mM (grün). Die Elutionsfraktionen (EF) (75 – 200 mM Imidazol) enthalten sauberes Protein (analysiert über SDS-PAGE (12,5 %)) (b) M: Markerproteine mit molaren Massen in kDa. GP: gereinigtes HisH-E180A.

Die Löslichkeit der Proteine lag bei ca. 50 %. Die Fraktionen mit gereinigtem Protein wurden jeweils vereinigt und gegen 5 l 50 mM KP pH 7,5 dialysiert. Die Reinheit der Proteine wurde nach der Dialyse über SDS-PAGE abgeschätzt und lag in der Regel bei über 90 % (Abbildung 44).

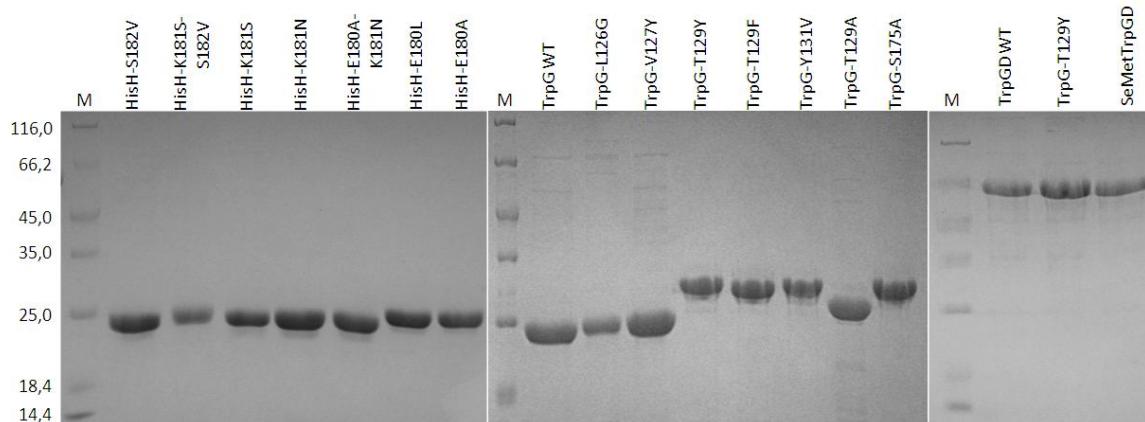


Abbildung 44: SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) zur Analyse des Reinheitsgrades der rekombinant hergestellten HisH, TrpG und TrpGD Proteine.

M: Markerproteine mit molaren Massen in kDa.

Die Ausbeute betrug bei allen Mutanten zwischen 10 und 45 mg Protein pro Liter Zellkultur. Keiner der Austausche hatte einen negativen Einfluss auf die Löslichkeit der Proteine. Gereinigtes Protein wurde in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80 °C gelagert.

6.4 TrpG-Mutanten mit konstitutiver Glutaminaseaktivität

Zunächst wurden die TrpG-Mutanten mit den aus TrpG-b7 vereinzelten Austauschen L126G, V127Y, T129Y und Y131V mit dem gekoppelten kontinuierlichen Assay auf Glutaminaseaktivität getestet (siehe 2.7.3.1; Abbildung 21). Dabei stellte sich heraus, dass sowohl die Mutante L126G, als auch die Mutante T129Y konstitutive Glutaminaseaktivität besitzen (Abbildung 45), wogegen die Mutanten V127Y und Y131V wie auch der WT bei 20 μ M Enzymkonzentration keine diesbezügliche Aktivität zeigten.

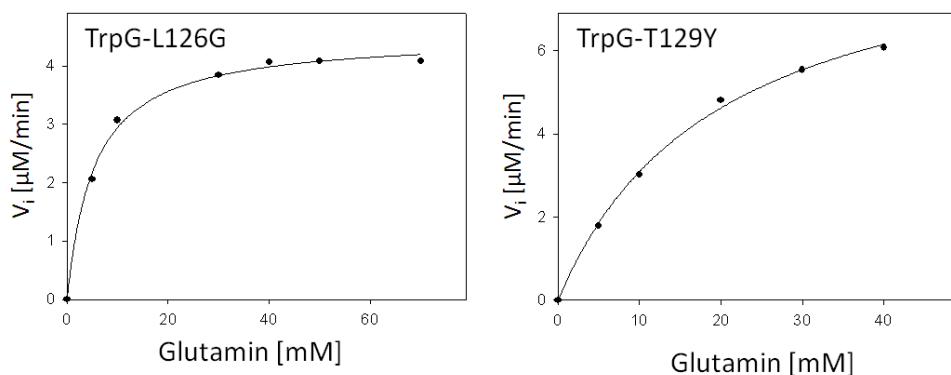


Abbildung 45: Sättigungskurve zur Quantifizierung der konstitutiven Glutaminaseaktivität von TrpG-L126G und TrpG-T129Y.

Der Umsatz erfolgte durch 5 μ M TrpG-Mutante in 50 mM Tricine/KOH pH 8,0 bei RT. Die Glutamatbildung wurde über die gekoppelte GDH-Reaktion verfolgt (siehe 2.7.3.1). Aufgetragen ist jeweils die Anfangsgeschwindigkeit v_i gegen die Konzentration des Substrates Glutamin. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis eines hyperbolischen *Fits*, durch das Programm Sigma Plot.

6.5 Strukturelle Grundlagen der konstitutiven Glutaminaseaktivität

Von TrpG wurde bislang keine dreidimensionale Struktur gelöst. Um trotzdem Informationen über die Tertiärstruktur zu erhalten, wurde das online verfügbare Tool *Swiss Model* vom Protein-Modelling Server des Biozentrums Basel zur Homologie-Modellierung verwendet (Kiefer *et al.* 2009). Zwei weitere Homologie-Modelle von TrpG wurden über die Webinterfaces der Programme Modeller (Eswar *et al.* 2006) und I-Tasser (Zhang 2008) erstellt. Im Wesentlichen wurde von allen drei Anwendungen nach Proteinen mit ähnlicher Sequenz und bekannter 3D-Struktur gesucht. Für TrpG sind dies die bereits beschriebenen Glutaminasen aus den AS Komplexen von *S. solfataricus* (1gdlB) und *S. marcescens* (1i7qB/D, 1i7sB/D). Alle drei Modellingserver lieferten vergleichbare Modell-Strukturen, die vor allem im Bereich des aktiven Zentrums keine nennenswerten Unterschiede aufwiesen.

Abbildung 46 zeigt das aktive Zentrum des *Swiss Model* TrpG-Modells. Während die Seitenketten von L126, V127 und Y131 ins Lösungsmittel zeigen, bildet die Hydroxylgruppe der Seitenkette von T129 eine Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxylgruppe von S175 im

Nachbarloop aus. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung befindet sich zwischen dem Rückgrat-Sauerstoff von T129 und dem Rückgrat-NH von H172.

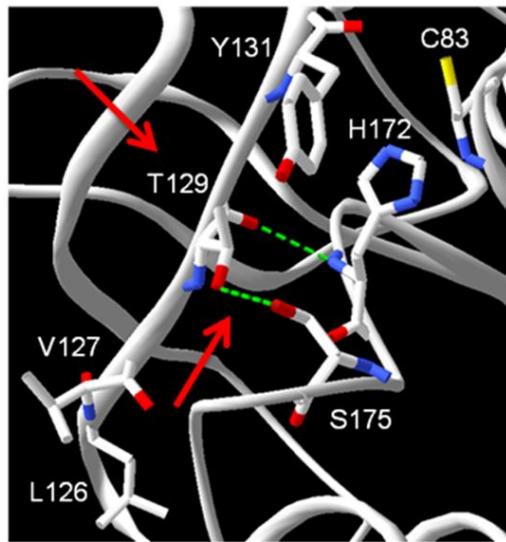


Abbildung 46: Ausschnitt des aktiven Zentrums aus dem Strukturmodell von TrpG.
Es sind die Reste H172 und C82 der katalytischen Triade sowie die in den Mutationsanalysen veränderten Reste gezeigt. Die roten Pfeile zeigen auf die Position T129 und die im Text besprochene Wasserstoffbrückenbindung.

Aus dieser Konstellation ergeben sich 3 Hypothesen zur konstitutiven Aktivierung von TrpG durch den Austausch T129Y:

- 1) Durch die beiden Wasserstoffbrückenbindungen wird der Loop mit dem katalytisch essentiellen H172 in einer inaktiven Konformation fixiert. Der Austausch T129Y zerstört eine dieser Wasserstoffbrückenbindungen, wodurch sich eine aktive Konformation einstellt.
- 2) Die Hydroxylgruppe des eingeführten Tyrosins aktiviert das katalytische H172 und wird damit Teil einer neuen katalytischen Triade.
- 3) Das eingeführte Tyrosin dreht sich während der Proteinfaltung „nach innen“ und verschiebt dadurch den Nachbarloop mit dem katalytischen H172 in eine aktive Konformation.

Zum Testen von Hypothese 1 wurden die Einzelmutanten T129A und S175A vermessen, bei denen jeweils die über die Seitenketten gebildete Wasserstoffbrücke zwischen den Loops nicht mehr ausgebildet werden kann. Keine der beiden Mutanten zeigte Glutaminaseaktivität, die Aufhebung der seitenkettenvermittelten Wasserstoffbrücke scheidet somit als Ursache für die konstitutive Glutaminaseaktivität aus. Hypothese 2 konnte durch den Nachweis

konstitutiver Glutaminaseaktivität der Mutanten T129F widerlegt werden, die die Hydroxylgruppe in der Seitenkette fehlt (Abbildung 47).

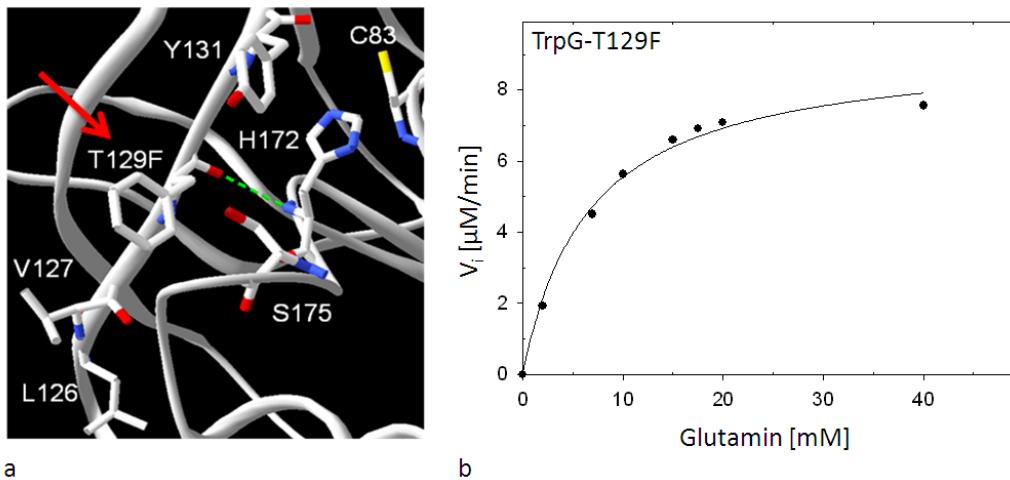


Abbildung 47: Ausschnitt des aktiven Zentrums aus dem Strukturmodell von TrpG-T129F sowie eine Sättigungskurve zur Quantifizierung ihrer konstitutiven Glutaminaseaktivität.

(a): Es sind die Reste H172 und C82 der katalytischen Triade sowie der Austausch T129F gezeigt. Der rote Pfeil zeigt auf den neu eingeführten Rest. (b): Der Umsatz erfolgte durch 10 μ M TrpG-T129F in 50 mM Tricine/KOH pH 8,0 bei RT. Die Glutamatbildung wurde über die gekoppelte GDH-Reaktion verfolgt (siehe 2.7.3.1). Aufgetragen ist jeweils die Anfangsgeschwindigkeit v_i gegen die Konzentration des Substrates Glutamin. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis eines hyperbolischen *Fits*, durch das Programm Sigma Plot.

Am plausibelsten erscheint damit Hypothese 3, also größere Konformationsänderungen am aktiven Zentrum, die aber nur durch die Aufklärung der Struktur der Mutante bestätigt werden könnten. Diese Theorie liefert auch eine mögliche Erklärung für die Aktivierung durch den Austausch L126G. Das am Anfang des Sequenzabschnitts b7 eingeführte Glycin kann zu größeren Konformationsänderungen führen, welche die Konformation des aktiven Zentrums beeinflussen und so zu konstitutiver Aktivität führen können.

In Tabelle 18 sind die aus den Sättigungskurven abgeleiteten katalytischen Parameter der TrpG-Einzelmutanten zusammen mit den Referenzen TrpG-b7, TrpG-WT sowie die Gesamtaktivität der Anthranilatsynthase (TrpGD:TrpE) aufgelistet.

Tabelle 18: Steady-state enzymkinetische Parameter der konstitutiven Glutaminaseaktivität von TrpG und TrpG-Mutanten.

Glutamin wurde durch jeweils 5 μ M der jeweiligen TrpG-Mutante (10 μ M TrpG-T129F) in 50 mM Tricine/KOH pH 8,0 bei RT umgesetzt. In jedem Ansatz befanden sich 5 mM NAD⁺ und 1mg/ml GDH. Es sind die durch einen hyperbolischen *Fit* der Sättigungskurve ermittelten Werte aufgelistet. k_{cat} : Wechselzahl; K_M^{Gln} : Michaelis-Menten-Konstante für Glutamin; k_{cat}/K_M^{Gln} katalytischer Effizienzparameter

	$k_{cat} [\text{min}^{-1}]$	$K_M^{Gln} [\text{mM}]$	$k_{cat}/K_M^{Gln} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$
TrpG-L126G	0,9	5,3	2,8
TrpG-V127Y	n.m.	n.m.	
TrpG-T129Y	1,8	19,7	1,7
TrpG-T129F	0,8	6,4	2,2
TrpG-T129A	n.m.	n.m.	
TrpG-Y131V	n.m.	n.m.	
TrpG-S175A	n.m.	n.m.	
Referenzen			
TrpG-b7 ¹	1,5	36	0,7

TrpG-WT	n.m.	n.m.	
TrpGD:TrpE ²	30	1,5	333

¹: Daten aus Häger (2005); ²: glutaminabhängige Komplexaktivität der Anthranilatsynthase. Daten aus List (2005); n.m.: nicht messbar, eventuell vorhandene Aktivitäten liegen unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Tests.

Der Vergleich der Aktivitäten zeigt, dass zwei der vier Austausche (L126G, T129Y) aus dem Abschnitt b7 unabhängig voneinander zu konstitutiver Glutaminaseaktivität führen. Da augenscheinlich keine additiven oder synergistischen Effekte vorliegen, kann man annehmen, dass beide Austausche über den gleichen Mechanismus zu konstitutiver Aktivität führen. Verglichen mit der glutaminabhängigen Gesamtaktivität der Anthranilatsynthase (TrpGD:TrpE), welcher der Aktivität der nativen Glutaminasereaktion mindestens entsprechen muss, sind die konstitutiven Aktivitäten der Mutanten um zwei Größenordnungen geringer.

6.6 Kristallisation von TrpG/TrpGD

Um die strukturellen Grundlagen des Aktivierungsmechanismus besser zu verstehen, sollte die 3D-Struktur von TrpG gelöst werden. Dazu wurden mit verschiedenen Mutanten von TrpG (siehe 2.8), Kristallisationsbedingungen in der *high-throughput crystallization facility* am EMBL Hamburg gesucht (Mueller-Dieckmann 2006). Von den getesteten TrpG-Mutanten kristallisierte nur die mit dem Austausch T129F (Abbildung 48a).

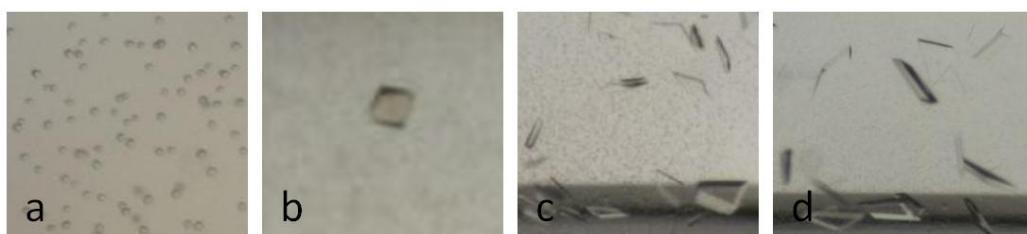


Abbildung 48: Proteinkristalle von verschiedenen TrpG-Mutanten.

(a): 12 mg/ml TrpG-T129F + 20 mM DON (0,1 M NaAc pH 4,6, 18 % PEG4000); (b): 12 mg/ml TrpGD+ 20 mM DON (0,1M HEPES pH 7,5, 0,2 M MgCl₂, 15 % PEG 400); (c) :SeMet-TrpGD (0,1 M NaAc pH 4,6, 0,12 M K⁺SCN; 30 % 2-methyl-2,4 Pentandiol; 0,1 M NaCl) (d): TrpGD-T129Y (Bedingungen wie c)

Die erhaltenen Kristalle streuten bis zu einer Auflösung von maximal 12 Å (*beamline* X11, DESY Hamburg) und ließen sich nicht weiter verbessern. Natives TrpGD Fusionsprotein lieferte Kristalle (Abbildung 48b), die an der Beamline ID23-2 am ESRF in Grenoble bis zu einer Auflösung von 3 Å streuten. Mit dem aufgenommenen Datensatz war es jedoch nicht möglich die Struktur durch molekularen Ersatz zu lösen. Als Suchmodelle wurden alle bekannten TrpG und TrpD Strukturen sowie nur die Rückgratverläufe oder einzelne Abschnitte daraus verwendet. Um ohne molekularen Ersatz zu einer 3D-Struktur zu gelangen,

wurden die TrpGD Kristalle mit Xenon oder der Iodverbindung I_3C gesoakt, deren anormale Beugungssignale auch ohne Suchmodell eine Strukturlösung ermöglichen sollten. Allerdings führte dies zu deutlich verschlechterten Beugungseigenschaften der Kristalle, wodurch diese für eine Strukturbestimmung nicht mehr geeignet waren. Aus diesem Grund wurde das Protein TrpGD mit L-Seleno-Methionin (SeMet) markiert. Die Einbaurate von SeMet wurde per Massenspektrometrie durch Prof. Rainer Deutzmann (Lehrstuhl Biochemie I, Universität Regensburg) überprüft. Die berechnete Masse für vollständig markiertes SeMet-TrpGD beträgt 60433,6 Da, die durch ESI-MS bestimmte Masse 60441,3 Da. Da der Massenunterschied von 7,7 Da innerhalb der Fehlertoleranz liegt kann davon ausgegangen werden, dass das Protein vollständig markiert wurde. Für SeMet-TrpGD mussten neue Kristallisationsbedingungen gefunden werden (Abbildung 48c). Unter identischen Bedingungen konnte auch TrpGD-T129Y kristallisiert werden (Abbildung 48d). Die Beugungseigenschaften dieser Kristalle waren jedoch für eine Strukturbestimmung erneut nicht ausreichend.

Da die Strukturbestimmung von TrpG nicht ohne Weiteres möglich war, wurde versucht den aktivierenden Effekt auf andere Gerüste zu übertragen und dadurch eine 3D-Struktur einer konstitutiv aktiven Glutaminase zu erhalten. Zunächst wurde der Austausch T129Y auf TrpG aus *S. solfataricus* übertragen. Die Gene *ssTrpG* und *ssTrpG-T133Y* ließen sich jedoch nur unzureichend exprimieren und reinigen. In Zusammenarbeit mit der Firma MrGene (Regensburg) konnte zwar durch eine Codonoptimierung die Menge an insgesamt erzeugtem (<http://blog.mrgene.com/some-like-it-hot-others-like-more-protein.html>), nicht aber der Anteil an löslichem Protein gesteigert werden. Vergleichende Aktivitätstests mit durch einen Hitzeschritt angereicherten Zellextrakten lassen vermuten, dass die konstitutive Glutaminaseaktivität von *ssTrpG-T133Y* zudem deutlich schwächer ausfällt als bei TrpG T129Y (Daten nicht gezeigt).

Als zweites Gerüst wurde die Glutaminase HisH verwendet, da von monomerem HisH bereits eine Röntgenstruktur gelöst wurde (Douangamath *et al.* 2002). An der Stelle von T129(TrpG) liegt in HisH bereits ein Tyrosin. Deshalb wurde durch rationales Design über verschiedene Austausche in der Umgebung des katalytisch essentiellen Histidins versucht, die katalytische Triade zu aktivieren oder neu auszurichten. Keine der getesteten Mutanten E180A, E180L, E180A-K181N, K181S-S182V, K181N, K181S, S182V zeigte jedoch synthaseunabhängige konstitutive Glutaminaseaktivität.

Mit den aufgelisteten Mutanten von HisH war das rationale Design zur Etablierung von Synthase-unabhängiger konstitutiver Glutaminaseaktivität zunächst erschöpft. Daher sollte ein *Screening* System für Glutaminaseaktivität entwickelt werden, um mit dessen Hilfe aus einer Genbank konstitutiv aktive Mutanten isolieren zu können.

6.7 Screening nach Glutaminaseaktivität im Periplasma

Da das Cytoplasma von *E. coli* hohe Glutaminaseaktivität besitzt, wurden *hisH* und *trpG-T129Y* jeweils N-terminal um eine *pelB* Sequenz erweitert, um das gebildete Genprodukt in das Periplasma von *E. coli* zu sekretieren (Better *et al.* 1988). Dazu wurden über Primer (siehe 1.8) an beiden Genen *NcoI/BamHI* Schnittstellen eingeführt, über die die Gene in den Vektor pET26b kloniert und dadurch um die bereits im Vektor vorhandene N-terminale *pelB*-Sequenz verlängert wurden. Für die Expression in KK8 Zellen wurde über ein *BspHI/BamHI*-Primerpaar (siehe 1.8) die *pelB*-Sequenz zusammen mit dem jeweiligen Gen in den Vektor pQE60 umkloniert. Der Vektor pQE60 wurde dafür mit dem *BspHI*-Isoschizomer *NcoI* und *BamHI* verdaut.

HisH diente dabei als Negativ- und TrpG-T129Y als Positivkontrolle für das zu etablierende Screening-System. Für den Aktivitätstest wurde das Periplasma nach üN Expression durch einen osmotischen Schock aufgeschlossen und durch Zentrifugation vom Cytoplasma getrennt (siehe 2.5.2). Die Glutaminaseaktivität im Periplasmaaufschluss wurde durch die Reaktion mit Hydroxylamin bestimmt (siehe 2.7.5). Abbildung 49 zeigt die Ergebnisse des Assays nach periplasmatischer Expression von HisH und TrpG-T129Y in KK8 und T7-Express Zellen.

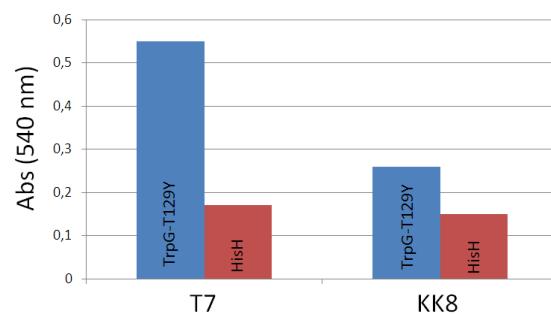


Abbildung 49: Hydroxylamin-Assay zum Nachweis von Glutaminaseaktivität in Periplasmalysaten.

In T7 und KK8 Zellen wurden jeweils HisH und TrpG-T129Y mit einem periplasmatischen Sekretionstag üN exprimiert. Die im Periplasmaaufschluss vorhandene Glutaminaseaktivität wurde mit einem Hydroxylamin-Assay bestimmt über die Absorption bei 540 nm bestimmt.

In beiden Zelltypen ist zu erkennen, dass die Periplasmafraktionen mit TrpG-T129Y mehr Glutaminaseaktivität zeigen als die Negativkontrolle (HisH). Die deutlich höhere Aktivität in T7 Zellen ist vermutlich auf eine stärkere Überexpression zurückzuführen.

Da das beschriebene System auf einer zeitaufwändigen Isolierung und Analyse von einzelnen Klonen basiert, wurde versucht die Glutaminaseaktivität im Periplasma direkt auf Agarplatten sichtbar zu machen. Dazu wurde das chromogene Glutaminanalogon L-Glutaminsäure γ -(4-nitroanilid) verwendet. Während der Glutaminasereaktion wird das blass gelbe Analogon in Glutamat und para-Nitroanilin gespalten, das eine kräftige gelbe Farbe besitzt (Tate & Meister 1977). Der Farbumschlag konnte mit gereinigtem TrpG-T129Y eindeutig beobachtet werden. Auf Grund der Labilität des Analogons färbten sich die Agarplatten jedoch bereits nach wenigen Stunden bei 37 °C gelb und waren zur Detektion von Enzymaktivität im Screeningverfahren nicht geeignet. Weitere Versuche unter Anwendung des Screeningsystems wurden an dieser Stelle aus Zeitmangel eingestellt.

6.8 Reaktionsmechanismus und geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Glutaminasereaktion von TrpG-T129Y

Während der Glutaminasereaktion wird Glutamin über die Zwischenstufe eines Thioesters zu Ammoniak und Glutamat hydrolysiert. Dazu wird Cys83 der katalytischen Triade durch His172 aktiviert und bildet ein Thiolat-Anion aus, das am Substrat Glutamin den Carbonyl-Kohlenstoff der Carboxamidgruppe angreift (Abbildung 50a). Dadurch entsteht ein tetrahedrales Intermediat mit einer negativen Ladung am Amid-Sauerstoff (Abbildung 50b), die durch die Amidgruppen des konservierten Oxyanion-Loches stabilisiert wird. Durch Protonierung der Amidgruppe des tetrahedralen Intermediats wird diese zur guten Abgangsgruppe und als Ammoniak abgespalten (Abbildung 50c). Zurück bleibt ein reaktives Thioesterintermediat, das im Anschluß durch Wasser wieder über ein tetrahedrales Intermediat (Abbildung 50d) zum zweiten Produkt Glutamat hydrolysiert wird (Abbildung 50e,f). Im letzten Schritt wird das katalytische Cystein reprotoniert.

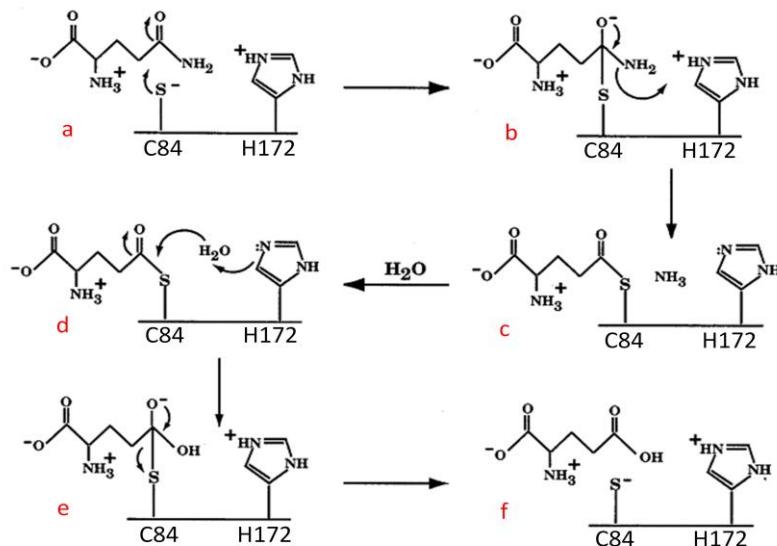


Abbildung 50: Reaktionsmechanismus der Glutaminasereaktion (Thoden et al. 1998)

Zur Bestimmung des Reaktionsschritts, der durch die aktivierende Mutation T129Y beschleunigt wird, wurde über einen radioaktiven Filterbindungsassay die Konzentration des Thioesters im *steady-state* bestimmt (siehe 2.7.4). Dazu wurden TrpG WT und TrpG-T129Y mit radioaktivem Glutamin inkubiert, die Reaktion mit TCA gequencht und der Reaktionspuffer mit dem enthaltenen radioaktivem Glutamin und Glutamat über einen Filter abgezogen. Da der Thioester unter diesen Bedingungen säurestabil ist (Lusty 1992) enthält das im Filter verbliebene Präzipitat aus Enzym-Thioester Komplex somit den im *steady-state* vorhandenen Thioester. Mit Hilfe eines Szintillationszählers wurde anschließend die im Filter vorhandene Radioaktivität gemessen und daraus die Thioesterkonzentration berechnet.

Tabelle 19: Konzentrationsbestimmung des Thioesters im *steady-state* bei TrpG-WT und TrpG-T129Y über einen Filterbindungsassay

	gelabelte Enzymfraktion [%]
TrpG-WT	1,3 ± 0,5
TrpG-T129Y	13,8 ± 1,9

Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Messungen dar.

Tabelle 19 zeigt, dass bei TrpG-T129Y eine um den Faktor 10 höhere Thioesterkonzentration im *steady-state* vorliegt als bei TrpG WT. Dieses Ergebnis lässt sich sowohl durch eine beschleunigte Bildung des Thioesters im Vergleich zum WT als auch durch eine verlangsamte Thioesterhydrolyse erklären.

Um zwischen diesen beiden Alternativen entscheiden zu können, wurde der ratenlimitierende Schritt der Glutaminhydrolyse durch die Reaktion mit Hydroxylamin bestimmt (siehe 2.7.5). Die Spaltung des Thioesters erfolgt normalerweise durch den nukleophilen Angriff von Wasser. Hydroxylamin stellt ein stärkeres Nukleophil als Wasser dar und reagiert daher sehr

schnell mit dem Thioester unter Bildung von γ -glutamyl-Hydroxamat. Die Gesamtgeschwindigkeit der Glutaminhydrolyse wird daher in Anwesenheit von Hydroxylamin durch die Thioesterbildungsraten limitiert (Chaparian & Evans 1991). Der Vergleich zwischen der so gemessenen Thioesterbildungsraten und der Glutaminhydrolyseraten in Abwesenheit von Hydroxylamin liefert somit den ratenlimitierenden Schritt der Gesamtreaktion. Abbildung 51 (links) zeigt die Menge an gebildetem γ -glutamyl-Hydroxamat in Abhängigkeit verschiedener Hydroxylamin-Konzentrationen. Bereits ab einer Konzentration von 50 mM Hydroxylamin wird der gebildete Thioester vollständig in γ -glutamyl-Hydroxamat umgesetzt. Abbildung 51 (rechts) zeigt die Bildung von γ -glutamyl-Hydroxamat durch TrpG-T129Y im zeitlichen Verlauf.

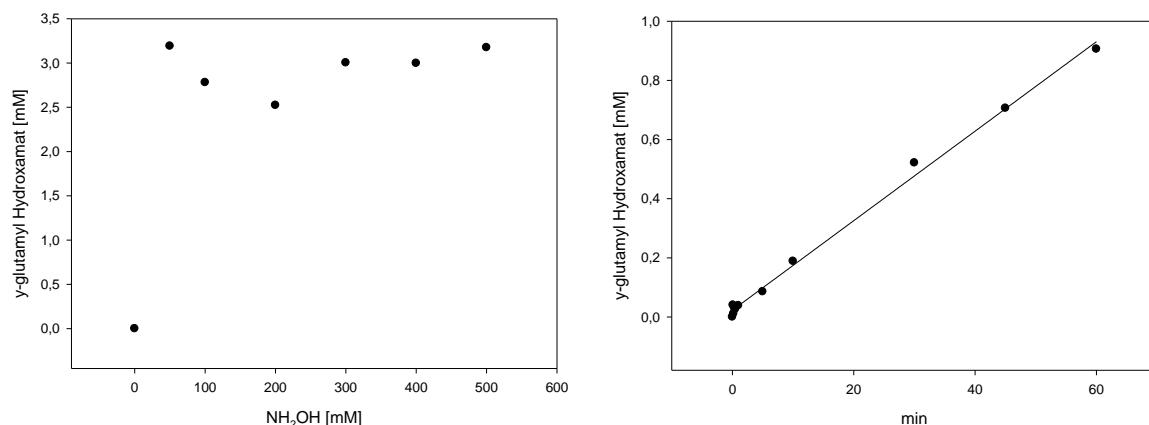


Abbildung 51: Bildung von γ -glutamyl-Hydroxamat

(links): Bildung von γ -glutamyl-Hydroxamat bei verschiedenen Hydroxylamin-Konzentrationen. Es wurden jeweils 50 mM Glutamin durch 20 μM TrpG-T129Y in 50 mM KP pH 7,5 umgesetzt. Die Ionenstärke wurde durch NaCl ausgeglichen. Aufgetragen ist die innerhalb einer Stunde gebildete Menge an γ -glutamyl-Hydroxamat gegen die eingesetzte Hydroxylamin-Konzentration. Die γ -glutamyl-Hydroxamat Konzentration wurde (nach Zugabe einer 1:1:1 Quenchlösung aus 80% TCA, 6N HCl und 10% FeCl_3 in 0,02N HCl) aus der Absorption bei 540 nm über eine Eichkurve berechnet.

(rechts): Zeitlicher Verlauf der γ -glutamyl-Hydroxamat Bildung. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots aus einem Ansatz mit 50 mM Glutamin, 500 mM NH_2OH , 10 μM TrpG-T129Y in 50 mM KP pH 7,5 entnommen, wie oben beschrieben gequenched und die jeweilige γ -glutamyl-Hydroxamat Konzentration bestimmt.

Die Bildungsraten des γ -glutamyl-Hydroxamats beträgt $1,7 \text{ min}^{-1}$ und entspricht damit der Geschwindigkeit der Glutaminasereaktion von TrpG-T129Y in Abwesenheit von Hydroxylamin ($1,8 \text{ min}^{-1}$). Damit ist gezeigt, dass nicht die Hydrolyse, sondern die Bildungsraten des Thioesters in der TrpG-T129Y Reaktion den ratenlimitierenden Schritt darstellt. Andernfalls, würde die Bildungsraten für γ -glutamyl-Hydroxamat über die Rate der normalen Glutaminasereaktion hinausgehen wie es zum Beispiel für die Hamster CAD-Glutaminase gezeigt wurde (Chaparian & Evans 1991). Im Gegensatz zu TrpG-T129Y wird bei TrpG WT kein γ -glutamyl-Hydroxamat gebildet. Die typische Rotfärbung während der Nachweisreaktion bleibt hier aus (Abbildung 52).

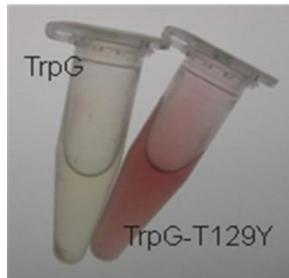


Abbildung 52: Farbnachweis für γ -glutamyl-Hydroxamat bei TrpG-WT und TrpG-T129Y.

Reaktionsansatz: 10 μ M TrpG Mutante, 500 mM NH_2OH , 50 mM Gln in 50 mM KP pH 7,5; Der Farbumschlag wird durch die Zugabe einer Quenchlösung (1:1:1; 80% TCA, 6 N HCl und 10% FeCl_3 in 0,02N HCl) nach 1 h Inkubation herbeigeführt. Mit γ -glutamyl-Hydroxamat entsteht ein roter Farbkomplex, der über die Absorption bei 540 nm quantifiziert werden kann.

Dies bedeutet, dass unter den verwendeten Reaktionsbedingungen durch TrpG-WT kein Thioester in nachweisbarer Konzentration gebildet wird. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Glutaminasereaktion ist also die Bildung des Thioesterintermediates (Abbildung 50c) die durch die Mutation T129Y beschleunigt wird.

In Ermangelung einer Röntgenstruktur von TrpG-T129Y wurde von Dr. Marco Bocola (Lehrstuhl für Biochemie II, Universität Regensburg) mit Hilfe des von *Swiss Model* erstellten TrpG-T129Y Homologiemodells eine Moleküldynamik-Simulation mit dem Programm Moloc durchgeführt (Abbildung 53a). Während der Simulation führte eine leichte Verschiebung von T129Y in Richtung des katalytischen His172 zu einer Neuausrichtung der katalytischen Triade (Abbildung 53b).

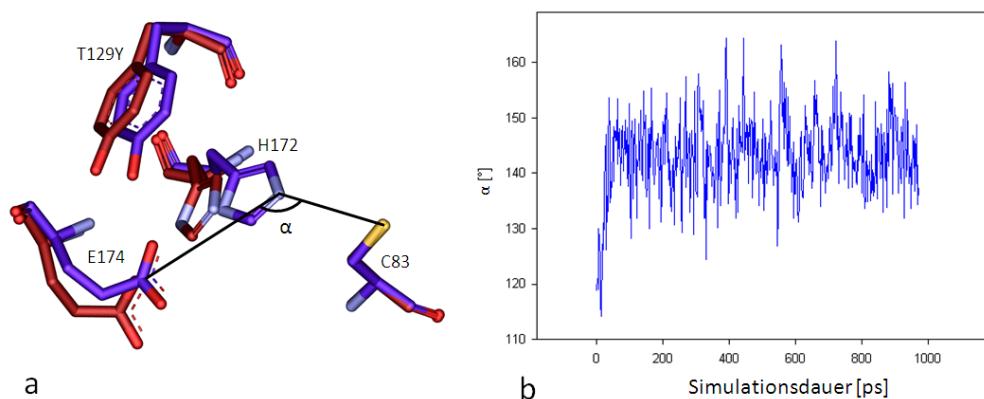


Abbildung 53: Ergebnis der Moleküldynamiksimulation von TrpG-T129Y.

(a): Die Änderung des Winkels α wurde als Maß für die verbesserte Ausrichtung der katalytischen Triade während der Simulation aufgezeichnet. (b): TrpG-T129Y vor (rot) und nach (blau) einer 972 ps MD Simulation.

Dabei änderte sich der in Abbildung 53 gezeigte Winkel α von 120 auf ca. $140^\circ \pm 7$ und der Abstand zwischen Cys83 und His172 von 6 auf $4 \text{ \AA} \pm 0,5$, wodurch die Triade eine aktive Geometrie einnimmt (mündliche Mitteilung Dr. Marco Bocola). Als Referenz für eine aktive katalytische Triade kann die Glutaminase aus dem *S. marcescens* AS-Komplex (1i7q)

angesehen werden, in der das Thioesterintermediat in der Röntgenstruktur zu erkennen ist. Der Winkel α beträgt dort 133° und der Abstand zwischen Cys85 und His172 liegt bei $3,5 \text{ \AA}$.

6.9 Diskussion und Ausblick

Charakteristisches Merkmal der GATase Familie ist die strenge Regulation der Glutaminaseaktivität auf zwei Ebenen. Zum Einen ist es für die Glutaminase essentiell einen Komplex mit der Synthase zu bilden und zum Anderen wird die Glutaminaseaktivität durch die Bindung eines Synthase-Liganden um ein Vielfaches beschleunigt. Die hier charakterisierten Mutanten von TrpG stellen eine neue, vollständig deregulierte Form von Glutaminaseuntereinheiten dar, für deren Aktivität eine Bindung an ihre Synthase nicht mehr obligat ist. Über kinetische Experimente und einen radioaktiven Assay konnte gezeigt werden, dass der für die Inhibition der wildtypischen Form verantwortliche ratenlimitierende Schritt noch vor der Bildung des Thioesterintermediats liegt. Bis zur Bildung dieses Thioesterintermediats finden im Wesentlichen drei Teilschritte statt (Abbildung 50a-c). Erstens die Bindung von Glutamin und die Ausbildung eines Michaelis-Menten Komplexes. Zweitens die Bildung eines tetrahedralen Übergangszustandes durch den nukleophilen Angriff des Thiolatanions und drittens, die Abspaltung von Ammoniak, die zur Bildung des Thioesterintermediats führt.

Die Moleküldynamik-Simulationen haben gezeigt, dass sich durch den Austausch T129Y die katalytische Triade in eine aktive Konformation umlagert. Unter der Annahme, dass die Substratbindestellen der Glutaminasen sehr ähnlich sind, deutet die Moleküldynamik-Simulation auf keine die Glutaminbindung beeinflussenden Konformationsänderungen hin. Der zweite Schritt, der nukleophile Angriff des Thiolatanions, ist wahrscheinlich der entscheidenden Schritt im Regulationsmechanismus, da der Schwefel des katalytischen Cys84 erst durch die Imidazolgruppe des His174 aktiviert werden muss. Diese Deprotonierung könnte in der wildtypischen Konformation gegenüber der T129Y-Mutante deutlich erschwert sein. Eine andere Möglichkeit für einen langsameren Ablauf dieser Teilreaktion wäre das Fehlen eines Oxyanion-Loches. Da die Moleküldynamik-Simulation aber auch am Oxyanion-Strang keine durch T129Y induzierten Bewegungen gezeigt hat, kann davon ausgegangen werden, dass das Oxyanion-Loch wie bei HisH auch im TrpG-WT permanent funktional ausgeprägt ist (siehe 3.1.3.3). Gegen den dritten Schritt als ratenlimitierender Faktor spricht, dass einmal abgespaltener Ammoniak durch die exponierte Lage des aktiven Zentrums unmittelbar vom Lösungsmittel protoniert werden kann und damit unreaktiv wird. Eine

Rückreaktion mit dem Thioester wie sie für das, gegen das Lösungsmittel abgeschlossene System, des HisH:HisF Komplexes postuliert wurde (siehe 3.2.7), ist daher praktisch ausgeschlossen.

Für die konstitutiv aktiven TrpG-Mutanten und damit vermutlich auch für TrpG im Komplex mit TrpE bedeutet diese Erkenntnis, dass die Aktivierung vermutlich der Deprotonierung des Cys84 durch das His174 entspricht. Für den HisH:HisF Komplex wurde vermutet, dass das konservierte Asp98 an der Kontaktfläche von HisF an diesem Prozess beteiligt ist (Abbildung 28). Die strukturelle Grundlage der Aktivierung im TrpG:TrpE Komplex ist bisher unklar und soll nun durch weitere Moleküldynamik-Simulationen aufgeklärt werden.

7 Die Evolution der Glutaminamidotransferasen

7.1 Bedeutung, strukturelle Grundlagen und Evolution von Protein-Protein Wechselwirkungen in GATasen

Wechselwirkungen zwischen Proteinen sind essentiell für fast alle biologischen Funktionen (Camacho & Vajda 2002). Fast immer erfolgt die Komplexbildung dabei nicht über kovalente Bindungen, sondern über eine Reihe schwächerer Wechselwirkungen. Dazu zählen Salz- und Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen zwischen unpolaren Seitenketten und unspezifische van-der-Waals-Bindungen zwischen Elektronenhüllen benachbarter Atome. Die Reichweite dieser nicht-kovalenten Bindungen liegt etwa zwischen 2,6 und 4 Å bei einem Energiegehalt von bis zu 30 kJ/mol. Im Vergleich dazu besitzen kovalente Bindungen einen Energiegehalt von 200 – 500 kJ/mol (Winter & Noll 1998). Komplexbildung ermöglicht es Enzymen ihre Aktivitäten über allosterische Signale zu koordinieren oder flüchtige und instabile Intermediate durch Substratkanäle von einem zum nächsten aktiven Zentrum zu transferieren (Huang *et al.* 2001; Kuriyan & Eisenberg 2007; Rabinowitz *et al.* 2008). Bei hyperthermophilen Bakterien wurde nachgewiesen, dass durch Komplexbildung die Stabilität von Proteinen erhöht werden kann (Sterner & Liebl 2001; Schwab *et al.* 2008).

Angesichts der großen Menge an sequenzierten und annotierten Genomen ist die Identifizierung und Charakterisierung von Protein-Protein Interaktionen eine der zentralen Aufgaben der biochemischen und bioinformatischen Forschung. Die Entdeckung neuer Proteinkomplexe wurde in den letzten Jahren durch moderne Hochdurchsatz-Screeningverfahren wie zum Beispiel das *large scale yeast two hybrid system* (Uetz 2002; Bao *et al.* 2009) stark voran getrieben. So können heute bereits über 57600 Wechselwirkungen aus 274 Organismen (DIP, Database of interacting Proteins (Xenarios *et al.* 2002)) in zahlreichen Datenbanken wie STRING (*Search Tool for Retrieval instances of Interacting Genes & Proteins*, (von Mering *et al.* 2005)), MIPS (*Munich Information center for Protein Sequences*, (Pagel *et al.* 2005)), MINT (*a Molecular Interaction Database*, (Chatr-aryamontri *et al.* 2007)) und BIND (*Biomolecular Interaction Network Database*, (Alfarano *et al.* 2005)) abgerufen werden. Zur plastischeren Darstellung wurde das Hefe-Interaktom in einer virtuellen 3D-Zelle dargestellt (Widjaja *et al.* 2009).

Zur Klärung der strukturellen Grundlagen, der funktionellen Konsequenzen und der evolutiven Entstehung von Protein-Protein Interaktionen, sind detaillierte Untersuchungen an

Modellsystemen unerlässlich. Ein gutes derartiges Modell-System stellt die Familie der Glutaminamidotransferasen dar, deren Mitglieder vergleichsweise einfache Enzymkomplexe bilden, die oft strukturell und funktionell gut charakterisiert sind.

Glutaminamidotransferasen (GATasen) mit einer spezifischen Interaktion zwischen einer Glutaminase und ihrer Synthase sind in allen Organismen weit verbreitet. In einigen Bakterien, wie zum Beispiel *Pseudomonas acidovorans*, *Bacillus subtilis* und *Acinetobacter calcoaceticus* wurden jedoch auch Glutaminasen der Klasse I gefunden, die mit mehreren Synthasen aus unterschiedlichen Stoffwechselwegen aktive Komplexe bilden können. Glutaminasen mit solch einem „amphibolaren“ Charakter können sich beispielsweise sowohl zum Anthranilat-Synthase Komplex (AS) als auch zum 4-amino-4-deoxychorismat-Synthase Komplex (ADCS) zusammenlagern (Sawula & Crawford 1972; Kane 1977; Buvinger *et al.* 1981; Zalkin 1993; Zwick 2007).

Diese Beobachtung führte zu einer Theorie bezüglich des evolutiven Ursprungs der GATasen, wonach eine ursprüngliche Glutaminase an verschiedene Synthasen binden und mit ihnen jeweils funktionale GATasen ausbilden konnte. Im weiteren Verlauf der Evolution hätten sich dann durch Genduplikation und Mutation die heutigen spezialisierten Glutaminasen gebildet, die nur noch jeweils mit einer Synthase wechselwirken können (Yanofsky 1984).

Unter der Annahme eines hohen Verwandtschaftsgrades sollten sich zwischen den Glutaminasen Ähnlichkeiten in Struktur, Funktion und Regulation finden lassen. Darüber hinaus sollte es möglich sein, die Spezifität einer Glutaminase durch wenige Mutationen an der Kontaktfläche so zu verändern, dass sie danach mit einer bis dahin inkompatiblen Synthase einen produktiven Komplex bilden kann. Als Modell-Enzym für derartige Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit die Glutaminase TrpG aus der AS ausgewählt, die nach Einführung geeigneter Mutationen eine Interaktion mit der bereits gut charakterisierten Synthase HisF ausgebilden sollte.

7.2 Die Anthranilat Synthase - eine GATase aus der Tryptophan-Biosynthese

Die Anthranilat Synthase (AS) katalysiert den ersten Schritt der Tryptophan-Biosynthese. Dabei stellt die Glutaminase (TrpG) Ammoniak für die Synthase (TrpE) bereit, welche in zwei Schritten aus Chorismat Anthranilat erzeugt. Zunächst erfolgt ein nukleophiler Angriff des von der Glutaminase gebildeten Ammoniaks am C2-Kohlenstoffatom des Chorismats unter Eliminierung von Wasser. Dies führt zur reversiblen Bildung des Zwischenprodukts 2-Amino-2-Deoxyisochorismat (ADIC), der sich die irreversible Eliminierung von Pyruvat anschließt (Abbildung 54). Beide Teilreaktionen sind Mg^{2+} -abhängig und das Intermediat ADIC wird nicht ins Lösungsmittel abgegeben (Morollo & Bauerle 1993; Byrnes *et al.* 2000).

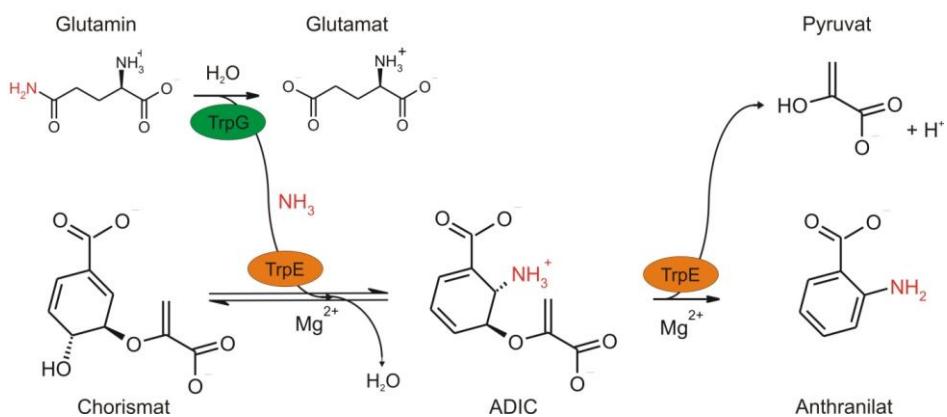


Abbildung 54: Reaktion der AS (TrpE:TrpG Komplex)

Die übertragene Amidgruppe ist rot gefärbt. ADIC: 2-amino-2-Deoxyisochorismat

Bisher wurden die Röntgenstrukturen der AS aus *S. solfataricus* (Apoenzym; (1QDL)), *S. typhimurium* (mit gebundenem Inhibitor Tryptophan; (1i1Q)) und *S. marcescens* (mit Produkt Glutamat (1i7Q) bzw Inhibitor Tryptophan; (1i7S)) aufgeklärt (Knöchel *et al.*, 1999; Morollo & Eck, 2001; Spraggon *et al.*, 2001).

Die TrpE-Untereinheit weist ein kompliziertes α/β Faltungsmuster mit zwei Domänen auf. Domäne I besteht aus einem elfsträngigen, antiparallelen β -Faltblatt und vier α -Helices. Domäne II setzt sich aus einem neunsträngigen, antiparallelen β -Faltblatt und vier α -Helices zusammen. TrpG besitzt die für GATasen der Klasse I typische α/β -Hydrolase-ähnliche Faltung (Zalkin & Smith, 1998). In Abbildung 55 ist die Struktur eines funktionalen Dimers aus TrpE und TrpG innerhalb des tetrameren (TrpE:TrpG)₂-Komplexes der AS aus *S. solfataricus* dargestellt.

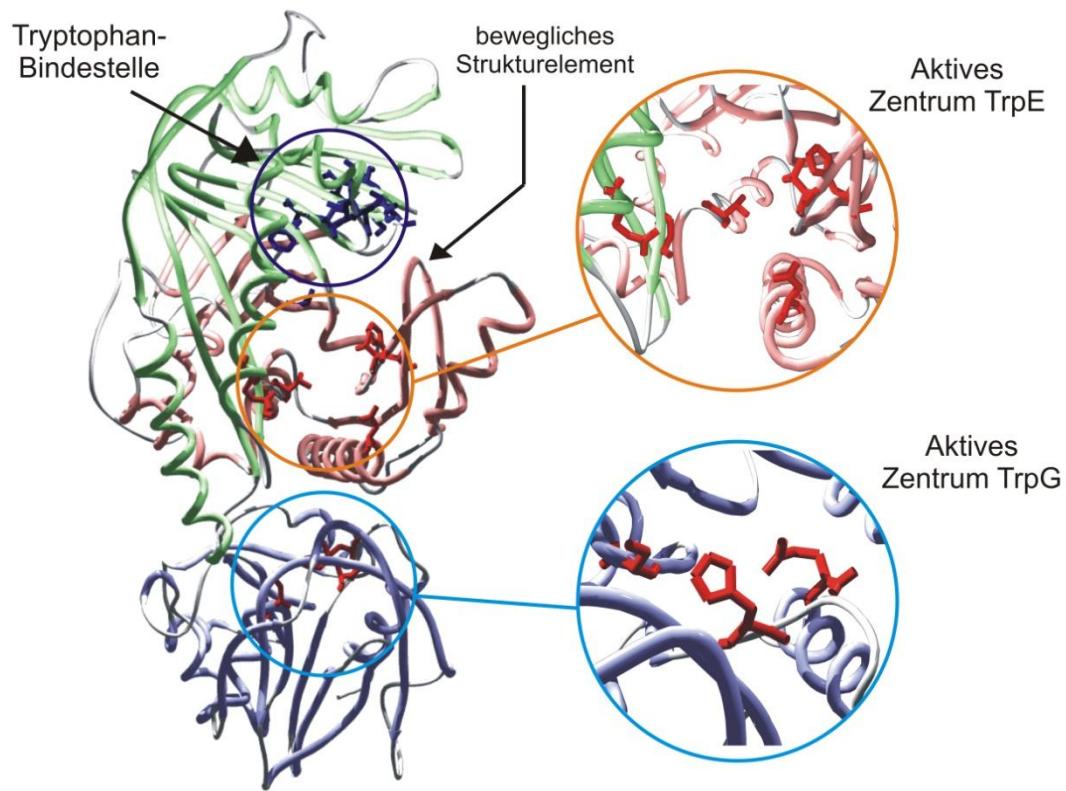


Abbildung 55: Funktionell wichtige Bereiche der AS aus *S. solfataricus*.

Darstellung der aktiven Zentren (in rot) von TrpE (Thr243, Asp266, His306, Thr333, Gly393, Glu403) und TrpG (Cys84, His175, Glu177) und der Tryptophanbindetasche (in blau) von TrpE (Glu30, Ser31, Ile32, Ser42, Val43, Asn204, Pro205, Met209, Phe210, Gly221, Ala373). Anhand der AS-Struktur aus *S. marcescens* (Spraggon *et al.*, 2001) wurde gezeigt, dass das bewegliche Strukturelement abhängig von Tryptophan- oder Chorismat-Bindung zur Verschiebung der katalytisch aktiven Reste in TrpE führt.

Anhand der AS aus *S. typhimurium* wurde gezeigt, dass (a) die Bindung von Chorismat an TrpE essentiell für die Glutamin-Hydrolyse an TrpG ist und (b) Tryptophan als *feedback* Inhibitor beide Teilreaktionen von TrpE inhibiert und die Glutaminbindung an TrpG erschwert (Caligiuri & Bauerle, 1991; Morollo & Eck, 2001). Außerdem konnten durch eingehende Mutationsanalysen die für die TrpE-Reaktion katalytisch essentiellen Reste und die an der Bindung des Inhibitors Tryptophan beteiligten Aminosäuren identifiziert werden (Caligiuri & Bauerle, 1991; Morollo & Bauerle, 1993). Die entsprechenden Reste in TrpE aus *S. solfataricus* und die katalytische Triade von TrpG sind in Abbildung 55 gezeigt.

Aus dem Vergleich der Röntgenstrukturen der AS aus *S. marcescens* in Anwesenheit verschiedener Liganden wurde ein Modell für den Mechanismus der *feedback* Inhibition durch Tryptophan abgeleitet. Danach führt die Bindung von Tryptophan zur Verschiebung des in Abbildung 55 gezeigten beweglichen Strukturelements (um 7 Å, relativ zur Struktur mit gebundenem Chorismat) zu Konformationsänderungen an der 18 Å entfernt liegenden Bindestelle von Chorismat. Dadurch werden unter anderem die katalytisch aktiven Reste

Thr333 und His306 (Zählweise nach der AS von *S. solfataricus*) sowie zwei zur Mg²⁺-Bindung notwendige Glutamate aus dem aktiven Zentrum gezogen. Die Bindung von Chorismat führt zu einer entgegengesetzten Bewegung des beweglichen Strukturabschnittes, wodurch die aktiven Reste optimal für die Katalyse ausgerichtet werden (Spraggon *et al.*, 2001). Im apo-Enzym liegen die Anordnung der aktiven Reste und des beweglichen Strukturelements etwa zwischen den beiden beschriebenen Zuständen. Mit Hilfe dieses „Wippe-Mechanismus“ lässt sich erklären, warum Tryptophan, obwohl es nicht ans aktive Zentrum bindet, formalkinetisch als kompetitiver Inhibitor für Chorismat wirkt (Caligiuri & Bauerle, 1991; Graf *et al.*, 1993; Knöchel *et al.*, 1999; Morollo & Eck, 2001; Spraggon *et al.*, 2001).

Alle drei bisher mittels Röntgenstrukturanalyse untersuchten AS aus *S. marcescens* (Spraggon *et al.*, 2001), *S. typhimurium* (Morollo & Eck, 2001) und *S. solfataricus* (Knöchel *et al.*, 1999) sind heterotetramere Komplexe aus zwei TrpE und zwei TrpG Untereinheiten [(TrpE:TrpG)₂]. Während die Kontaktflächen innerhalb der funktionellen TrpE:TrpG Heterodimere sehr ähnlich sind, lagern sich die beiden Dimere auf jeweils unterschiedliche Weise zusammen (Abbildung 56). Bei der AS aus *S. marcescens* erfolgt die Verknüpfung ausschließlich über die beiden TrpE-Untereinheiten (Abbildung 56a), bei der AS aus *S. typhimurium* ist zusätzlich TrpG an der Verknüpfung beteiligt (Abbildung 56b). In der AS aus *S. solfataricus* sind ausschließlich die TrpG-Untereinheiten miteinander verbunden (Abbildung 56c).

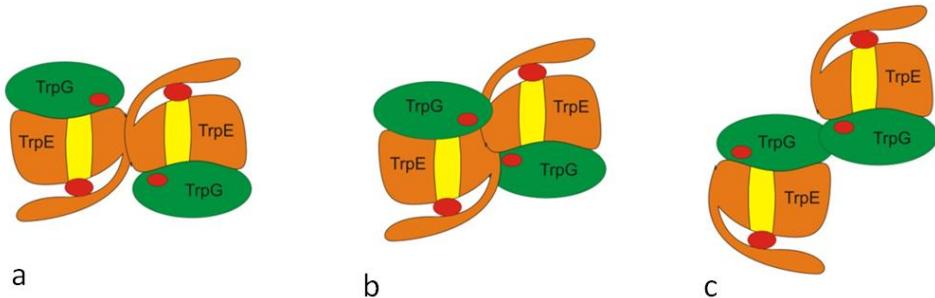


Abbildung 56: Schematischer Vergleich bekannter Quartärstrukturen des Anthranilatsynthase-Komplexes

(a) AS aus *S. marcescens* (Spraggon *et al.*, 2001); (b) AS aus *S. typhimurium* (Morollo & Eck, 2001); (c) AS aus *S. solfataricus* (Knöchel *et al.*, 1999). Die roten Ellipsen markieren die Lage der aktiven Zentren.

7.3 Vergleich der Anthranilat Synthase aus *S. solfataricus* mit der Imidazolglycerinphosphat Synthase aus *T. maritima*

Abbildung 57 zeigt die Röntgenstrukturen des HisH:HisF Komplexes aus *T. maritima* und eine funktionales TrpE:TrpG Dimer des [TrpE:TrpG]₂ Komplexes aus *S. solfataricus*. TrpG

und HisH zeigen die typische Klasse I Glutaminase Faltung, während HisF und TrpE keine Ähnlichkeiten aufweisen. Darüber hinaus ist die Kontaktfläche zwischen TrpE und TrpG mit 2700 Å (Knöchel *et al.* 1999) deutlich größer als die Kontaktfläche zwischen HisH und HisF mit 1100 Å (Douangamath *et al.* 2002). Die Überlagerung der Glutaminase-Strukturen veranschaulicht die große Ähnlichkeit insgesamt ($\text{rmsd}_{\text{ca}} = 2,4 \text{ Å}$, (Holm & Park 2000)) und die identische Positionierung der katalytischen Triaden Cys-His-Glu.

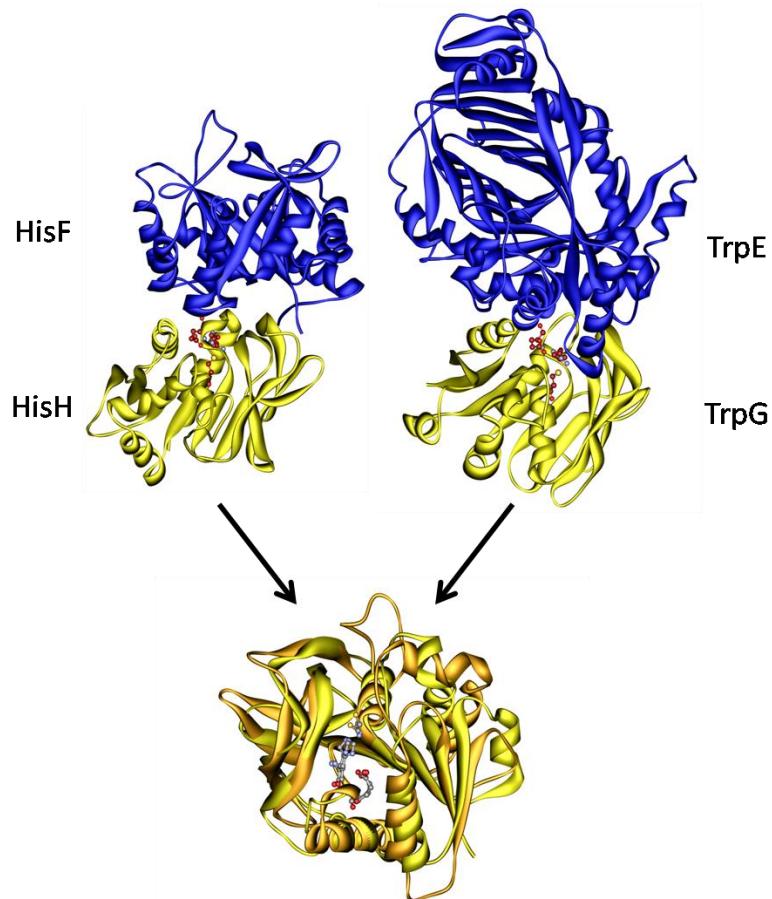


Abbildung 57: Bänderdiagramm der ImGPS aus *T. maritima* und der AS aus *S. solfataricus*.

Die Synthasen HisF und TrpE sind blau dargestellt, die Glutaminasen HisH und TrpG gelb. Die Reste der katalytischen Triade sind jeweils gekennzeichnet. Der Einfachheit halber ist nur ein funktionales TrpG:TrpE-Dimer Einheit gezeigt. Die Pfeile zeigen zu der mit DaliLight durchgeföhrten Überlagerung von TrpG (orange) und HisH (gelb) mit den katalytischen Triaden Cys-His-Glu.

7.4 Vorarbeiten

Bereits in einer früheren Arbeit wurde versucht die Kontaktflächeneigenschaften so von HisH auf TrpG zu übertragen, dass dieses mit HisF einen stabilen TrpG:HisF Komplex bilden kann (Häger 2005). Dafür wurden zunächst die 3D-Strukturen von TrpG aus *S. solfataricus* und HisH superpositioniert. Anschließend wurde ein Sequenzalignment erstellt, um die Sekundärstrukturelemente aus der ssTrpG Struktur auf die Sequenz von TrpG zu projizieren.

Durch die Kombination der beiden Schritte wurde ein indirektes „strukturbasiertes“ Sequenzalignment zwischen TrpG und HisH erstellt.

Durch eine detaillierte Kontaktflächenanalyse wurden anschließend Reste identifiziert, die an der Interaktion zwischen HisH und HisF beteiligt sind. Zum großen Teil liegen diese Reste in zusammenhängenden Sequenzabschnitten vor. Diese wurden nach den umliegenden Sekundärstrukturelementen mit b5, b6, b7, b9 und a5 bezeichnet (Abbildung 58).

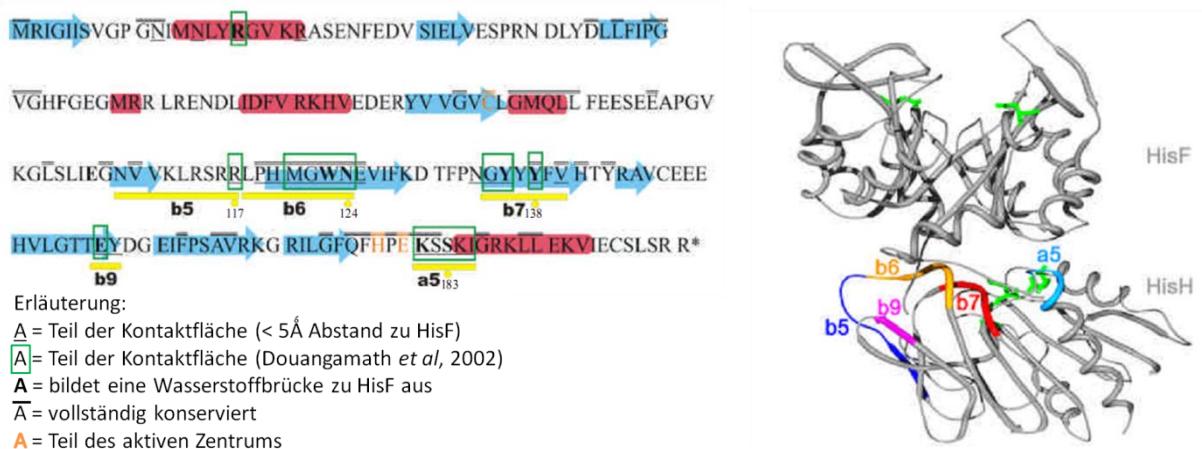


Abbildung 58: Position der Sequenzabschnitte a5, b5, b6, b7, b9 in HisH, die in TrpG an Stelle der dort vorkommenden Abschnitte eingesetzt wurden (modifiziert nach Häger 2005).

Neben den Abschnitten sind in dem Bänderdiagramm rechts die katalytisch essentiellen Reste (HisF: D11, D130; HisH: C84, H178, G180) grün hervorgehoben. Blau hinterlegte Sequenzen entsprechen β -Strängen, rot hinterlegte α -Helices.

Aus den Informationen des indirekten „strukturbasierten“ Sequenzalignments und der Kontaktflächenanalyse wurden schließlich TrpG-Mutanten mit HisH-Abschnitten hergestellt und so mit HisF interagierende Bereiche von HisH auf TrpG übertragen.

Keine von bislang 11 charakterisierten TrpG-Mutanten die bis zu 63 % der Kontaktfläche von HisH tragen, bildete eine nachweisbare Interaktion mit HisF aus (Häger 2005). Deshalb sollten zunächst mittels Mutationsanalyse die für die Komplexbildung essentiellen Positionen an der Interaktionsfläche von HisH und HisF identifiziert werden. Dazu wurden HisH-Mutanten mit einzelnen Alaninmutationen sowie mit längeren mutierten Sequenzabschnitten an der Kontaktfläche hergestellt und charakterisiert.

Die daraus gewonnenen Informationen sollten im Anschluss dazu genutzt werden die Kontaktfläche von TrpG spezifischer an HisF anzupassen, um eine stabile Interaktion zwischen TrpG und HisF zu etablieren. Da TrpG in *T. maritima* als Fusionsprotein mit TrpD vorkommt und nur als solches mit TrpE interagieren kann (List 2005), wurden die Austausche auch in den TrpGD Kontext kloniert.

7.5 Gerichtete Mutagenese zur Herstellung der *hisH*- und *hisF* Genkonstrukte

Die entsprechenden Mutationen für die HisH- und HisF-Mutanten wurden über Megaprimer-PCRs (2.3.3) mit Hilfe der in Kapitel 1.8 aufgelisteten Primer in das *hisH* bzw. in einem Fall in das *hisF* Gen eingeführt. Im Folgenden sind die *hisH*- und *hisF*-Genkonstrukte mit ihren Restriktionsschnittstellen und Expressionsplasmiden aufgelistet.

pDS <i>hisH</i> -WT	(<i>Sph</i> I/ <i>Hind</i> III)*
pDS <i>hisH</i> -W123F	(<i>Sph</i> I/ <i>Hind</i> III)*
pQE70 <i>hisH</i> -W123K	(<i>Sph</i> I/ <i>Hind</i> III)
pQE70 <i>hisH</i> -W123A	(<i>Sph</i> I/ <i>Hind</i> III)
pDS <i>hisH</i> -Y138A	(<i>Sph</i> I/ <i>Hind</i> III)*
pDS <i>hisH</i> -K181A	(<i>Sph</i> I/ <i>Hind</i> III)**
pDS <i>hisH</i> -K181S	(<i>Sph</i> I/ <i>Hind</i> III)
pDS <i>hisH</i> -b6	(<i>Sph</i> I/ <i>Hind</i> III)*
pET11c <i>hisF</i> -W156F	(<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI)*
pET11c <i>hisF</i> -D98A-W156F	(<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI)

*(Häger 2005), **(Karin Babinger, unveröffentlichte Daten),

7.6 Heterologe Expression und Reinigung der HisH- und HisF-Mutanten

Von Zellen mit den verschiedenen Konstrukten wurden zunächst stets zwei einzelne Kolonien für eine analytische Probeexpression (siehe 2.5.1) in einem Volumen von 10 ml angezogen, um die Menge und Löslichkeit der Proteine zu kontrollieren. Die präparative Expression der Konstrukte erfolgte für pDS- und pQE-Vektoren in frisch transformierten KK8-Zellen, für pET-Vektoren in frisch transformierten BL21(DE3)Rosetta Zellen, üN in LB-Medium und wurde mit IPTG induziert (siehe 2.5.3). Da die hergestellten rekombinanten Enzyme aus dem hyperthermophilen Bakterium *T. maritima* stammten, wurde nach präparativer Expression als erster Reinigungsschritt der lösliche Zellextrakt erhitzt (siehe 2.5.5.1) und dadurch ein großer Teil der Wirtsproteine denaturiert und ausgefällt. Die weitere Aufreinigung der HisH- und HisF-Mutanten erfolgte über Ionenaustausch-Chromatographie (siehe 2.5.5.3) und, je nach Bedarf, zur Entfernung von DNA über Ammoniumsulfat Fällung (siehe 2.5.7) oder präparative Gelfiltration (2.5.6).

Die Löslichkeit der HisF-Proteine lag bei ca. 50 %. Die Ausbeuten nach der Anionenaustauscher-Chromatographie schwankten zwischen 20 und 60 mg gereinigtes

Protein pro Liter Zellkultur. Die Reinheit der Proteine wurde nach der Dialyse über SDS-PAGE abgeschätzt und lag in der Regel bei über 90 % (Abbildung 59).

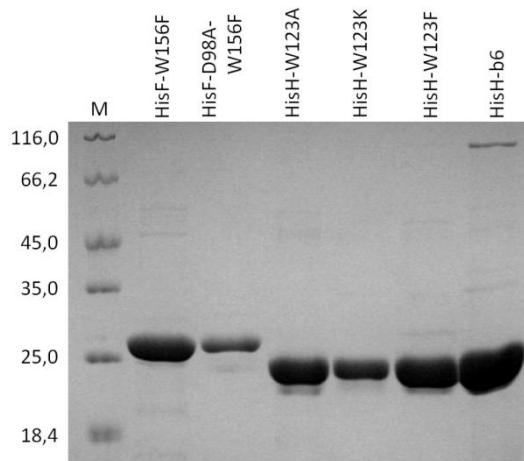


Abbildung 59: SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid) zur Analyse des Reinheitsgrades der zur Kontaktflächenanalyse hergestellten HisH- und HisF-Mutanten.

M: Proteinmarker mit molaren Massen in kDa.

Gereinigtes Protein wurde in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80 °C gelagert.

7.7 Fluoreszenztitration zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten

Bei der Komplexbildung zwischen HisH und HisF wird das an der Kontaktfläche von HisH liegende Trp123 vom Lösungsmittel abgeschirmt. Der damit verbundene hypsochrome Effekt (Blauverschiebung) kann mit Hilfe der Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie verfolgt werden. In früheren Arbeiten wurde die Bildung eines 1:1 Komplexes zwischen HisH und HisF über die Verschiebung des Emisionsmaximums von 345 nm auf 325 nm nachgewiesen (Beismann-Driemeyer & Sterner 2001; Häger 2005). In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzabnahme bei 360 nm genutzt, um über Titrationskurven K_D -Werte für die Bindung von HisH-Mutanten an Trp-freies HisF-W156F zu bestimmen (siehe 2.6.7). In Abbildung 57 ist exemplarisch eine Titrationskurve für HisH-WT gezeigt.

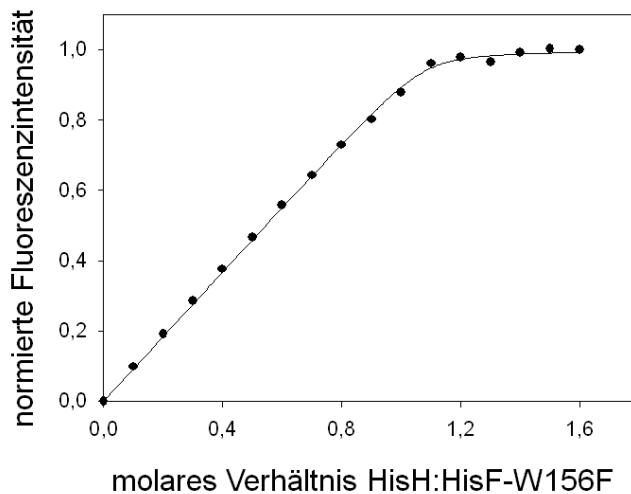


Abbildung 60: Exemplarische Titrationskurve zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von HisH mit HisF-W156F.

Im vorliegenden Fall wurden 10 μ M HisH in 50 mM KP pH 7,5 vorgelegt und in 1 μ M Schritten HisF-W156F zutitriert. Die durch die Abschirmung von Trp123(HisH) bedingte Abnahme des Emissionsmaximums bei 360 nm nach Anregung bei 280 nm ist in Form einer Titrationskurve dargestellt. Bei Anwesenheit äquimolarer Mengen beider Proteine wird keine weitere Signalabnahme mehr beobachtet, was der Ausbildung eines 1:1 Komplexes entspricht.

Die aus den Titrationskurven mit Hilfe eines quadratischen *Fits* mit dem Programm SigmaPlot ermittelten K_D -Werte (Formel 8) sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Über Fluoreszenztitration ermittelte K_D -Werte für die Bindung von HisH-Mutanten an HisF-W156F.

	K_D [nM]
HisH-HisF	4,5
HisH-R117A:HisF	3,3
HisH-N124A:HisF	1,8
HisH-Y138A:HisF	5,2
HisH-K181A:HisF	3,0
HisH-K181S:HisF	11,0
HisH-S183A:HisF	4,7
HisH:HisF-D98A*	9,0
HisH-K181A:HisF-D98A*	9,8
HisH-b9:HisF	5,0
HisH-b7:HisF	55

*titriert mit HisF-D98A-W156F

Der gemessenen K_D -Wert für den WT wurde durch eine ITC Messung überprüft. Diese wurde von Britta Badziura (Lehrstuhl Prof. König, Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg) durchgeführt. Der resultierende K_D -Wert betrug 2 nM (siehe Anhang 9.2) und passt damit gut zu dem aus der Fluoreszenztitration ermittelten Wert von 4,5 nM.

7.8 Analytische Gelfiltration mit HisH-b6

Für HisH-b6, bei der der in Abbildung 55 gezeigte Sequenzabschnitt b6 (M121-G122-W123-N124) gegen den entsprechenden Abschnitt aus TrpG (I103-L104-H105-K107-T108-S109) ersetzt wurde, konnte keine direkte Fluoreszenztitration durchgeführt werden, da hier das Signal-liefernde Trp123 fehlt.

Analytische Gelfiltrationsläufe mit HisH-b6 zeigten im Gegensatz zu früheren Messungen (Häger 2005), dass zwischen HisH-b6 und HisF unter den verwendeten Laufbedingungen kein Komplex gebildet wird. Zum Vergleich sind Gelfiltrationsläufe mit HisH-C84A gezeigt, die die Komplexbildung mit HisF belegen (Abbildung 61).

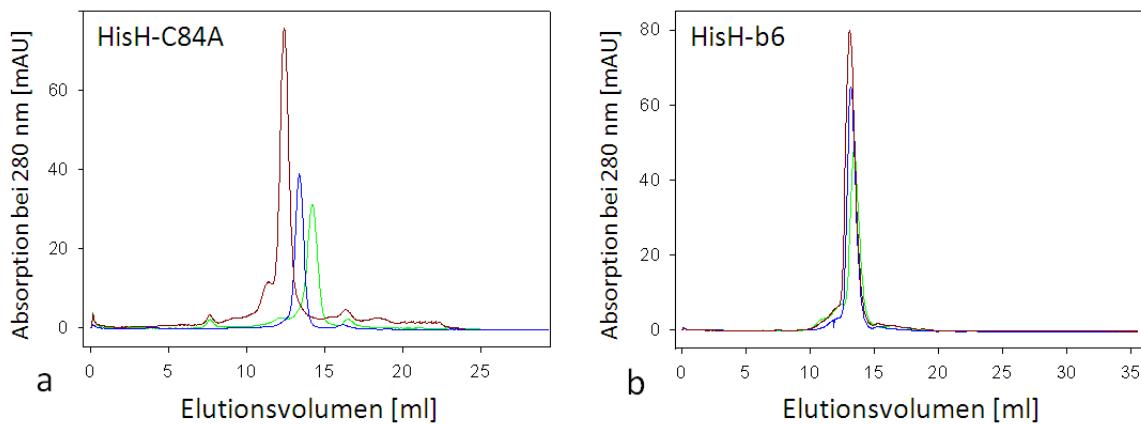


Abbildung 61: Analytische Gelfiltrationsläufe (Superdex 75) zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen den gezeigten HisH-Mutanten und HisF.

Laufpuffer: 50 mM KP pH 7,5; 300 mM NaCl; Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 0,5 ml/min und wurde über die Absorption bei 280 nm verfolgt. (a): grün: 50 µl 100 µM HisH-C84A; blau: 50 µl 50 µM HisF; rot: 100 µl 1:1 HisH-C84A:HisF. (b): grün: 100 µl 100 µM HisH-b6, blau: 100 µl 50 µM HisF; rot: 100 µl 1:1 HisH-b6:HisF Komplex.

Die Elutionszeiten sowie die Umrechnung in apparente molare Massen unter Verwendung einer Kalibrierungsgeraden (siehe Anhang 9.1) sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21: Aus den Gelfiltrationsläufen abgeleitete apparente molare Massen (MW^{app}) im Vergleich mit den berechneten molaren Massen (MW^{calc})

Protein	Elutionszeit [min]	MW^{app} [kDa]	MW^{calc} [kDa]
HisH-C84A	14,2	16,5	23,1
HisF	13,3	26,1	27,7
HisH-C84A:HisF	12,3	42,9	50,8
HisH-b6	13,4	24,8	23,0
HisF	13,2	27,4	27,7
HisH-b6:HisF	13,1	28,9	50,7

Die Bedingungen der Läufe entsprechen denen in der Legende zu Abbildung 58.

Die aus den beiden HisF-WT Läufen abgeleiteten apparenten molaren Massen entsprechen den berechneten molaren Massen und bestätigen damit frühere Untersuchungen (Beismann-Driemeyer 2000). Für HisH-C84A wurde eine apparente molare Masse von 16,5 kDa

bestimmt. Dieses retadierte Verhalten wurde bereits früher für HisH WT beobachtet (Beismann-Driemeyer 2000; Häger 2005). Da der Austausch C84A nicht an der Oberfläche liegt, war davon auszugehen, dass die Komplexbildung mit HisF nicht beeinträchtigt ist. Dies bestätigte sich nach der Mischung äquimolarer Mengen von HisH-C84A und HisF, wobei sich ein definiertes Elutionsmaximum mit einer apparenten molaren Masse von 42,9 kDa ergab. Damit verhält sich HisH-C84A auch diesbezüglich wie HisH-WT, wo nach Mischung mit HisF eine apparente molare Masse von 41,8 KDa bestimmt wurde. (Beismann-Driemeyer 2000). HisH-b6 zeigt ein von HisH-WT und HisH-C84A deutlich abweichendes Verhalten. Zum einen eluiert das Protein mit einer apparenten molaren Masse von 24,8 kDa von der Säule und damit deutlich näher an der berechneten molaren Masse. Zum anderen bildet sich mit HisF auf der Gelfiltrationssäule kein Komplex mehr aus.

Zur Klonierung von HisH-b6 wurde ein Sequenzabschnitt von TrpG auf HisH übertragen. Die apparente molare Masse von TrpG entspricht nach Gelfiltration einem Dimer (Häger 2005). Es ist daher denkbar, dass die Dimerisierungstendenz mit dem Sequenzabschnitt von TrpG auf HisH übertragen und gleichzeitig die Komplexbildung mit HisF verhindert wird.

7.9 Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe mit HisH-b6

Das Assoziationsverhalten von HisH-b6 wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Helmut Durchschlag (Lehrstuhl für Biochemie II, Universität Regensburg) durch analytische Ultrazentrifugation genauer untersucht. Dazu wurden in einem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf in 50 mM KP pH 7,5 parallel HisH WT, HisH-b6 und HisH-b6 zusammen mit 300 mM KCl analysiert. Für alle drei Proben wurde ein Sedimentationskoeffizient von 2,3 S bestimmt. (Abbildung 62).

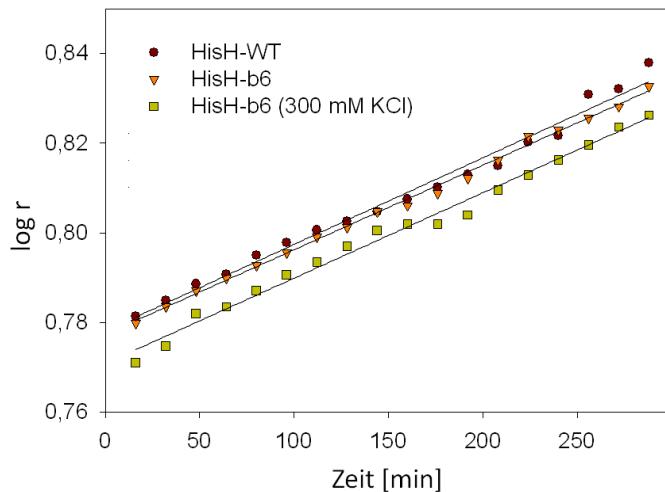


Abbildung 62: Auswertung der Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe von HisH-WT und HisH-b6.

Die Proteinkonzentration betrug jeweils 0,2 mg/ml in 50 mM KP, pH 7,5 bei 21 °C. Aus der Geradensteigung wurde mittels Formel 13 für alle Proben ein Sedimentationskoeffizient von 2,3 S berechnet (siehe 2.6.10).

Da die S-Werte von HisH WT und HisH-b6 gleich sind und durch die Salzkonzentrationen der Gelfiltrationsläufe nicht beeinflusst werden, ist davon auszugehen, dass es bei HisH-b6 nicht zu einer Dimerbildung kommt. Die unterschiedlichen Elutionszeiten bei der Gelfiltration sind somit sehr wahrscheinlich auf veränderte Interaktionen mit dem Säulenmaterial zurückzuführen, die durch die Austausche an der Oberfläche bedingt werden.

7.10 Native PAGE mit HisH-b6

Die Komplexbildung zwischen HisH-b6 und HisF wurde weiterhin mit Hilfe von nativer PAGE (siehe 2.6.4) ebenfalls untersucht. Die Proteine werden dabei nach Größe und pI-Wert getrennt. Findet eine Interaktion zwischen zwei Proteinen statt, ist anstelle zweier Banden nur noch eine gemeinsame Bande zu erwarten. Dies ist für HisH-b6:HisF der Fall (Abbildung 63).

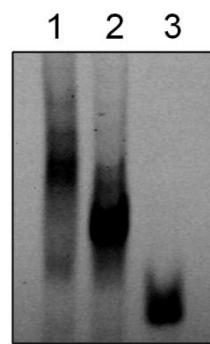


Abbildung 63: Native PAGE zeigt die Komplexbildung zwischen HisH-b6 und HisF.

1: HisH-b6 (10 µg), 2: HisH-b6 und HisF in einem molaren Verhältnis von 1:1, 3: HisF (10 µg)

Die fehlende Komplexbildung zwischen HisH-b6 und HisF bei der analytischen Gelfiltration kann auf die im Laufpuffer vorhandene Salzkonzentration (300 mM) oder die starke

Verdünnung auf der Säule zurückgeführt werden. Um ein quantitatives Maß für die Affinität von HisH-b6 für HisF zu erhalten, wurde eine kompetitive Fluoreszenztitration durchgeführt. Um die Rolle des in HisH-b6 enthaltenen W123K Austausches zu beleuchten, wurden auch die HisH-Mutanten W123K, W123A und W123F wie in 7.5 und 7.6 beschrieben mit Hilfe der in Kapitel 1.8 aufgelisteten Primer hergestellt und nach heterologer Expression und Reinnigung charakterisiert.

7.11 Kompetitive Fluoreszenztitration

Bei der kompetitiven Fluoreszenztitration wurde eine Trp-freie HisH-Mutante ($\text{HisH}_{\Delta\text{Trp}}$) als kompetitiver Inhibitor zu einem HisH-Protein mit Trp eingesetzt. HisH und variierende Konzentrationen an $\text{HisH}_{\Delta\text{Trp}}$ wurden vorgelegt und mit HisF-W156F titriert. Abhängig von der Affinität von $\text{HisH}_{\Delta\text{Trp}}$ zu HisF-W156F stand für $\text{HisH}_{\Delta\text{Trp}}$ weniger HisF-W156F zur Verfügung und die Fluoreszenzabnahme fiel, im Vergleich zu einem Ansatz ohne $\text{HisH}_{\Delta\text{Trp}}$, geringer aus.

Die Auftragung steigender $\text{HisH}_{\Delta\text{Trp}}$ -Konzentrationen gegen die jeweils gemessene Fluoreszenzsignaländerung liefert die Konzentration an $\text{HisH}_{\Delta\text{Trp}}$ (IC_{50}), bei der noch die Hälfte der eingesetzten HisH-Konzentration von HisF-W156F gebunden wird (Abbildung 64). Je geringer IC_{50} , desto höher ist die Affinität von $\text{HisH}_{\Delta\text{Trp}}$ zu HisF.

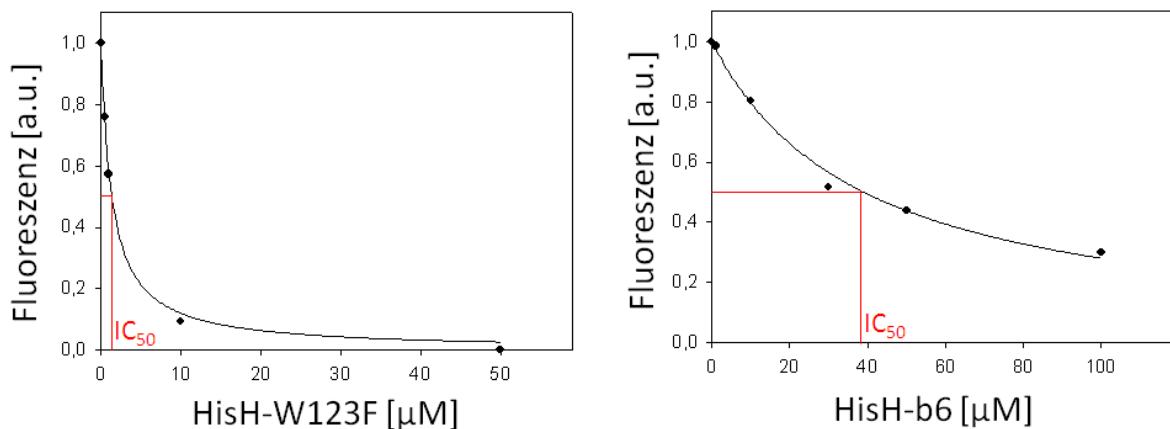


Abbildung 64: Kompetitive Fluoreszenztitration der Trp-freien HisH-Mutanten W123F (links) und b6 (rechts).

Eingesetzt wurden jeweils 1 μM HisF-W156F, 1 μM HisH-K181S und variierende Konzentrationen Trp-freier HisH-Mutante in 50 mM KP pH 7,5 bei RT. Der IC_{50} -Wert ist jeweils rot markiert.

Die Titration wurde mit den Trp-freien HisH-Mutanten W123A, W123F, W123K und b6 durchgeführt. In Tabelle 22 sind die IC_{50} -Werte und daraus nach Formel 9 (siehe 2.6.8) berechneten K_D - und ΔG° -Werte aufgeführt. HisH-K181S wurde als Signalgeber für die Titration ausgewählt, da es von den in Tabelle 20 aufgeführten Mutanten neben HisH-b7 den

höchsten K_D -Wert besitzt und damit empfindlicher auf die konkurrierende Bindung von HisH $_{\Delta\text{Trp}}$ anspricht. HisH-b7 konnte nicht verwendet werden, da die maximale Fluoreszenzänderung mit dieser Mutante zu gering ausfällt.

Tabelle 22: IC_{50} und K_D -Werte aus kompetitiven Fluoreszenztitrationen.

Mutante	IC_{50} [μM]	K_D [nM]	ΔG° [kJ/mol]
HisH-W123A:HisF	1,2	13,2	-44,9
HisH-W123F:HisF	1,3	14,3	-44,7
HisH-W123K:HisF	37	407	-36,4
HisH-b6:HisF	39	429	-36,3
HisH:HisF (aus Tabelle 20)	-	4,5	-47,6

Die K_D -Werte wurden aus den IC_{50} -werten nach Formel 9 (siehe 2.6.8) berechnet und daraus ΔG° Werte mit $\Delta G^\circ = RT\ln K_D$ (25°C) ermittelt.

Die deutlich höheren IC_{50} - und der K_D -Werte für die Mutanten HisH-b6 und HisH-W123K passen zur fehlenden Komplexbildung auf der Gelfiltrationssäule von HisH-b6 mit HisF. Im wildtypischen HisH:HisF Komplex geht W123 eine konservierte Kation- π -Wechselwirkung mit Arg249 aus HisF ein (Abbildung 65). Die Substitutionen W123A und W123F zeigen, dass die Entfernung dieser Interaktion den Komplex nur gering destabilisiert. Erst durch das Aufeinandertreffen von Arg249(HisF) mit dem durch den Sequenzabschnitt b6 eingeführten Lysin (W123K) kommt es zur Erhöhung des K_D -Wertes, vermutlich auf Grund von elektrostatischen Abstoßungen. Die Komplexstabilität sinkt dabei um 11,2 kJ/mol verglichen mit dem WT (Tabelle 22). Die Einzelmutante HisH-W123K zeigt den gleichen Effekt wie HisH-b6 mit vier eingeführten Mutationen. Damit wurde bestätigt, dass die Komplexstabilität ausschließlich durch W123K beeinträchtigt wird und die drei anderen Austausche im Sequenzabschnitt b6 diese nicht beeinflussen.

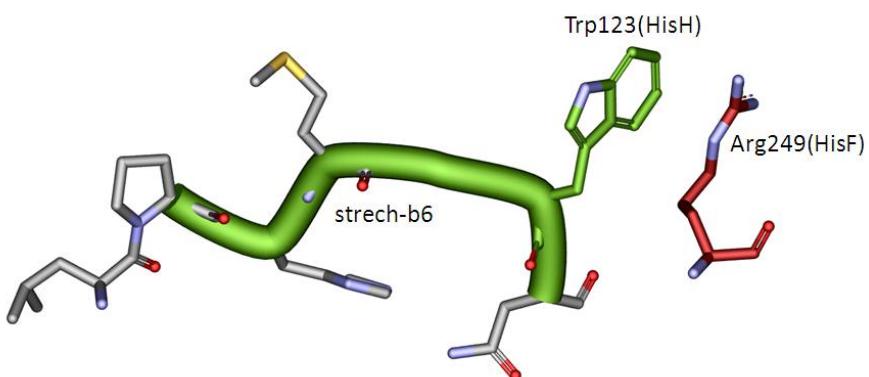


Abbildung 65: Trp123(HisH) und Arg249(HisF) interagieren über eine Kation- π -Wechselwirkung.
Ausschnitt aus der Kontaktfläche des HisH:HisF Komplexes. Der Sequenzabschnitt b6 und Trp123 aus HisH sind grün, Arg249 aus HisF ist rot dargestellt.

Die Charakterisierung der Kontaktfläche von HisH:HisF durch Alaninaustausche und Sequenzabschnittsmutationen hat gezeigt, dass das Entfernen einzelner Interaktionen die

Komplexstabilität nur in sehr geringem Ausmaß beeinflusst. Erst das Einbringen eines positiv geladenen Lysins durch den Austausch W123K(HisH) und die damit verbundene Repulsion durch ein bereits vorhandenes Arg249(HisF) konnte den Komplex deutlich destabilisieren. Eine vergleichbare Beobachtung wurde für den Komplex aus TEM1- β -Lactamase und dem β -Lactamase Inhibitor-Protein gemacht, in dem es erst durch gleichzeitig in verschiedenen Bereichen (Cluster) eingeführte Alaninaustausche zu einer Destabilisierung kam. Hingegen hatten Austausche im gleichen Cluster nur einen geringen Einfluss auf die Komplexstabilität (Reichmann *et al.* 2005).

7.12 Anpassung der Kontaktfläche von TrpG an die Interaktion mit HisF

Die Austausche an der Kontaktfläche von HisH haben gezeigt, dass eine neu eingeführte, elektrostatische Abstoßung den Komplex deutlich destabilisiert. Für den Versuch die Kontaktfläche von TrpG an HisF anzupassen bedeutet dies umgekehrt, dass ein einziger ungünstiger Aminosäurerest die Komplexbildung verhindern könnte.

Bisher wurden durch Kombination der Sequenzabschnittsaustausche maximal 63% der Kontaktfläche von HisH auf TrpG übertragen (Häger 2005). In einem neuen Ansatz sollte nun ein möglichst großer Teil der Kontaktfläche übertragen werden. Dazu wurden die bisherigen Abschnitte b5, b6 und b9 anhand der modellierten 3D-Struktur überarbeitet und ein zusätzlicher Sequenzabschnitt (a1) ausgetauscht (Abbildung 66). Es wurde darauf geachtet, Sekundärstrukturelemente als Ganzes zu übertragen um ihre Ausbildung möglichst wenig zu stören.

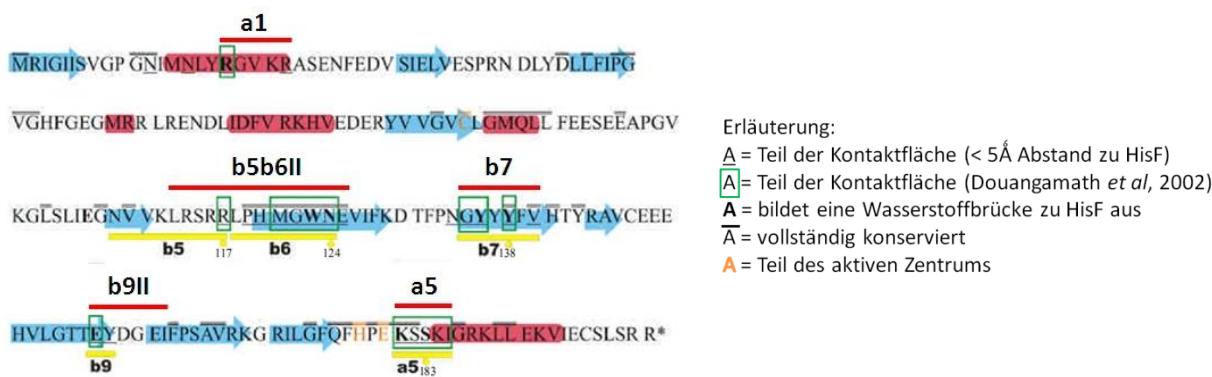


Abbildung 66: Position der Sequenzabschnitte in HisH, die in TrpG an Stelle der dort vorkommenden Abschnitte eingesetzt wurden (modifiziert nach Häger 2005).

Die Abbildung entspricht der um die neu ausgetauschten Sequenzabschnitte (rote Balken) erweiterten Abbildung 55. Die bereits früher ausgetauschten Sequenzabschnitte sind als gelbe Balken dargestellt.

In *T. maritima* bildet TrpG nur in seiner nativen Form als Fusionsprotein mit TrpD einen Komplex mit der Synthase TrpE aus (List 2005). Daher wurden die beiden Mutanten mit der größten Anzahl an Austauschen auch in den TrpGD-Kontext kloniert. In der Gesamtmutante

(TrpGD-a1b5b6IIb7b9IIa5) wurden 92 % der Kontakfläche von HisH auf TrpG übertragen, wobei die verbliebenen 8 % auf Ser12 und Gly94 entfallen, die weit außerhalb der definierten Abschnitte liegen. Der Austausch Ser12 zu Asn wurde als konservativ und daher als nicht notwendig eingestuft, Gly94 wurde aus strukturellen Erwägungen nicht entfernt.

Auf dieser Grundlage wurden folgende TrpG/TrpGD-Mutanten mit HisH-Sequenzabschnitten hergestellt:

- a1: Q19R¹-E23R¹
- b5b6II: A100L-K101R-insS-insR-insR¹-R103L-I104P^{*}-H105M^{*}-K107W^{*1}-T108N^{*1}-S109E^{*1}-K110del
- b7: L126G-V127Y¹-T129Y^{*1}-Y131V^{*}
- b9II: D152E¹-D153Y¹-insD-insG-insE-G154I
- a5: S175K^{*1}-V176S^{*}-L176S¹-T177del-E178K-E179I

^{*}: Rest in HisH streng konserviert

¹: Rest bildet in HisH eine direkte Interaktion mit HisF aus

ins: inserierter Rest (kein entsprechender Rest in TrpG vorhanden)

del: deletierter Rest (kein entsprechender Rest in HisH vorhanden)

7.12.1 Gerichtete Mutagenese zur Herstellung *trpG/trpGD*-Genkonstrukte

Die entsprechenden Mutationen wurden über Megaprimer-PCRs (2.3.3) unter Verwendung der in Kapitel 1.8 aufgelisteten Primer in das *trpG/trpGD* Gen eingeführt. Im Folgenden sind die *trpG/trpGD* Genkonstrukte mit ihren Restriktionsschnittstellen und Expressionsplasmiden aufgelistet:

pET11c <i>trpG</i> -WT	(<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI) ^{*1}
pET28a <i>trpG</i> -b5b6IIb7	(<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI) ¹
pET28a <i>trpG</i> -b5b6IIb7b9II	(<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI) ¹
pET28a <i>trpG</i> -b5b6IIb7T129F	(<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI) ¹
pET24a <i>trpGD</i> -b5b6IIb7b9IIa5	(<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I)
pET21a <i>trpGD</i> -a1b5b6IIb7b9IIa5	(<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I)

^{*}(Häger 2005),¹Aminosäuren 1-197 des bifunktionellen TrpGD

Für *yeast-two-hybrid* Untersuchungen (siehe 2.2.7) wurden die aufgelisteten TrpG-Mutanten zusätzlich über PCR eingeführte *Eco*RI/*Bam*HI Schnittstellen in den Beute-Vektor pGAD umkloniert. Die für das *yeast-two-hybrid* System verwendeten Vektoren sind im Folgenden aufgelistet:

- pAS 2.1 *hisF**
- pGBK T7 *p53**
- pGAD 424 *hisH**
- pGAD 424 TrpGb5b6IIb7
- pGAD 424 TrpGb5b6IIb7b9

pGAD 424 TrpGb5b6IIT129Y
 pGAD 424 TrpGDb5b6IIb7b9a5
 pGAD 424 TrpGDa1b5b6IIb7b9a5
 pGAD 424 *LargeTAntigen**
 *(Häger 2005)

7.13 *In vivo* Interaktionstests der TrpG/TrpGD-Mutanten mit HisF

Die TrpG-Mutanten wurden *in vivo* durch das *yeast-two-hybrid System* (Fields & Song 1989) auf Komplexbildung mit HisF getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 67 gezeigt.

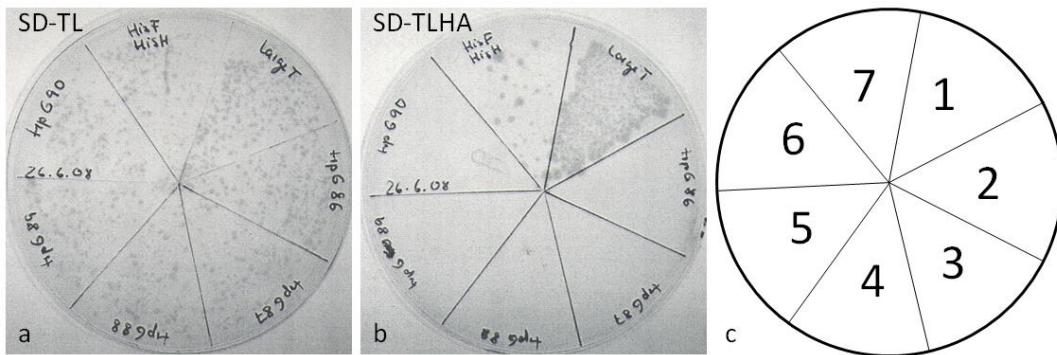


Abbildung 67: Yeast-two-hybrid Test auf *in vivo* Interaktion verschiedener TrpG-Mutanten mit HisF.

(a): Das Wachstum auf Platten ohne die Auxotrophiemarker Tryptophan und Leucin (SD-TL) belegt die erfolgreiche Transfektion. (b): Im Gegensatz zu den Positivkontrollen p53-LargeTAntigen, sowie HisH-HisF, ist für die TrpG-Mutanten kein Wachstum ohne die Interaktionsmarker Adenin und Histidin (SD-TLHA) zu beobachten. (c): Plattierungsschema:

- | | |
|--|--|
| 1: pGBK7 p53 + pGAD424 LargeTAntigen | 2: pAS2.1 HisF + pGAD424 TrpGb5b6IIb7 |
| 3: pAS2.1 HisF + pGAD424 TrpGb5b6IIb7b9 | 4: pAS2.1 HisF + pGAD424 TrpGb5b6IIT129Y |
| 5: pAS2.1 HisF + pGAD424 TrpGDb5b6IIb7b9a5 | 6: pAS2.1 HisF + pGAD424 TrpGDa1b5b6IIb7b9a5 |
| 7: pAS2.1 HisF + pGAD424 HisH | |

Der Test zeigt, dass *in vivo* keine Interaktion zwischen HisF und den TrpG-Mutanten detektierbar ist. Deshalb sollte die Gesamtmutante TrpGDa1b5b6IIb7b9a5 heterolog exprimiert und *in vitro* bezüglich einer Komplexbildung mit HisF analysiert werden. Durch die Expression und Reinigung dieser Mutante sollte gleichzeitig geklärt werden, ob das Protein trotz seiner 30 Mutationen noch löslich exprimiert werden kann.

7.13.1 *In vitro* Interaktionstests von TrpGDa1b5b6IIb7b9a5 mit HisF

Die Expression von TrpGDa1b5b6IIb7b9a5 erfolgte analog zu TrpGD-WT (siehe 6.3) Die Löslichkeit des Proteins lag bei etwa 25 % und damit bei der Hälfte der Löslichkeit des WTs. Der Verlauf der Reinigung über Hitzeschritt, Ammoniumsulfatfällung und Anionenaustausch-Chromatographie ist in Abbildung 68 gezeigt.

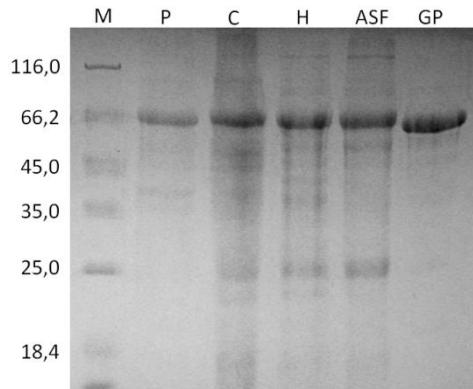


Abbildung 68: SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) zur Dokumentation der heterologen Expression und Reinigung von TrpGa1b5b6IIb7b9IIa5.

Dargestellt sind die unlösliche Fraktion (Pellet P), der lösliche Überstand (Crude extract C), der Überstand des Hitzeschritts (H), das resuspendierte Pellet nach der Ammoniumsulfatfällung (ASF) sowie das gereinigte Protein nach der Anionenaustausch-Chromatographie (GP). M: Markerproteine mit molaren Massen in kDa.

Die Komplexbildung der Mutante mit HisF wurde durch analytische Gelfiltration und Fluoreszenztitration überprüft, wobei letztere durch das mit dem Austausch b5b6II eingeführte Trp107 möglich wurde. Komplexbildung mit HisF sollte zu einer Abschirmung dieses Trp-Restes vom Lösungsmittel und damit zu einer Verschiebung des Fluoreszenz-Emissionsmaximums von 342 nm hin zu niedrigeren Wellenlängen führen. Ein solche Verschiebung konnte auch nach Zugabe von 100 μ M HisF-W156F zu 10 μ M der TrpG-Mutante nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Gelfiltrationsläufe zeigten für HisF und TrpGDa1b5b6IIb7b9IIa5 identisches Laufverhalten unabhängig davon, ob die Proteine getrennt oder als Mischung mit 10-fachem molarem Überschuss an HisF aufgetragen wurden.

7.14 Diskussion und Ausblick

Die Identifizierung von amphibolaren Glutaminasen in den 70er Jahren lieferte erste Hinweise auf einen gemeinsamen Ursprung von Glutaminasen der Klasse I, die durch Sequenzvergleiche und Strukturbestimmungen erhärtet wurden (Sawula & Crawford 1972; Crawford 1975; Kane 1977; Buvlinger *et al.* 1981; Häger 2005). Nach Yanofsky (1984) hat es eine ursprüngliche unspezialisierte Glutaminase prokaryotischen Ursprungs gegeben, die in der Lage war mit verschiedenen Synthasen zu interagieren. Daraus hätten sich durch Genduplikation und Diversifikation die heutigen spezialisierten Glutaminasen entwickelt, die in der Regel nur noch mit einer Synthase produktive Komplexe bilden können. Für einen gemeinsamen Ursprung sprechen ein identischer Faltungstyp ($\alpha\beta$ -Hydrolase) und identische katalytische Triaden (Cys-His-Glu). Diese Gemeinsamkeiten treffen auch für das Glutaminasepaar TrpG aus der AS (TrpG:TrpE)₂ und HisH aus der ImGPS (HisH:HisF) zu.

Um die postulierte enge Verwandtschaft der beiden Glutaminasen zu untermauern, wurde ein Projekt fortgesetzt (Häger 2005) in dem der Versuch unternommen wurde, die Kontaktfläche der Glutaminase TrpG so zu verändern, dass eine Komplexbildung mit HisF möglich wird. Dazu wurden durch maximal 30 Mutationen bis zu 92 % der Kontaktfläche von HisH auf den TrpG-Teil des TrpGD-Fusionsproteins übertragen. Dabei wurden konservierte Reste besonders berücksichtigt und möglichst ganze Sekundärstrukturelemente übertragen. Im *yeast-two-hybrid* System zeigte keine der TrpG-Mutanten eine *in vivo* Interaktion mit HisF. Die Gesamtmutante TrpGDa1b5b6IIb7b9a5 in der alle ausgetauschten Sequenzabschnitte kombiniert vorlagen, konnte löslich exprimiert werden und war ausreichend stabil, um durch einen Hitzeschritt bei 60°C angereichert zu werden. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich trotz der großen Anzahl an Mutationen um ein wohlgefaltetes Protein handelt. Mittels analytischer Gelfiltration sowie Fluoreszenzspektroskopie konnte jedoch auch *in vitro* kein stabiler Komplex mit HisF detektiert werden.

Das Ausbleiben einer Komplexbildung zwischen den TrpG-Mutanten und HisF legt die Vermutungen nahe, dass eine gemeinsame promiskutive Vorläuferglutaminase in der Evolution bereits zu weit zurück liegt, um die Kontaktflächenspezifitäten noch durch eine einfache Übertragung von Sequenzabschnitte aus HisH auf TrpG auszutauschen.

Betrachtet man die Synthase-Untereinheiten der ImGPS und der AS so stellt man fest, dass sie keine erkennbaren Gemeinsamkeiten besitzen (Abbildung 57). Es gibt jedoch auch GATase Komplexe, deren Synthasen den gleichen Faltungstyp aufweisen. Im Fall der AS ist dies z.B. die 4-Amino-4-deoxychorismat Synthase (Parsons *et al.* 2002) und im Fall der ImGPS die Pyridoxal-5-Phosphat Synthase (PLPS) (Bauer *et al.* 2004).

Die Theorie eines gemeinsamen Vorläufers von Yanofsky (1984) kann durch diese Beobachtungen erweitert werden (Abbildung 66). In einer ersten Evolutionsstufe wären demnach aus unspezifischen Glutaminasen, die mit mehreren Synthasen produktive Komplexe bilden konnten, spezifische GATase-Komplexe entstanden. In einer zweiten Evolutionsstufe entwickelten sich aus diesen definierten GATase Komplexen wiederum durch Multiplikation und Diversifikation neue GATase-Komplexe mit strukturell ähnlichen Synthase- und Glutaminase-Untereinheiten, jedoch verschiedenen Funktionen.

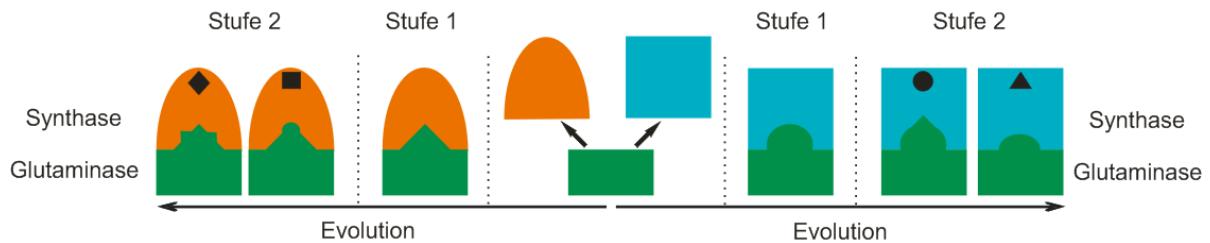


Abbildung 69: Zweistufiges Evolutionsmodell der GATasen.

Unterschiedliche Reaktionen sind in Stufe 2 durch verschiedene geformte aktive Zentren symbolisiert. Beispiele für strukturell ähnliche Paare von GATasen auf Stufe 2 stellen die AS und die ADICS bzw. die ImGPS und die PLPS dar.

Die GATase Komplexe ImGPS und AS wären demnach evolutionär weiter voneinander entfernt als z.B. ImGPS und PLPS. Ein Hinweis der diese Theorie stützt, ist die Beobachtung dass die bekannten amphibolaren Glutaminasen nur mit Synthasen des gleichen Faltungstyps produktive Komplexe bilden können (Sawula & Crawford 1972; Kane 1977; Buvinger *et al.* 1981; Zalkin 1993; Zwick 2007).

Für das rationale Design von Kontaktflächen bedeutet dies, dass es deutlich erfolgsversprechender sein sollte, die Interaktionsspezifitäten von Glutaminasen wechselseitig zu verändern, welche mit dem gleichen Synthasefaltungstyp interagieren. ImGPS und PLPS bieten sich dafür insofern an, als dass von beiden Komplexen jeweils 3D-Strukturen von den isolierten Monomeren als auch von den Komplexen vorhanden sind und damit die, mit Homolgiemodellen verbundenen Unsicherheiten von vorne herein ausgeschlossen werden können.

8 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Struktur, Funktion und Evolution von Glutaminamidotransferasen (GATasen). Vertreter dieser Enzymfamilie sind für den Einbau von Stickstoff innerhalb der Biosynthesewege von Nukleotiden, Aminosäuren, Coenzymen und Antibiotika verantwortlich. Bei allen GATasen wird am aktiven Zentrum einer Glutaminase durch die Hydrolyse von Glutamin Ammoniak erzeugt, der durch einen vom Lösungsmittel abgeschirmten Kanal zum aktiven Zentrum der Synthase gelangt und mit dem dort gebundenen Substrat zu einem oder mehreren Produkten reagiert. In der Regel wird die Glutaminase erst durch die Bindung des Substrates an die Synthase aktiviert, wodurch die verschwenderische Hydrolyse von Glutamin verhindert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde hauptsächlich die GATase Imidazolglycerinphosphat-Synthase (ImGPS, 1:1 Komplex aus der Glutaminase HisH und der Synthase HisF) aus der Histidin-Biosynthese von *Thermotoga maritima* charakterisiert. In einem Seitenprojekt wurde die Anthranilat-Synthase (AS, 2:2 Komplex aus der Glutaminase TrpG und der Synthase TrpE) aus der Tryptophan-Biosynthese von *T. maritima* vergleichend untersucht. HisH und TrpG gehören zur Klasse I der Glutaminasen, die als typisches Merkmal eine katalytische Triade (Cys-His-Glu) besitzen, während HisF und TrpE keine strukturellen oder funktionellen Ähnlichkeiten aufweisen.

Der Hauptteil der Arbeit beschäftigte sich mit der strukturellen Grundlage der Kopplung von Glutaminase- und Synthaseaktivität im HisH:HisF-Komplex. Die Bindung des HisF-Substrates N'-[5'phosphoribulosylformimino]-5'-aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid (PRFAR) führt zur Hydrolyse von Glutamin am 25 Å entfernt liegenden aktiven Zentrum von HisH. Dort entstandener Ammoniak gelangt durch einen langen Kanal zum aktiven Zentrum von HisF, wo er mit PRFAR zu den Produkten ImGP und 5'-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid (AICAR) reagiert. Als aktivierende Liganden können neben dem Substrat auch das Analogon ProFAR, ImGP und, wie sich im Laufe der Arbeit herausstellte, NAD⁺ dienen. Zur Identifizierung von Resten, die an der Regulation der Glutaminaseaktivität von HisH beteiligt sind, wurden an der Kontaktfläche der beiden Untereinheiten eine Reihe von Aminosäuren zu Alanin mutiert und die Konsequenzen der Austausche für die Funktion und Struktur der ImGPS untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass Asp98 aus HisF entscheidend zur Glutaminaseaktivität von HisH beiträgt. Vermutlich bildet die Carboxylatseitenkette dieses Restes eine Wasser-vermittelte

Interaktion mit His178 aus der katalytischen Triade von HisH aus und vervollständigt auf diese Weise das aktive Zentrum der Glutaminase. Es scheint, dass diese aktivierende Interaktion nur in Anwesenheit eines HisF-Liganden vollständig ausgeprägt ist.

Die Reste Tyr138 und Lys181 aus HisH flankieren die katalytische Triade und grenzen sie an der Kontaktfläche zu HisF vom Lösungsmittel ab. Die beiden Einzelmutationen Y138A und K181A führten zu gesteigerter Glutaminaseaktivität in Anwesenheit eines HisF-Liganden wie auch zu konstitutiver, d.h. zu Liganden-unabhängiger Glutaminhydrolyse. Die Kombination der beiden Mutationen steigerte die konstitutive Glutaminaseaktivität der ImGPS im Vergleich zum wildtypischen Enzym um den Faktor 4400, wobei nur noch 5 % des gebildeten Ammoniaks mit PRFAR abreagierten. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung zeigte die Röntgenstruktur der Doppelmutante, dass durch das Entfernen der beiden voluminösen Seitenketten ein Zugang zum Lösungsmittel entsteht, durch den naszierender Ammoniak abdiffundieren kann (Kooperation mir Dr. Matthias Wilmanns, EMBL Hamburg). Auf der Basis dieser Beobachtung wird ein neuartiges Modell zur Aktivierung der Glutaminase diskutiert, das auf durch naszierenden Ammoniak verursachte Produktinhibition beruht, die entweder durch dessen Reaktion mit PRFAR oder durch seine Diffusion ins Lösungsmittel aufgehoben werden kann.

In früheren Arbeiten war postuliert worden, dass der am aktiven Zentrum von HisF gelegene flexible Loop $\beta 1\alpha 1$ (Loop1) den Ausgangspunkt für die Aktivierung von HisH darstellen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die enzymatische Aktivität der HisF- Δ Loop1 Mutante untersucht und ihre Röntgenstruktur aufgeklärt (Kooperation mir Dr. Matthias Wilmanns, EMBL Hamburg). Die Ergebnisse erbrachten keine eindeutigen Hinweise für die die Rolle von Loop1 bei der Signaltransduktion, machen seine Beteiligung an der Bindung von PRFAR jedoch unwahrscheinlich.

Um durch HisF-Liganden induzierte Konformationsänderungen mit aktivierender Wirkung auf HisH zu identifizieren, müssen die Strukturen der apo- und der holo-Form der ImGPS verglichen werden. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, eine Röntgenstruktur der ImGPS mit gebundenem Synthase-Liganden aufzuklären. Um diesbezügliche Informationen zu erhalten, wurden NMR-Titrationsexperimente mit isotopenmarkiertem HisF durchgeführt. Die Ergebnisse deuten auf weitreichende ligandinduzierte Konformationsänderungen hin, deren funktionelle Bedeutung jedoch momentan noch unklar ist (Kooperation mit Prof. Eike Brunner, Universität Regensburg und TU Dresden).

Um die Reaktions- und Aktivierungsmechanismen verwandter Glutaminasen vergleichend zu untersuchen, wurden TrpG-Mutanten genauer charakterisiert, die auch in Abwesenheit der Synthase TrpE konstitutiv Glutamin hydrolysierten. Dabei wurden bereits vorhandene und neu hergestellte Mutanten enzymkinetisch und durch Moleküldynamik-Simulationen analysiert (Kooperation mit Dr. Marco Bocola, Universität Regensburg). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mutationen zu Umlagerungen am aktiven Zentrum von TrpG führen, die eine Aktivierung der katalytischen Triade zur Folge haben. Dies lässt vermuten, dass in HisH und TrpG unterschiedliche Effekte zu konstitutiver Aktivität führen und sich wohl auch die Aktivierungsmechanismen durch die Synthasen HisF und TrpE grundlegend unterscheiden.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die evolutive Verwandtschaft von TrpG und HisH näher untersucht. Dem Ansatz lag die Annahme zugrunde, dass sich beide Glutaminasen aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelten, der sowohl mit HisF als auch mit TrpE produktive Komplexe bilden konnte. Um die Plausibilität dieser Annahme zu überprüfen, wurde versucht die Kontaktfläche von HisH auf TrpG zu übertragen und dadurch einen stabilen TrpG:HisF Komplex zu etablieren. Obwohl insgesamt bis zu 92 % der Kontaktfläche von TrpG ausgetauscht wurden, ergaben sich weder *in vivo* (*yeast-two-hybrid*) noch *in vitro* (Gelfiltration, Fluoreszenztitration) Hinweise auf eine Interaktion mit HisF.

9 Literaturverzeichnis

- Alfarano, C., C. E. Andrade, *et al.* (2005). "The Biomolecular Interaction Network Database and related tools 2005 update." *Nucleic Acids Res* **33**(Database issue): D418-24.
- Amaro, R. E., R. S. Myers, *et al.* (2005). "Structural elements in IGP synthase exclude water to optimize ammonia transfer." *Biophys J* **89**(1): 475-87.
- Amaro, R. E., A. Sethi, *et al.* (2007). "A network of conserved interactions regulates the allosteric signal in a glutamine amidotransferase." *Biochemistry* **46**(8): 2156-73.
- Anand, R., A. A. Hoskins, *et al.* (2004). "Domain organization of *Salmonella typhimurium* formylglycinamide ribonucleotide amidotransferase revealed by X-ray crystallography." *Biochemistry* **43**(32): 10328-42.
- Anderson, P. M. and A. Meister (1965). "Evidence for an activated form of carbon dioxide in the reaction catalyzed by *Escherichia coli* carbamyl phosphate synthetase." *Biochemistry* **4**(12): 2803-9.
- Ausubel, F. M., R. Brent, *et al.* (1989). "Current Protocols in Molecular Biology." *New York: John Wiley & Sons.*
- Banfield, M. J., J. S. Lott, *et al.* (2001). "Structure of HisF, a histidine biosynthetic protein from *Pyrobaculum aerophilum*." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**(Pt 11): 1518-25.
- Banner, D. W., A. C. Bloomer, *et al.* (1975). "Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data." *Nature* **255**(5510): 609-14.
- Bao, L., C. Redondo, *et al.* (2009). "Deciphering soluble and membrane protein function using yeast systems (Review)." *Mol Membr Biol* **26**(3): 127-35.
- Barrette-Ng, I. H., K. K. Ng, *et al.* (2002). "Structure of arterivirus nsp4. The smallest chymotrypsin-like proteinase with an alpha/beta C-terminal extension and alternate conformations of the oxyanion hole." *J Biol Chem* **277**(42): 39960-6.
- Bartel, P., C. T. Chien, *et al.* (1993). "Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system." *Biotechniques* **14**(6): 920-4.
- Bauer, J. A., E. M. Bennett, *et al.* (2004). "Three-dimensional structure of YaaE from *Bacillus subtilis*, a glutaminase implicated in pyridoxal-5'-phosphate biosynthesis." *J Biol Chem* **279**(4): 2704-11.
- Beismann-Driemeyer, S. (2000). "Dissertation Universität zu Köln."
- Beismann-Driemeyer, S. and R. Sterner (2001). "Imidazole glycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima*. Quaternary structure, steady-state kinetics, and reaction mechanism of the bienzyme complex." *J Biol Chem* **276**(23): 20387-96.
- Bera, A. K., S. Chen, *et al.* (1999). "Interdomain signaling in glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase." *J Biol Chem* **274**(51): 36498-504.
- Better, M., C. P. Chang, *et al.* (1988). "Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment." *Science* **240**(4855): 1041-3.
- Binda, C., R. T. Bossi, *et al.* (2000). "Cross-talk and ammonia channeling between active centers in the unexpected domain arrangement of glutamate synthase." *Structure* **8**(12): 1299-308.

- Brannigan, J. A., G. Dodson, *et al.* (1995). "A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation." *Nature* **378**(6555): 416-9.
- Brent, R. and M. Ptashne (1985). "A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor." *Cell* **43**(3 Pt 2): 729-36.
- Buvinger, W. E., L. C. Stone, *et al.* (1981). "Biochemical genetics of tryptophan synthesis in *Pseudomonas acidovorans*." *J Bacteriol* **147**(1): 62-8.
- Byrnes, W. M., R. N. Goldberg, *et al.* (2000). "Thermodynamics of reactions catalyzed by anthranilate synthase." *Biophys Chem* **84**(1): 45-64.
- Camacho, C. J. and S. Vajda (2002). "Protein-protein association kinetics and protein docking." *Curr Opin Struct Biol* **12**(1): 36-40.
- CCP4 (1994). "COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4. ``The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography''. *Acta Cryst. D50*, 760-763.".
- Certa, U., W. Bannwarth, *et al.* (1986). "Subregions of a conserved part of the HIV gp41 transmembrane protein are differentially recognized by antibodies of infected individuals." *EMBO J* **5**(11): 3051-6.
- Chaparian, M. G. and D. R. Evans (1991). "The catalytic mechanism of the amidotransferase domain of the Syrian hamster multifunctional protein CAD. Evidence for a CAD-glutamyl covalent intermediate in the formation of carbamyl phosphate." *J Biol Chem* **266**(6): 3387-95.
- Chatr-aryamontri, A., A. Ceol, *et al.* (2007). "MINT: the Molecular INTeraction database." *Nucleic Acids Res* **35**(Database issue): D572-4.
- Chaudhuri, B. N., S. C. Lange, *et al.* (2001). "Crystal structure of imidazole glycerol phosphate synthase: a tunnel through a (beta/alpha)8 barrel joins two active sites." *Structure* **9**(10): 987-97.
- Chaudhuri, B. N., S. C. Lange, *et al.* (2003). "Toward understanding the mechanism of the complex cyclization reaction catalyzed by imidazole glycerolphosphate synthase: crystal structures of a ternary complex and the free enzyme." *Biochemistry* **42**(23): 7003-12.
- Chittur, S. V., T. J. Klem, *et al.* (2001). "Mechanism for acivicin inactivation of triad glutamine amidotransferases." *Biochemistry* **40**(4): 876-87.
- Corda, M., B. Era, *et al.* (2004). "Structural investigation of pig metmyoglobin by ¹²⁹Xe NMR spectroscopy." *Biochim Biophys Acta* **1674**(2): 182-92.
- Crawford, I. P. (1975). "Gene rearrangements in the evolution of the tryptophan synthetic pathway." *Bacteriol Rev* **39**(2): 87-120.
- Davis, I. W., A. Leaver-Fay, *et al.* (2007). "MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids." *Nucleic Acids Res* **35**(Web Server issue): W375-83.
- Davisson, V. J., I. L. Deras, *et al.* (1994). "A Plasmid-Based Approach for the Synthesis of a Histidine Biosynthetic Intermediate." *Journal of Organic Chemistry* **59**(1): 137-143.
- Dossena, L., B. Curti, *et al.* (2007). "Activation and coupling of the glutaminase and synthase reaction of glutamate synthase is mediated by E1013 of the ferredoxin-dependent enzyme, belonging to loop 4 of the synthase domain." *Biochemistry* **46**(15): 4473-85.
- Douangamath, A., M. Walker, *et al.* (2002). "Structural evidence for ammonia tunneling across the (beta alpha)(8) barrel of the imidazole glycerol phosphate synthase bienzyme complex." *Structure* **10**(2): 185-93.
- Edman, P. and G. Begg (1967). "A protein sequenator." *Eur J Biochem* **1**(1): 80-91.

- Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-32.
- Eswar, N., B. Webb, *et al.* (2006). "Comparative protein structure modeling using Modeller." *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 5*: Unit 5 6.
- Fan, Y., L. Lund, *et al.* (2009). "A combined theoretical and experimental study of the ammonia tunnel in carbamoyl phosphate synthetase." *J Am Chem Soc* **131**(29): 10211-9.
- Fan, Y., L. Lund, *et al.* (2008). "Mechanism for the transport of ammonia within carbamoyl phosphate synthetase determined by molecular dynamics simulations." *Biochemistry* **47**(9): 2935-44.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." *Nature* **340**(6230): 245-6.
- Flicker, K., M. Neuwirth, *et al.* (2007). "Structural and thermodynamic insights into the assembly of the heteromeric pyridoxal phosphate synthase from *Plasmodium falciparum*." *J Mol Biol* **374**(3): 732-48.
- Floquet, N., P. Durand, *et al.* (2009). "Collective motions in glucosamine-6-phosphate synthase: influence of ligand binding and role in ammonia channelling and opening of the fructose-6-phosphate binding site." *J Mol Biol* **385**(2): 653-64.
- Floquet, N., S. Mouilleron, *et al.* (2007). "Ammonia channeling in bacterial glucosamine-6-phosphate synthase (GlmS): molecular dynamics simulations and kinetic studies of protein mutants." *FEBS Lett* **581**(16): 2981-7.
- Frieden, E. and C. Walter (1963). "Prevalence and significance of the product inhibition of enzymes." *Nature* **198**: 834-7.
- Gerlt, J. A. and F. M. Raushel (2003). "Evolution of function in (beta/alpha)8-barrel enzymes." *Curr Opin Chem Biol* **7**(2): 252-64.
- Goodrich, J. and J. Kugel (2006). "Binding and Kinetics for Molecular Biologists." *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Goto, M., R. Omi, *et al.* (2004). "Crystal structures of CTP synthetase reveal ATP, UTP, and glutamine binding sites." *Structure* **12**(8): 1413-23.
- Grieshaber, M. and R. Bauerle (1974). "Monomeric and dimeric forms of component II of the anthranilate synthetase--anthranilate 5-phosphoribosylpyrophosphate phosphoribosyltransferase complex of *Salmonella typhimurium*. Implications concerning the mode of assembly of the complex." *Biochemistry* **13**(2): 373-83.
- Gu, Y., D. M. Gordon, *et al.* (2005). "A GTP:AMP phosphotransferase, Adk2p, in *Saccharomyces cerevisiae*. Role of the C terminus in protein folding/stabilization, thermal tolerance, and enzymatic activity." *J Biol Chem* **280**(19): 18604-9.
- Guillon, J. M., T. Meinnel, *et al.* (1992). "Nucleotides of tRNA governing the specificity of *Escherichia coli* methionyl-tRNA(fMet) formyltransferase." *J Mol Biol* **224**(2): 359-67.
- Häger, M. (2005). "Evolution und Regulation von Protein-Protein Interaktionen in zwei Glutamin-Amidotransferasen aus der Biosynthese von Histidin und Tryptophan." *Dissertation Universität Regensburg*.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-80.
- Harper, J. W., G. R. Adami, *et al.* (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." *Cell* **75**(4): 805-16.

- Henn-Sax, M., R. Thoma, *et al.* (2002). "Two (betaalpha)(8)-barrel enzymes of histidine and tryptophan biosynthesis have similar reaction mechanisms and common strategies for protecting their labile substrates." *Biochemistry* **41**(40): 12032-42.
- Ho, B. K. and F. Gruswitz (2008). "HOLLOW: generating accurate representations of channel and interior surfaces in molecular structures." *BMC Struct Biol* **8**: 49.
- Holm, L. and J. Park (2000). "DaliLite workbench for protein structure comparison." *Bioinformatics* **16**(6): 566-7.
- Holyoak, T., T. D. Fenn, *et al.* (2003). "Malonate: a versatile cryoprotectant and stabilizing solution for salt-grown macromolecular crystals." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**(Pt 12): 2356-8.
- Hope, I. A. and K. Struhl (1986). "Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast." *Cell* **46**(6): 885-94.
- Howlett, G. J., A. P. Minton, *et al.* (2006). "Analytical ultracentrifugation for the study of protein association and assembly." *Curr Opin Chem Biol* **10**(5): 430-6.
- Huang, X., H. M. Holden, *et al.* (2001). "Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions." *Annu Rev Biochem* **70**: 149-80.
- Hutter, R., P. Niederberger, *et al.* (1986). "Tryptophan biosynthetic genes in eukaryotic microorganisms." *Annu Rev Microbiol* **40**: 55-77.
- Hwang, L. H. and H. Zalkin (1971). "Multiple forms of anthranilate synthetase-anthranilate 5-phosphoribosylpyrophosphate phosphoribosyltransferase from *Salmonella typhimurium*." *J Biol Chem* **246**(8): 2338-45.
- Inoue, H., H. Nojima, *et al.* (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-8.
- Isupov, M. N., G. Obmolova, *et al.* (1996). "Substrate binding is required for assembly of the active conformation of the catalytic site in Ntn amidotransferases: evidence from the 1.8 Å crystal structure of the glutaminase domain of glucosamine 6-phosphate synthase." *Structure* **4**(7): 801-10.
- Ito, H., Y. Fukuda, *et al.* (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." *J Bacteriol* **153**(1): 163-8.
- Ivens, A. (1998). "Characterization of Anthranilate Synthase and Anthranilate Phosphorybosyltransferase from *Thermotoga maritima* and *Sulfolobus solfataricus* ." *Dissertation Universität zu Basel*.
- James, P., J. Halladay, *et al.* (1996). "Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast." *Genetics* **144**(4): 1425-36.
- Kane, J. F. (1977). "Regulation of a common amidotransferase subunit." *J Bacteriol* **132**(2): 419-25.
- Kiefer, F., K. Arnold, *et al.* (2009). "The SWISS-MODEL Repository and associated resources." *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue): D387-92.
- Kim, J. H., J. M. Krahn, *et al.* (1996). "Structure and function of the glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase glutamine site and communication with the phosphoribosylpyrophosphate site." *J Biol Chem* **271**(26): 15549-57.
- Klem, T. J. and V. J. Davisson (1993). "Imidazole glycerol phosphate synthase: the glutamine amidotransferase in histidine biosynthesis." *Biochemistry* **32**(19): 5177-86.
- Knöchel, T., A. Ivens, *et al.* (1999). "The crystal structure of anthranilate synthase from *Sulfolobus solfataricus*: functional implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17): 9479-84.

- Korolev, S., T. Skarina, *et al.* (2002). "Crystal structure of glutamine amidotransferase from *Thermotoga maritima*." *Proteins* **49**(3): 420-2.
- Krahn, J. M., J. H. Kim, *et al.* (1997). "Coupled formation of an amidotransferase interdomain ammonia channel and a phosphoribosyltransferase active site." *Biochemistry* **36**(37): 11061-8.
- Künzler, M., T. Balmelli, *et al.* (1993). "Cloning, primary structure, and regulation of the HIS7 gene encoding a bifunctional glutamine amidotransferase: cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* **175**(17): 5548-58.
- Kuriyan, J. and D. Eisenberg (2007). "The origin of protein interactions and allostery in colocalization." *Nature* **450**(7172): 983-90.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lang, D., R. Thoma, *et al.* (2000). "Structural evidence for evolution of the beta/alpha barrel scaffold by gene duplication and fusion." *Science* **289**(5484): 1546-50.
- Larsen, T. M., S. K. Boehlein, *et al.* (1999). "Three-dimensional structure of *Escherichia coli* asparagine synthetase B: a short journey from substrate to product." *Biochemistry* **38**(49): 16146-57.
- Leslie, A. G. (1998). "MOSFLM 7.0.4 edit. Cambridge, UK.".
- Lipchock, J. and J. P. Loria (2009). "Millisecond dynamics in the allosteric enzyme imidazole glycerol phosphate synthase (IGPS) from *Thermotoga maritima*." *J Biomol NMR* **45**(1-2): 73-84.
- Lipchock, J. M. and J. P. Loria (2008). "1H, 15N and 13C resonance assignment of imidazole glycerol phosphate (IGP) synthase protein HisF from *Thermotoga maritima*." *Biomol NMR Assign* **2**(2): 219-21.
- List, F. (2005). "Protein-Protein Wechselwirkungen innerhalb der Anthranilat Synthase aus *Thermotoga maritima*." *Diplomarbeit Universität Regensburg*.
- Lusty, C. J. (1992). "Detection of an enzyme bound gamma-glutamyl acyl ester of carbamyl phosphate synthetase of *Escherichia coli*." *FEBS Lett* **314**(2): 135-8.
- Mareya, S. M. and F. M. Raushel (1994). "A molecular wedge for triggering the amidotransferase activity of carbamoyl phosphate synthetase." *Biochemistry* **33**(10): 2945-50.
- Massiere, F. and M. A. Badet-Denisot (1998). "The mechanism of glutamine-dependent amidotransferases." *Cell Mol Life Sci* **54**(3): 205-22.
- Matthews, B. W. (1968). "Solvent content of protein crystals." *J Mol Biol* **33**(2): 491-7.
- McCoy, A. J. (2007). "Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**(Pt 1): 32-41.
- Miles, B. W., J. A. Banzon, *et al.* (1998). "Regulatory control of the amidotransferase domain of carbamoyl phosphate synthetase." *Biochemistry* **37**(47): 16773-9.
- Mohrlüder, N. (2003). *Diplomarbeit*.
- Morollo, A. A. and R. Bauerle (1993). "Characterization of composite aminodeoxyisochorismate synthase and aminodeoxyisochorismate lyase activities of anthranilate synthase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21): 9983-7.
- Morollo, A. A. and M. J. Eck (2001). "Structure of the cooperative allosteric anthranilate synthase from *Salmonella typhimurium*." *Nat Struct Biol* **8**(3): 243-7.

- Mouilleron, S., M. A. Badet-Denisot, *et al.* (2008). "Ordering of C-terminal loop and glutaminase domains of glucosamine-6-phosphate synthase promotes sugar ring opening and formation of the ammonia channel." *J Mol Biol* **377**(4): 1174-85.
- Muchmore, C. R., J. M. Krahn, *et al.* (1998). "Crystal structure of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from *Escherichia coli*." *Protein Sci* **7**(1): 39-51.
- Mueller-Dieckmann, J. (2006). "The open-access high-throughput crystallization facility at EMBL Hamburg." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**(Pt 12): 1446-52.
- Mullis, K. B. and F. A. Falloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-50.
- Murshudov, G. N., A. A. Vagin, *et al.* (1997). "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**(Pt 3): 240-55.
- Myers, R. S., R. E. Amaro, *et al.* (2005). "Reaction coupling through interdomain contacts in imidazole glycerol phosphate synthase." *Biochemistry* **44**(36): 11974-85.
- Myers, R. S., J. R. Jensen, *et al.* (2003). "Substrate-induced changes in the ammonia channel for imidazole glycerol phosphate synthase." *Biochemistry* **42**(23): 7013-22.
- Nakamura, A., M. Yao, *et al.* (2006). "Ammonia channel couples glutaminase with transamidase reactions in GatCAB." *Science* **312**(5782): 1954-8.
- Nakatsu, T., H. Kato, *et al.* (1998). "Crystal structure of asparagine synthetase reveals a close evolutionary relationship to class II aminoacyl-tRNA synthetase." *Nat Struct Biol* **5**(1): 15-9.
- Nielsen, J. E. and J. A. McCammon (2003). "Calculating pKa values in enzyme active sites." *Protein Sci* **12**(9): 1894-901.
- Ofran, Y. and B. Rost (2003). "Analysing six types of protein-protein interfaces." *J Mol Biol* **325**(2): 377-87.
- Ollis, D. L., E. Cheah, *et al.* (1992). "The alpha/beta hydrolase fold." *Protein Eng* **5**(3): 197-211.
- Omi, R., H. Mizuguchi, *et al.* (2002). "Structure of imidazole glycerol phosphate synthase from *Thermus thermophilus* HB8: open-closed conformational change and ammonia tunneling." *J Biochem* **132**(5): 759-65.
- Oshikane, H., K. Sheppard, *et al.* (2006). "Structural basis of RNA-dependent recruitment of glutamine to the genetic code." *Science* **312**(5782): 1950-4.
- Pagel, P., S. Kovac, *et al.* (2005). "The MIPS mammalian protein-protein interaction database." *Bioinformatics* **21**(6): 832-4.
- Papaleo, M. C., E. Russo, *et al.* (2009). "Structural, evolutionary and genetic analysis of the histidine biosynthetic "core" in the genus *Burkholderia*." *Gene*.
- Parsons, J. F., P. Y. Jensen, *et al.* (2002). "Structure of *Escherichia coli* aminodeoxychorismate synthase: architectural conservation and diversity in chorismate-utilizing enzymes." *Biochemistry* **41**(7): 2198-208.
- Purohit, P., A. Mitra, *et al.* (2007). "A stepwise mechanism for acetylcholine receptor channel gating." *Nature* **446**(7138): 930-3.
- Rabinowitz, J. D., J. J. Hsiao, *et al.* (2008). "Dissecting enzyme regulation by multiple allosteric effectors: nucleotide regulation of aspartate transcarbamoylase." *Biochemistry* **47**(21): 5881-8.

- Raschle, T., N. Amrhein, *et al.* (2005). "On the two components of pyridoxal 5'-phosphate synthase from *Bacillus subtilis*." *J Biol Chem* **280**(37): 32291-300.
- Reichmann, D., O. Rahat, *et al.* (2005). "The modular architecture of protein-protein binding interfaces." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(1): 57-62.
- Reinstein, J., I. Schlichting, *et al.* (1990). "Structurally and catalytically important residues in the phosphate binding loop of adenylate kinase of *Escherichia coli*." *Biochemistry* **29**(32): 7451-9.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, *et al.* (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-91.
- Sambrook, J., E. Fritsch, *et al.* (1989). "Molecular cloning: a laboratory Manual." *New York, Cold Spring Harbour*.
- Sanger, F., S. Nicklen, *et al.* (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
- Sawula, R. V. and I. P. Crawford (1972). "Mapping of the tryptophan genes of *Acinetobacter calcoaceticus* by transformation." *J Bacteriol* **112**(2): 797-805.
- Schmitt, E., M. Panvert, *et al.* (2005). "Structural basis for tRNA-dependent amidotransferase function." *Structure* **13**(10): 1421-33.
- Schoenborn, B. P. and C. L. Nobbs (1966). "The binding of xenon of sperm whale deoxymyoglobin." *Mol Pharmacol* **2**(5): 495-8.
- Schwab, T., D. Skeggs, *et al.* (2008). "A rationally designed monomeric variant of anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus* is as active as the dimeric wild-type enzyme but less thermostable." *J Mol Biol* **376**(2): 506-16.
- Sears, L. E., L. S. Moran, *et al.* (1992). "CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase." *Biotechniques* **13**(4): 626-33.
- Sharp, P. A., B. Sugden, *et al.* (1973). "Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose--ethidium bromide electrophoresis." *Biochemistry* **12**(16): 3055-63.
- Sivaraman, J., R. S. Myers, *et al.* (2005). "Crystal structure of *Methanobacterium thermoautotrophicum* phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase HisI." *Biochemistry* **44**(30): 10071-80.
- Slatko, B. E. (1994). "Thermal cycle dideoxy DNA sequencing." *Methods Mol Biol* **31**: 35-45.
- Spraggon, G., C. Kim, *et al.* (2001). "The structures of anthranilate synthase of *Serratia marcescens* crystallized in the presence of (i) its substrates, chorismate and glutamine, and a product, glutamate, and (ii) its end-product inhibitor, L-tryptophan." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6021-6.
- Sterner, R. and W. Liebl (2001). "Thermophilic adaptation of proteins." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **36**(1): 39-106.
- Strohmeier, M., T. Raschle, *et al.* (2006). "Structure of a bacterial pyridoxal 5'-phosphate synthase complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(51): 19284-9.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J Mol Biol* **189**(1): 113-30.
- Tambasco-Studart, M., I. Tews, *et al.* (2007). "Functional analysis of PDX2 from *Arabidopsis*, a glutaminase involved in vitamin B6 biosynthesis." *Plant Physiol* **144**(2): 915-25.

- Tan, J., K. H. Verschueren, *et al.* (2005). "pH-dependent conformational flexibility of the SARS-CoV main proteinase (M(pro)) dimer: molecular dynamics simulations and multiple X-ray structure analyses." *J Mol Biol* **354**(1): 25-40.
- Tate, S. S. and A. Meister (1977). "Affinity labeling of gamma-glutamyl transpeptidase and location of the gamma-glutamyl binding site on the light subunit." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(3): 931-5.
- Tesmer, J. J., T. J. Klem, *et al.* (1996). "The crystal structure of GMP synthetase reveals a novel catalytic triad and is a structural paradigm for two enzyme families." *Nat Struct Biol* **3**(1): 74-86.
- Thoden, J. B., H. M. Holden, *et al.* (1997). "Structure of carbamoyl phosphate synthetase: a journey of 96 Å from substrate to product." *Biochemistry* **36**(21): 6305-16.
- Thoden, J. B., X. Huang, *et al.* (2004). "Long-range allosteric transitions in carbamoyl phosphate synthetase." *Protein Sci* **13**(9): 2398-405.
- Thoden, J. B., X. Huang, *et al.* (1999). "The small subunit of carbamoyl phosphate synthetase: snapshots along the reaction pathway." *Biochemistry* **38**(49): 16158-66.
- Thoden, J. B., S. G. Miran, *et al.* (1998). "Carbamoyl phosphate synthetase: caught in the act of glutamine hydrolysis." *Biochemistry* **37**(25): 8825-31.
- Uetz, P. (2002). "Two-hybrid arrays." *Curr Opin Chem Biol* **6**(1): 57-62.
- van den Heuvel, R. H., B. Curti, *et al.* (2004). "Glutamate synthase: a fascinating pathway from L-glutamine to L-glutamate." *Cell Mol Life Sci* **61**(6): 669-81.
- van den Heuvel, R. H., D. Ferrari, *et al.* (2002). "Structural studies on the synchronization of catalytic centers in glutamate synthase." *J Biol Chem* **277**(27): 24579-83.
- van den Heuvel, R. H., D. I. Svergun, *et al.* (2003). "The active conformation of glutamate synthase and its binding to ferredoxin." *J Mol Biol* **330**(1): 113-28.
- Vega, M., List F., Häger M. C., Razeto A., Sterner R., Wilmanns M. (unveröffentlichte Daten).
- von Mering, C., L. J. Jensen, *et al.* (2005). "STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms." *Nucleic Acids Res* **33**(Database issue): D433-7.
- Widjaja, Y. Y., C. N. Pang, *et al.* (2009). "The Interactorium: visualising proteins, complexes and interaction networks in a virtual 3D cell." *Proteomics*.
- Wilmouth, R. C., K. Edman, *et al.* (2001). "X-ray snapshots of serine protease catalysis reveal a tetrahedral intermediate." *Nat Struct Biol* **8**(8): 689-94.
- Wilson, G. G. and N. E. Murray (1991). "Restriction and modification systems." *Annu Rev Genet* **25**: 585-627.
- Winkler, M. (1987). "In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Biosynthesis of histidine." *Washington American Society for Microbiology*.
- Winter, R. and F. Noll (1998). "Methoden der Biophysikalischen Chemie." *Teubner*.
- Wohlfarth, G. and G. Diekert (1991). "Thermodynamics of methylenetetrahydrofolate reduction to methyltetrahydrofolate in *l*is implications for the energy metabolism of homoacetogenic bacteria." *Arch Microbiol* **155**: 378-381.
- Xenarios, I., L. Salwinski, *et al.* (2002). "DIP, the Database of Interacting Proteins: a research tool for studying cellular networks of protein interactions." *Nucleic Acids Res* **30**(1): 303-5.

- Yanofsky, C., T. Platt, *et al.* (1981). "The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *Escherichia coli*." Nucleic Acids Res **9**(24): 6647-68.
- Zalkin, H. (1993). "The amidotransferases." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **66**: 203-309.
- Zalkin, H. and J. L. Smith (1998). "Enzymes utilizing glutamine as an amide donor." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **72**: 87-144.
- Zein, F., Y. Zhang, *et al.* (2006). "Structural insights into the mechanism of the PLP synthase holoenzyme from *Thermotoga maritima*." Biochemistry **45**(49): 14609-20.
- Zhang, Y. (2008). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction." BMC Bioinformatics **9**: 40.
- Zhang, Y., M. H. El Kouni, *et al.* (2006). "Structure of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase in complex with an ATP analog at 1.1 angstroms resolution." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **62**(Pt 2): 140-5.
- Zhu, J., J. W. Burgner, *et al.* (2005). "A new arrangement of (beta/alpha)8 barrels in the synthase subunit of PLP synthase." J Biol Chem **280**(30): 27914-23.
- Zwick, M. (2007). "Rekombinante Expression der *Bacillus subtilis* Gene pabA, pabB, trpE und Charakterisierung der Komplexbildung der Genprodukte." Diplomarbeit Universität Regensburg.

10 Anhang

10.1 Glutaminseaktivität in Abwesenheit von ProFAR

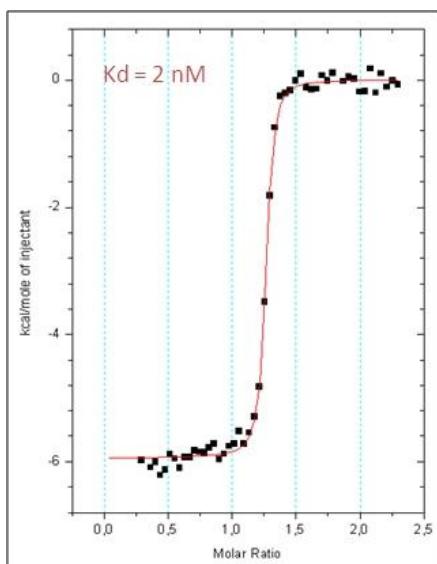
Steady-state enzymkinetische Konstanten der Glutaminase-HisH-Teilreaktion in Abwesenheit von ProFAR

Die Messungen erfolgten bei 25 °C in 50 mM Tricine/KOH, pH 8,0 mit Hilfe des diskontinuierlichen Assays (siehe 2.7.3.3). Die Konzentration an Glutamin betrug in allen Ansätzen 10 mM.

HisH:HisF Mutante	$k_{cat} [min^{-1}]^I$	$k_{cat} [min^{-1}]^I$
	(APAD ⁺)	(NAD ⁺)
HisH-WT	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
HisH-Y138A	1,7 ± 0,15	0,9 ± 0,4
HisH-K181A	1,7 ± 0,21	1,7 ± 0,3
HisH-Y138A-K181A	84 ± 48	180 ± 87
HisH-Y138A:HisF-D98A	0,1 ± 0,06	0,03 ± 0,02
HisH-Y138A-K181A:HisF-D98A	1,2 ± 0,06	

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen.

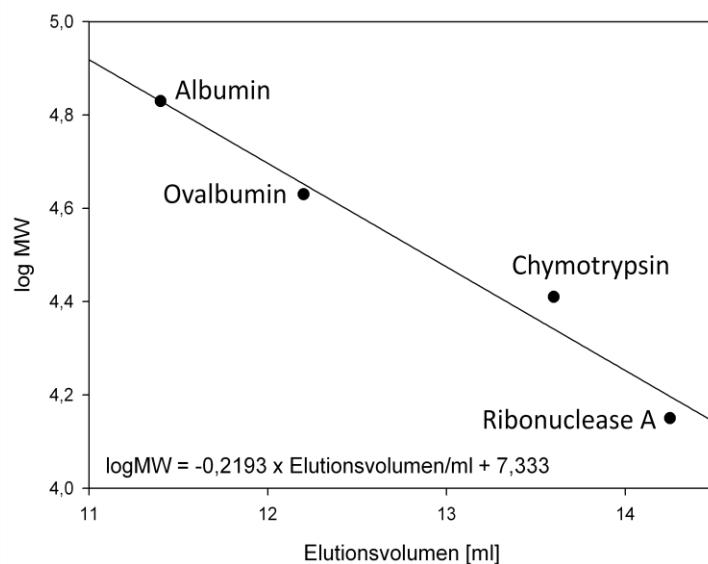
10.2 ITC von HisH mit HisF



Die Messungen wurden am Institut für organische Chemie, der Universität Regensburg durchgeführt.

Zu 1,8 ml 30 µM HisH wurde in 58 Schritten insgesamt 300 µl HisF (310 µM) titriert. Die Analyse der Daten unter Annahme einer 1:1 Stöchiometrie (siehe 2.6.9) ergab einen K_d-Wert für die Komplexbildung von 2 nM.

10.3 Kalibrierung der Superdex-75 (16/60) Gelfiltrationssäule



Kalibrierung der Superdex S-75 Gelfiltrationssäule.

Verschiedene Proteine mit bekannten molaren Massen (siehe unten) wurden bei RT mit 50 mM KP pH 7,5, 300 mM NaCl auf die Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert. Dargestellt ist die Auftragung des Logarithmus der molaren Massen (log MW) gegen das Elutionsvolumen in ml.

Zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule Superdex S-75 verwendete Proteine.

Protein	MW [g/mol]	log MW	Elutionsvolumen [ml]
Albumin	67000	4,83	11,4
Ovalbumin	43000	4,63	12,2
Chymotrypsin	25000	4,40	13,6
Ribonuklease A	13700	4,14	14,25

10.4 Syntheseversuch eines ProFAR/PRFAR Analogons

Zur Bestimmung der Glutaminaseaktivität des HisH:HisF Komplexes wird der PRFAR Vorläufer ProFAR verwendet. Dies ist nötig, da das HisF-Substrat PRFAR instabil ist und spontan hydrolysiert. Durch die Hydrolyse wird die im PRFAR enthaltene Schiff'sche Base unter Bildung von AICAR und weiterer nicht näher beschriebene Produkte gespalten (Davisson *et al.* 1994). Die durch ProFAR stimulierte Glutaminaseaktivität ist jedoch geringer, als die Gesamaktivität des HisH:HisF Komplexes erwarten lässt. Daher wurde

versucht, ein stabiles und möglichst PRFAR ähnliches Analogon zu synthetisieren, das auch für Kokristallisationsexperimente mit HisH:HisF Verwendung finden sollte.

Um die Hydrolyseanfälligkeit zu verringern, soll die entsprechende Schiff'sche Base durch eine C=C Bindung in Form von 3deaza-PRFAR ersetzt werden.

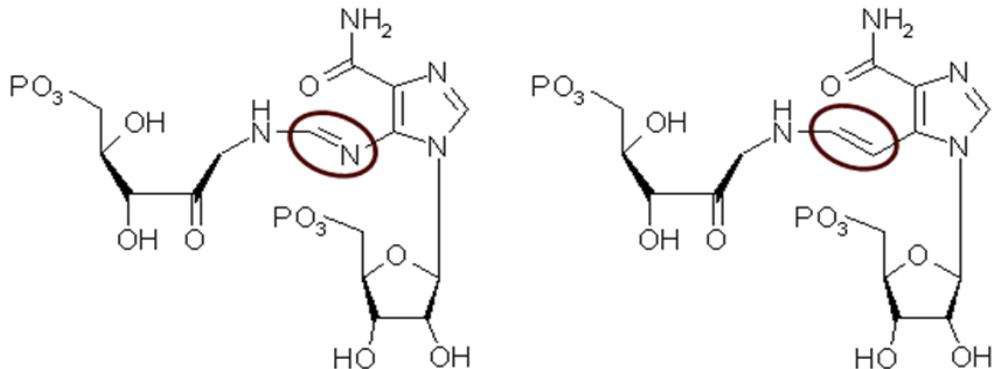
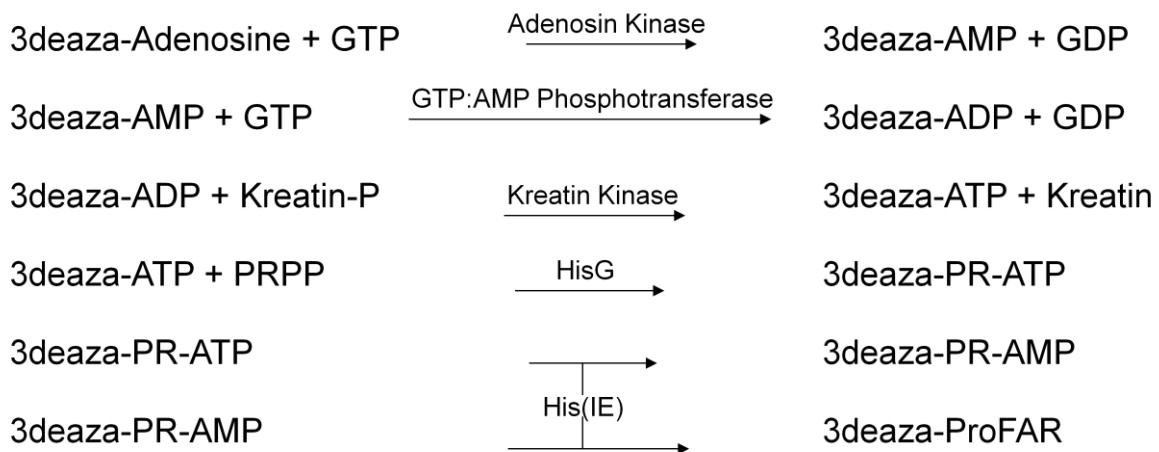


Abbildung: links: PRFAR; die Schiff'sche Base ist hervorgehoben. rechts: 3deaza-PRFAR; die neue C=C Bindung ist hervorgehoben.

Als Ausgangssubstanz stand das kommerziell erhältliche 3deaza-Adenosin zur Verfügung. Dieses wurde zunächst mit Hilfe von Adenosin Kinase, GTP:AMP Phosphotransferase und Kreatin-Kinase zu 3deaza-ATP phosphoryliert und im Anschluß analog zur nativen ProFAR-Herstellung innerhalb der Histidinbiosynthese (Klem & Davisson 1993) mit PRPP weiter umgesetzt:



Bei der Auswahl der ersten beiden phosphorylierenden Enzyme spielten folgende Überlegungen eine Rolle, um Reaktionen in einem Ansatz ablaufen lassen zu können: 1) Da der Phosphorylgruppendonator für die ersten beiden Reaktionen im Überschuss zugesetzt wird, darf es sich nicht um ATP handeln. Überschüssiges ATP würde sonst in der HisG Reaktion genau wie 3deaza-ATP mit PRPP zu PR-ATP reagieren. Da GTP kein Substrat für HisG darstellt, aber bei Enzymen aus einigen Organismen als Phosphorylgruppendonator akzeptiert wird, wurden die Adenosin-Kinase aus *Toxoplasma gondii* und die humane GTP:AMP

Phosphotransferase für die ersten beiden Phosphorylierungsschritte ausgewählt. Das Gen der Adenosin Kinase aus *T. gondii* wurde von Dr. S. Ealick (Cornell University, NY, USA) in dem Expressionsplasmid pET28a zur Verfügung gestellt (Zhang *et al.* 2006). Das Gen der GTP:AMP Phosphotransferase wurde in dem Expressionsplasmid pET21a von Dr. Y. Gu (UMDNJ-New Jersey Medical School, Newark, USA) zur Verfügung gestellt (Gu *et al.* 2005). Die Reinigung beider Enzyme erfolgte über Metall-Affinitätschromatographie nach dem Standardprotokoll.

Der Syntheseweg wurde erfolgreich für Adenosin getestet (Daten nicht gezeigt). Die einzelnen Schritte der Synthese mit 3deaza-Adenosin konnten bis zur HisG-Reaktion durch sequenzielle Enzymzugabe und HPLC-Analyse verfolgt werden (Daten nicht gezeigt). Da die HisE- und HisI-Aktivitäten auf einer Polypeptidkette liegen, wurde das Produkt über HPLC gereinigt und per Massenspektrometrie von Prof. Rainer Deutzmann (Biochemie I, Universität Regensburg) analysiert. Es ergab sich eine Masse von 559 Dalton für das gereinigte Produkt, die der berechneten Massen von 3deaza-PR-AMP mit 560 Da entspricht. Die berechnete Masse von 3deaza-ProFAR beträgt dagegen 576 Da. Dies bedeutet dass die HisI Reaktion, also die Ringöffnung von 3deaza-PR-AMP zu 3deaza-ProFAR nicht stattfindet. Die Röntgenstruktur von HisI mit einem modelliertem putativen Übergangszustand von PR-AMP (Sivaraman *et al.* 2005) liefert keinen Hinweis darauf, dass die Bindung des 3deaza-Substrats verschlechtert sein könnte, da zwischen dem entsprechenden Stickstoffatom und dem aktiven Zentrum des Enzyms keine Wechselwirkung stattfindet. Sehr wahrscheinlich findet die Reaktion wegen den veränderten chemischen Eigenschaften des 3deaza-Purin Gerüsts im Vergleich zum unmodifizierten Heterocyclus nicht mehr statt. Weitere Versuche bei hohen Temperaturen (70 °C) mit *S. solfataricus* HisI bei neutralem oder saurem pH (pH 3) führten ebenfalls nicht zur Öffnung des 3deaza-Purinrings.

Da die enzymatische Herstellung von 3deaza-PRFAR offensichtlich nicht möglich ist, sollte in Zukunft ein organisch chemischer Syntheseversuch unternommen werden.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Sterner. Ich danke ihm für das Vertrauen, dass er mir mit der Vergabe dieses vielseitigen und interessanten Themas entgegen gebracht hat. Seine stets offene Tür und sein fachlicher Rat waren mir eine große Hilfe. Auch möchte ich mich für die Möglichkeit zur Teilnahme an interessanten Tagungen und die Chance vorübergehend in Hamburg zu arbeiten bedanken.

Prof. Dr. Eike Brunner danke ich für sein Interesse an dem HisF-Projekt und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonders danke ich Dr. Matthias Wilmanns für spannende Diskussionen zum Projekt und für drei sehr lehrreiche und produktive Monate in seiner Arbeitsgruppe. Dr. Adelia Razeto danke ich für die praxisnahe Einführung in die Strukturbiologie sowie für ihre fachliche Unterstützung über diese Zeit hinaus. Bei Dr. Anne Due, Dr. Young-Hwa Song, Dr. Arie Geerlof, Dr. Santosh Panjikar, Dr. Christian Poulsen sowie Yusuf Akhter, Florian Sauer, Hubert Mayerhofer, Jacopo Negroni und den anderen Mitgliedern der AG Wilmanns bedanke ich mich für die vielen Hilfen und schönen Momente innerhalb und außerhalb des Labors in Hamburg.

Der *European Molecular Biology Organisation* und den Freunden der Universität Regensburg danke ich für finanzielle Unterstützung.

Dr. Helmut Durschlag gilt mein Dank für die durchgeführten UZ-Läufe und seine Hilfe bei der Auswertung sowie für viele heitere Anekdoten.

Dr. Marco Bocola danke ich für die durchgeführten Moleküldynamik-Simulationen und sein eingebrachtes Wissen über katalytische Triaden, das von großem Wert für diese Arbeit war.

Bei Christoph Liebold bedanke ich mich für viele interessante Diskussionen rund um HisF und Erklärungen zur NMR-Spektroskopie sowie die angenehme und ergiebige Zusammenarbeit.

Dr. Jörg Claren, Dr. André Fischer, Alexander Ehrmann und Daniel Schneider haben meine Arbeit stets mit wertvollen Ideen und Diskussionen begleitet und auch bei vereinzelten Rückschlägen passende Worte gefunden. Dafür und für manch langen Abend innerhalb und außerhalb des Labors ein großes Dankeschön.

Ein ganz großes Dankeschön geht auch an Christiane Endres und Jeannette Ueckert, die mir bei vielen Projekten engagiert und hilfreich zur Seite standen. Auch bei Barbara Kellerer, Sonja Fuchs und Hermine Reisner möchte ich mich herzlich für die vielen zuverlässigen Hilfestellungen im Labor bedanken.

Bei Dr. Patrick Babinger und Harald Guldan bedanke ich mich für zahlreiche Tips und Hilfen sowie oft inspirierende neue Problemlösungsstrategien. Bernd Reisinger danke ich für seine Hilfe bei chemischen Fragen und wünsche ihm für die kommende Arbeit eine glückliche Hand und dass er seinen Elan beibehält. Dr. Sandra Schlee danke ich für viele Diskussionen über Reaktionsmechanismen und das Korrekturlesen des ImGP Kapitels. Dr. Rainer Merkl und Hermann Zellner danke ich für manch guten Tip und Hilfe zur Bioinformatik und Enzymevolution. Klaus Tiefenbach war bei allen computertechnischen und biophysikalischen Problemen ein guter Ansprechpartner. Claudia Pauer danke ich für ihre unerschütterliche Bereitschaft mit dem Verwaltungsapparat zu kommunizieren.

Für eine hilfsbereite und stets angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich auch bei Susanne Dietrich, Tobias Seitz, Monika Meier, Linn Carstensen, Thomas Schwab, Bettina Sommer, Josef Sperl, Kathleen Burghardt, Daniel Roderer, David Peterhoff, Dietmar Birzer und allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Lehrstuhls Biochemie II bedanken.

Agnes Rosenauer, Elisabeth Doblinger, Manuel Wittner, Thomas Gross, Matthias Zwick und Bernd Reisinger danke ich für ihr Engagement im Rahmen ihrer Labor-Praktika.

Claudia danke ich für ihre Ideen, das Korrekturlesen der Arbeit und die wertvolle gemeinsame Zeit.

Wolfgang und Angelika danke ich für ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für ihren Enthusiasmus, ihre Unterstützung und ihr Vertrauen in mich. Auf sie konnte ich mich immer verlassen.

Erklärung

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

Regensburg, den 08.12.2009

(Felix List)

Posterbeiträge

- List F., Vega C., Häger M.C., Babinger K., Kuper J., Wilmanns M., Sterner R.,** 2006. Mutational analysis of a functional protein-protein interaction. *Faltertage; Halle, Leipzig.*
- List F., Vega C., Häger M.C., Babinger K., Kuper J., Wilmanns M., Sterner R.,** 2008. Mutational analysis of a functional protein-protein interaction. *2nd International Conference on Molecular Perspectives on Protein-Protein Interactions, Dubrovnik.*
- Liebold C., List F., Kalbitzer H.R., Sterner R. Brunner E.,** 2009. ¹⁴N-NMR Studies of Ammonia Production by the Thermostable Enzymes HISH and HISF. *30th Trinational Discussion Meeting, Regensburg.*
- List F., Vega C., Häger M.C., Babinger K., Kuper J., Wilmanns M., Sterner R.,** 2009. Mutational analysis of a functional protein-protein interaction. *Protein-Protein Interactions: Theory and Experiment, Hünfeld.*