

**NMR-Spektroskopische
Untersuchungen der
Imidazolglycerinphosphat-Synthase
HisF
aus *Thermotoga maritima*:**

**Studien zur Bindung von Effektormolekülen und
Xenon sowie zum pK_a -Wert katalytisch aktiver
Aminosäurereste**

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

vorgelegt von

Christoph Liebold

aus

Stuttgart / Baden-Württemberg

im Jahr 2010

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 11.05.2009
Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Eike Brunner

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender : Prof. Dr. Reinhard Wirth

1. Gutachter : Prof. Dr. Eike Brunner

2. Gutachter : Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

3. Prüfer : Prof. Dr. Reinhard Sterner

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Die Rolle von HisF in der Histidinbiosynthese	7
1.2. Gekoppelte Enzymaktivität zwischen der Synthase-Einheit HisF und der Glutaminase-Einheit HisH	8
1.3. Substratübertragung zwischen den aktiven Zentren durch einen Kanal . . .	10
1.4. Säurestärken im aktiven Zentrum von HisF	10
1.5. Fragestellungen	11
2. Zuordnung	13
2.1. Motivation - die Bedeutung des [^1H , ^{15}N]-HSQC	13
2.2. Zuordnungsstrategie	14
2.3. Auftretende Probleme bei der Zuordnung einer ^1H , ^{15}N , ^{13}C -markierten Pro- be von HisF	15
2.4. Zuordnung einer ^{15}N , ^{13}C markierten und perdeuterierten Probe von HisF 17	
2.4.1. Zuordnung des [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrums in 50 mM Phosphatpuffer	17
2.4.2. Zuordnung in 50 mM Tricin	19
2.5. Vergleich der Zuordnungen: die Rolle von Phosphat	20
2.6. Zusammenfassung	26
3. Bindung von Liganden an HisF und Aktivierung von HisH	28
3.1. Aktivierung von HisH durch NAD^+ -gebundenes HisF	28
3.1.1. Motivation - direkter Nachweis der NH_3 -Freisetzung für konstitutiv aktive Varianten von HisH	28
3.1.2. Messung der glutaminabhängigen Reaktion in Gegenwart eines Li- ganden	28
3.1.3. Quantitative Bestimmung der NH_3 -Bildung durch ^{14}N -Spektroskopie	29
3.1.4. Aktivierung von HisH-WT und HisH-Y138A durch NAD^+	30
3.2. Der Nachweis der Rückreaktion für die Spaltung von Glutamin	33
3.2.1. Die „Lochhypothese“ des Aktivierungsmechanismus von HisH . . .	33
3.2.2. Modell für die Rückreaktion	33
3.2.3. Nachweis intermediär entstehenden markierten Glutamins	35
3.2.4. Diskussion	37
3.3. Modelle der Ligandbindung - Austauschprozesse	38
3.3.1. Bindung von NAD^+ an HisF	39

3.4.	Aktivierung von HisH durch ImGP-gebundenes HisF	40
3.4.1.	Ergebnisse der NMR-Relaxationsexperimente von Loria et al.	40
3.4.2.	Zustände im schnellen Austausch bei der Bindung von ImGP	40
3.4.3.	Zustände im mittleren Austausch bei der Bindung von ImGP	41
3.5.	Aktivierung von HisH durch ProFAR-gebundenes HisF	43
3.5.1.	Änderungen der chemischen Verschiebung durch die Bindung von ProFAR	43
3.5.2.	Signalverbreiterung durch die Bindung von ProFAR	44
3.5.3.	Signalaufspaltung durch die Bindung von ProFAR	46
3.6.	Diskussion	51
4.	pK_a-Werte ausgewählter protonierbarer Gruppen in HisF	54
4.1.	Bestimmung von pK_a und pH_m mit Hilfe der NMR-Spektroskopie	54
4.2.	pH -Titration von Asp11	56
4.2.1.	pK_a -Werte und die Katalyse der Cyclase-Reaktion	56
4.2.2.	pH -Titration der Apo-Form von HisF in Tricin	56
4.2.3.	pH -Titration der ligandengebundenen Form von HisF	57
4.2.4.	Diskussion	64
4.3.	pH -Titration der Histidin-Reste in HisF	66
4.3.1.	Konservierung von Histidinresten in HisF	66
4.3.2.	pH -Titration der Histidinreste unter verschiedenen Puffer-Bedingungen	66
4.3.3.	Diskussion	70
5.	Xenon-Bindung und intramolekularer Substrat-Transport	73
5.1.	Xenon als NMR-Sonde	73
5.2.	Nachweis der spezifischen Wechselwirkung zwischen Xenon und HisF	74
5.3.	Detektion von Aminosäuren mit starker Xenon-Interaktion im [$^1H, ^{15}N$]- HSQC-Spektrum	75
5.4.	Untersuchung der Interaktionen zwischen NH_3 und HisF	78
5.5.	Diskussion	81
5.5.1.	Kavitäten von HisF und Xenon-Bindung	81
5.5.2.	NH_3 -Transport durch Kavität III	82
6.	Methoden	84
6.1.	Proteinexpression und Synthese von ProFAR	84
6.1.1.	Heterologe Expression und Aufreinigung des Proteins	84
6.2.	Substanzen	85
6.3.	NMR-Spektrometer	85
6.4.	Temperatureichung	85
6.5.	Referenzierung der chemischen Verschiebung	85
6.5.1.	1H -, ^{15}N -, ^{13}C -chemische Verschiebung	85
6.5.2.	^{129}Xe -chemische Verschiebung	86
6.5.3.	^{14}N -chemische Verschiebung	86

6.6.	Pulsprogramme	86
6.7.	Puffer	87
6.7.1.	Kalium-Phosphat-Puffer	87
6.7.2.	Tricin/KOH für ^{14}N -Messungen der NH_3 -Freisetzung	87
6.7.3.	Tricin-Puffer für Zuordnung	87
6.7.4.	Tris/HCl für die Ligandtitrationen und die $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Messungen unter Xenon-Druck	87
6.8.	pH -Messungen	87
6.8.1.	Proteinproben für Zuordnung, Ligandtitrationen, $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC unter Xenon-Druck	87
6.8.2.	pH -Titration	88
6.8.3.	Messung des pH in D_2O	88
6.9.	Bestimmung der Proteinkonzentration	88
6.9.1.	photometrische Konzentrationsbestimmung mit UV-Spektroskopie	88
6.10.	Auswertung mit Computerprogrammen	88
6.10.1.	Prozessierung und Darstellung von NMR-Daten	88
6.10.2.	Auswertung der Ligandtitrationen mit Matlab	88
6.10.3.	Maple	88
6.10.4.	Origin	89
6.10.5.	MolMol	89
6.11.	Zuordnung	89
6.12.	Ligandbindung an HisF und Aktivierung von HisH	90
6.12.1.	^{14}N -Experimente zur Detektion des aus der HisH-Reaktion freigesetzten NH_3	90
6.12.2.	$[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum in Anwesenheit von NAD^+	90
6.12.3.	Nachweis der Rückreaktion für die Spaltung von Glutamin	91
6.12.4.	ImGP-Titration	92
6.12.5.	ProFAR-Titration	92
6.13.	pK_a -Werte ausgewählter protonierbarer Gruppen in HisF	93
6.13.1.	Proteinkonzentration	93
6.13.2.	Auswertung	93
6.13.3.	Zuordnung der Histidin-Signale	93
6.13.4.	pH -Titration in 50 mM KP-Puffer	93
6.13.5.	pH -Titration in 50 mM Tris/HCl	94
6.13.6.	pH -Titration in 20 mM Tris/HCl/150 mM KCl in D_2O	94
6.14.	Xenon-Bindung und intramolekularer Substrat-Transport	94
6.14.1.	Proteinkonzentration	94
6.14.2.	Messung der ^{129}Xe -chemischen Verschiebung	94
6.14.3.	$[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren	95
6.14.4.	Berechnung der Kavitäten	96

A. Zuordnung	97
A.1. Zuordnungstabelle	103
A.2. Vollständigkeit der Zuordnung	107
B. Bindung von Liganden	112
C. Xenon-NMR-Spektroskopie	113
C.1. Probenbefüllung	113
C.2. Probenentleerung: Druckkontrolle / Druckabbau	113
C.3. Evakuierung des Pumpstandes	114
C.4. Gasfüllung	115
C.5. Originalfoto des Pumpstandes	116
D. Zusammenfassung	117
D.1. Zuordnung	117
D.2. Xenon-Bindung und intramolekularer Substrattransport	117
D.3. Ligandbindung	117
D.4. pK_a -Wert Bestimmung	118
Bibliographie	125
E. Danksagung	126

1. Einleitung

1.1. Die Rolle von HisF in der Histidinbiosynthese

Die Biosynthese der essentiellen Aminosäure Histidin besteht aus neun Reaktionsschritten. Die zweite Teilreaktion des fünften Schrittes (Zählung nach [O'Donoghue et al., 2001]) besteht in der Ausbildung des Imidazolringes des Histidins. Dieser Schritt wird durch HisF katalysiert. Daher wird HisF auch als Cyclase oder allgemeiner wie bei allen Glutaminamidotransferasen als Synthase-Einheit bezeichnet. Die eigentliche Reaktion führt vom Substrat PRFAR (N'-((5'-Phosphoribulosyl)formimino)-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid) unter Ammoniakverbrauch zu ImGP (Imidazolglycerolphosphat) und AICAR (5-Aminoimidazol-4-carboxamid-ribotid) (vgl. Abb. 1-1), wobei der Stickstoff des Ammoniaks für den Aufbau des Imidazolringes verwendet wird [Klem & Davisson, 1993]. AICAR wird für die *de novo* Purinbiosynthese benötigt. Somit stellt HisF den Verzweigungspunkt zwischen den beiden oben genannten Biosynthesewegen dar [Winkler, 1987].

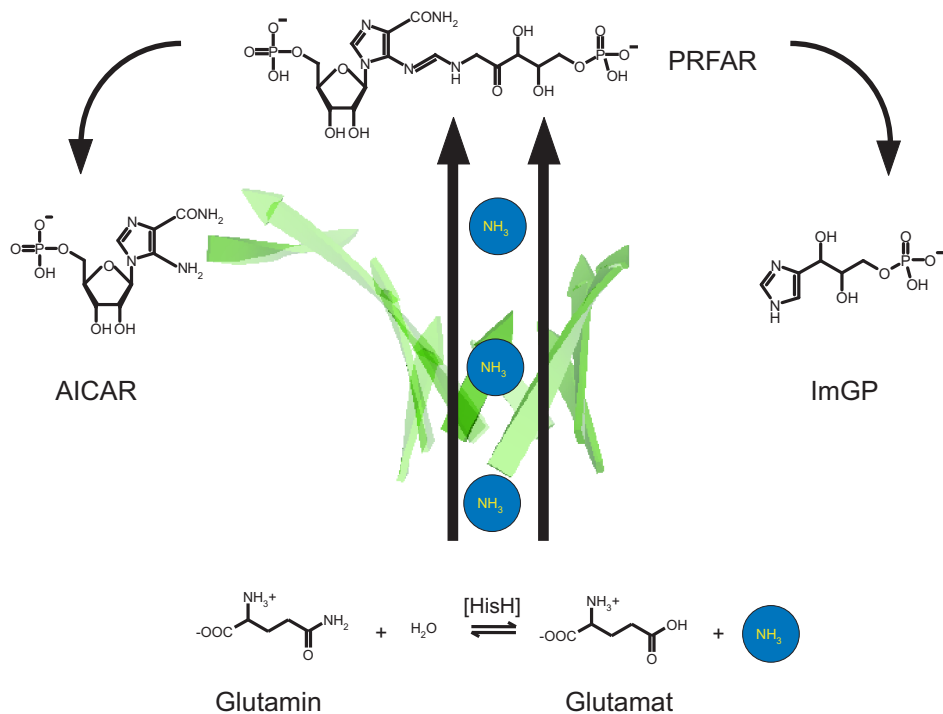


Abb. 1-1 Die Glutaminase HisH spaltet in Gegenwart von ligandgebundenem HisF Glutamin zu Glutamat und NH_3 . In der nachfolgenden Cyclase-Reaktion spaltet HisF PRFAR mit NH_3 zu AICAR und ImGP. NH_3 wird durch einen intramolekularen Tunnel über eine Entfernung von 25 Å vom aktiven Zentrum des HisF zum aktiven Zentrum des HisH transportiert.

1.2. Gekoppelte Enzymaktivität zwischen der Synthase-Einheit HisF und der Glutaminase-Einheit HisH

Der für den Aufbau von ImGP benötigte Ammoniak wird durch die Glutaminase HisH zur Verfügung gestellt [Zalkin & Smith, 1998]. Diese spaltet das endständige Amid des Glutamins hydrolytisch zu Glutamat, wobei Ammoniak frei wird (vgl. Abb. 1-1 und Abb. 1-2). In Bakterien ist die Glutaminase-Einheit ein von HisF getrenntes Enzym. Die beiden Untereinheiten binden allerdings mit hoher Affinität aneinander (10^{-8}M) [Klem & Davisson, 1993]. In Hefe sind dagegen beide Funktionen auf einem Protein (His7) vereinigt [Kuenzler et al., 1993]. Es hat sich gezeigt, dass HisH und HisF eine starke Kopplung ihrer Aktivität besitzen [Klem & Davisson, 1993]. HisF kann PRFAR nur umsetzen, wenn ihm NH_3 zur Verfügung gestellt wird und HisH zeigt nur eine Aktivität, wenn es an HisF binden kann, welches seinerseits bereits sein Substrat gebunden hat. Auf diese Weise wird Glutamin nur hydrolysiert, wenn tatsächlich NH_3 für die Reaktion benötigt wird (vgl. Abb. 1-2). Allerdings gibt es auch andere Liganden, die nicht von HisF umgesetzt werden können und HisH trotzdem aktivieren. Dies trifft z.B. auf das Produkt ImGP zu oder auch auf ProFAR, das Substrat der Isomerase HisA, die den vorangehenden, vierten Schritt der Histidinbiosynthese katalysiert [Klem & Davisson, 1993]. HisF zählt zu Enzymen mit TIM-

oder $(\beta\alpha)_8$ -barrel-Faltung. TIM steht dabei für Triosephosphat-Isomerase - das Enzym, bei dem dieser Faltungstyp erstmalig entdeckt wurde [Banner et al., 1975]. Wie andere TIM-barrel zeigt auch HisF eine besondere Affinität zu negativ geladenen Liganden [Raychaudhuri et al., 1997; Nagano et al., 2002]. Der Grund hierfür liegt in der speziellen Anordnung seiner α -Helices. Diese sind mit ihrem N-terminalen Ende alle in Richtung der Aktivitätsseite von HisF orientiert. Somit besitzt die Seite des Enzyms, an die der Ligand bindet, tatsächlich einen positiven Ladungsüberschuss [Raychaudhuri et al., 1997].

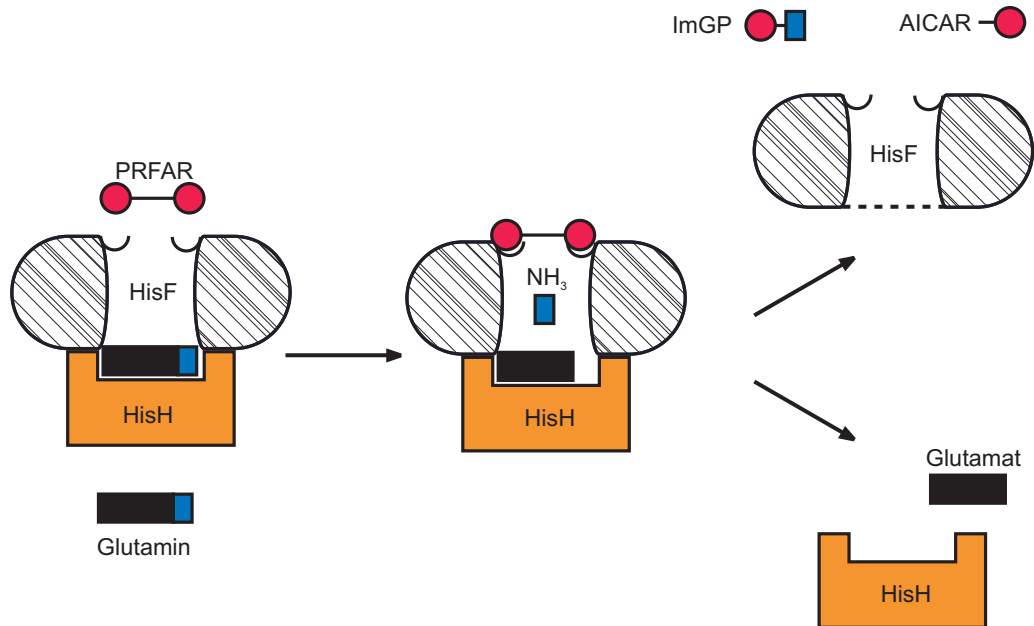


Abb. 1-2 Die Spaltung von Glutamin zu Glutamat und NH₃ durch HisH findet nur in Gegenwart eines an HisF gebundenen Liganden statt. Anschließend wird das Substrat PRFAR zu AICAR und ImGP umgesetzt. Der Ammoniak wird für die Bildung des Imidazol-Ringes in ImGP benötigt.

Die Frage, wie das Bindsignal von HisH über eine Entfernung von 25 Å bis zur Kontaktfläche mit HisF übertragen wird, ist nicht abschließend geklärt. In NMR-Untersuchungen konnten Lipchock & Loria [2009] zeigen, dass sowohl die Bindung des Liganden ImGP als auch die von HisH an HisF zu Veränderungen führt, die über die jeweilige Bindestelle hinausgehen und das gesamte Protein betreffen. Diese Veränderungen äußern sich in Änderungen der chemischen Verschiebung und Signalverbreiterungen. CPMG-Messungen [Lipchock & Loria, 2009] zeigen eine Zunahme von Bewegungen auf der μ s-ms Zeitskala und können mit Hilfe eines „Zwei-Zustands-Modells“ beschrieben werden. Die Autoren gehen davon aus, dass die dynamischen Veränderungen eine nicht näher bestimmte Rolle für die Übertragung des Bindsignales spielen. Außerdem zeigen Mutationsexperimente [Myers et al., 2005; List, 2010], dass einzelne Reste in der Kontaktfläche für die Kommunikation zwischen den Enzymen essentiell sind.

HisH besitzt eine der $\alpha\beta$ -Hydrolase ähnliche Faltung, wie sie bei den Glutaminamidotransferasen vom Typ I (GAT I) zu finden ist. Das aktive Zentrum von HisH bildet eine katalytische Triade (Cys-His-Glu [Ollis et al., 1992]). Im Gegensatz dazu ist bei den Glutaminase-Untereinheiten von Klasse II GATasen ein N-terminales Cystein der kata-

lytisch aktive Aminosäurerest. Durch Vergleich mit anderen GAT I-asen kann von einem Mechanismus ausgegangen werden, der einen Glutamyl-Thioester-Zwischenzustand einschließt [Thoden et al., 1999]. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt auf der Seite des thermodynamisch stabileren Glutamats.

1.3. Substratübertragung zwischen den aktiven Zentren durch einen Kanal

HisF [Lang et al., 2000] besitzt die Faltung eines TIM- oder $(\beta\alpha)_8$ -barrels, bei der acht β -Faltblätter das Innere und die gleiche Anzahl an α -Helices die Außenseite einer kurzen zylinderartigen Struktur bilden. Zwischen den β -Faltblättern befindet sich ein zentraler Hohlraum. Es wird vermutet, dass dieser als ein Kanal für den Transport von NH_3 zwischen den aktiven Zentren von HisH und HisF dient [Chaudhuri et al., 2001]. Eine solche Strategie des intramolekularen Substrattransportes, wie sie schon an anderen Enzymen nachgewiesen wurde, ist sinnvoll, wenn es darum geht, ein labiles Substrat vor dem Kontakt mit dem Lösungsmittel zu schützen oder dessen Verlust durch Diffusion zu verhindern. Im Falle von NH_3 könnte die Erklärung darin liegen, dass das Molekül in Lösung, als protoniertes unreaktives NH_4^+ vorliegen würde [Huang et al., 2001].

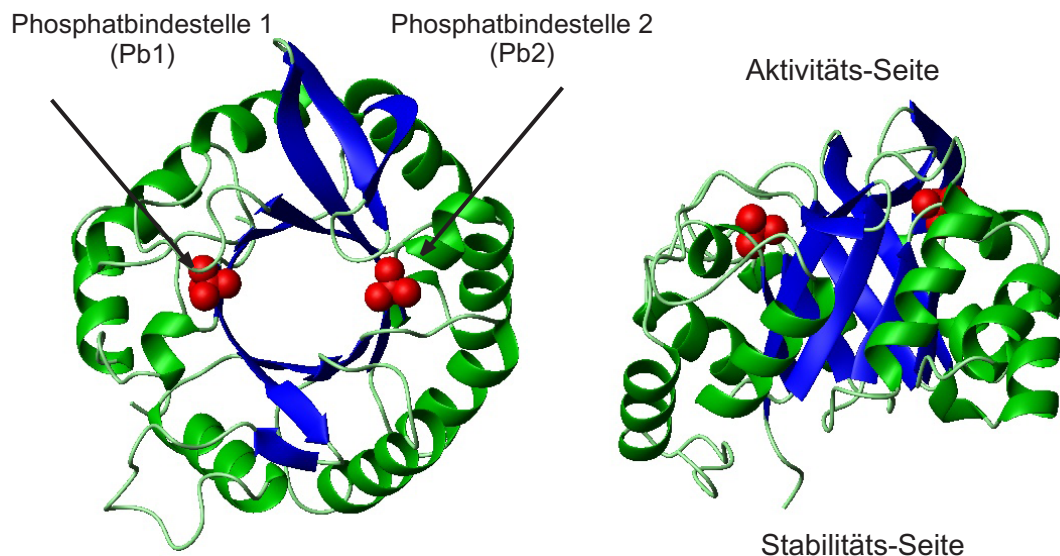


Abb. 1-3 Bänderdarstellung der Kristallstruktur (1THF; [Lang et al., 2000]) von HisF mit Blickrichtung auf das aktive Zentrum (links) und um 90° gedreht von der Seite (rechts). Das gebundene Phosphat ist rot dargestellt. Die β -Faltblätter im Inneren des $(\beta\alpha)_8$ -barrels sind blau, die α -Helices auf der Außenseite grün eingefärbt.

1.4. Säurestärken im aktiven Zentrum von HisF

Im aktiven Zentrum von HisF sind die pK_a -Werte einiger Aminosäurereste bedeutsam für die katalysierte Synthese-Reaktion. Mutationsstudien zeigen, dass die Aminosäuren Asp11 und Asp130, die an den gegenüberliegenden Enden der Substrat-Bindefurche lie-

gen, essentiell für die Funktionalität von HisF sind [Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001]. Asp11 kann durch keine andere Aminosäure ersetzt werden. Die Mutation von Asp130 zu Glutamat führt zu einer Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit. Es wird ein Säure-Base-katalysierter Mechanismus angenommen, wobei Asp11 die Rolle der Säure und Asp130, die Rolle der Base übernimmt (vgl. Abb. 1-4).

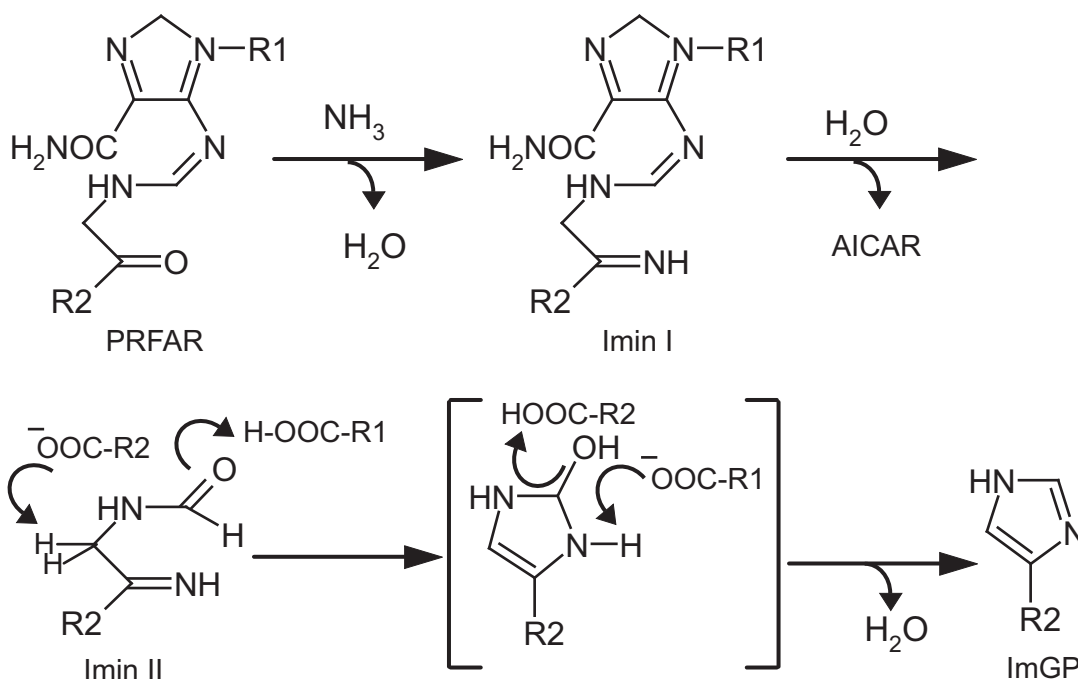


Abb. 1-4 Die Reaktion von PRFAR zu AICAR und ImGP verläuft über verschiedene Stufen, für deren Katalyse eine Aktivierung durch Säuren bzw. Basen notwendig ist. Der Rest R_1 ist wahrscheinlich mit Asp11, R_2 mit Asp130 identisch. Abb. nach Beismann-Driemeyer & Sterner [2001].

In Proteinen beträgt der durchschnittliche pK_a -Wert eines Aspartatrestes 4.0 in ungefalteten [Forsyth et al., 2002] und 3.4 ± 0.1 in gefalteten Bereichen [Clark et al., 2007]. Für Asp11 in HisF, das in einem β -Faltblatt liegt, erwartet man nun eine deutliche Verschiebung zu größeren pK_a -Werten. Dies bedeutet, dass Aspartat auch im Neutralbereich noch vorwiegend in seiner protonierten Form vorliegen würde und somit als katalytische Säure (H-A1) dient. Vorhersagen durch das Programm PROPKA [Li et al., 2005] ergeben eine Verschiebung des pK_a -Wertes von Asp11 von 3.8 auf 5.09.

1.5. Fragestellungen

Die vorliegende Arbeit dient der Beantwortung folgender Fragestellungen:

1. Dient der Kanal, welcher durch das Zentrum von HisF verläuft tatsächlich dem NH_3 -Transport? Als geeignete NMR-Sonde soll Xenon verwendet werden. Dieses Edelgas bietet den Vorteil, dass es aufgrund seiner Größe ($d=4.4 \text{ \AA}$) und seines inerten Charakters bei der Bindung einerseits größere strukturelle Veränderungen verursachen aber andererseits außerhalb der Bindestelle nur geringe Veränderungen

bewirken sollte. Lassen sich darüber hinaus weitere Belege für einen intramolekularen Transport von NH_3 finden?

2. Lässt sich die NH_3 -Produktion konstitutiv aktiver HisH-Varianten mit NMR-spektroskopischen Methoden nachweisen?
3. Kann der veränderte pK_a -Wert von Asp11 bestimmt werden?
4. Wie verändert sich HisF durch die Bindung von Liganden? Lassen sich daraus Rückschlüsse auf die Weiterleitung des Bindsignales ziehen?

2. Zuordnung

2.1. Motivation - die Bedeutung des $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC

Der Ausgangspunkt für Experimente wie Bindungsstudien, pK_a -Wert Bestimmungen oder NMR-Relaxationsmessungen ist die Zuordnung des zweidimensionalen $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrums einer ^{15}N -markierten Probe von HisF. Dieses Spektrum zeigt für jedes Proton, das an einen markierten Stickstoff gebunden ist, ein Signal. Damit ist auch jedes Amidproton des Proteinrückgrates detektierbar, d.h. man erhält pro Aminosäurerest ein Signal, das durch seine Protonen- und Stickstoffverschiebung definiert ist (vgl. Schema Abb. 2-1).

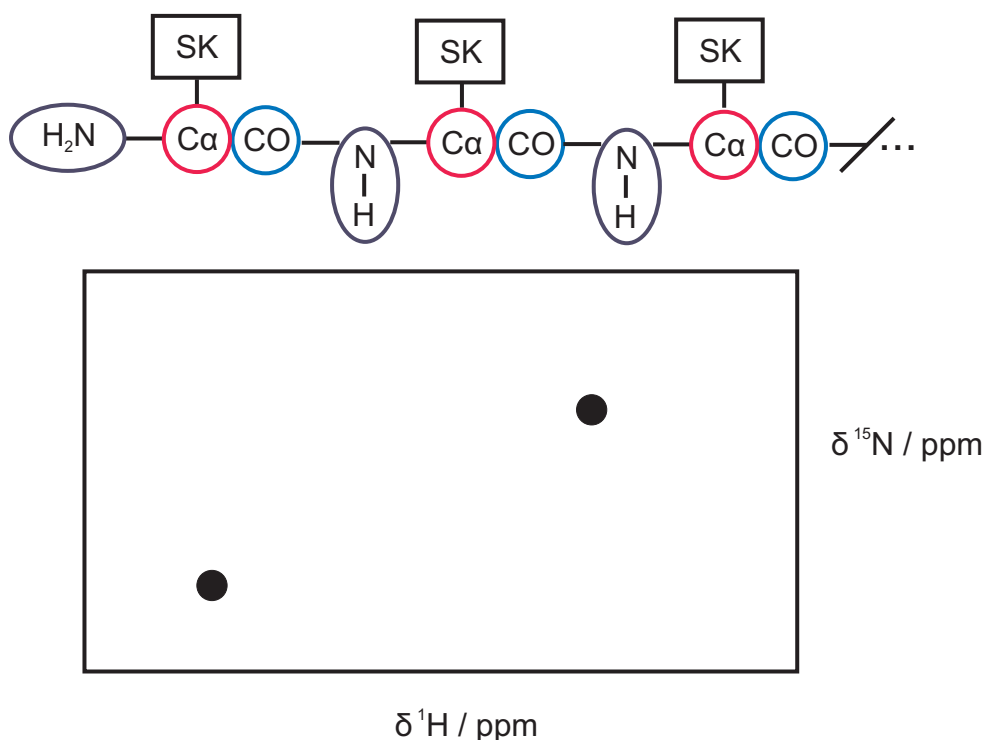


Abb. 2-1 Im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum sind nur Signale von Protonen zu sehen, die an Stickstoff gebunden sind. Im Proteinrückgrat sind solche Protonen in der Amidbindung enthalten.

Somit kann nach erfolgter Zuordnung auch die Reaktion einzelner Aminosäurereste auf die Bindung eines Liganden oder pH -Änderungen im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC verfolgt werden. Es kommt zu einer Positionsänderung der betroffenen Signale. Diese Veränderung wird meist als ein gewichteter Abstand, bezeichnet als „combined chemical shift“ $\Delta\delta_{comb}$, [Schumann et al], zwischen den Signalen angegeben.

$$\Delta\delta_{comb} = \sqrt{(w_{H_i} * \Delta\delta_H)^2 + (w_{N_i} * \Delta\delta_N)^2} \quad (2.1)$$

Hierbei sind $\Delta\delta_H$ und $\Delta\delta_N$ die Änderung der chemischen Verschiebungen in der Protonen- bzw. Stickstoffrichtung und w_{Hi} , w_{Ni} Aminosäure-spezifische Gewichtungsfaktoren. Änderungen der chemischen Verschiebung werden als Hinweis auf eine Interaktion gedeutet, wenn sie den Grenzwert $2^*\sigma_{korr}$ überschreiten. Bei σ_{korr} handelt es sich um die korrigierte Standardabweichung zu Null aller Änderungen der chemischen Verschiebung. σ_{korr} wird durch die iterative Berechnung von σ_0 gewonnen, wobei in jedem Schritt diejenigen Werte $\Delta\delta_{comb}$ ausgeschlossen werden, die $3^*\sigma_{korr}$ überschreiten.

2.2. Zuordnungsstrategie

Die Zuordnung des Rückgrates großer Proteine (≥ 10 kDa) beruht weitgehend auf dreidimensionalen Experimenten [Zuiderweg & Fesik, 1989], die in ihrer Projektion wieder zu einem $[^1H, ^{15}N]$ -HSQC-Spektrum führen. Man erhält zusätzlich zu den 1H - und ^{15}N -chemischen Verschiebungen eines Aminosäurerestes auch die Verschiebungen des zugehörigen C_α , C_β oder CO [Kay et al., 1990]. Vor Abschluss der Zuordnung ist noch nicht bekannt welches der Signale im $[^1H, ^{15}N]$ -HSQC-Spektrum zu welchem Aminosäurerest gehört. Dreidimensionale Korrelationsspektren sind so aufgebaut, dass sie diese Signale über ihre C_α -, C_β - oder CO-chemischen Verschiebungen sequentiell miteinander verknüpfen. So erhält man beispielsweise im HNCA [Kay et al., 1990] zu einem gegebenen 1H , ^{15}N -Paar, d.h. zu einem noch unbekannten Aminosäurerest, nicht nur die Information über das eigene C_α , sondern auch die chemische Verschiebung des C_α der Vorgängeraminosäure. Findet man jetzt ein anderes 1H , ^{15}N -Paar, das als eigene C_α -Verschiebung eben den gesuchten Wert der Vorgängeraminosäure besitzt, so ist der Vorgänger bestimmt (vgl. Schema Abb. 2-2).

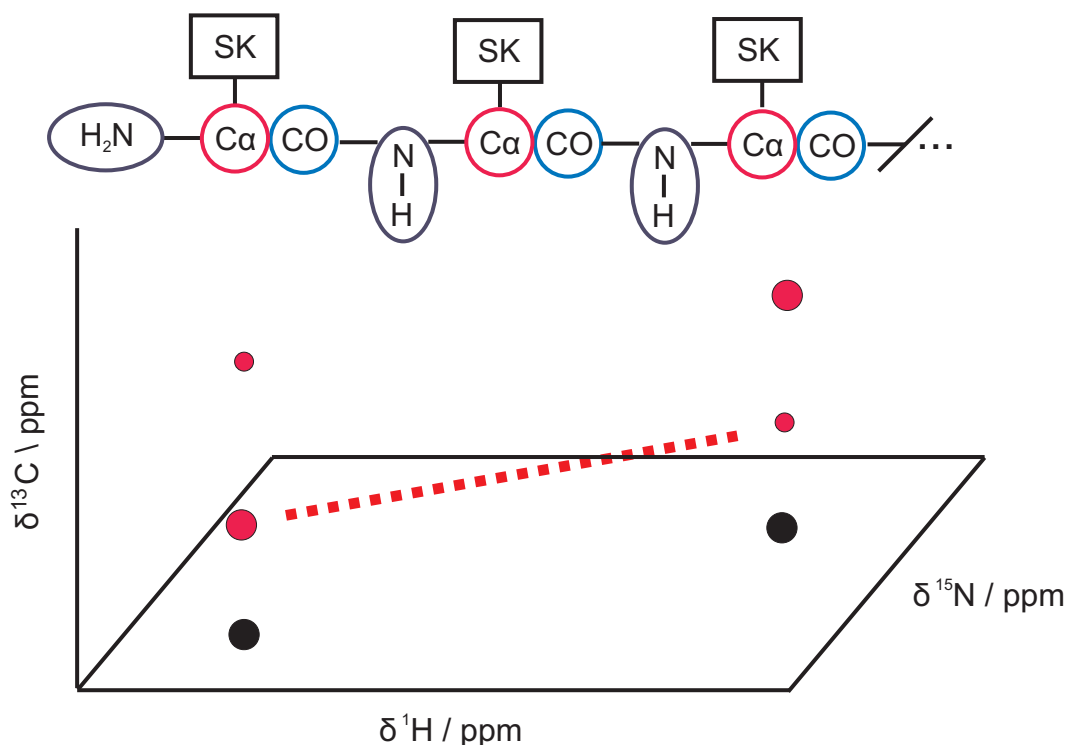


Abb. 2-2 Bei der Zuordnung mit Hilfe dreidimensionaler Spektren erhält man über jedem Signal in der $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Projektion zwei Signale: ein stärkeres für eine ^{13}C -chemische Verschiebung des eigenen Aminosäurerestes und ein schwächeres für die entsprechende Verschiebung des Vorgängers. Auf diese Weise können sequentiell benachbarte Aminosäurereste identifiziert werden.

Das CBCANH-Spektrum [Grzesiek & Bax, 1992b] liefert analoge Informationen für die C_β -chemische Verschiebung, das $\text{HN}(\text{CA})\text{CO}$ [Clubb et al., 1992] für die Carbonyl-Kohlenstoffe des Rückgrates. Diese zusätzlichen Spektren sind notwendig für Fälle in denen das HNCA mehr als einen Vorgänger zulässt, allerdings ist ihre Empfindlichkeit deutlich schlechter als im HNCA. Manche Aminosäurereste (z.B. Gly, Thr, Ala) lassen sich anhand ihrer C_α - bzw. C_β -chemischen Verschiebungen sofort eindeutig identifizieren [Wang & Jardetzky, 2002]. Findet man mehrere dieser eindeutigen Aminosäuren hintereinander (z.B. GA, TA, TT ...) kann man herausfinden, wo man sich in der Sequenz befindet. Bei großen Proteinen wie HisF ist eine Zweierkombination allerdings meist nicht ausreichend, da sie mehr als einmal vorkommen kann. Mit der zusätzlichen Verwendung deuterierten Proteins gewinnt man Empfindlichkeit und spektrale Auflösung, v.a. durch Nutzung der TROSY-Versionen der NMR-Experimente.

2.3. Auftretende Probleme bei der Zuordnung einer ^1H , ^{15}N , ^{13}C -markierten Probe von HisF

Ein erster Versuch mit einem ^{15}N und ^{13}C markierten Protein führt trotz zahlreicher Experimente (HNCA , $\text{CBCA}(\text{CO})\text{NH}$ [Grzesiek & Bax, 1992a], HNCO [Kay et al., 1990],

HN(CA)CO, CBCANH, NOESY-HSQC) nicht zum Erfolg. Daher soll auf die gezeigten Daten in diesem Abschnitt nur kurz eingegangen werden. Es werden lediglich die Ursachen für das Fehlschlagen der Zuordnung erläutert.

Eine erste Begründung dafür ist das starke Überlappen der chemischen Verschiebungen in C_α -Richtung im HNCA (vgl. Tab. 2-1). Dieses Problem ist allerdings bei der Größe des Proteins praktisch unvermeidbar.

Signale pro ^{13}C -Ebene	Anzahl d. ^{13}C -Ebenen	Anzahl Signale
1	15	15
2	11	22
3	17	51
4	4	16
5	4	20
6	5	30
7	1	7
8	2	16
9	3	27
10	0	0
11	1	11
12	0	0
13	1	13
14	0	0

Tabelle 2-1

Die Tabelle veranschaulicht den Signalüberlapp in ^{13}C -Richtung im HNCA-Spektrum. Es wird aufgeführt wie viele ^{13}C -Ebenen jeweils zwischen einem und 14 Signalen enthalten. Eindeutig ist die Zuordnung nur, wenn zwei Signale pro Ebene zu finden sind.

Es sind 247 Signale zu erwarten (253 abzüglich der fünf Proline und der N-terminalen Aminosäure). Davon liegen 191 Signale in Ebenen mit mehr als drei Signalen (vgl. Tab. 2-1 Spalte 3). Hier ist die Zuordnung anhand des HNCA nicht eindeutig und es werden zusätzliche Informationen aus anderen Spektren benötigt. Das CBCA(CO)NH-Spektrum (192 Signalpaare) liefert allerdings ausschließlich C_β -Informationen über den Vorgänger, so dass man in günstigen Fällen (Threonin, Alanin, Glycin) bestimmen kann, um welchen Aminosäuretyp es sich handelt. Manchmal kann man dann die betreffende Stelle in der Sequenz auffinden und dies zum Ausschluss mehrdeutiger Vorgänger im HNCA-Spektrum nutzen. Das CBCANH-Spektrum hat für HisF eine sehr schlechte Empfindlichkeit, so dass nur 50 C_β -Verschiebungen bestimmt werden können. Ebenso ist es beim HN(CA)CO-Spektrum. Hier ist die Anzahl der potentiellen Signale (192) zwar höher, aber nur 81 liegen als Signalpaare vor und sind daher für die sequentielle Zuordnung nutzbar. In zahlreichen Fällen lässt sich der Vorgänger auch dann nicht eindeutig identifizieren, wenn zusätzlich CO-Verschiebungen vorliegen. Der Grund hierfür ist wohl darin zu suchen, dass hier die Anzahl der Signale pro Ebene noch größer ist als im HNCA (durchschnittlich 10 statt 6 Signale pro Ebene; Daten nicht gezeigt). Hinzu kommt die große Anzahl der Stellen, an denen im Spektrum offensichtlich kein Vorgänger existiert (vgl. Tab. 2-1 Zeile 1). Man sieht, dass neben den 6 unvermeidlichen Abbrüchen durch Prolin und die erste Aminosäure, die ja keinen Vorgänger besitzt, 9 weitere zu verzeichnen sind. Es fehlen außerdem Signale von Aminosäuren, wie allein schon an der zu geringen Anzahl der eindeutig identifizierbaren Alanin(-2), Glycin (-4) und Threonin-Reste(-2) feststellbar ist. Das Vorgehen nach dem Ausschlussprinzip kann also auch zu Fehlentscheidungen führen,

wenn man einen Kettenabbruch in einer Ebene mit mehreren Vorgängern übergeht. Kurz zusammengefasst scheitert die Zuordnung aus zwei Gründen. 1) Die Signale vieler Aminosäuren sind nicht detektierbar. 2) Alle Spektren, die zusätzlich zum HNCA-Spektrum sequentielle Information liefern könnten besitzen eine zu geringe Empfindlichkeit, was auf die Größe des Proteins zurückzuführen ist (vgl. [Sattler et al., 1999]).

2.4. Zuordnung einer ¹⁵N,¹³C markierten und perdeuterierten Probe von HisF

2.4.1. Zuordnung des [¹H,¹⁵N]-HSQC-Spektrums in 50 mM Phosphatpuffer

Durch Verwendung einer dreifach markierten (¹⁵N,¹³C,²H) Probe kann man mit einer Kombination aus zwei Experimenten (HNCA, HNCACB [Wittekind & Mueller, 1993]) den Großteil der Signale eindeutig zugeordnen (vgl. Tab. 2-3, vgl. Tab. 2-2).

Position	Aminosäure
1-20	M L F K R I A C L D V K D G R V V K G
21-40	I N F E N L R D S G D P V E L G K F Y S
41-60	E I G I D E L V F L D I T A S V E K R R K
61-80	T M L E L V E K V A E Q I D I P F T V C
81-100	G G I H D F E T A S E L I L R G A D K V
101-120	S I N T A A V E N P S L I T Q I A Q T F
121-140	G S Q A V V V A I D A K R V D G E F M V
141-160	F T Y S G K K N I G I L L R D W V V E V
161-180	E K R G A G E I L L T S I D R D G T K S
181-200	G Y D T E M I R F V R P L T T L P I I A
201-220	S G G A G K M E H F L E A F L A G A D A
221-240	A L A A S V E H F R E I D V R E L K E Y
241-253	L K K H C V N V R L E G L

Tabelle 2-2
Zuordnung des Proteinrückgrates von HisF. Zugeordnete Signale im [¹H,¹⁵N]-HSQC-Spektrum von HisF sind blau, nicht zugeordnete rot gezeigt. Proline besitzen kein Amidproton und werden nicht eingefärbt. Bedingungen: 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer, *pH*=7.5, *T*=298K.

Beispielhaft ist ein Ausschnitt aus dem HNCA gezeigt (vgl. Abb. 2-3)

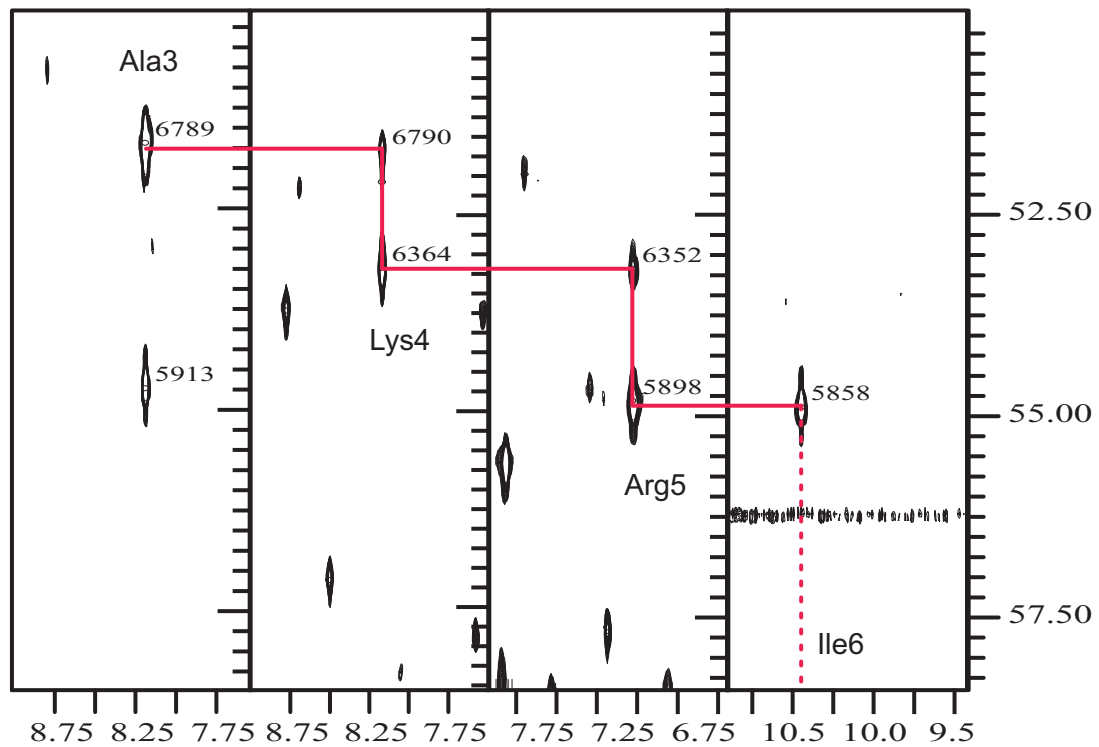


Abb. 2-3 Typisches Vorgehen bei der Zuordnung als Ausschnitt aus dem HNCA. Bedingungen: 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer, 600 MHz $pH=7.2$, $T=298\text{ K}$.

Auf eine Darstellung des **HNCACB** wird verzichtet. Das Spektrum ist zwar auswertbar, zeigte aber starke Artefakte in ^{13}C -Richtung.

Abb. 2-4 zeigt ein zugeordnetes $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von HisF. Eine Tabelle mit den chemischen Verschiebungen der Zuordnung sowie die unter den verschiedenen Bedingungen zugeordneten $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren befinden sich im Anhang.

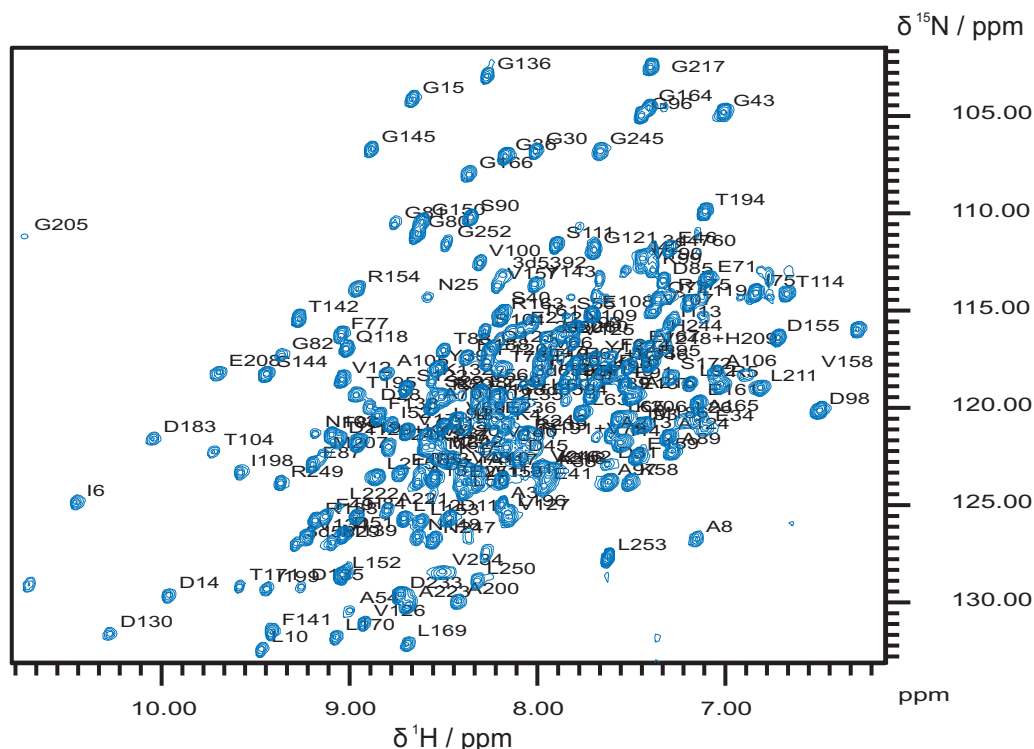


Abb. 2-4 Zugeordnetes ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum von HisF. Bedingungen: 600 MHz; 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer $pH=7.2$; $T=298$ K.

Interessanterweise kommt eine kürzlich publizierte Zuordnung der Signale [Lipchock & Loria, 2008], die unter anderen experimentellen Bedingungen erstellt wurde, dagegen zu einer fast vollständigen Zuordnung des Proteinrückgrates (vgl. Tab. 2-3).

2.4.2. Zuordnung in 50 mM Tricin

HisF besitzt zwei Phosphatbindestellen. Daher besteht die Vermutung, dass die Messung in Phosphatpuffer möglicherweise das Ergebnis der Zuordnung beeinflussen könnte. Aus diesem Grund wird der 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer gegen einen 50 mM Tricin-Puffer ausgetauscht. Die Zuordnung erfolgt mit Hilfe eines **HNCA** und den bekannten Daten von Lipchock & Loria [2008]. Unter diesen Bedingungen können weitaus mehr Signale zugeordnet werden als in Phosphatpuffer (vgl. Tab. 2-3).

Die Bedingungen, unter denen die jeweiligen Zuordnungen gewonnen werden, ebenso wie die Anzahl der nicht zugeordneten Signale im ^1H , ^{15}N -HSQC finden sich in (Tab. 2-3). Für eine genauere Gegenüberstellung der einzelnen Zuordnungen wird auf den Anhang verwiesen. Ebenso finden sich dort die beiden zugeordneten ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren in Phosphatpuffer und in Tricin.

Probe	Fehlend	$c(\text{HisF})$	T / K	pH	Puffer
P	39 (15.4 %)	0.9 mM	298	7.5	50 mM KP, 10% D_2O
P	39 (15.4 %)	0.9 mM	298	7.2	50 mM KP, 10% D_2O
T	16 (6.3 %)	0.9 mM	298	7.4	50 mM Tricin, 10 % D_2O
L	14 (5.5 %)	0.3-0.5 mM	303	6.8	10 mM MES, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 % D_2O

Tabelle 2-3

Vergleich der Bedingungen zwischen den beiden selbst erstellten Zuordnungen in 50 mM Kalium-Phosphat (P) und 50 mM Tricin (T), sowie der von Lipchock & Loria [2008] (L). Fehlende Signale sind diejenigen, die im $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC nicht auftauchen. Dabei sind die generell nicht detektierbaren 5 Proline und die erste, N-terminale Aminosäure mit eingerechnet.

2.5. Vergleich der Zuordnungen: die Rolle von Phosphat

Die fehlenden Signale aus der Zuordnung des $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC gehören zum großen Teil zu einer zusammenhängenden Region auf der Oberfläche von HisF und gruppieren sich um die erste Phosphatbindestelle (vgl. Abb. 2-5). Die „durchgehende“ Zuordnung der Signale ist dadurch an vier Stellen unterbrochen. Es ist darauf hinzuweisen, dass in der Kristallstruktur [Lang et al., 2000] gebundenes Phosphat nachgewiesen wurde und die Bindestellen daher bekannt sind.

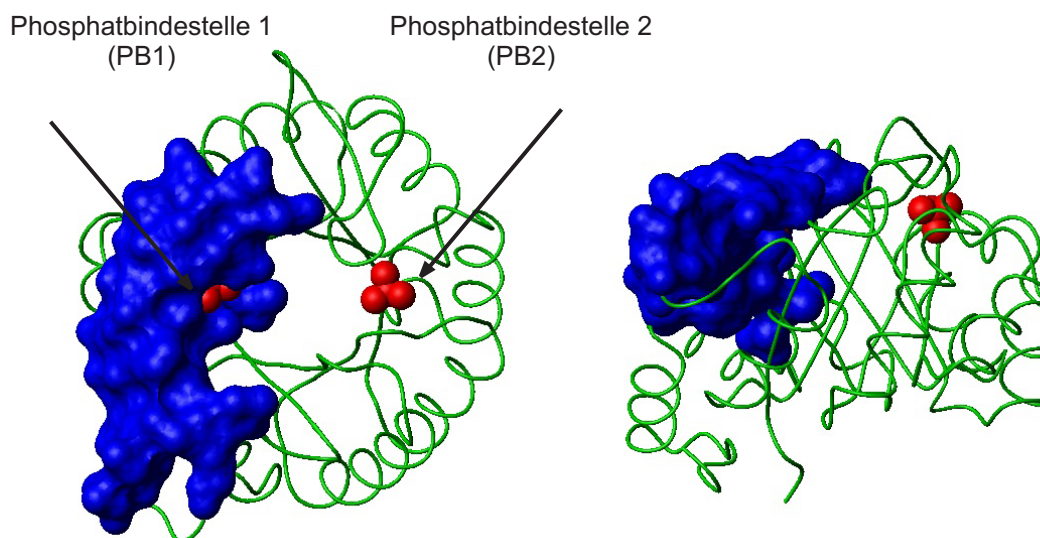


Abb. 2-5 Positionen von Aminosäuren, deren Signal im $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum in Kalium-Phosphatpuffer nicht detektierbar sind, dargestellt in der Kristallstruktur (1THF [Lang et al., 2000]). In Phosphatpuffer sind 39 Signale nicht detektierbar. Davon gruppieren sich 29 um die erste Phosphatbindestelle (Folgende Aminosäurereste sind betroffen: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 202, 203, 204, 205, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232). Die Grafik zeigt die zugehörigen Aminosäuren blau und die Phosphate selbst in rot. Bedingungen der Zuordnung: 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer; $pH=7.5$; $T=298$ K.

Beim Vergleich der Zuordnung in Phosphatpuffer und der von Lipchock & Loria [2008] pu-

blizierten Zuordnung anhand der zugehörigen $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren zeigen sich ebenfalls auffällig viele Unterschiede, welche als „combined chemical shift“ sichtbar gemacht werden können in der Region um die Phosphatbindestellen (vgl. Abb. 2-7 und Tab. 2-5).

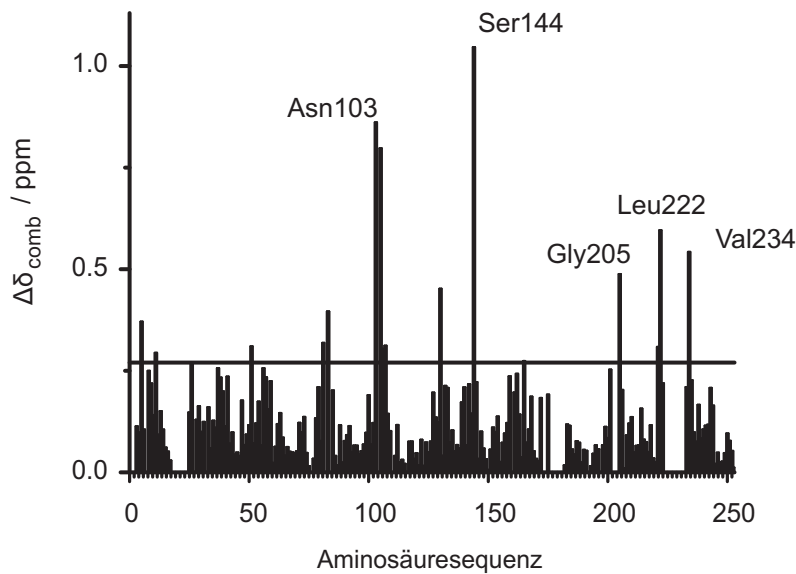


Abb. 2-6 Vergleich der chemischen Verschiebungen des $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrums aus der Zuordnung von Lipchock & Loria [2008] und der Zuordnung in Phosphatpuffer (diese Arbeit). Die Unterschiede sind als „combined chemical shift“ ($\Delta\delta_{comb}$) dargestellt. Bedingungen: Lipchock & Loria [2008] : 0.3-0.5 mM ^{15}N , ^{13}C perdeuteriertes HisF; 303 K ; $pH=6.8$; 10 mM MES 50 mM KCl; diese Arbeit: 600 MHz; 0.9 mM ^{15}N , ^{13}C perdeuteriertes HisF; 298 K; $pH=7.2$; 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer.

Von der ersten Phosphatbindestelle aus breiten sich die Veränderungen darüber hinaus bis zur gegenüberliegenden Stabilitätsseite von HisF aus. In der Kontaktfläche zu HisH sind die Änderungen der chemischen Verschiebung bei Arg5 sichtbar, das einen Teil des Salzbrückenclusters von HisF bildet.

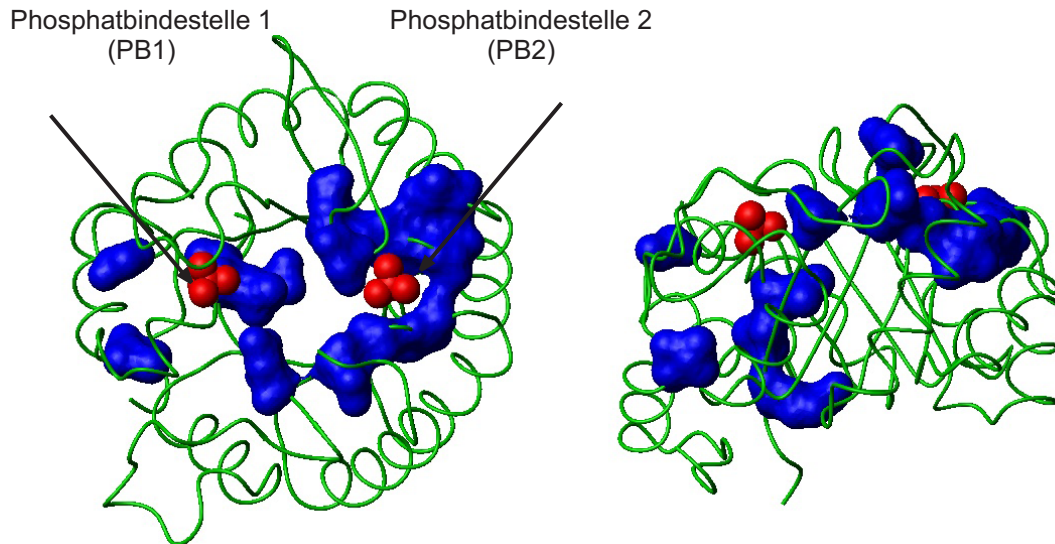


Abb. 2-7 Vergleich der chemischen Verschiebungen des $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrums aus der Zuordnung von Lipchock & Loria [2008] und der Zuordnung in Phosphatpuffer (diese Arbeit) anhand der „combined chemical shift“ ($\Delta\delta_{\text{comb}}$). In der Kristallstruktur (1THF: [Lang et al., 2000]) sind Aminosäurereste, deren Signale eine Änderung von $\Delta\delta_{\text{comb}}$ größer $2^*\sigma_{\text{corr}}$ erfahren blau dargestellt. Bedingungen: Lipchock & Loria [2008] : 0.3-0.5 mM ^{15}N , ^{13}C perdeutiertes HisF; 303 K ; $pH=6.8$; 10 mM MES 50 mM KCl; diese Arbeit: 600 MHz; 0.9 mM ^{15}N , ^{13}C perdeutiertes HisF; 298 K; $pH=7.2$; 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer.

Für die Zuordnung des Spektrums in 50 mM Tricin wird der Phosphatpuffer im Konzentrator schrittweise ausgetauscht. Dabei wird wiederholt aufkonzentriert und das Volumen anschließend mit Phosphat-freiem Tricin-Puffer ersetzt. Der Vergleich dieser Zuordnung mit der von Loria et al publizierten zeigt jedoch, dass Phosphat durch den Austausch im Konzentrator nicht vollständig entfernt worden ist, da weiterhin auffällige Unterschiede in der Region um die Phosphatbindestellen sichtbar sind (vgl. Abb. 2-8 und Tab. 2-5).

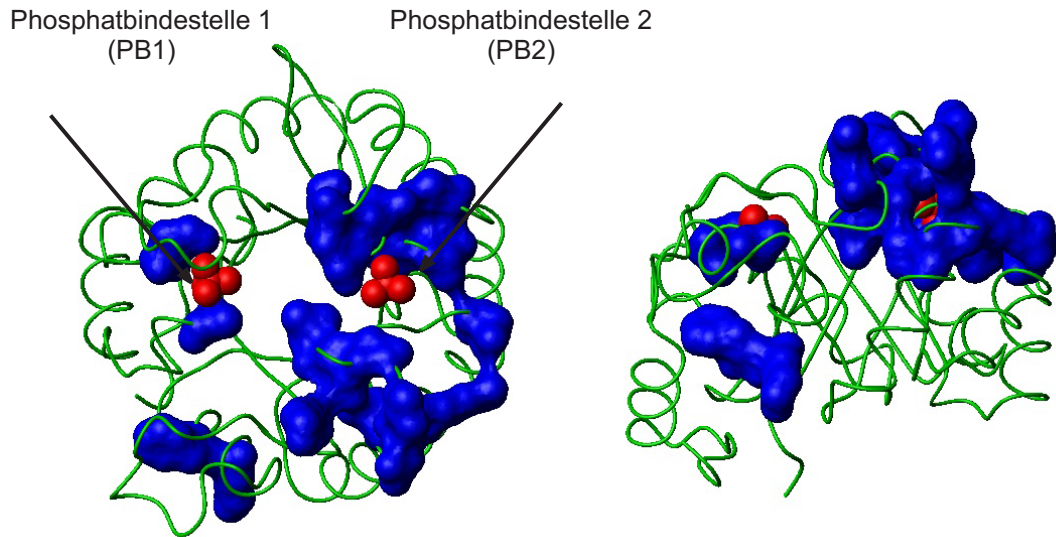


Abb. 2-8 Vergleich der chemischen Verschiebungen des $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrums aus der Zuordnung von Lipchock & Loria [2008] und der Zuordnung in Tricin (diese Arbeit) anhand der „combined chemical shift“ ($\Delta\delta_{\text{comb}}$). In der Kristallstruktur (1THF: [Lang et al., 2000]) sind Aminosäurereste, deren Signale eine Änderung von $\Delta\delta_{\text{comb}}$ größer $2 \cdot \sigma_{\text{corr}}$ erfahren blau dargestellt. Bedingungen: Lipchock & Loria [2008] : 0.3-0.5 mM ^{15}N , ^{13}C perdeutrieres HisF; 303 K ; $pH=6.8$; 10 mM MES 50 mM KCl; diese Arbeit: 600 MHz; 0.9 mM ^{15}N , ^{13}C perdeutrieres HisF; 298 K; $pH=7.4$; 50 mM Tricin.

Im Gegensatz dazu zeigt die Zuordnung in Tricin im Vergleich mit der in Phosphatpuffer die meisten Unterschiede an Phosphatbindestelle 1, was darauf hindeutet, dass diese Bindestelle das Phosphat schwächer bindet und daher bei einem Austausch auch schneller wieder abgibt (vgl. Abb. 2-9 und Tab. 2-5).

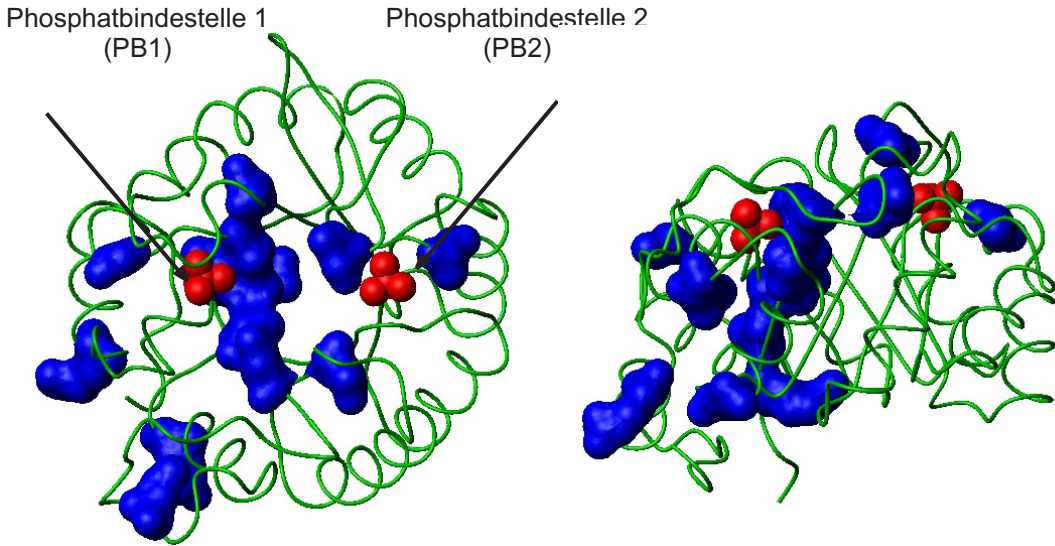


Abb. 2-9 Vergleich der chemischen Verschiebungen des $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrums aus der Zuordnung in Tricin und in Phosphatpuffer (beide diese Arbeit) anhand der „combined chemical shift“ ($\Delta\delta_{\text{comb}}$). In der Kristallstruktur (1THF: [Lang et al., 2000]) sind Aminosäurereste, deren Signale eine Änderung von $\Delta\delta_{\text{comb}}$ größer $2 \cdot \sigma_{\text{corr}}$ erfahren blau dargestellt. Bedingungen: Phosphatpuffer : 600 MHz; 0.9 mM $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ perdeuteriertes HisF; 298 K; $pH=7.2$; 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer Tricin: 600 MHz; 0.9 mM $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ perdeuteriertes HisF; 298 K; $pH=7.4$; 50 mM Tricin.

Spektren von HisF, das nie mit Phosphat in Berührung gekommen ist, zeigen immer noch Unterschiede zu der Zuordnung von Lipchock & Loria [2008] (vgl. Abb. 2-10 und Tab. 2-5), allerdings sind diese nicht mehr auf die Phosphatbindestellen beschränkt und das Ausmaß der Veränderungen im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum ist deutlich geringer als in Phosphatpuffer (vgl. Tab. 2-4).

Tabelle 2-4

Abweichungen der $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren der verschiedenen Zuordnungen von Loria et al (L), in 50 mM Phosphatpuffer(P), in 50 mM Tricin (T) und phosphatfrei in 50 mM TRIS/HCl (PF) voneinander. Die Unterschiede werden als „combined chemical shift“ berechnet. Die genauen experimentellen Bedingungen der einzelnen Zuordnungen finden sich in Tab. 2-3.

Zuordnung	$2 \cdot \sigma_{\text{corr}}$ / ppm	Mittelwert / ppm	σ / ppm
P-T	0.2	0.08	0.08
L-P	0.27	0.13	0.13
L-T	0.15	0.07	0.09
L-PF	0.1	0.05	0.04

Die Unterschiede sind wahrscheinlich in den experimentellen Rahmenbedingen, Tempera-

tur, Puffer und pH zu suchen (vgl. Tab. 2-3).

Die Zuordnung der Spektren in Tris/HCl erfolgt durch die Kombination von Daten der Tricin-Zuordnung mit der Zuordnung von Lipchock & Loria [2008]. Aufgrund von überlappenden Signalen und nicht eindeutiger Zuordnung können hier nur 209 der insgesamt zu erwartenden 247 Signale (253 Aminosäuren, 5 Proline und n-terminale Aminosäure nicht detektierbar) aufgefunden werden. Ein auf diese Weise zugeordnetes $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC findet sich im Anhang.

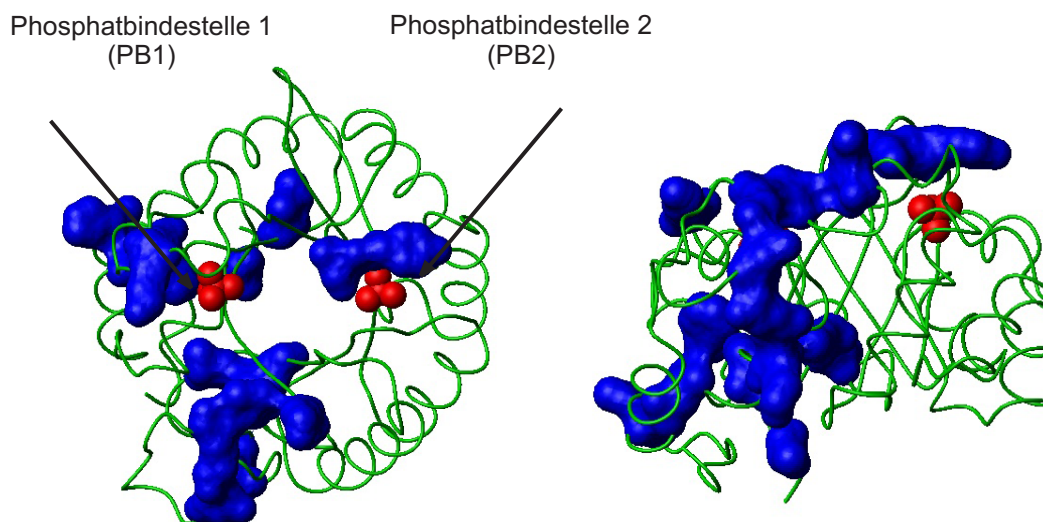


Abb. 2-10 Vergleich der chemischen Verschiebungen des $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrums aus der Zuordnung von Lipchock & Loria [2008] und eines Spektrums in Tris/HCl (diese Arbeit) anhand der „combined chemical shift“ ($\Delta\delta_{comb}$). In der Kristallstruktur (1THF: [Lang et al., 2000]) sind Aminosäurereste, deren Signale eine Änderung von $\Delta\delta_{comb}$ größer $2 \cdot \sigma_{corr}$ erfahren blau dargestellt. Bedingungen: Lipchock & Loria [2008] : 0.3-0.5 mM ^{15}N , ^{13}C perdeutiertes HisF; 303 K ; $pH=6.8$; 10 mM MES 50 mM KCl; diese Arbeit: 800 MHz; 1 mM ^{15}N -HisF; 298 K; $pH=7.5$; 50 mM Tris/HCl.

L-P		L-Tric		L-Tris		P-Tric	
$2^*\sigma_{corr}$	0.27	$2^*\sigma_{corr}$	0.15	$2^*\sigma_{corr}$	0.1	$2^*\sigma_{corr}$	0.2
Amino-säurerest	$\Delta\delta_{comb}$ / ppm	Amino-säurerest	$\Delta\delta_{comb}$ / ppm	Amino-säurerest	$\Delta\delta_{comb}$ / ppm	Amino-säurerest	$\Delta\delta_{comb}$ / ppm
144	1.05	144	0.78	3	0.37	222	0.55
103	0.86	103	0.72	37	0.29	205	0.39
105	0.8	105	0.55	47	0.2	11	0.36
222	0.6	38	0.39	244	0.18	26	0.32
234	0.54	37	0.33	241	0.15	221	0.28
205	0.49	130	0.27	179	0.13	144	0.28
130	0.45	56	0.24	44	0.13	5	0.27
83	0.4	224	0.24	198	0.13	201	0.26
5	0.37	106	0.23	144	0.12	105	0.26
81	0.32	57	0.22	18	0.12	41	0.25
107	0.31	59	0.21	34	0.12	235	0.24
51	0.31	204	0.21	143	0.12	9	0.24
221	0.31	50	0.2	19	0.11	172	0.23
106	0.3	107	0.2	13	0.11	51	0.21
11	0.29	145	0.19	28	0.11	-	-
-	-	85	0.19	-	-	-	-
-	-	62	0.18	-	-	-	-
-	-	203	0.17	-	-	-	-
-	-	142	0.16	-	-	-	-
-	-	51	0.16	-	-	-	-
-	-	13	0.16	-	-	-	-
-	-	54	0.16	-	-	-	-

Tabelle 2-5

Unterschiede in den [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$]-HSQC-Spektren von HisF berechnet als „combined chemical shift“ unter verschiedenen Bedingungen. Tric: 600 MHz; 0.9 mM $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ perdeuteriertes HisF; 298 K; $pH=7.4$; 50 mM Tricin Tris: 800 MHz; 1 mM ^{15}N -HisF; 298 K; $pH=7.5$; 50 mM Tris/HCl L [Lipchock & Loria, 2008]; 0.3-0.5 mM $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ perdeuteriertes HisF; 303 K ; $pH=6.8$; 10 mM MES 50 mM KCl; P: 600 MHz; 0.9 mM $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ perdeuteriertes HisF; 298 K; $pH=7.2$; 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer.

2.6. Zusammenfassung

Es konnte eine Zuordnung von HisF in Phosphatpuffer erstellt werden. In dieser Zuordnung fehlen 29 Signale, die sich in unmittelbarer Nähe der Phosphatbindestelle 1 befinden. Beim Vergleich mit der Zuordnung in phosphatfreiem Puffer finden sich Veränderungen der chemischen Verschiebung die auf der Seite der Phosphatbindestelle 1 auch den Stabilitätspol von HisF erreichen. Die Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit erstellten Zuordnungen und der Zuordnung von Lipchock & Loria [2008] sind hauptsächlich der An- bzw. Abwesenheit von Phosphat und in geringerem Maße den anderen experimentellen Bedingungen (Temperatur, Puffer, pH) zuzuschreiben. Beim Vergleich mit der von Lipchock & Loria [2008] erstellten Zuordnung werden abgesehen von den ge-

nannten Veränderungen keine Unterschiede festgestellt, die auf Fehler bei der Zuordnung hindeuten. Durch die Auswertung der $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren in Anwesenheit und Abwesenheit von Phosphationen ist deutlich geworden, dass die Bindung von Phosphat zu strukturellen Veränderungen an HisF führt. Doch während bei der Untersuchung mit Hilfe der Röntgenkristallographie Phosphationen in einem Beispiel [Douangamath et al., 2002] eher einen strukturierenden Einfluss zu haben schienen, deutet die fehlende Detektierbarkeit zahlreicher Signale in den NMR-Spektren auf eine Zunahme der Beweglichkeit in den betroffenen Bereichen hin. In zahlreichen Kristallstrukturen von HisF sind die Phosphatbindestellen besetzt. Die Liganden sind dabei entweder Phosphat selbst [Lang et al., 2000; Banfield et al., 2001; Douangamath et al., 2002], Sulfat [Chaudhuri et al., 2001, 2003] oder PRFAR [Chaudhuri et al., 2003]. Bei der von Omi et al. [2002] gelösten Struktur ist zwar kein Phosphat detektierbar, allerdings wurde bei der Herstellung der Kristalle ein phosphathaltiger Puffer verwendet. Phosphat ist nicht in der Lage eine Aktivierung von HisH zu bewirken. Es ist dennoch vorstellbar, dass durch die Besetzung der Phosphatbindestellen schon ein Teil der konformationellen Änderungen ausgelöst wird, die HisH aktivieren. Dies würde die Identifizierung des Bindsignales erschweren. Auf jeden Fall ist jedoch davon auszugehen, dass die Kristallstruktur einen Zustand zeigt, der sich von der freien Form von HisF unterscheidet. Allerdings lässt sich nach den bisherigen Untersuchungen nicht sagen, wie groß dieser Unterschied tatsächlich ist.

3. Bindung von Liganden an HisF und Aktivierung von HisH

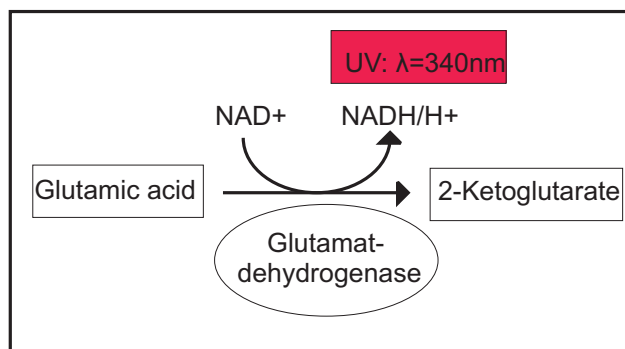
3.1. Aktivierung von HisH durch NAD^+ -gebundenes HisF

3.1.1. Motivation - direkter Nachweis der NH_3 -Freisetzung für konstitutiv aktive Varianten von HisH

HisH kann nur in Gegenwart von ligandgebundenem HisF Glutamin zu Glutamat und NH_3 spalten. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass der Ammoniak nur produziert wird, wenn er auch zur Bildung von ImGP benötigt wird. Einige HisH-Varianten sind jedoch auch in Gegenwart von ungebundenem HisF aktiv. Die NMR-spektroskopische Bestimmung der NH_3 -Produktion bietet einen einfachen und direkten Nachweis für die Aktivität dieser Varianten ohne die Notwendigkeit der Zugabe weiterer Substanzen.

3.1.2. Messung der glutaminabhängigen Reaktion in Gegenwart eines Liganden

Nur in Gegenwart von HisF nebst daran gebundenem Liganden zeigt wildtypisches HisH eine Glutaminaseaktivität. Das entstehende Glutamat wird traditionell indirekt über eine gekoppelte Reaktion durch die Produktion von NADH detektiert, das bei 340 nm UV-spektroskopisch bestimmt wird (vgl. Abb. 3-1)[Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001]. Auf diesem Wege wird die NH_3 -Konzentration indirekt bestimmt.

**Abb. 3-1**

Schema der photometrischen Bestimmung der Glutaminasereaktion. Die enzymatische Bestimmung der Glutaminhydrolyse durch HisH/HisF erfolgt als gekoppelte Reaktion. Die Produktion von Reduktionsäquivalenten bei der Oxidation von Glutamat zu α -Ketoglutarat kann bei 340 nm UV-spektroskopisch verfolgt werden.

3.1.3. Quantitative Bestimmung der NH₃-Bildung durch ¹⁴N-Spektroskopie

Bei der Detektion der Glutaminhydrolyse mit Hilfe der ¹⁴N-NMR-Spektroskopie kann die Ammoniak-Freisetzung, im Gegensatz zur geschilderten photometrischen Methode, ohne Zusatz weiterer Substanzen direkt verfolgt werden. ¹⁴N besitzt einen Spin $I = 1$ und somit ein Kernquadrupolmoment sowie eine natürliche Häufigkeit von 99.6 %. Elektrische Feldgradienten in der Umgebung von ¹⁴N bewirken allerdings Kopplungskonstanten C_Q von mehreren MHz und damit eine besonders effektive Relaxation. Das führt in asymmetrischen Umgebungen zu breiten Linien von ¹⁴N [Galanter & Labotka, 1991], wie es bereits am Beispiel eines kleinen Moleküles wie Glutamin gut zu erkennen ist. Symmetrische Moleküle wie NH₃/NH₄⁺ zeigen dagegen schmale, gut detektierbare Linien [Lundberg et al., 1989; Seo & Murakami, 1991] (vgl. Tab. 3-1, Abb. 3-2).

	Amid-Funktion d. Gln	Amino-Funktion d. Gln	NH ₃ /NH ₄ ⁺
Linienbreite [Hz]	~350	~140	2.6

Tabelle 3-1

Linienbreite von ¹⁴N in verschiedenen molekularen Umgebungen. Während in der symmetrischen Umgebung von NH₃/NH₄⁺ die Linienbreite gering ist, hat der in Glutamin gebundene Stickstoff Linienbreiten von mehreren hundert Hz.

Diese vorteilhafte Eigenschaft wurde unter anderem bereits zur Vermessung der NH₃-Diffusion durch die Erythrozytenmembran mit ¹⁴N-NMR-Spektroskopie [Labotka et al., 1995] ausgenutzt. Aufgrund des Gleichgewichtes zwischen NH₃ und NH₄⁺ in wässriger Lösung



erzeugen beide Moleküle - NH₃ und NH₄⁺ ein gemeinsames schmales Signal.

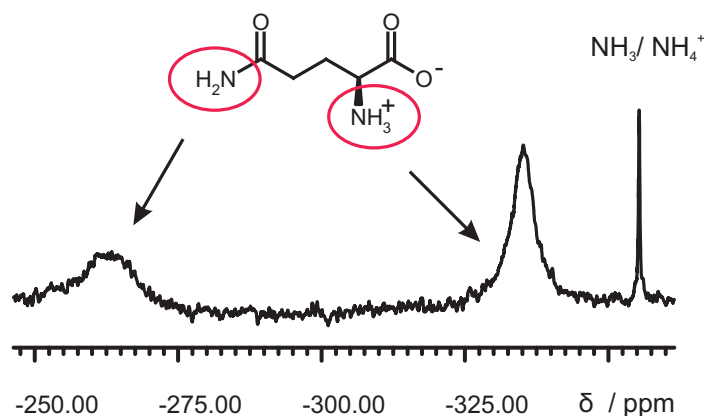


Abb. 3-2

Das ¹⁴N-Spektrum zeigt die Signale für das Amid und die Amino-Funktion des Glutamins sowie das schmale Signal des freigesetzten NH₃/ NH₄⁺. Probenzusammensetzung: 50 mM Tricin/KOH; pH=8; c₀(Gln)=0.1M; T=298 K; 50 μM WT-HisF/Y138A-HisH; t=114 min; LB=8 Hz .

Das NH₃/ NH₄⁺-Signal wird durch eine Kalibrierung mit Hilfe von Vergleichslösungen bekannten Gehaltes quantifiziert.

3.1.4. Aktivierung von HisH-WT und HisH-Y138A durch NAD⁺

Wildtypisches HisH zeigt auch in Gegenwart von HisF nur eine NH₃-Freisetzung, welche der nichtenzymatischen Hydrolyse einer reinen Glutaminlösung entspricht (vgl. Abb. 3-3).

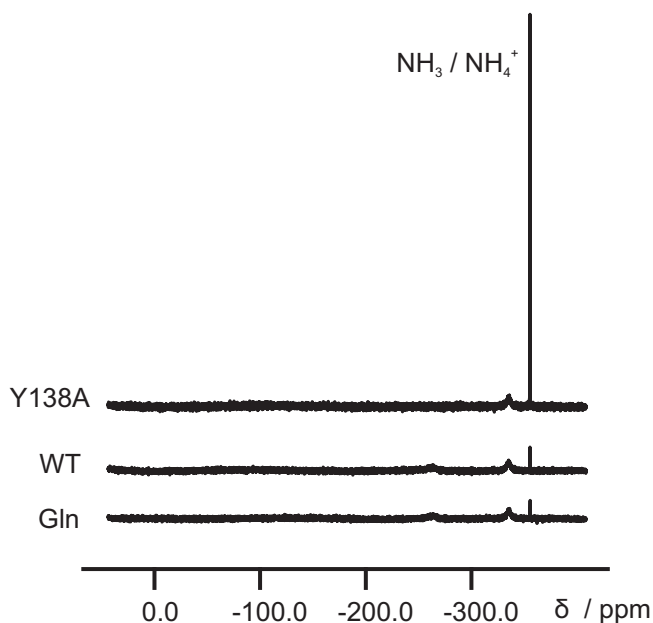
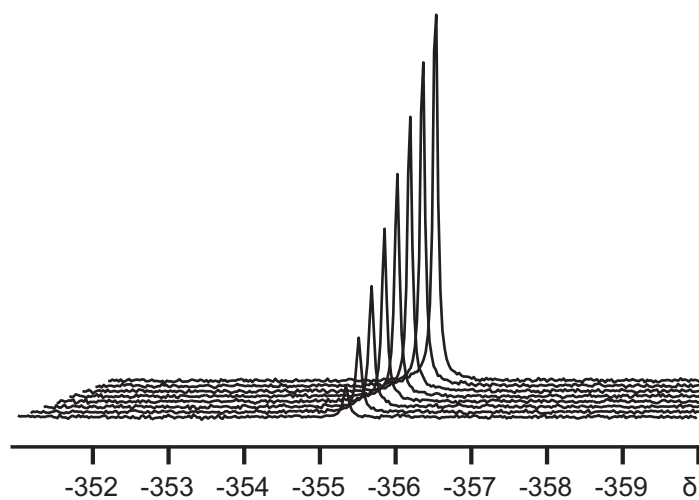


Abb. 3-3

Endpunkt der NH₃-Freisetzung durch Glutamin-Hydrolyse im ¹⁴N-Spektrum für HisH-Y138A/HisF, WT-HisH/HisF und reines Glutamin. Probenzusammensetzung: 50 mM Tricin/KOH; pH=8; c₀(Gln)=0.1M; T=298 K; a) 50 μM WT-HisF/Y138A-HisH b) 50 μM WT-HisF/WT-HisH c) Nullprobe .

Dagegen kann HisH-Y138A in Gegenwart von HisF ohne gebundenen Liganden die Glutaminasereaktion durchführen (vgl. Abb. 3-3 und Abb. 3-4).

**Abb. 3-4**

Das zunehmende $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Signal im ^{14}N -NMR-Spektrum zeigt die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat. Probenzusammensetzung: 50 mM Tricin/KOH; $pH=8$; $c_0(\text{Gln})=0.1\text{M}$; $T=298\text{ K}$; $50\text{ }\mu\text{M}$ WT-HisF/Y138A-HisH.

Die mit Hilfe der gekoppelten Reaktion photometrisch bestimmten Reaktionsgeschwindigkeiten sind deutlich größer als die mit Hilfe der NMR gefundenen. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Verfahren besteht darin, dass dem enzymatischen Assay NAD^+ und GDH zugesetzt werden. Durch Zugabe von NAD^+ zu den Probelösungen für die NMR-spektroskopische Bestimmung wird deshalb auf einen möglichen aktivierenden Effekt durch NAD^+ getestet. Tatsächlich ist zu beobachten, dass NAD^+ in der Lage ist, sowohl die Hydrolyse durch wildtypisches HisH als auch durch HisH-Y138A zu beschleunigen (vgl. Abb. 3-5 und Tab. 3-2).

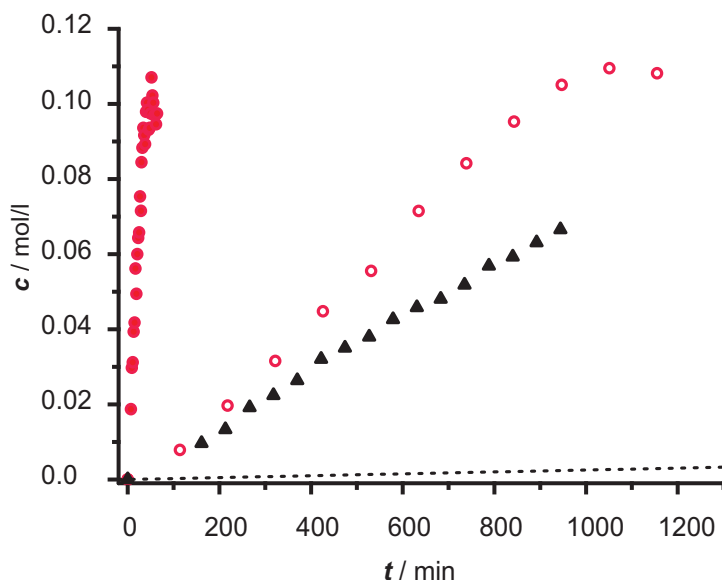


Abb. 3-5 NH_3 -Produktion aus der Hydrolyse von Glutamin durch Y138A-HisH/HisF detektiert im ^{14}N -NMR-Spektrum (rote Kreise: gefüllt: $+10\text{ mM NAD}^+$; leer: ohne NAD^+ -Zusatz) und HisH-WT/HisF $+10\text{ mM NAD}^+$ (schwarze Dreiecke) bzw. ohne NAD^+ -Zusatz (gestrichelt). Probenzusammensetzung: 50 mM Tricin/KOH; $pH=8$; $c_0(\text{Gln})=0.1\text{M}$; $T=298\text{ K}$; + rote gefüllte Kreise: $50\text{ }\mu\text{M}$ WT-HisF/Y138A-HisH $+10\text{ mM NAD}^+$ rote leere Kreise: $50\text{ }\mu\text{M}$ WT-HisF/Y138A-HisH schwarze Dreiecke: $50\text{ }\mu\text{M}$ WT-HisF/WT-HisH.

	HisH-WT	WT+NAD ⁺	HisH-Y138A	Y138A+NAD ⁺
Hydrolyserate / min ⁻¹	0.006	1.43 ± 0.02	2.33 ± 0.05	46.96 ± 0.03

Tabelle 3-2

Hydrolyseraten von HisH-Wildtyp und HisH-Y138A mit und ohne Zusatz von 10 mM NAD⁺. Beide reagieren mit einer deutlichen Steigerung der Glutamin-Hydrolyse auf die Gegenwart von NAD⁺.

NAD⁺ war zuvor nicht als aktivierender Ligand bekannt. Im Vergleich zu ImGP, PRFAR und ProFAR ist die Aktivierung allerdings wesentlich geringer. Wie eingangs erklärt (vgl. Abb. 3-1), wird für die photometrische Bestimmung der NH₃-Produktion NAD⁺ benötigt. Um trotzdem die korrekte Reaktionsgeschwindigkeit messen zu können, darf sich NAD⁺ nicht in Lösung mit HisH/HisF und Glutamin befinden. Daher müssen HisH und HisF durch einen Ultrafiltrationsschritt aus dem Ansatz entfernt werden bevor NAD⁺ und Glutamatdehydrogenase zugegeben werden (diskontinuierlicher Assay [List, 2010]). Die Aktivierung ist im typischen Konzentrationsbereich für die Bedingungen des enzymatischen Assays linear (vgl. Abb. 3-6 und Tab. 3-3).

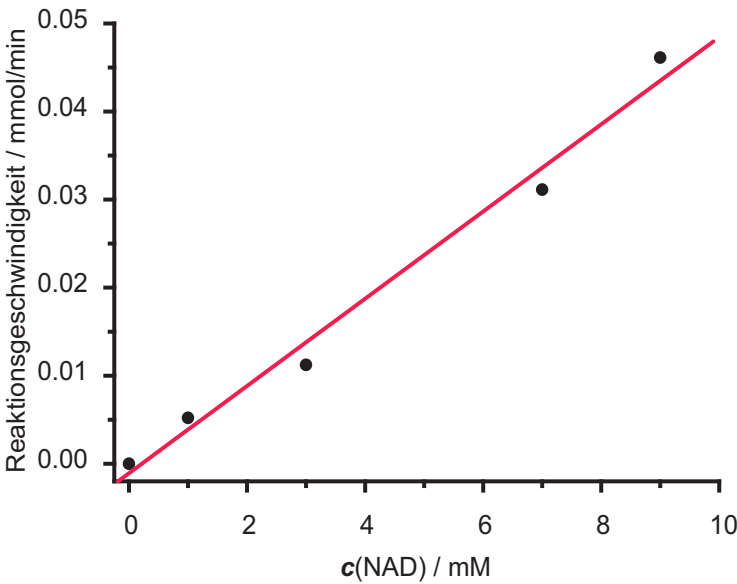


Abb. 3-6

Im ¹⁴N-NMR-Spektrum mit steigender NAD⁺-Konzentration bestimmte Hydrolyseraten. Die Abhängigkeit der Hydrolyserate von HisH-WT/HisF von der NAD⁺-Konzentration lässt sich im beobachteten Konzentrationsbereich mit einer Geraden beschreiben (vgl. Tab. 3-3) Bedingungen: 50 mM Tricin/KOH; pH=8; c₀(Gln)=0.1M; T=298 K; 68 μM / 45 μM WT-HisF/WT-HisH .

	Achsenabschnitt / μMol*min ⁻¹	Steigung / μMol*(min*mM) ⁻¹
Wert	1.07 ± 0.353	4.95 ± 1.87

Tabelle 3-3

Parameter des linearen Modelles der Glutaminhydrolyse in Abhängigkeit von der NAD⁺-Konzentration gemessen in mM.

3.2. Der Nachweis der Rückreaktion für die Spaltung von Glutamin

3.2.1. Die „Lochhypothese“ des Aktivierungsmechanismus von HisH

Die Aktivierung der Glutaminaseaktivität von wildtypischem HisH erfolgt erst durch Kontakt mit der HisF-Untereinheit, die ihrerseits einen Liganden gebunden haben muss. Durch Mutationen an der Kontaktfläche zwischen HisH und HisF können HisH-Varianten erzeugt werden, die konstitutiv, d.h. ohne einen an HisF gebundenen Liganden aktiv sind (z.B. Y138A, K181A [List, 2010]). Eine mögliche Erklärung für die Aktivierung, die beide Mutationen auf einen gemeinsamen Mechanismus zurückführt, ist die Vorstellung, dass der gebildete Ammoniak den Tunnel zwischen den beiden aktiven Zentren beim Wildtyp nur verlassen kann, wenn ein Ligand an HisF bindet [List, 2010; Miles et al., 1998]. Da der Ammoniak ansonsten in einem kleinen Volumen gefangen bleibt, was einer hohen Konzentration entspricht, wird dadurch nach dem Massenwirkungsgesetz die Rückreaktion, also die Bildung von Glutamin, begünstigt (vgl. Abb. 3-7).

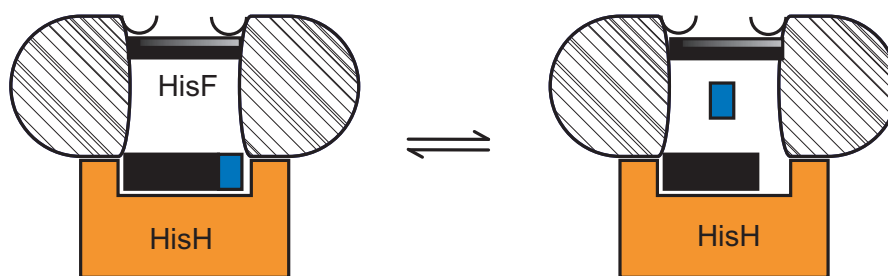
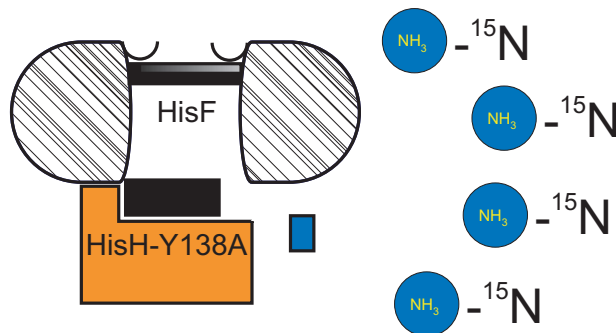


Abb. 3-7 Hypothese für die Inaktivität von HisH in Abwesenheit eines Liganden [List, 2010; Miles et al., 1998]. Der bei der Spaltung von Glutamin entstehende Ammoniak (blau) bleibt in dem Tunnel zwischen den beiden aktiven Zentren gefangen. Dadurch wird die Rückreaktion zu Glutamin begünstigt.

Die Mutationen führen dazu, dass ein Loch in der Kontaktfläche zwischen den beiden Enzymen entsteht, wodurch der Ammoniak in die umgebende Lösung diffundieren kann und somit aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Das Gleichgewicht liegt nun auf der Seite des thermodynamisch stabileren Glutamats und die Reaktion läuft vollständig ab.

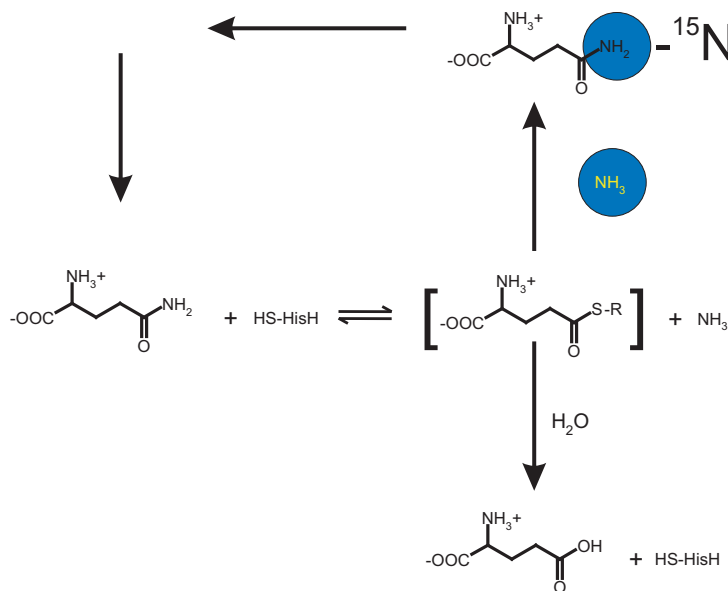
3.2.2. Modell für die Rückreaktion

Mit Hilfe von ^{15}N -markiertem NH_3 , zugeführt als Ammoniumchlorid im Überschuss, kann man überprüfen ob eine solche Rückreaktion tatsächlich stattfindet [Li et al., 2007]. Man setzt unmarkiertes Glutamin ein und überwacht die Entstehung von ^{15}N -markiertem Glutamin. Auch wenn die Reaktion letztendlich vollständig bis zum Glutamat und NH_3 verläuft, sollte sich intermediär markiertes Glutamin bilden, welches sich NMR-spektroskopisch mit Hilfe eines eindimensionalen $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrums sehr gut detektieren lässt (vgl. Abb. 3-8).

**Abb. 3-8**

Schema für das Experiment zur Überprüfung der Rückreaktion. Bei den „Lochvarianten“ kann unmarkiertes NH_3 (blaues Rechteck) das aktive Zentrum verlassen und durch ^{15}N -markierten Ammoniak (blaue Kreise), der im Überschuss vorliegt, ersetzt werden. Findet die Rückreaktion statt, kann sie über die Bildung ^{15}N -markierten Glutamins detektiert werden.

Auf der mechanistischen Ebene bedeutet dies in einem einfachen Modell, dass der entstehende Thioester-Übergangszustand [Miles et al., 1998] in einigen Fällen nicht mit Wasser zu Glutamat gespalten wird, sondern mit ^{15}N - NH_3 zu ^{15}N -Glutamin, was der Rückreaktion entspricht (vgl. Abb. 3-9). In beiden Fällen wird die reaktive Thiolgruppe von HisH (HS-HisH) regeneriert. Die Reaktion kommt allerdings erst dann zum Stillstand, wenn Glutamin vollständig zum thermodynamisch stabileren Glutamat umgesetzt ist.

**Abb. 3-9**

Schema des Reaktionsmechanismus der Rückreaktion. Der intermediär gebildete Thioester kann entweder mit Wasser zu Glutamat gespalten werden, oder mit NH_3 zu Glutamin zurückreagieren. Ist der Ammoniak ^{15}N -markiert, entsteht ^{15}N -markiertes Glutamin.

Der Konzentrationsverlauf von ^{15}N -markiertem Glutamin lässt sich mit folgender Gleichung beschreiben (vgl. auch Methoden Seite 91)

$$c(\text{Gln}_{15}) = c_0 * k * r * t * e^{(-k*t)} \quad (3.2)$$

wobei c_0 die Anfangskonzentration von unmarkiertem Glutamin, k die Geschwindigkeitskonstante für den Glutaminabbau und r die Häufigkeit angibt, mit der der Zwischenzu-

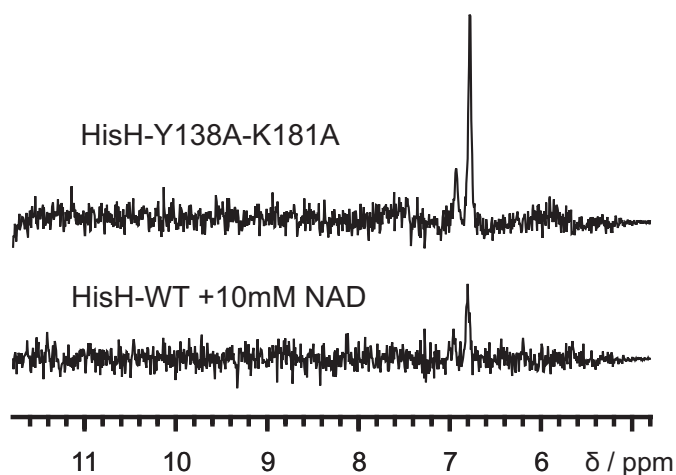
stand durch NH_3 statt durch H_2O gespalten wird. Man sieht, dass bei kurzen Zeiten t der lineare Teil der Gleichung dominiert, während für lange Zeiten, die Exponentialfunktion den Verlauf bestimmt. Zu Beginn entsteht somit markiertes Glutamin, während am Endpunkt stets Glutamin vollständig zu Glutamat umgesetzt ist. Die Gleichung gilt unter folgenden, vereinfachenden Annahmen.

1. Die Geschwindigkeitskonstante für den Glutaminabbau ist für unmarkiertes und markiertes Glutamin gleich.
2. Die Menge an markiertem NH_3 bleibt konstant und damit auch die Häufigkeit r der Rückreaktion.

Da das nachfolgende Experiment ohne einen ^{15}N -Glutaminstandard und Quantifizierung des Glutaminabbaus durchgeführt wird, vereinfacht sich die Gleichung zu: $c(\text{Gln}_{15}) = A * t * e^{-k*t}$.

3.2.3. Nachweis intermediär entstehenden markierten Glutamins

Die beiden untersuchten Proben enthalten 500 mM ^{15}N -Ammoniumchlorid, 100 mM Glutamin bei $pH=8.5$, sowie entweder HisH-WT/HisF-WT+10mM NAD^+ , oder die „Doppel-Loch-Mutante“ HisH-Y138A-K181A/HisF-WT. Die Bildung ^{15}N -markierten Glutamins zeigt sich im Auftreten eines Signals im eindimensionalen TROSY $-[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC bei 6.8 ppm. Man sieht in beiden Proben, dass intermediär markiertes Glutamin entsteht (vgl Abb. 3-10). Etwa 90 Hz in Richtung Tieffeld verschoben tritt ein zweites wesentlich schwächeres Signal auf. Dies entspricht der Kopplungskonstante zwischen ^1H und ^{15}N in Amiden. Somit ist das zweite kleinere Signal vermutlich auf eine unvollständige TROSY-Filterung zurückzuführen. Im 1D- ^1H -Spektrum ist zu erkennen, dass das zu erwartende zweite Amidsignal bei 7.6 ppm aufgrund des pH -Wertes von 8.5 stark verbreitert ist (Daten nicht gezeigt). Daher ist es im TROSY $-[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC nicht detektierbar.

**Abb. 3-10**

Eindimensionale Version eines TROSY- $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrums zur Detektion intermediär entstehenden ^{15}N -Glutamins. Sowohl mit HisH-WT (unten) als auch mit der Y138A-K181A-HisH (oben) wird ein Amidproton des entstehenden ^{15}N -Glutamins detektiert. Bedingungen: 50 mM Tris/KOH; $p\text{H}=8.5$; $c_0(\text{Gln})=0.1$ M; 500 mM $^{15}\text{N}\text{-NH}_4\text{Cl}$; $T=298$ K; WT-HisH-HisF je 50 μM + 10 mM NAD^+ ; 3.1/6.2 μM Y138A-K181A-HisH/HisF.

Die Rückreaktion läuft also sowohl für NAD^+ -aktivierten Wildtyp als auch bei HisH-Y138A-K181A ab. Allerdings sind die Reaktionsgeschwindigkeiten in beiden Fällen deutlich geringer als erwartet. Bei HisH-Y138A-K181A soll die Reaktion nach vier Stunden abgeschlossen sein, allerdings muss der Versuch nach 74 Stunden aus Zeitmangel nach immer noch unvollständiger Umsetzung abgebrochen werden. Die bis dahin gesammelten Daten lassen sich allerdings mit der oben hergeleiteten Gleichung beschreiben. Bei HisH-Wildtyp + NAD^+ ist die Reaktion so langsam, dass nicht genügend Datenpunkte aufgenommen werden können, um das beschriebene Modell anzuwenden.

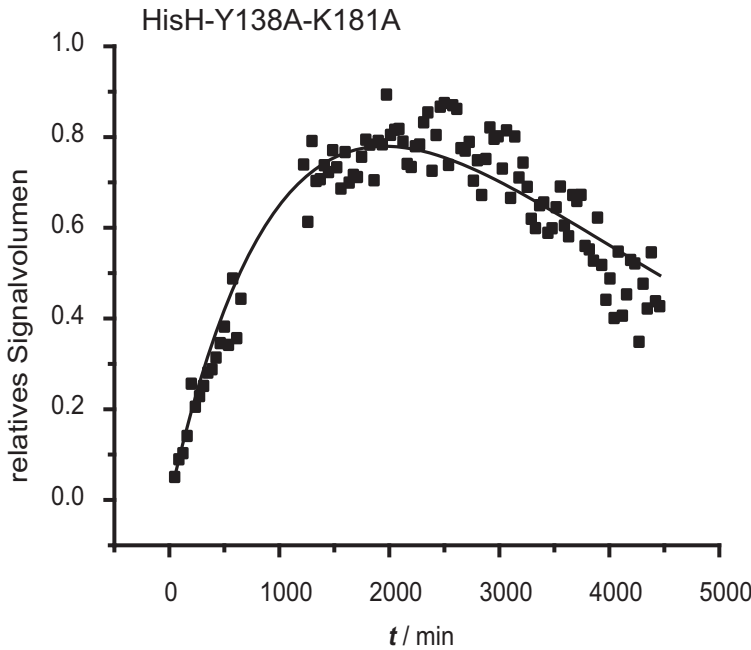


Abb. 3-11
Verlauf der ^{15}N -Glutaminkonzentration detektiert im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum. Die intermediäre Entstehung markierten Glutamins lässt sich für HisH-Y138A-K181A mit obiger Gleichung beschreiben. Bedingungen: 50 mM Tris/KOH; $\text{pH}=8.5$; $c_0(\text{Gln})=0.1\text{ M}$; 500 mM $^{15}\text{N}\text{-NH}_4\text{Cl}$; $T=298\text{ K}$; 3.1/6.2 μM Y138A-K181A-HisH/HisF.

A / relative Intensität	k /min ⁻¹
2.12 ± 0.02	5.1*10 ⁻⁴ ± 0.1*10 ⁻⁴

Tabelle 3-4
Parameter des vereinfachten Modells $c(\text{Gln}_{15}) = A * t * e^{-k * t}$. Aufgrund der fehlenden Quantifizierung kann **A** nur als relative Intensität bestimmt werden.

3.2.4. Diskussion

Die durchgeführten Experimente mit $^{15}\text{N}\text{-NH}_4\text{Cl}$ lassen folgende Schlüsse zu.

- Im Vergleich zum HisH-WT zeigt Y138A-K181A-HisH einen deutlich höheren Einbau von $^{15}\text{N}\text{-NH}_3$ in Glutamin. Dies kann auf der einen Seite bedeuten, dass die Glutamin-Hydrolyse häufiger abläuft, d.h. auch der Thioester-Zwischenzustand bildet sich öfter. Auf der anderen Seite könnte es auch bedeuten, dass die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Moleküle aus der Lösung aufgrund der veränderten Kontaktfläche größer ist. Somit wäre auch die Diffusion von NH_3 aus dem aktiven Zentrum heraus erhöht. Eine zusätzliche Information ließe sich aus dem Parameter r für die Häufigkeit der Spaltung durch NH_3 gewinnen. Je größer r , desto größer die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für NH_3 . Allerdings setzen alle diese Überlegungen voraus, dass H_2O bzw. NH_3 nicht schon von Anfang an am aktiven Zentrum vorliegt. In diesem Fall bedeutet ein erhöhter Wert von r lediglich, dass das aktive Zentrum NH_3 häufiger als „Substrat“ anstelle von H_2O akzeptiert. Ein zusätzliches experimentelles Problem ergibt sich daraus, dass ein Vergleichswert r

für den Wildtyp bestimmt werden muss. HisH-WT besitzt aber praktisch keinen Umsatz.

- Die Rückreaktion findet statt. Im Vergleich zu den NH_3 -Konzentrationen im Inneren des Proteins ist der NH_3 -Überschuss von 0.5 M in den durchgeführten Experimenten moderat. Tatsächlich befindet sich ein NH_3 -Molekül ($1/6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}$) in einem Volumen das maximal der Größe des zentralen Kanals in HisF (etwa 10^{-25} L) entspricht, was eine Konzentration von mehr als 16 M ergibt. Unter diesen Bedingungen sollte also die Rückreaktion ebenfalls stattfinden, wenn NH_3 nicht abtransportiert wird.

Der Grund für den extrem langsamen Verlauf der Reaktion ist wahrscheinlich darin zu suchen, dass Chlorid-Ionen in höheren Konzentrationen die HisH-Reaktion hemmen [Klem & Davisson, 1993; Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001]. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass höhere NH_3 -Konzentrationen einen ähnlichen Effekt hervorrufen könnten.

3.3. Modelle der Ligandbindung - Austauschprozesse

Wenn NMR-aktive Kerne zwischen unterschiedlichen chemischen Umgebungen wechseln können, spricht man von chemischem Austausch. Im Falle eines Proteins können unterschiedliche chemische Umgebungen zum Beispiel durch Konformationsänderungen oder die Anlagerung eines Liganden entstehen. Man unterscheidet drei Fälle: langsamen, schnellen und mittleren Austausch [Bain, 2003].

- Bei langsamem Austausch ist der Wechsel zwischen den Zuständen langsam auf der NMR-Zeitskala, d.h. die Anzahl der Übergänge pro Zeiteinheit ist klein gegenüber dem Unterschied in der Resonanzfrequenz der beiden Zustände: man sieht für die beiden Zustände zwei getrennte Signale.
- Bei schnellem Austausch ist der Wechsel zwischen den Zuständen schnell auf der NMR-Zeitskala, d.h. die Anzahl der Übergänge pro Zeiteinheit ist groß gegenüber dem Unterschied der Resonanzfrequenzen der beiden Zustände: man sieht für beide Zustände ein einziges Signal, das dem gewichteten Mittel zwischen den Resonanzfrequenzen der beiden Zustände entspricht.
- Bei mittlerem Austausch ist die Anzahl der Übergänge pro Zeiteinheit ähnlich der Differenz zwischen den beiden Resonanzfrequenzen: es kommt zu einer starken Linienverbreiterung und das Signal ist unter Umständen im Spektrum nicht mehr nachweisbar.

Mit der Entdeckung der aktivierenden Wirkung von NAD^+ steht ein weiterer Ligand für HisF neben den bereits bekannten ImGP und ProFAR zur Verfügung.

Die Wechselzahl k_{cat} , die unter ImGP bzw. ProFAR-Aktivierung in Sättigung erreicht wird beträgt 6 min^{-1} [Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001]. Geht man nun davon aus,

dass dieser Wert auch für NAD^+ in der Sättigung gilt und nimmt man zusätzlich stark vereinfachend einen linearen Anstieg der Wechselzahl von HisF bis zur Sättigung mit NAD^+ an, so kann man aus der $k_{cat}=1.43 \text{ min}^{-1}$ bei 10 mM NAD^+ abschätzen, dass die Sättigung bei $\gg 42 \text{ mM}$ erreicht ist. Damit gilt: $K_{act} \gg 20 \text{ mM}$.

	$k_{cat} / \text{min}^{-1}$	$K_{act} / \mu\text{M}$
ImGP ^a	6	1500
ProFAR ^a	6	23
PRFAR ^a	24	-
NAD^+ ^b	-	$\gg 20000$

Tabelle 3-5

Stärke der Aktivierung durch NAD^+ im Vergleich zu ImGP und ProFAR. Die Wechselzahl k_{cat} in Sättigung und K_{act} die Effekorkonzentration bei halbmaximalem k_{cat} sind angeben. a: [Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001], b: Schätzung aus den Daten dieser Arbeit, vgl. Text.

Somit besteht die Möglichkeit, drei Effektoren mit unterschiedlich starker aktivierender Wirkung miteinander zu vergleichen (vgl. Tab. 3-5). Auf diese Weise kann weiter eingegrenzt werden, welche der auftretenden strukturellen Veränderungen für die Weiterleitung des Bindesignales an HisF essentiell sind.

3.3.1. Bindung von NAD^+ an HisF

Die ^{14}N -NMR-Experimente zeigen die aktivierende Wirkung von NAD^+ eindeutig. Bindet NAD^+ an HisF, so äußert sich das auch in Änderungen der chemischen Verschiebungen seiner Amid-Protonen. Mit Hilfe eines $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrums lässt sich also herausfinden an welcher Stelle des Proteins NAD^+ bindet und in welchen Regionen durch die Bindung größere Veränderungen ausgelöst werden. Aufgrund der schlechten Bindefähigkeit müssen allerdings so große Mengen zugegeben werden, dass die Aromaten-Protonen von NAD^+ als „ T_1 -Noise“ im TROSY- $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC auftauchen. Im eindimensionalen ^1H -Spektrum ist deutlich zu erkennen, dass die Signale des NAD^+ mit ihrer geringen Liniengbreite um ein Vielfaches intensiver als die des Proteins sind. Obwohl NAD^+ nicht ^{15}N -markiert ist, bleiben daher Reste dieser Signale im Spektrum zurück. Bei 45 mM NAD^+ sind diese Artefakte beträchtlich, weshalb von einer Zugabe noch größerer Mengen abgesehen wird. Es muss berücksichtigt werden, dass mit Sicherheit noch keine Sättigung des Enzymes mit Ligand erreicht wird, obwohl das Verhältnis von Protein zu Ligand ca. 1:45 beträgt. Aus den ^{14}N -NMR Experimenten wird jedoch deutlich, dass selbst bei einem Verhältnis von 1:200 (50 μM Enzym, 10 mM NAD^+) noch keine Sättigung erreicht ist. Die durch die Bindung verursachten Änderungen der chemischen Verschiebungen treten vor allem in der Umgebung der Phosphatbindestelle 2 gehäuft auf und erreichen auch nur

auf dieser Hälfte des Enzyms die Kontaktfläche zu HisH (vgl. Abb. 3-12).

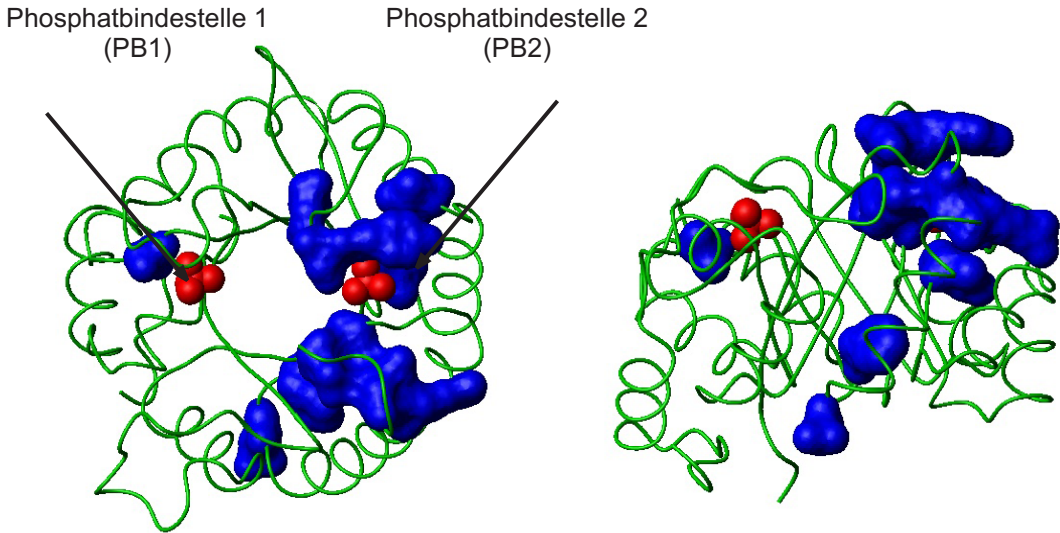


Abb. 3-12 Veranschaulichung der NAD^+ -Bindung anhand der Kristallstruktur von HisF. Aminosäurereste deren Signale im $[\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC Spektrum von starken Änderungen der chemischen Verschiebung durch die NAD^+ -Bindung betroffen sind (berechnet als „combined chemical shift“) werden in der Kristallstruktur (1THF: [Lang et al., 2000]) blau dargestellt. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $\text{pH}=7.5$; $T=298$ K; 1.1 mM ^{15}N -HisF; 45 mM NAD^+ .

σ_{corr}		0.08	
Amino- säurerest	$\Delta\delta_{\text{comb}}$ / ppm	Amino- säurerest	$\Delta\delta_{\text{comb}}$ / ppm
144	0.38	51	0.10
130	0.22	74	0.09
81	0.18	204	0.09
143	0.15	77	0.09
59	0.12	102	0.09
107	0.12	58	0.09

Tabelle 3-6
Änderung der chemischen Verschiebung im $[\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum berechnet als „combined chemical shift“ bei Zugabe von 45 mM NAD^+ .

3.4. Aktivierung von HisH durch ImGP-gebundenes HisF

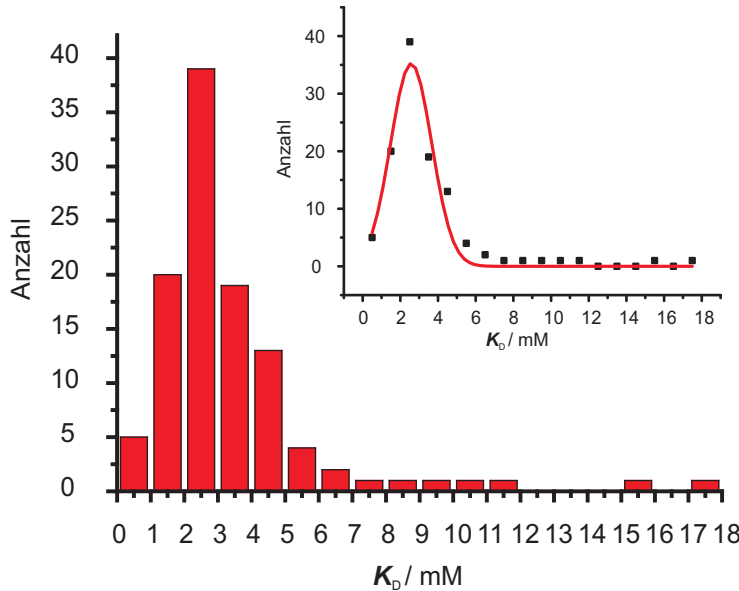
3.4.1. Ergebnisse der NMR-Relaxationsexperimente von Loria et al.

Wie in der Einleitung erläutert, haben Lipchock & Loria [2008] eine Zunahme dynamischer Veränderungen im ms-Bereich festgestellt, die sich von der Ligandbindefurche bis zur Kontaktfläche mit HisH erstrecken.

3.4.2. Zustände im schnellen Austausch bei der Bindung von ImGP

Das Titrationsexperiment mit ImGP wird wiederholt, um die Änderungen in der chemischen Verschiebung auszuwerten. Die bereits gemachten Beobachtungen können bestätigt

werden [Lipchock & Loria, 2009]. Änderungen der chemischen Verschiebung, die laut Loria auf den schnellen Austausch zwischen der ligandgebundenen und der freien Form von HisF zurückzuführen sind, erfassen das gesamte Protein. Die Daten lassen sich mit Hilfe eines einfachen „Zwei-Zustands-Modelles“ beschreiben. Die daraus errechneten apparenten K_D -Werte zeigen eine Häufung bei 2.6 ± 0.1 mM berechnet als Gauss-Verteilung (vgl. Abb. 3-13 und Tab. 3-7).

**Abb. 3-13**

Verteilung der K_D -Werte für die Titration von HisF mit ImGP. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298$ K; 0.8 mM ^{15}N -HisF.

Mittelwert / mM	Standardabweichung / mM
2.6 ± 0.1	0.93 ± 0.01

Tabelle 3-7

Beschreibung der Verteilung der K_D -Werte mit Hilfe einer Gauss-Verteilung.

3.4.3. Zustände im mittleren Austausch bei der Bindung von ImGP

Wie schon durch Lipchock & Loria [2009] festgestellt, erfassen dynamische Veränderungen das gesamte Protein. Da mit zunehmender ImGP-Konzentration mehr und mehr Signale durch Verbreiterung nicht mehr detektierbar sind (vgl. Abb. 3-14 und Abb. 3-15), sind die Informationen über die Änderung der chemischen Verschiebung unvollständig. Die nicht mehr detektierbaren Signale liefern in diesem Fall mehr Informationen über die Ausbreitung des Bindesignals durch das Protein.

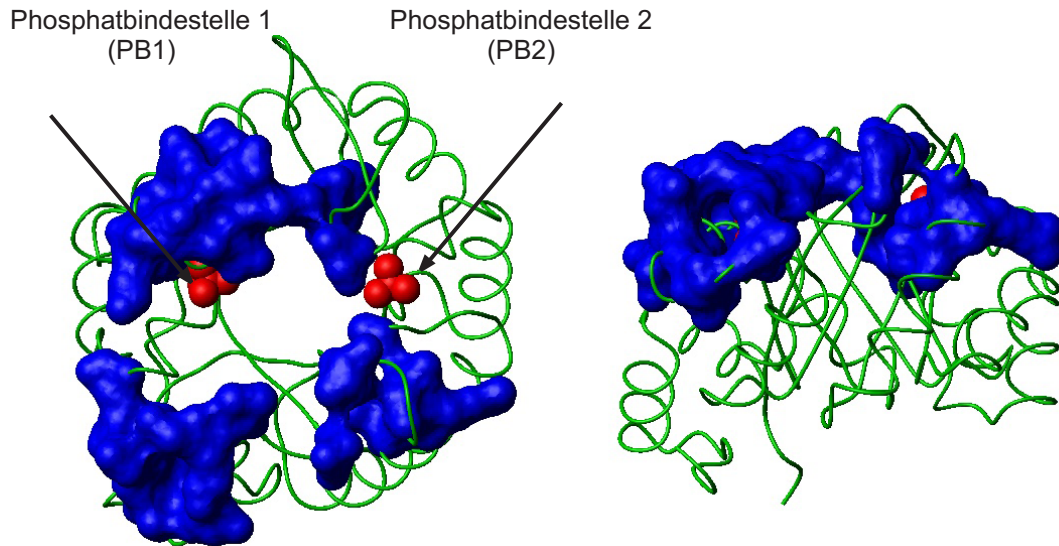


Abb. 3-14 Veranschaulichung der Signalverbreiterung im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum bei 0.49 mM ImGP anhand der Kristallstruktur (1THF: [Lang et al., 2000]) von HisF. Aminosäuren deren Signale im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum nicht mehr detektierbar sind werden blau dargestellt. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298$ K; 0.8 mM ^{15}N -HisF.

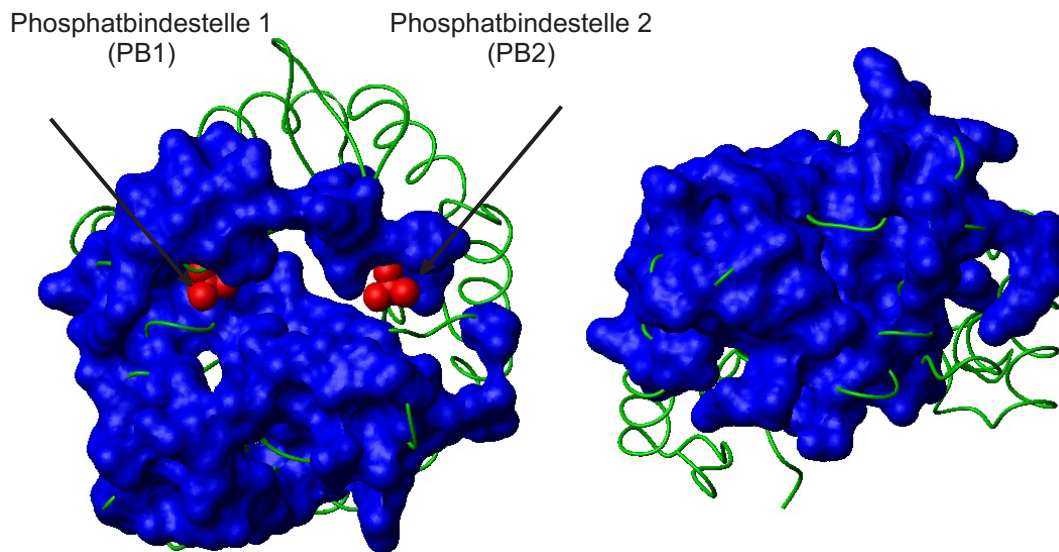


Abb. 3-15 Veranschaulichung der Signalverbreiterung im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum bei 8.24 mM ImGP anhand der Kristallstruktur (1THF: [Lang et al., 2000]) von HisF. Aminosäuren deren Signale im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum nicht mehr detektierbar sind werden blau dargestellt. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298$ K; 0.8 mM ^{15}N -HisF.

3.5. Aktivierung von HisH durch ProFAR-gebundenes HisF

3.5.1. Änderungen der chemischen Verschiebung durch die Bindung von ProFAR

Nach unseren Informationen wird die Bindung von ProFAR in dieser Arbeit zum ersten Mal mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht. Bei Zugabe dieses Liganden sind starke Änderungen der chemischen Verschiebung v.a. in der Region um die beiden Phosphatbindestellen zu erkennen. Darüber hinaus erreicht das Bindesignal an mehreren Stellen die Kontaktfläche zu HisH (vgl. Abb. 3-16).

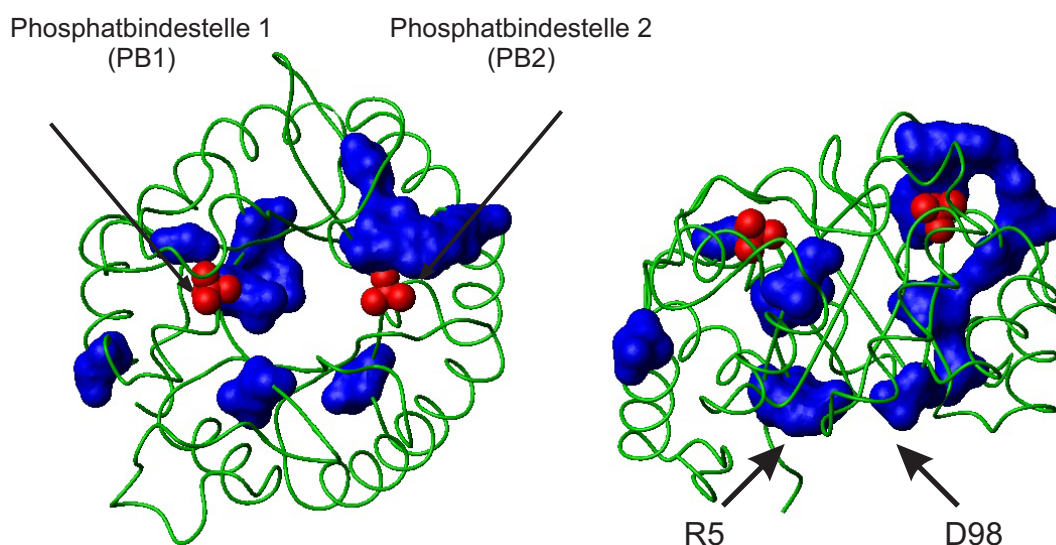


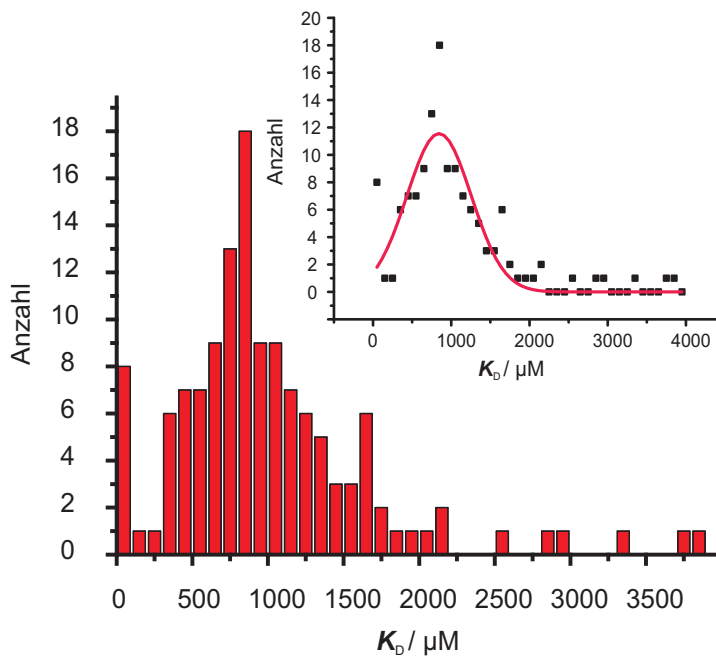
Abb. 3-16 Veranschaulichung der ProFAR-Bindung in der Kristallstruktur von HisF. Aminosäurerest deren Signale im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum bei Zugabe von $829\ \mu\text{M}$ ProFAR von starken Änderungen der chemischen Verschiebung (berechnet als „combined chemical shift“) betroffen sind, werden blau dargestellt. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298\ \text{K}$; 1.0 mM ^{15}N -HisF.

Die Häufigkeit der berechneten apparenten K_D -Werte besitzt ein Maximum bei etwa $800\ \mu\text{M}$ (vgl. Abb. 3-17).

σ_{corr}	0.13		
Amino-säurerest	$\Delta\delta_{comb}$ / ppm	Amino-säurerest	$\Delta\delta_{comb}$ / ppm
106	0.29	140	0.17
233	0.25	142	0.17
5	0.22	108	0.15
203	0.21	98	0.15
222	0.19	127	0.15
10	0.18	165	0.14
143	0.17	219	0.14

Tabelle 3-8

Änderung der chemischen Verschiebung im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum in Anwesenheit von 829 μM ProFAR.

**Abb. 3-17**

Verteilung der K_D -Werte für die Titration von HisF mit ProFAR. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298$ K; 1.0 mM ^{15}N -HisF.

Obwohl das Rauschen hier deutlich größer ist, als bei derselben Darstellung der K_D -Werte von ImGP, kann die Verteilung mit einer Gauss-Kurve angenähert werden (vgl.Tab. 3-9).

Mittelwert / μM	Standardabweichung / μM
845 ± 37	350 ± 33

Tabelle 3-9

Beschreibung der Verteilung der K_D -Werte mit Hilfe einer Gauss-Verteilung.

3.5.2. Signalverbreiterung durch die Bindung von ProFAR

Wie bei ImGP kommt es auch bei ProFAR zu Signalverlusten aufgrund von Austauschprozessen, deren Austauschrate in derselben Größenordnung liegt, wie die Frequenzunterschiede zwischen den zugehörigen Zuständen. Im Gegensatz zu ImGP treten nicht mehr detektierbare Signale bei ProFAR aber hauptsächlich auf der C-terminalen Seite von HisF, direkt angrenzend an die Bindestelle von ProFAR auf (vgl. Abb. 3-18 und Abb. 3-19). In

der Kontaktfläche zu HisH bleiben die Signale weitgehend nachweisbar.

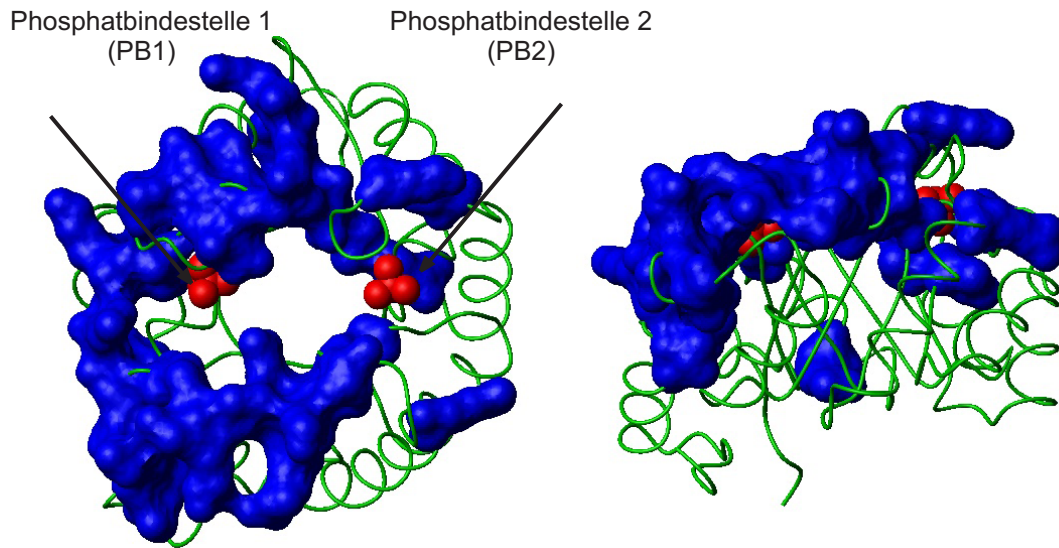


Abb. 3-18 Veranschaulichung der Signalverbreiterung im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum bei 410 μM ProFAR anhand der Kristallstruktur (1THF: [Lang et al., 2000]) von HisF. Aminosäuren, deren Signale im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum nicht mehr detektierbar sind werden blau dargestellt. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298$ K; 1.0 mM ^{15}N -HisF.

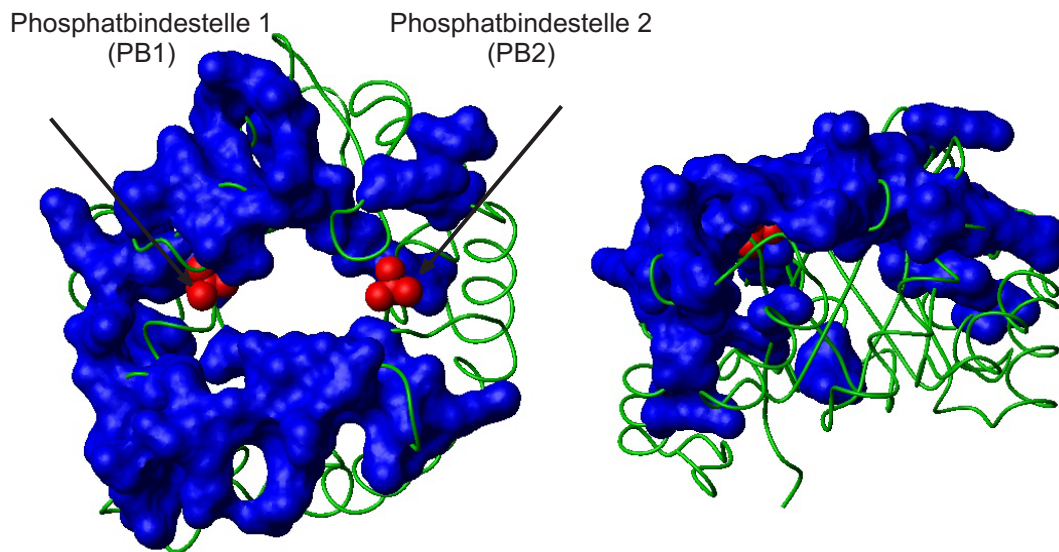


Abb. 3-19 Veranschaulichung der Signalverbreiterung im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum bei 829 μM ProFAR anhand der Kristallstruktur (1THF: [Lang et al., 2000]) von HisF. Aminosäuren, deren Signale im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum nicht mehr detektierbar sind werden blau dargestellt. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298$ K; 1.0 mM ^{15}N -HisF.

410 μM ProFAR	829 μM ProFAR	410 μM ProFAR	829 μM ProFAR
Aminosäure- rest	Aminosäure- rest	Aminosäure- rest	Aminosäure- rest
11	8	173	133
12	11	175	147
13	12	176	159
16	13	180	172
18	16	183	173
19	18	191	175
20	19	202	176
22	20	204	180
22	22	205	183
23	23	206	185
26	26	210	191
51	51	228	202
53	52	230	204
59	53	231	205
81	58	232	206
102	59	234	210
107	61	-	221
128	81	-	228
130	102	-	230
132	107	-	231
133	128	-	232
147	130	-	234
172	132	-	238

Tabelle 3-10

Signale im $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum, die aufgrund von Linienverbreiterung bei 410 bzw 829 μM ProFAR nicht mehr detektierbar sind. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298$ K; 1.0 mM ^{15}N -HisF.

3.5.3. Signalaufspaltung durch die Bindung von ProFAR

Im Gegensatz zu NAD^+ und ImGP zeigen die Spektren bei der Titration mit ProFAR neben der Änderung der chemischen Verschiebung auch eine Signalaufspaltung (vgl. Abb. 3-20).

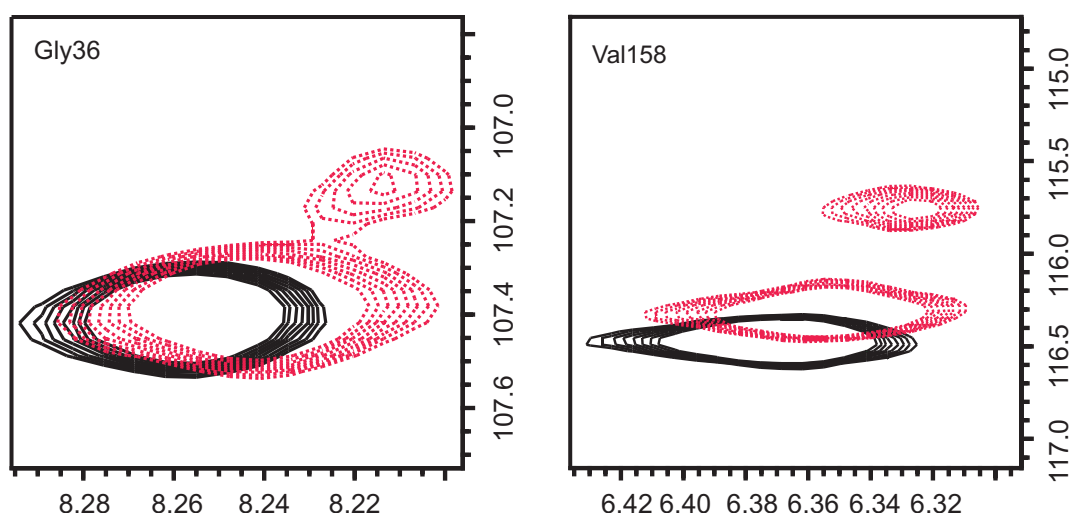


Abb. 3-20 Beispiele für eindeutig aufgespaltene Signale im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum. Neue Signale, die in Bereichen mit stark überlappenden Signalen oder nicht in eindeutiger Nähe zu zugeordneten Signalen auftreten sind nicht berücksichtigt. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298\text{ K}$; 1.0 mM ^{15}N -HisF.

Diese ist zwar nur bei einigen Signalen eindeutig zu erkennen, die jedoch über das gesamte Protein verteilt sind (vgl. Abb. 3-21). Somit kann davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Prozess im gesamten Protein stattfindet.

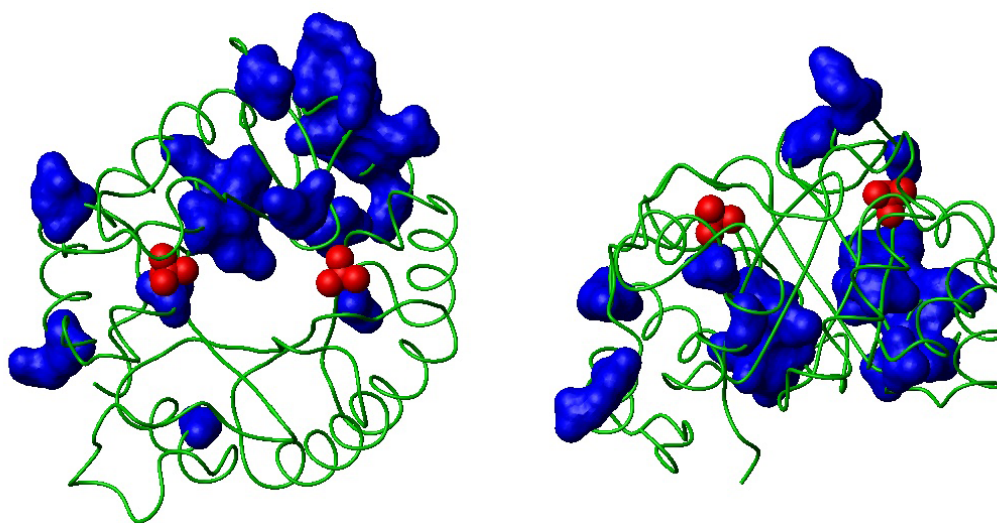


Abb. 3-21 Aminosäuren bei denen eine eindeutige Signalaufspaltung zu erkennen ist, sind über das gesamte Protein verteilt (36, 124, 127, 134, 146, 150, 154, 155, 157, 158, 159, 161, 164, 198, 199, 200, 208, 217, 219, 223, 235). Daher kann man davon ausgehen, dass die Konformationsänderung auch das vollständige Protein betrifft. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298\text{ K}$; 1.0 mM ^{15}N -HisF.

Signalaufspaltungen sind ein eindeutiger Hinweis auf das Vorliegen von Zuständen, für die die Bedingung des langsamen Austausches gilt, wobei das Verhältnis zwischen den Signalvolumina dem Verhältnis zwischen den Populationen entspricht. Allerdings lassen sich keine Aussagen darüber treffen, wie stark sich die beiden Zustände strukturell voneinander unterscheiden. Ebenso wie die Veränderungen bei den chemischen Verschiebun-

gen ist auch dieser Prozess „sättigbar“, so dass tatsächlich ein Bindungsvorgang hinter dem Prozess angenommen werden kann. Die Tatsache, dass Signalaufspaltungen bei Aminosäuren auftreten, die über das gesamte Protein verteilt sind, spricht dafür, dass die durch ProFAR ausgelöste Konformationsänderung das gesamte Enzym erfasst. Es liegt nahe, anzunehmen, dass der neu entstandene Zustand einer aktiven Form von HisF entspricht. Die Daten der Volumina können sowohl je Aminosäure als auch simultan durch ein „Zwei-Zustands-Modell“ beschrieben werden. Durch letzteres Verfahren lässt sich das System gut beschreiben, wenn man unterschiedliche Volumenquotienten und damit unterschiedliche Besetzungen der Populationen in der Sättigung zulässt, welche allerdings im Rahmen des durch die Integration verursachten Volumenfehlers liegen (vgl. Abb. 3-22 und Abb. 3-23).

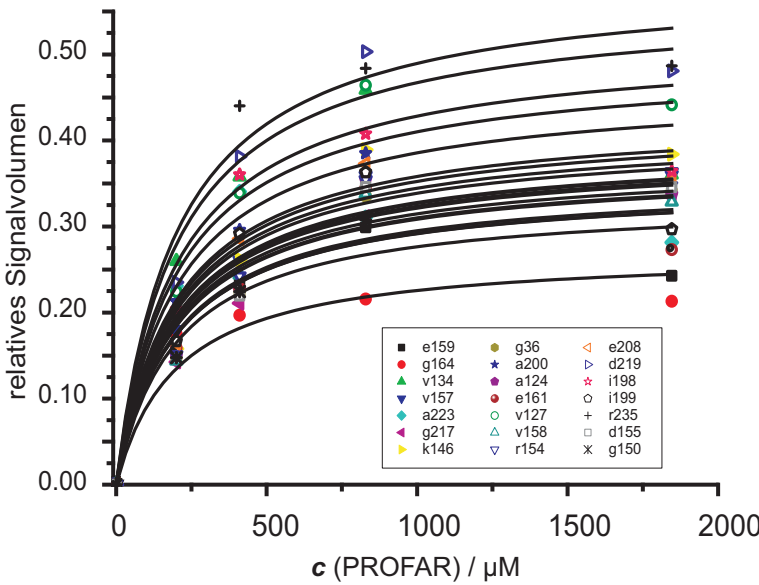


Abb. 3-22
Gemeinsame Beschreibung der Volumenquotienten der aufgespaltenen Signale durch ein „Zwei-Zustands-Modell“. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298\text{ K}$; 1.0 mM ^{15}N -HisF.

K_D	$202 \pm 21 / \mu\text{M}$										
Aminosäure	159	164	134	157	223	217	146	36	200	124	
Besetzungsgrad	0.33	0.27	0.49	0.41	0.39	0.35	0.42	0.37	0.43	0.38	
σ	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	
Aminosäure	161	127	158	154	208	219	198	199	235	155	150
Besetzungsgrad	0.35	0.51	0.37	0.39	0.41	0.56	0.46	0.39	0.59	0.39	0.35
σ	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03

Tabelle 3-11
 K_D und Besetzungsgrad des zweiten Zustandes, bei simultaner Beschreibung aller Daten durch ein „Zwei-Zustands-Modell“. Der K_D soll dabei für alle Daten gleich sein, während der Besetzungsgrad für jeden Datensatz gesondert angepasst wird.

Aufgrund des in die Berechnung der Volumenquotienten eingehenden Volumenfehlers, lassen sich alle Datensätze bis auf Arg235 gut durch den gemeinsamen Mittelwert (41.1 %)

plus Standardabweichung (7.6 %) beschreiben und damit zu einem einzigen Prozess zusammenfassen (vgl. Abb. 3-23). Da Arg235 weiter am Ende der Sequenz liegt als die anderen Aminosäuren wäre hier tatsächlich ein zusätzlicher Prozess vorstellbar. Die scheinbare Häufung der aufgespaltenen Signale an bestimmten Stellen in der Sequenz ist wahrscheinlich zufällig. Die Aufspaltung ist nur an den Stellen eindeutig zu identifizieren, an denen das neue Signal in unmittelbarer Nähe zum ursprünglichen entsteht und zusätzlich kein Überlappen von Signalen stattfindet. Zusätzliche Signale entstehen noch an vielen anderen Stellen im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum. Allerdings fehlt hier die eindeutige Zuordnung. Für die Auswertung werden nur die eindeutigen Fälle aufgeführt.

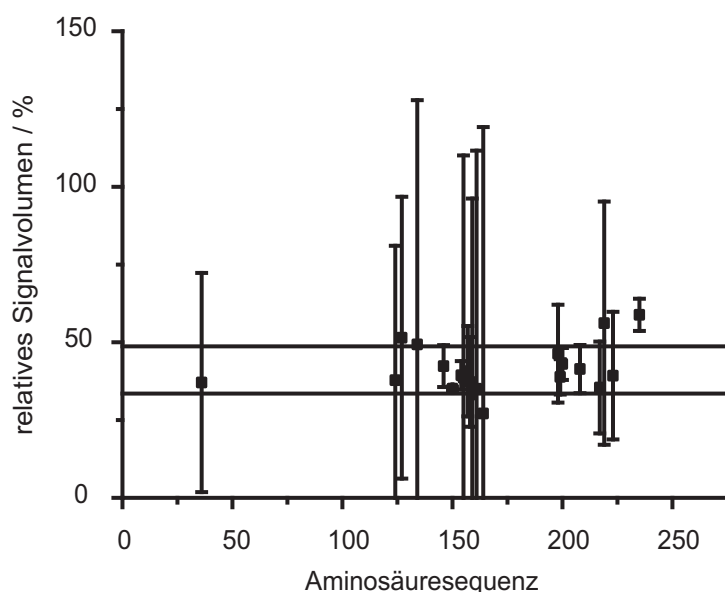
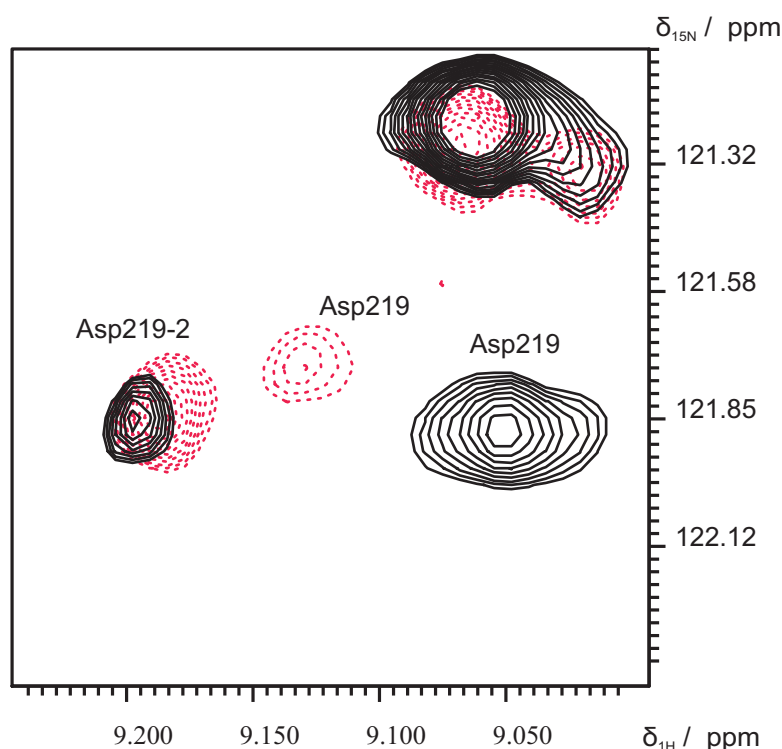


Abb. 3-23

Populationen des zweiten Zustandes in der Sättigung zusammen mit dem bei der Berechnung der Volumina in Auremol entstandenen Volumenfehler. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298$ K; 1.0 mM ^{15}N -HisF.

Das neu entstehende Signal behält seine Position praktisch bei. Selbst bei vollständiger Sättigung mit ProFAR liegt die ausgelöste Veränderung im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum berechnet als „combined chemical shift“ nur bei den Signalen von drei Aminosäuren (Glu159, Asp219, Ile199) knapp über dem durch die digitale Auflösung bedingten Fehler von 0.02 ppm (vgl. Abb. 3-24, vgl. Tab. 3-12).

**Abb. 3-24**

Ursprüngliches (Asp219) und aufgespaltenes (Asp219-2) Signal in Anwesenheit von 200 μM (schwarz) und 1846 μM ProFAR (rot, gestrichelt). Bedingungen: Spektrometerfrequenz 800 MHz; 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298$ K; 1.0 mM ^{15}N -HisF.

Aufgrund des geringen Ausmaßes der chemischen Verschiebung kann kein K_D -Wert bestimmt werden. Es kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass den Veränderungen ein weiterer konformationeller Prozess und damit weitere Zustände des Proteins zugrunde liegen.

Aminosäurerest	$\Delta\delta_{comb}$ / ppm	Aminosäurerest	$\Delta\delta_{comb}$ / ppm
Glu159	0.03066	Val127	0.00941
Gly164	0.01049	Val158	$5.26 \cdot 10^{-4}$
Val134	0.01248	Arg154	$6.12 \cdot 10^{-4}$
Val157	$5.26 \cdot 10^{-4}$	Glu208	0.01002
Ala223	0.00961	Asp219	0.02328
Gly217	$5.53 \cdot 10^{-4}$	Ile198	0.02022
Lys146	$6.09 \cdot 10^{-4}$	Ile199	$5.40 \cdot 10^{-4}$
Gly36	0.0168	Arg235	0.01431
Ala200	0.00898	Asp155	$6.37 \cdot 10^{-4}$
Ala124	0.0153	Gly150	$5.55 \cdot 10^{-4}$
Glu161	$6.28 \cdot 10^{-4}$	-	-

Tabelle 3-12

„combined chemical shift“ ($\Delta\delta_{comb}$) für die neu entstandenen Signale der zugehörigen Aminosäurereste bei sättigender ProFAR-Konzentration (1846 μM). Nur an drei Positionen (Glu159, Asp219, Ile199) liegt $\Delta\delta_{comb}$ für die höchste ProFAR-Konzentration über dem durch die digitale Auflösung bedingten Fehler von 0.02 ppm. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298$ K; 1.0 mM ^{15}N -HisF.

3.6. Diskussion

Die untersuchten Liganden zeigen Gemeinsamkeiten in ihrer chemischen Struktur. Wichtig für die Bindung ist offensichtlich die Phosphatgruppe. Daneben finden sich ein stickstoffhaltiger Heterozyklus, sowie Hydroxylgruppen (vgl. auch die Tatsache gebundenen Glycerins in der Kristallstruktur von Banfield et al. [2001]) in allen Strukturen (vgl. Abb. 3-25). Anorganisches Phosphat ist ebenfalls in der Lage an HisF zu binden (vgl. Zuordnung), wobei der Austausch gegen Tricin dafür spricht, dass die Bindung an die Phosphatbindestelle 2 stärker ist. Allerdings besitzt Phosphat allein keine aktivierende Wirkung.

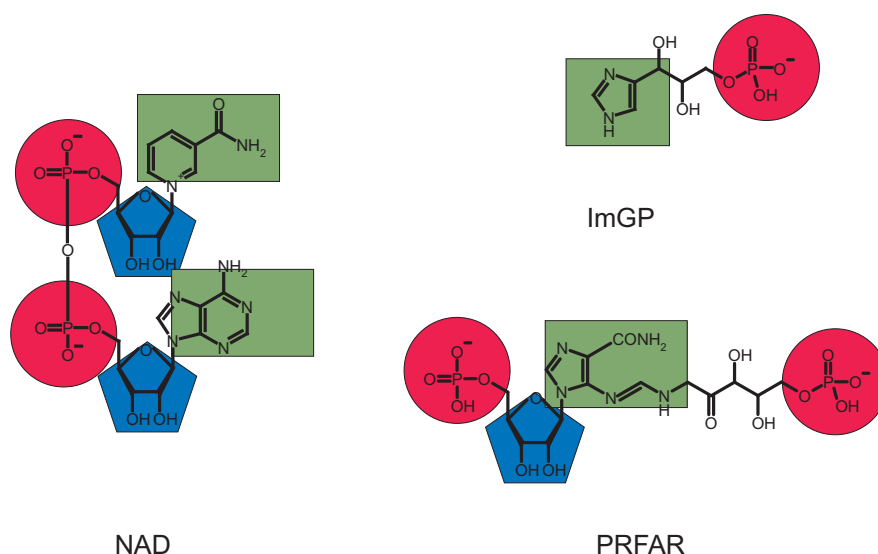


Abb. 3-25 Strukturelle Übereinstimmungen zwischen verschiedenen Effektoren von HisF. Gemeinsamkeiten zwischen den Strukturen der verschiedenen Liganden sind Phosphatgruppen (rot), stickstoffhaltige Heterozyklen (grün) und Hydroxylgruppen die auch als Zucker (NAD⁺, ProFAR) vorliegen können.

ProFAR ist der einzige Ligand, der wie das natürliche Substrat PRFAR, in der Lage ist, die beiden Phosphatbindestellen von HisF zu verbrücken. Allerdings finden sich sowohl bei NAD⁺ als auch bei ImGP Veränderungen an beiden Phosphatbindestellen, so dass man annehmen kann, dass in diesen Fällen zwei Moleküle an der Aktivierung von HisF mitwirken.

Die Ligandbindung aller untersuchten Liganden führt bei HisF zu konformationellen Änderungen, die sich bis zur Kontaktfläche fortpflanzen. Die verschiedenen Konformationen stehen dabei miteinander im schnellen (Änderungen der chemischen Verschiebung: NAD⁺, ImGP, ProFAR), mittleren (Signalverbreiterungen: ImGP, ProFAR) und langsamen Austausch (Signalaufspaltung: ProFAR). In einem einfachen Modell lassen sich die beobachteten Ergebnisse folgendermaßen zusammenfassen.



Die Ausbildung eines HisF-Ligand-Komplexes findet bei allen Liganden statt und ist verantwortlich für die Veränderungen der chemischen Verschiebung im schnellen Austausch. Von dem HisF-Ligand-Komplex ausgehend findet der Übergang in die eigentliche aktive Form von HisF statt. Die unterschiedlichen Liganden unterscheiden sich demnach dadurch, wie stark sie die Ausbildung dieses aktiven Zustandes begünstigen. Bei NAD^+ scheint auch der Übergang zwischen dem HisF-Ligand-Komplex und aktivem HisF im schnellen Austausch stattzufinden, während ImGP den mittleren und ProFAR den langsamen Austausch zwischen den Zuständen bewirkt. Die Aktivierung von HisH funktioniert dabei auf allen Zeitskalen, allerdings ist sie bei ProFAR am stärksten ausgeprägt. Möglicherweise befindet sich HisF aufgrund des langsamen Austausches hier am längsten in der aktiven Konformation.

Von allen untersuchten Liganden besitzt allein anorganisches Phosphat keinen aktivierenden Effekt. Ein wesentlicher Unterschied bei der Phosphatbindung besteht darin, dass das Bindsignal nur von der Phosphatbindestelle 1 aus zur Kontaktfläche mit HisH weitergeleitet wird. Bei NAD^+ , ImGP und ProFAR sind dagegen Änderungen in der chemischen Verschiebung ausgehend von der Phosphatbindestelle 2 bis zur Stabilitätsseite von HisF zu erkennen (vgl. Abb. 3-12, Abb. 3-15, Abb. 3-16). Daher kann davon ausgegangen werden, dass an dieser Stelle der in den Liganden mit Phosphat verknüpfte organische Molekülrest (vgl. Abb. 3-25) das eigentliche Bindsignal für HisH auslöst. Zwei Aminosäurereste, die sowohl bei der Zugabe von ImGP (Signalverbreiterung) als auch von ProFAR (Änderung der chemischen Verschiebung) von Veränderungen betroffen sind, sind Arg5 und Asp98. Arg5 ist Teil des Salzbrückennetzwerks, das den Eingang des intramolekularen Tunnels verschließt. Asp98 hat sich in Mutationsstudien als unverzichtbar für die HisH-Aktivität erwiesen (vgl. Abb 3-26).

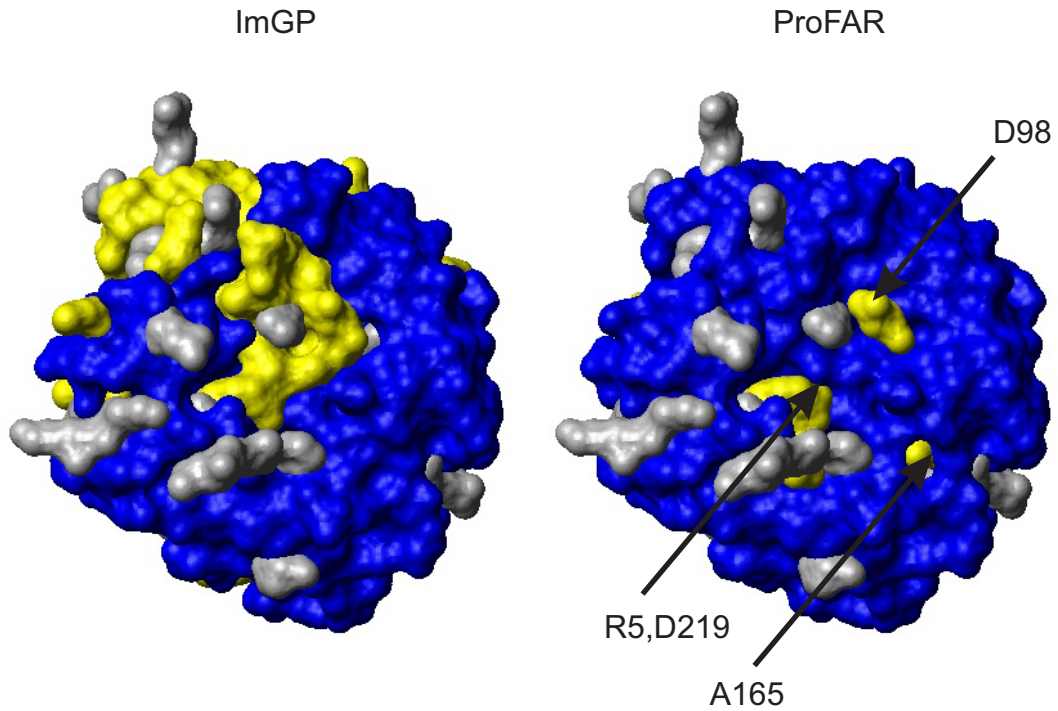
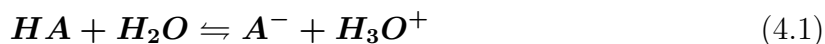


Abb. 3-26 Kontaktfläche von HisF bei Zugabe von ImGP (links) und ProFAR (rechts). Bei beiden Liganden erreicht das Bindesignal (betroffene Reste: gelb) die Kontaktfläche - bei ImGP in Form einer Linienverbreiterung und bei ProFAR als Änderung der chemischen Verschiebung. Gemeinsam sind beiden Liganden Veränderungen an den Aminosäuren Arg5 und Asp98. Bedingungen: **Kristallstruktur** (1THF: [Lang et al., 2000] **ImGP**: 8.24 mM ImGP; 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298$ K; 0.8 mM ^{15}N -HisF **ProFAR**: 829 μM ProFAR; 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298$ K; 1.0 mM ^{15}N -HisF .

4. pK_a -Werte ausgewählter protonierbarer Gruppen in HisF

4.1. Bestimmung von pK_a und pH_m mit Hilfe der NMR-Spektroskopie

Der pK_a -Wert ist ein Maß für das Bestreben einer protonierbaren Gruppe HA ihr Proton abzugeben.



Er ist definiert als der negative dekadische Logarithmus der Gleichgewichtskonstante für die Deprotonierung.

$$pK_a = -\log \frac{[A^-] * [H_3O^+]}{[HA]} \quad (4.2)$$

Je kleiner der pK_a , desto größer die Säurestärke. Besitzen die beiden chemischen Spezies HA und A^- unterschiedliche chemische Verschiebungen kann der Vorgang der Umladung der protonierbaren Gruppe mittels NMR-Spektroskopie verfolgt werden. In allen Beispielen dieses Kapitels befinden sich die konjugierten Säure-Base-Paare im schnellen Austausch miteinander. Dies bedeutet, dass die gemessene chemische Verschiebung δ das gewichtete Mittel der chemischen Verschiebungen der reinen Säure (δ_{HA}) und der reinen Base (δ_{A^-}) ist. Es sei p der Stoffmengenanteil der reinen Säure so ergibt sich die gemessene chemische Verschiebung δ_m zu:

$$\delta_m = p * \delta_{HA} + (p - 1)\delta_{A^-} \quad (4.3)$$

Probleme können dadurch auftreten, dass die chemische Verschiebung eines Atoms nicht nur von einem einzigen pK_a beeinflusst wird. Schon bei einer einfachen chemischen Verbindung wie der Aminosäure Histidin (vgl. Abb 4-1), die allerdings drei protonierbare Gruppen besitzt, kann man erkennen, dass sich in den Titrationskurven pK_a -Werte mehrerer protonierbarer Gruppen niederschlagen.

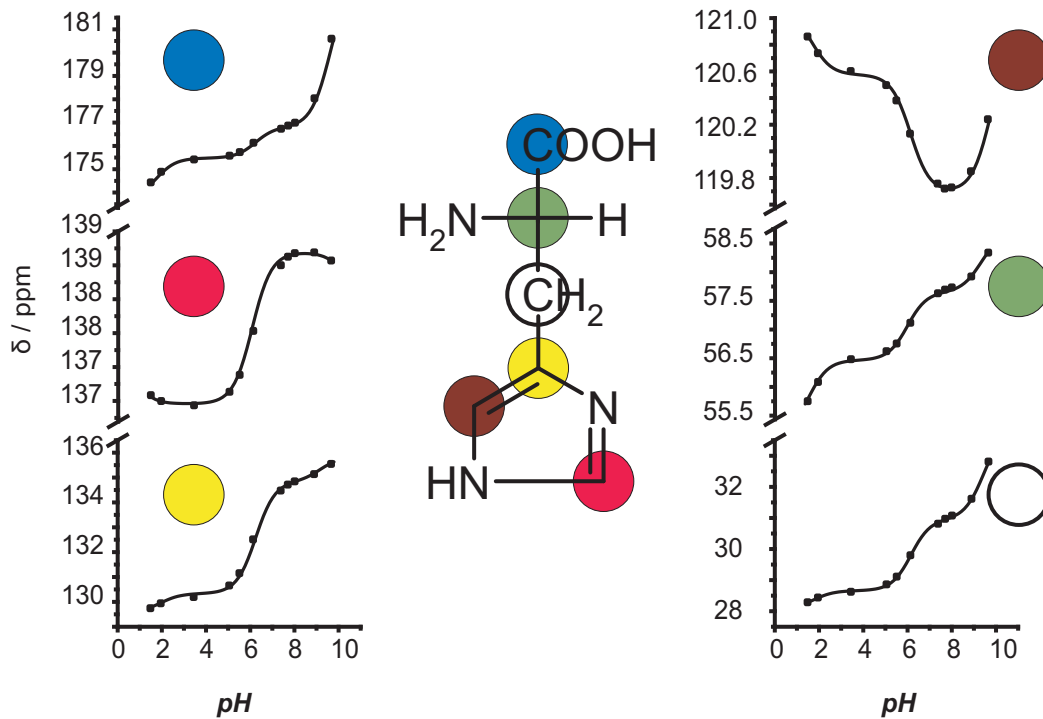


Abb. 4-1 Titrationskurven der Aminosäure Histidin zeigen die pK_a -Werte der unterschiedlichen protonierbaren Gruppen ($pK_a(\text{NH}_2)=9.2$, $pK_a(\text{COOH})=1.8$, $pK_a(\text{HN-His})=6.0$). Die Daten werden aus den ^{13}C -Verschiebungen der einzelnen Kohlenstoff-Atome bei unterschiedlichem pH gewonnen.

Die Titrationskurven für die ^{13}C -Atome des Histidins können als kollektiver Effekt mehrerer gleichzeitig ablaufender Titrationsen mit den pK_a -Werten $pK_a(\text{NH}_2)=9.2$, $pK_a(\text{COOH})=1.8$ und $pK_a(\text{HN-His})=6.0$ beschrieben werden [Wasylishen & Tomlinson, 1975].

$$\delta_{\text{gemessen}} = \delta_{\text{min}} + \sum_{i=1}^3 \frac{\Delta_i 10^{pK_{ai}-pH}}{1 + 10^{pK_{ai}-pH}} \quad (4.4)$$

Dabei bezeichnet pK_{ai} die jeweiligen pK_a -Werte und Δ_i die Differenzen der chemischen Verschiebung zwischen dem protonierten und dem unprotonierten Zustand. Die Δ_i sind für jedes Kohlenstoffatom unterschiedlich (jedes ^{13}C wird von der Titration unterschiedlich weit entfernter Nachbarn unterschiedlich stark beeinflusst) und können sowohl positives als auch negatives Vorzeichen besitzen. Daher steigen einige Kurven monoton (C_α , C_β , C_γ , C_δ (blau, grün, weiß, gelb)), während andere (C_1^ϵ , C_2^δ (braun, rot)) Extrema aufweisen. Die δ_{min} hängen ebenfalls vom jeweiligen Kohlenstoff-Atom ab, die alle unterschiedliche chemische Verschiebungen besitzen. Die pK_{ai} liegen auf den Wendepunkten der Kurven. Dieses Modell gilt unter der Annahme, dass sich die einzelnen Titrationschritte nicht gegenseitig beeinflussen. Eine allgemein gültige Beschreibung wird dagegen durch folgende Gleichung [Spoerner et al., 2005] erreicht:

$$\delta = \frac{\delta_0 + \sum_{i=1}^N \delta_i * 10^{ipH - \sum_{j=1}^i pK_j}}{1 + \sum_{i=1}^N \delta_i * 10^{ipH - \sum_{j=1}^i pK_j}} \quad (4.5)$$

Im Falle eines Proteins kommt hinzu, dass sich auch konformationelle Veränderungen der chemischen Verschiebung aufprägen können. Daher spricht man häufig auch von pH_m statt von pK_a [Pujato et al., 2005]. Dies gilt vor allem, wenn man nicht direkt ein Atom der protonierbaren Gruppe beobachtet. Für die Titrationskurven in dieser Arbeit wird dagegen angenommen, dass es sich um einstufige Prozesse handelt. Daher werden die Kurven generell mit folgender Gleichung beschrieben [Markley, 1975] .

$$\delta = \frac{\delta_{A^-} + \delta_{HA} * 10^{n*(pH_m - pH)}}{1 + 10^{n*(pH_m - pH)}} \quad (4.6)$$

Dabei stellen δ_{HA} und δ_{A^-} das saure bzw. basische Niveau der Titrationskurve dar. Der pH_m ist der Wendepunkt der Kurve und n der Hillkoeffizient.

In HisF ist vor allem der pK_a -Wert der Aminosäure Asp11 von Bedeutung, da er nach dem postulierten Reaktionsmechanismus deutlich in Richtung Neutralpunkt verschoben sein sollte (siehe Einleitung).

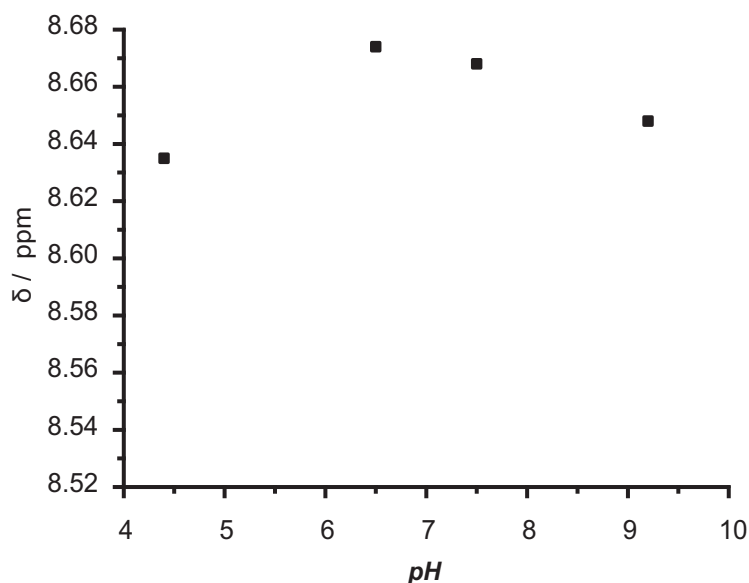
4.2. *pH*-Titration von Asp11

4.2.1. pK_a -Werte und die Katalyse der Cyclase-Reaktion

Wie bereits in der Einleitung erläutert, besitzt Asp11 eine wesentliche Funktion für die Katalyse der HisF-Reaktion. Für den postulierten Reaktionsmechanismus sollte die Carboxylgruppe von Asp11 eine zu größeren pK_a -Werten verschobene Säurestärke besitzen. Vorhersagen durch das Programm PROPKA [Li et al., 2005] ergeben eine Anhebung des pK_a -Wertes von Asp11 von 3.8 auf 5.09.

4.2.2. *pH*-Titration der Apo-Form von HisF in Tricin

Um den pK_a -Wert von Asp11 in der Ligand-freien Form von HisF zu bestimmen werden vier $[^1H, ^{15}N]$ -HSQC-Spektren in 150 mM Tris/HCl bei *pH* 4.4, 6.5, 7.5 und 9.2 aufgenommen. In diesem *pH*-Bereich kann keine vollständige Titrationskurve aufgenommen werden (vgl. Abb. 4-2), weil der pK_a -Wert offensichtlich in einem anderen Bereich liegt.

**Abb. 4-2**

^1H -chemische Verschiebung des Signales von Asp11 in Abhängigkeit vom *pH*-Wert. Bedingungen: 800 MHz; 50 mM Tris/HCl; $T=298$ K.

Außerdem sind die hierbei detektierten Änderungen der chemischen Verschiebungen gering im Vergleich zu den Werten die in der Literatur für die Amidprotonen eines Aspartatrestes angegeben werden (siehe Diskussion).

4.2.3. *pH*-Titration der ligandgebundenen Form von HisF

Es sind bereits Enzyme bekannt bei denen sich der pK_a -Wert mit der Bindung eines Liganden ändert (Serin-Protease [Oda et al., 1994], UDP-Galaktose-4-Epimerase [Liu et al., 1997]). Ebenso gibt es Substrate, deren pK_a -Wert sich bei der Bindung an das zugehörige Protein ändert, um eine Katalyse zu ermöglichen (p21^{ras} [Schweins et al., 1997; Nührs, 2003]). Das natürliche Substrat von HisF, PRFAR, ist ausgesprochen labil. Daher werden ImGP, ein Produkt der Cyclase-Reaktion, sowie ProFAR, eine Vorstufe von PRFAR und Substrat von HisA, verwendet. Beide binden HisF und sind in der Lage, die Glutaminase HisH zu aktivieren.

Linienverbreiterung von Asp11 in Gegenwart der Liganden ProFAR und ImGP

Wie in den Experimenten von Lipchock & Loria [2009] zur ImGP-Bindung festgestellt, erfahren zahlreiche Signale in Anwesenheit von ImGP eine starke Linienverbreiterung. Wir haben das Experiment wiederholt und können dieses Verhalten insbesondere auch für das Signal von Asp11 bestätigen (vgl. Abb. 4-3).

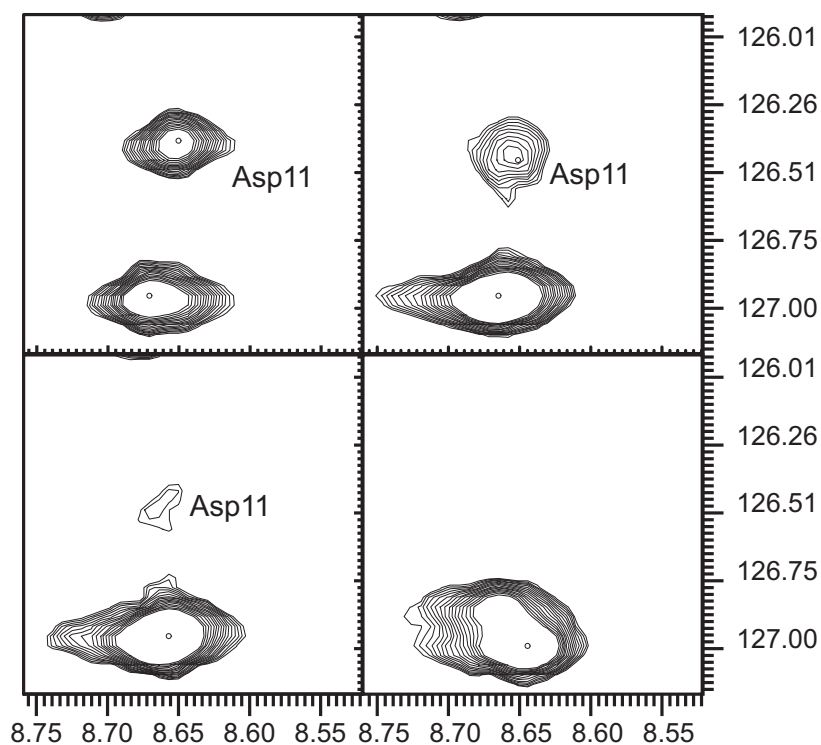


Abb. 4-3 Signalverbreiterung des Signales von Asp11 im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum mit steigender Konzentration von ImGP. Bedingungen: 800 MHz; 50 mM Tris/HCl; $T=298\text{ K}$; $pH=7.5$; 0.8 mM ^{15}N -HisF; 0,0.5,1,3 mM ImGP.

Darüber hinaus zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente zur Bindung von ProFAR, dass es auch mit diesem Liganden zu einer starken Signalverbreiterung kommt (vgl. Abb. 4-4).

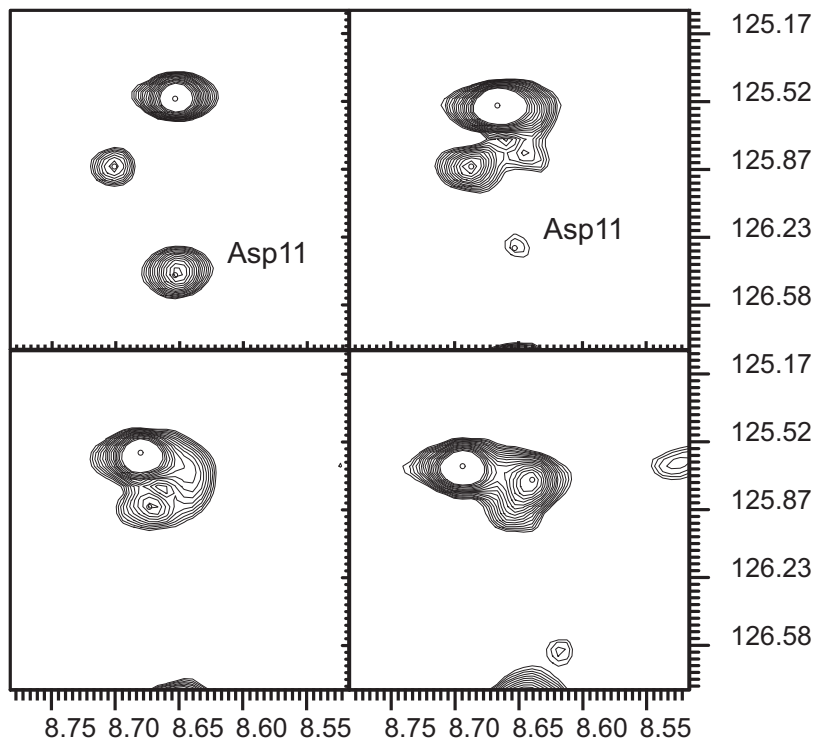
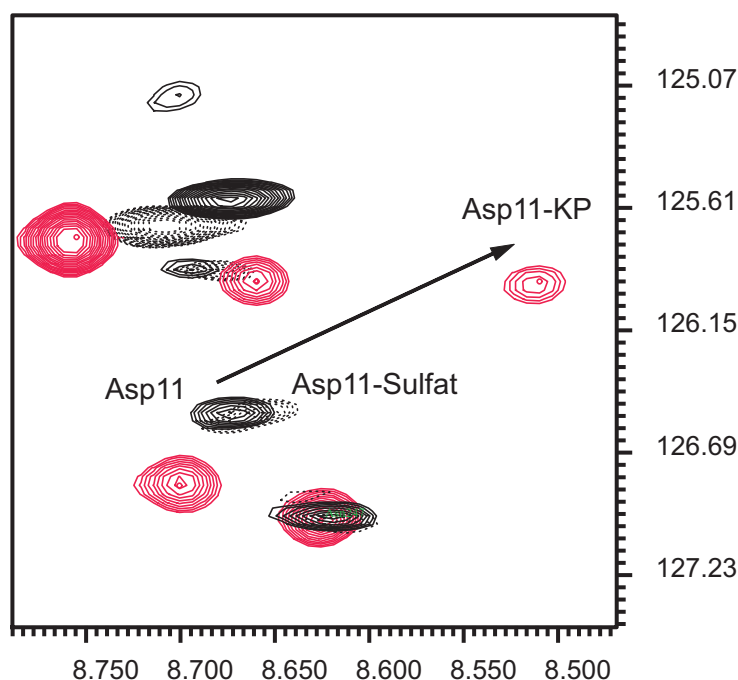


Abb. 4-4 Signalverbreiterung des Signales von Asp11 im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum mit steigender Konzentration von ProFAR. Bedingungen: 800 MHz; 50 mM Tris/HCl; $T=298$ K; $p\text{H}=7.5$; 1 mM ^{15}N -HisF; 0,200,410,829 μM ProFAR.

Die Experimente zur Ligandbindung zeigen überdies, dass NAD^+ nur schlecht an die Phosphatbindestelle neben Asp11 bindet. Daher gehört Asp11 auch nicht zu den stark beeinflussten Aminosäureresten bei der NAD^+ -Bindung. Aufgrund der angeführten Probleme wird auf eine Titration in Anwesenheit von ImGP, ProFAR und NAD^+ verzichtet.

Phosphat als einfache Modells substanz zur Simulation der Anwesenheit eines Liganden

HisF-Liganden werden über ihre Phosphat-Reste an das Protein gebunden. Aus Röntgenstrukturuntersuchungen ist bekannt, dass anorganisches Phosphat die Positionen der beiden Phosphatbindestellen in HisF besetzen kann [Lang et al., 2000]. Auch in den $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren in 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer kommt es zu deutlichen Verschiebungen des Signales von Asp11 gegenüber der Phosphat-freien Form. Dagegen sind 75 mM Sulfat nicht in der Lage diesen Effekt auszulösen (vgl. Abb 4-5).

**Abb. 4-5**

Einfluss verschiedener Ionen auf die Position des Signales von Asp11 im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum. Gezeigt ist das Signal in Anwesenheit von 50 mM Phosphat (rot) und 75 mM Sulfat (schwarz, gepunktet). Das Spektrum in Tris/HCl ist mit schwarzen durchgezogenen Linien dargestellt. Bedingungen: 800 MHz $T=298$ K; 150 mM Tris/HCl ($pH=7.5$); 150 mM Tris/HCl + 75 mM Na_2SO_4 ($pH=7.6$); 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer ($pH=7.5$).

Daher wird Phosphat als einfache Modells substanz zur Simulation der Anwesenheit eines Liganden genutzt.

Zuordnung von Asp11 im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC und CACO-Spektrum

Die Zuordnung des Signales von Asp11 im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum erfolgt mit Hilfe eines HNCA- und HNCACB-Spektrums (vgl. Kapitel Zuordnung). Die Zuordnung des Carbonyl-Kohlenstoffes von Asp11 erfolgt mit Hilfe eines COCA-Spektrums. Dabei werden die C_β (zusammen mit den C_α der Glycine) selektiv angeregt und die Magnetisierung per INEPT-Transfer auf die CO der Carboxylgruppe übertragen. Aus Gründen eines besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses werden Antiphasen-Signale detektiert. Der Nachteil ist bei dieser Methode allerdings, dass sich positive und negative Signale bei Überlappung teilweise auslöschen können. Das entstehende Spektrum korreliert das CO der Seitenkette (direkte Dimension) mit dem zugehörigen C_β des Aspartates (indirekte Dimension) (vgl. Abb. 4-6).

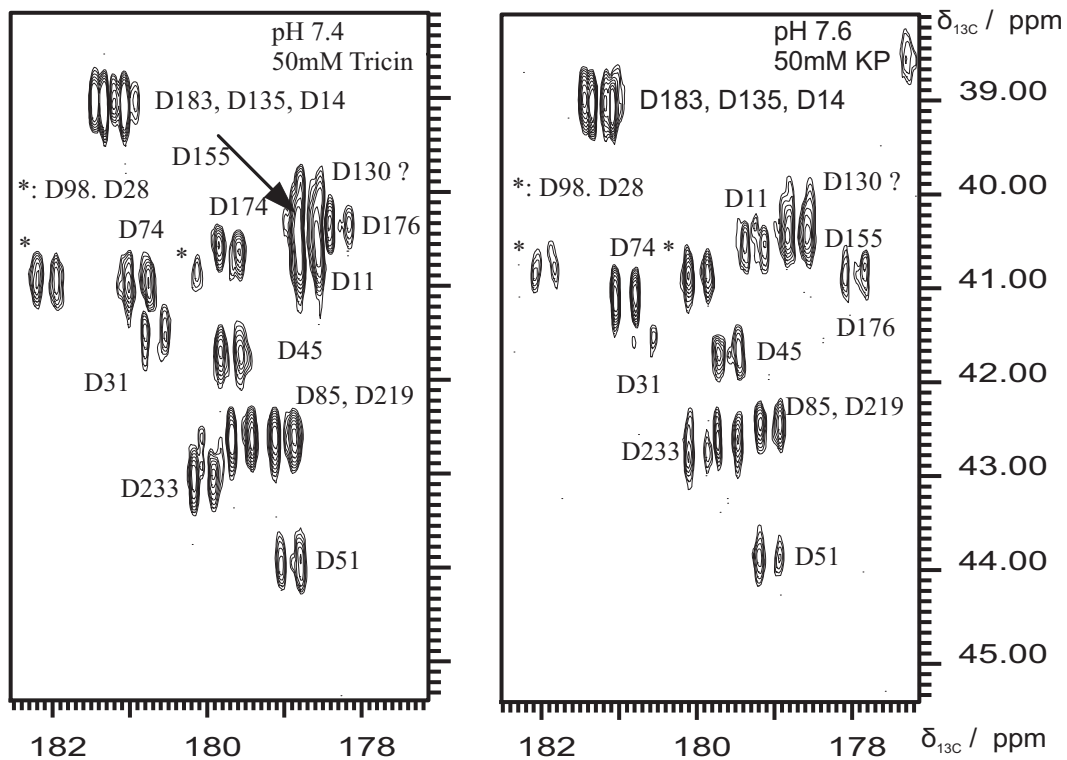
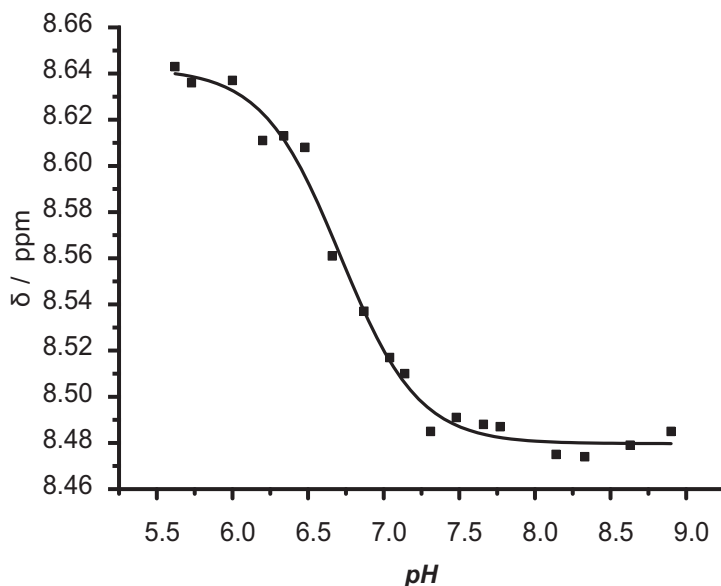


Abb. 4-6 Zugeordnete CACO-Spektren in Abwesenheit und Anwesenheit von Phosphat. In vielen Bereichen ist die Zuordnung zweifelhaft, da die C_β -Verschiebungen zu dicht beieinander liegen. Bedingungen: 800 MHz; $T=298$ K; 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer ($pH=7.6$) bzw. 50 mM Tricin ($pH=7.4$); 2H , ^{15}N , ^{13}C -HisF.

Für das CO ist der direkte Effekt der Umladung zu erwarten, während am C_β auch mögliche Konformationsänderungen in die chemische Verschiebung eingehen können. Die Zuordnung erfolgt mit Hilfe der bereits bekannten C_β -Verschiebungen aus der Zuordnung von Lipchock & Loria [2008] und der eigenen Zuordnung in Phosphatpuffer. In vielen Bereichen liegen die C_β allerdings so nahe beieinander, dass die zugehörige Aminosäure im CACO-Spektrum nicht zweifelsfrei bestimmt werden kann. Als zusätzliche Hilfe kann die Empfindlichkeit des Signals auf die Zugabe von Phosphat herangezogen werden. Der Effekt sollte für die Aspartate 11, 174 und 176, die um die erste Phosphatbindestelle verteilt liegen, am größten sein.

Bestimmung des pH_m von Asp11 aus einem $[^1H, ^{15}N]$ -HSQC-Spektrum

Für Asp11 ergibt sich aus der $[^1H, ^{15}N]$ -HSQC-Titration tatsächlich ein pK_a -Wert, der nahe am Neutralpunkt ($pH_m=6.7$) liegt (vgl. Abb. 4-7). Sowohl die Richtung (Protonen: Hochfeldverschiebung mit steigendem pH , Stickstoff: Tieffeldverschiebung mit steigendem pH , Daten nicht gezeigt) als auch die Größe des Gesamteffekts ($\Delta\delta=0.163$ ppm) stimmt mit den Literaturangaben für Aspartatreste überein (siehe Diskussion).

**Abb. 4-7**

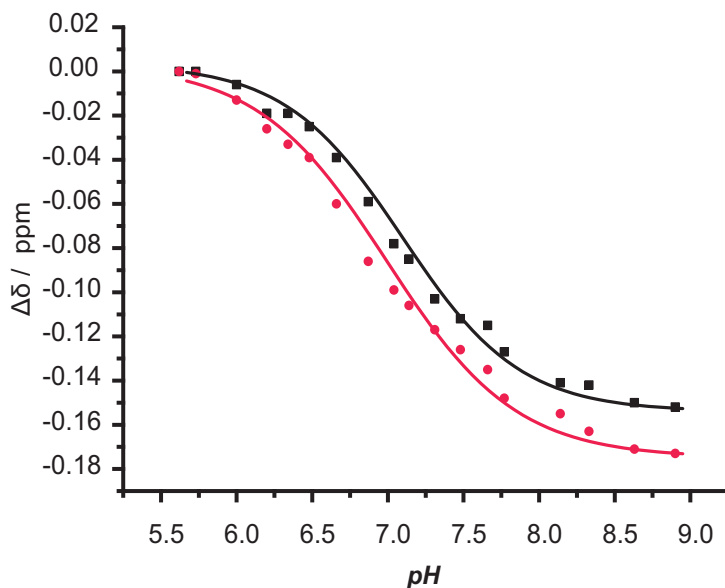
Chemische Verschiebung des Signales von Asp11 im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC in Protonenrichtung bei steigendem *pH*. Der pH_m liegt bei 6.7 (vgl. Tab. 4-1) Bedingungen: 800 MHz; $T=298\text{ K}$; 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer.

	pH_m	$\Delta\delta$	n	δ_{HA}	δ_{A-}
H_N Asp11	6.73 ± 0.03	0.163 ± 0.008	1.73 ± 0.18	8.642 ± 0.005	8.480 ± 0.003

Tabelle 4-1

Aus dem modifizierten Hill-Modell (siehe Einleitung) gewonnene Parameter für die Änderung der chemischen Verschiebung mit dem *pH*-Wert. $\Delta\delta$ ist der Unterschied zwischen dem rein sauren (δ_{HA}) und dem rein basischen (δ_{A-}) Niveau. Der Hill-Koeffizient wird mit n bezeichnet.

Allerdings könnte dieser Effekt auch indirekt durch in der Nähe von Asp11 befindliche protonierbare Gruppen einer benachbarten Aminosäure verursacht werden. Beispielsweise besitzt Leu241 keine protonierbare Gruppe und zeigt trotzdem eine deutliche *pH*-Titrationskurve mit einem pH_m um den Neutralpunkt. Der Abstand zwischen den Niveaus der protonierten und unprotonierten Form ist dabei fast genauso groß wie im Falle von His244, das eigentlich in diesem *pH*-Bereich umgeladen wird und den Effekt, vermutlich als Konformationsveränderung, auf Leu241 überträgt (vgl. Abb. 4-8).

**Abb. 4-8**

Titrationsskurve von Leu241 (schwarz) und His244 (rot) bestimmt aus den Signalen der Amidprotonen des $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrums. Die Anfangswerte sind zur besseren Vergleichbarkeit für beide Signale auf Null gesetzt. (vgl. Tab. 4-2 Bedingungen: 800 MHz; $T=298\text{ K}$; 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer.

	pH_m	n	$\Delta\delta$
H_N His244	6.839 ± 0.04	0.8 ± 0.06	0.197 ± 0.009
H_N Leu241	7.011 ± 0.03	0.99 ± 0.07	0.160 ± 0.009

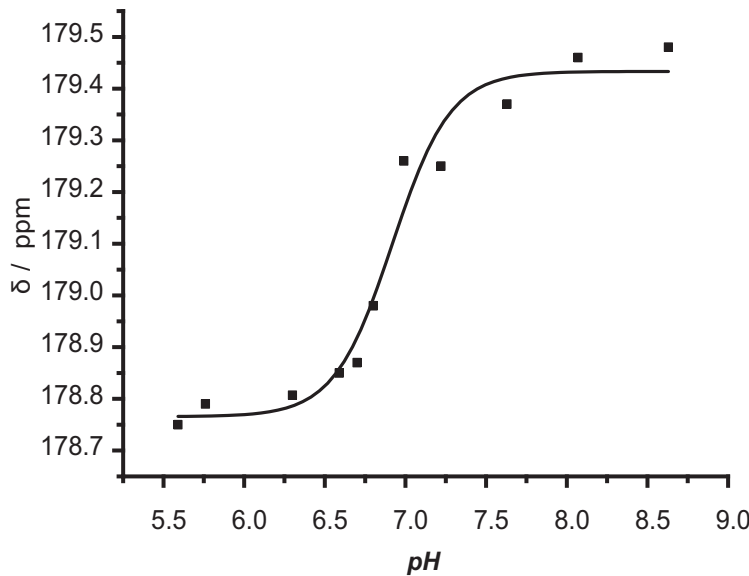
Tabelle 4-2

Aus dem modifizierten Hill-Modell (siehe Einleitung) gewonnene Parameter für die Änderung der chemischen Verschiebung mit dem *pH*-Wert. $\Delta\delta$ ist der Unterschied zwischen dem rein sauren und dem rein basischen Niveau. Der Hillkoeffizient wird mit n bezeichnet. Die Anpassung an das Modell erfolgt aus den Originaldaten, bei denen der Anfangswert nicht auf Null gesetzt ist.

Im Falle von Asp11 zeigen aber die sequenziell benachbarten Aminosäuren alle einen deutlich geringeren Gesamteffekt als das Aspartat selbst (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass der beobachtete Umladungsvorgang tatsächlich an Asp11 abläuft.

pK_a von Asp11 im ^{13}C -detektierten CACO-Spektrum

Nach Auswertung aller Titrationskurven zeigt sich nur eine, deren pH_m in einem Bereich liegt, der aus dem $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC bestimmt worden ist. (Dies ist auch die einzige Kurve bei der das Niveau der reinen Säuregruppe erreicht wird. Für alle anderen Kurven konnte demnach, obwohl zwischen *pH* 4.1 und 8.6 aufgenommen, auch kein pH_m bestimmt werden.) Das zugehörige Signal passt sowohl von der C_β -chemischen Verschiebung als auch von der Phosphat-Empfindlichkeit zu Asp11. Der pH_m liegt bei 6.9 (vgl. Abb. 4-9).

**Abb. 4-9**

Die Titrationskurve des Asp11 zugeordneten Signales zeigt als einzige einen pK_a -Wert, von 6.9, der dem aus dem $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC nahe kommt (vgl. Tab. 4-3). Bedingungen: 800 MHz; $T=298$ K; 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer; $^2\text{H}, ^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -HisF.

	pH_m	$\Delta\delta$	n	δ_{HA}	δ_{A-}
CO Asp11	6.92 ± 0.05	-0.668 ± 0.073	2.42 ± 0.62	178.766 ± 0.037	179.433 ± 0.036

Tabelle 4-3

Aus dem modifizierten Hill-Modell (siehe Einleitung) gewonnene Parameter für die Änderung der chemischen Verschiebung mit dem *pH*-Wert. $\Delta\delta$ ist der Unterschied zwischen dem rein sauren (δ_{HA}) und dem rein basischen (δ_{A-}) Niveau. Der Hill-Koeffizient wird mit n bezeichnet.

4.2.4. Diskussion

Bestimmung des pH_m von Asp11 aus $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie sich eine titrierte Seitenkette auf die Verschiebung des H_N -Signales auswirken kann. Die erste Möglichkeit ist eine direkt Wasserstoffbrückenbindung zwischen Amid-Proton und Seitenkette, die einen großen Gesamteffekt $\Delta\delta$ (~ 1 ppm) verursacht und häufig mit einer Absenkung des pK_a -Wertes einhergeht [Schaller & Robertson, 1995]. Auf der anderen Seite gibt es auch einen intrinsischen Effekt der Umladung einer Aspartat-Seitenkette [Bundi, 1979], der entlang der Bindungen übertragen wird. Der Gesamteffekt $\Delta\delta$ liegt im Falle des Asp11 von HisF (~ 0.16) in Kalium-Phosphat-Puffer in einer Größenordnung, die mit den Angaben für die Titration eines Aspartatrestes aus der Literatur übereinstimmt. [Bundi, 1979; Pujato et al., 2005; Clark et al., 2007]. Auch die Richtung (Protonen: Hochfeldverschiebung mit steigendem *pH*, Stickstoff: Tieffeldverschiebung mit steigendem *pH*) stimmt mit den Angaben aus der Literatur überein. Auf der anderen Seite zeigt die Titrationskurve von Asp11 in Tris/HCl keinen nennenswert erhöhten pK_a -Wert. Die bis $pH=4.4$ auftretende ($\Delta\delta=0.035$ ppm) Veränderung entspricht etwa 20% des für ein Aspartat ($\Delta\delta \sim 0.16$) zu erwartenden Gesamteffektes. Geht man von diesem Effekt aus, kann man $pH_m \sim 4$ abschätzen. Allerdings ist die Richtung des Effektes (Protonen: Tieffeldverschiebung mit steigendem *pH*)

den Angaben aus der Literatur entgegengesetzt. Möglicherweise beobachtet man also eine konformationelle Änderung. Ein möglicher pK_a -Wert im basischen Bereich würde nach analogen Überlegungen wie oben bei etwa 9.9 *pH*-Einheiten liegen. In beiden Fällen unterscheidet sich der pK_a -Wert im Phosphat-gebundenen Zustand des Proteins deutlich von dem im Phosphat-freien Zustand (vgl. Abb. 4-10).

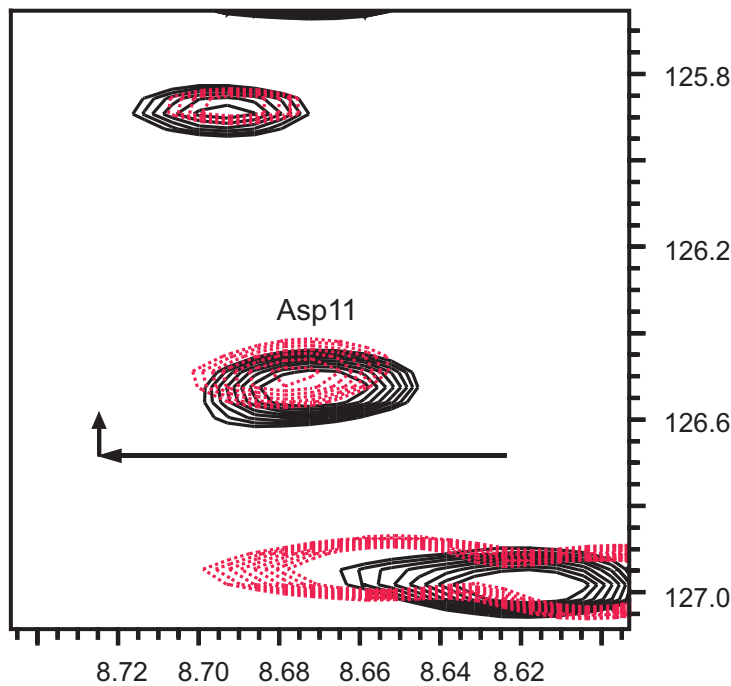
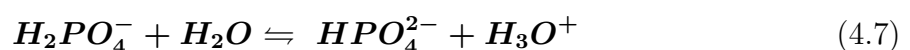


Abb. 4-10

Die Veränderungen im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC zwischen $pH=7.5$ (schwarz) und $pH=6.5$ (rot, gestrichelt) sind gering. Zum Vergleich sind die zugehörigen Änderungen der chemischen Verschiebung im selben *pH*-Bereich in Phosphatpuffer als Pfeile mit eingezeichnet. Bedingungen: 800 MHz; $T=298$ K; 150 mM Tris/HCl.

Unabhängig von den Abschätzungen für das Apo-Enzym kann davon ausgegangen werden, dass der pK_a -Wert des Ligand-gebundenen Zustandes für die Katalyse entscheidend ist. Dies wurde bereits für andere Enzyme gezeigt [Oda et al., 1994; Liu et al., 1997; Schweins et al., 1997; Nühns, 2003]. Die Daten für die Bestimmung des pK_a -Wertes stehen im Einklang mit einem erhöhten pK_a . Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass der Gesamteffekt $\Delta\delta=0.6$ ppm in ^{13}C -Richtung deutlich geringer ist als bei allen anderen Titrationskurven des CACO-Spektrums ($\Delta\delta \geq 1.8$ ppm). Möglicherweise könnte dies jedoch ein Nebeneffekt eben der Verschiebung des pK_a -Wertes sein. Für Amid-Protonen wurde bereits eine Korrelation zwischen der Größe des beobachteten Effektes $\Delta\delta$ und der Stärke der Veränderung des pK_a -Wertes ΔpK_a gegenüber den Referenzwerten festgestellt [Schaller & Robertson, 1995]. Je stärker der pK_a -Wert sinkt, desto größer wird der Unterschied $\Delta\delta$ zwischen den Niveaus der reinen Säure bzw. Base. Umgekehrt wäre es also auch für die ^{13}C -chemischen Verschiebungen vorstellbar, dass ein steigender pK_a -Wert zu einem geringeren Unterschied $\Delta\delta$ zwischen den Niveaus führt. In der bisherigen Literatur treten geringe Unterschiede $\Delta\delta$ zwischen den Niveaus allerdings nur bei mehrstufigen Titrationskurven auf [Oda et al., 1994]. Abschließend sei noch darauf hingewiesen, dass Phosphat selbst für seine zweite Titrationsstufe einen pK_a besitzt der, abhängig von Temperatur und Salzkonzentration, nahe am Neutralpunkt liegt.



Aufgrund der räumlichen Nähe der Phosphatbindestelle 1 zu Asp11, lässt dies wiederum zwei Interpretationen zu. Entweder spiegelt die am Signal von Asp11 gemessene Titrationskurve den pK_a -Wert von Dihydrogenphosphat wider oder die Bindung des Phosphates bewirkt eine pK_a -Änderung für die Seitenkette von Asp11. Für die zweite Alternative spricht vor allem, dass der Effekt an Asp11 selbst am größten ist und bei den benachbarten Aminosäuren deutlich geringer. Darüber hinaus entspricht die Richtungen der Änderung der chemischen Verschiebung in Protonen- und Stickstoffrichtung genau den Erwartungen für die Umladung einer Aspartat-Seitenkette. Man kann sich vorstellen, dass die zusätzliche negative Ladung, die durch die Phosphat-Bindung in der Nähe von Asp11 entsteht, die Abgabe eines Protons erschwert und damit den pK_a -Wert anhebt. Der umgekehrte Fall wurde bereits für die Bindung von NAD^+ (Einführung einer zusätzlichen positiven Ladung) an UDP-Galaktose-4-Epimerase gefunden [Liu et al., 1997]. Hier konnte eine deutliche Absenkung des pK_a -Wertes um 3.6 Einheiten nach Bindung des Liganden gezeigt werden. Der Großteil des Effektes wird dem elektrostatischen Feld von NAD^+ und einem benachbarten Lysin zugeschrieben. Bei HisF kommt dazu, dass auch größere strukturelle Änderungen mit der Phosphatbindung einhergehen. Der reine Ladungseffekt muss also nicht der einzige Grund für die Verschiebung des pK_a -Wertes sein.

4.3. pH-Titration der Histidin-Reste in HisF

4.3.1. Konservierung von Histidinresten in HisF

HisF besitzt vier Histidinreste (His84, His209, His228 und His244). Zwei dieser Histidinreste (His228, His209) sind stark konserviert. His228 ist in den Sequenzen von 72 Cyclase-Einheiten enthalten, während His209 in fünf Fällen durch ein Aspartat ersetzt ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll überprüft werden, ob die Konservierung dieser Aminosäurereste mit einem veränderten pK_a -Wert einhergeht.

4.3.2. pH-Titration der Histidinreste unter verschiedenen Puffer-Bedingungen

Der pH_m -Wert der Histidinreste wird anhand der H_N chemischen Verschiebung in 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer sowie 50 mM Tris/HCl bestimmt. Die Resultate der beiden Experimente ergänzen sich, da jeweils unterschiedliche Histidinreste unter den jeweiligen Bedingungen nicht detektierbar sind. Der pK_a -Wert wird anhand der chemischen Verschiebung des H_1^ϵ in 20 mM Tris/HCl/150 mM KCl in D_2O bestimmt. Für die Titration wird das Protein in D_2O gelöst, damit die Aromaten-Signale unter dem starken Hintergrund der H_N des Rückrates sichtbar werden. Die Protonenverschiebungen der vier H_1^ϵ werden mit Hilfe eines [^1H , ^{13}C]-HSQC anhand ihrer charakteristischen chemischen Verschiebung identifiziert (vgl. Abb. 4-11), wobei zwei Signale überlappen. Die Zuordnung zu den jeweiligen Aminosäureresten erfolgt, soweit möglich, aus den pH_m -Werten der Amid-Protonen (vgl. Tab. 4-4), deren Zuordnung vorliegt. Von den H_2^δ -Signalen kann nur eines

identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

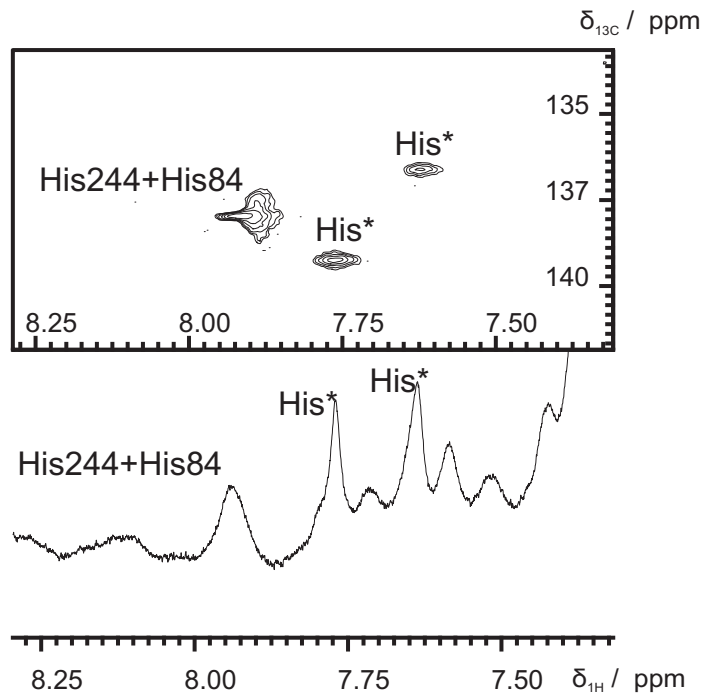


Abb. 4-11

Die Signale der H_1^e des Histidinringes können über ihre charakteristischen Verschiebungen im $[^1H, ^{13}C]$ -HSQC identifiziert werden. Zwei der vier Signale überlappen. Die mit * bezeichneten Signale können nicht sicher einer Aminosäure zugeordnet werden. Bedingungen: 800 MHz; $T=298$ K ; 20 mM Tris/HCl; 150 mM KCl; pH=7.0; 1D: in D_2O ; $^{15}N, ^{13}C$ -HisF ^{13}C -HSQC in H_2O .

Die Ergebnisse aller Titrations sind in Tabelle 4-4 zusammengefasst. Alle Titrationskurven zeigen einen Hill-Koeffizienten kleiner als eins. Dies könnte auf gleichzeitig ablaufende Umladungsvorgänge in der Umgebung hindeuten.

	His84 H_N -P	His244 H_N -P	Signal 1 H_1^e	Signal 2 H_1^e	His244 H_N -Tris
pH_m	7.53 ± 0.02	6.86 ± 0.04	7.96 ± 0.022	6.5 ± 0.02	6.79 ± 0.09
$\Delta\delta$	0.524 ± 0.012	0.147 ± 0.009	1.054 ± 0.012	1.066 ± 0.016	0.179 ± 0.014
n	0.83 ± 0.03	0.81 ± 0.06	0.75 ± 0.02	0.87 ± 0.03	0.95 ± 0.17
δ_{HA}	9.163 ± 0.004	7.450 ± 0.006	8.513 ± 0.004	8.704 ± 0.007	7.488 ± 0.007
δ_{A-}	8.639 ± 0.008	7.303 ± 0.003	7.459 ± 0.008	7.638 ± 0.009	7.309 ± 0.007

Tabelle 4-4

Unterschiede zwischen den unter verschiedenen Bedingungen bestimmten pH_m -Werten der Histidinreste. (H_N : Amid-Protonen im $[^1H, ^{15}N]$ -HSQC; P: 50 mM Phosphatpuffer, Tris: 150 mM Tris/HCl, H_1^e : H_1^e des Histidinringes; $\Delta\delta$ Unterschied zwischen dem sauren δ_{HA} und dem basischen δ_{A-} Niveau der chemischen Verschiebung; n Hillkoeffizient). Allerdings liegen alle ermittelten Werte im typischen Bereich für Histidin.

In der Tabelle sind nur die Histidine aufgeführt, für die unter den jeweiligen Bedingungen, ein pK_a -Wert bestimmt werden konnte. So ist His228 in Phosphatpuffer nicht sichtbar und His209 zeigt in Richtung kleiner pH -Werte bis $pH=5.5$ keine Veränderung der chemischen Verschiebung. Ebenso ist His84 (nicht besetzte Phosphatbindestelle) in Tris/HCl nicht sichtbar, während His209 (bis $pH=4.4$) und His228 (bis $pH=6.5$) (vgl. Abb. 4-14) nur geringe Änderungen der chemischen Verschiebung aufweisen. In D_2O finden sich ebenfalls zwei Signale, die nur geringe Änderungen der chemischen Verschiebung zeigen und

die daher His228 und His209 zugeordnet werden (vgl. Abb. 4-12).

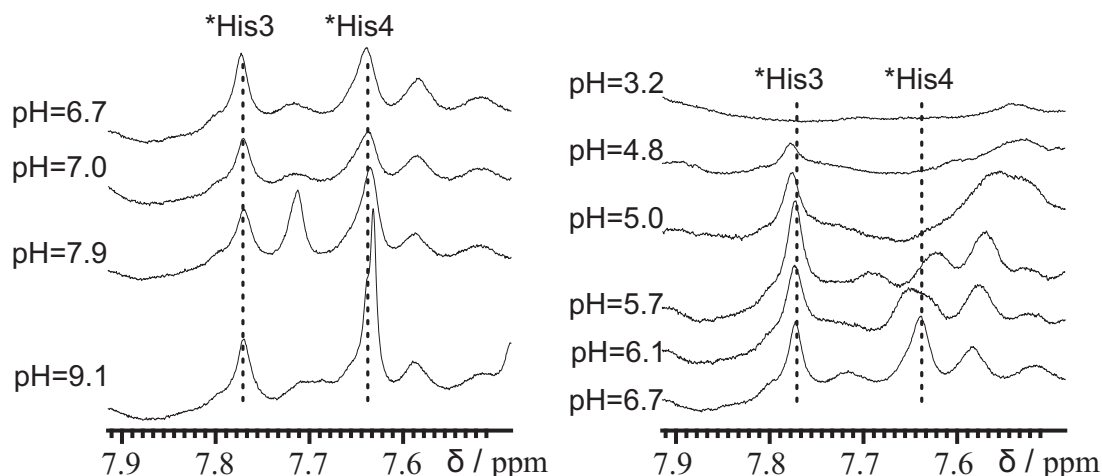


Abb. 4-12 Die zwei Signale der H_1^ϵ , die His228 und His209 zugeordnet werden können zeigen keine signifikanten Veränderungen der chemischen Verschiebung im beobachteten *pH*-Bereich. Bedingungen: 800 MHz; $T=298$ K; 20 mM Tris/HCl; 150 mM KCl; in D_2O .

Bei den beiden verbliebenen Signalen handelt es sich somit um His244 und His84. Die hier ermittelten pK_a -Werte stimmen jedoch nicht mit denen aus den $[^1H, ^{15}N]$ -HSQC-Titrations in Phosphatpuffer und Tris/HCl überein. Es ist allerdings bekannt, dass erhöhte Salzkonzentrationen, den pK_a -Wert verändern können. Nimmt man eine Verschiebung von 0.4 bzw. 0.5 für beide pK_a -Werte in D_2O an, so wäre Signal 1 H_1^ϵ His84 und Signal 2 H_1^ϵ könnte His244 zugeordnet werden (vgl. Abb. 4-13).

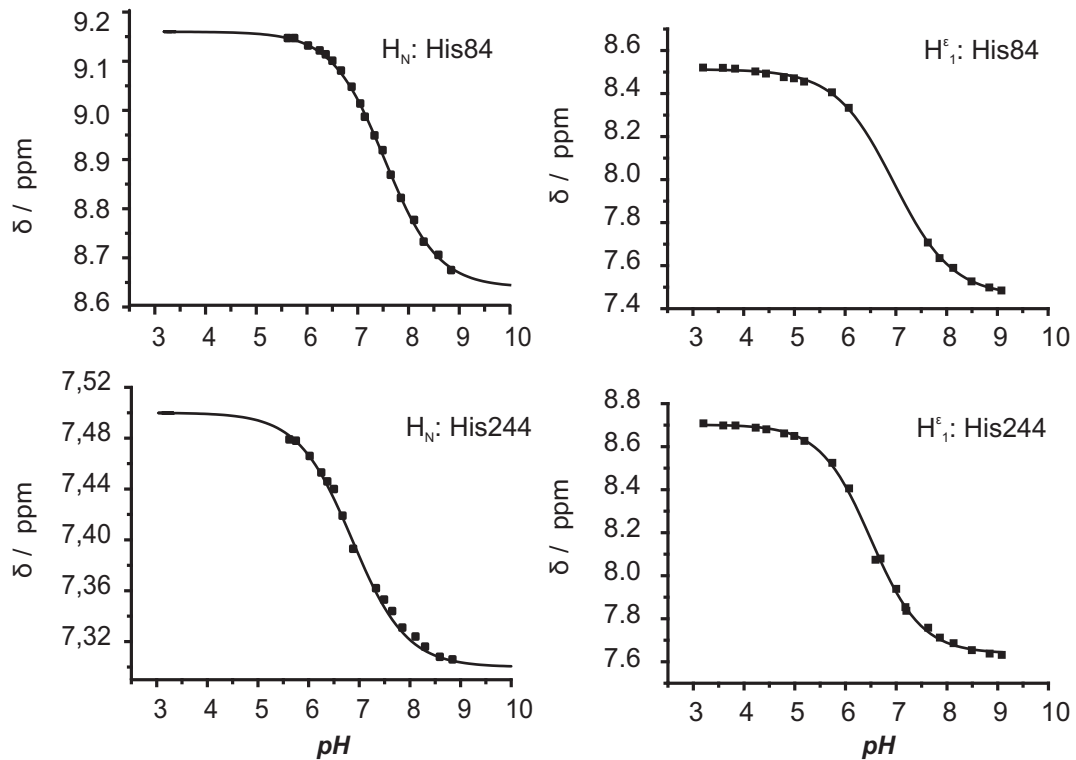


Abb. 4-13 Die Titrationskurven der H_1^ϵ und H_N zeigen unterschiedliche pH_m -Werte. Dies kann entweder an der unterschiedlichen Salzkonzentration oder an zusätzlichen Einflüssen auf die H_N , wie Konformationsänderungen oder Ladungsänderungen in der Umgebung liegen (vgl. Tab. 4-4). Bedingungen: $T=298$ K; H_1^ϵ : 600 MHz; 20 mM Tris/HCl; 150 mM KCl; in D_2O ; H_N : 800 MHz; 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer; in H_2O .

Andererseits könnte zwischen den pK_a -Werten aus dem $[^1H,^{15}N]$ -HSQC und den H_1^ϵ tatsächlich ein Unterschied bestehen. Dies wäre dann der Fall, wenn die jeweiligen H_N nicht nur von der Umladung an ihrer eigenen Seitenkette sondern auch von anderen Ladungsänderungen oder konformationellen Prozessen beeinflusst würden. Der Unterschied zwischen den über die H_N und H_1^ϵ -Signale ΔpK_a beträgt für His84 +0.5 bzw. +1.0 und für His244 -0.1 sowie +0.4. In allen Fällen liegen die pK_a -Werte jedoch im typischen Bereich für Histidin, während die pK_a -Werte von His228 und His209 deutlich verändert sind. Der niedrigste pH -Wert im $[^1H,^{15}N]$ -HSQC bei dem das Signal von His228 noch sichtbar ist beträgt 6.5 (vgl. Abb. 4-14). Eine Aufspaltung des Signals ist nicht erkennbar.

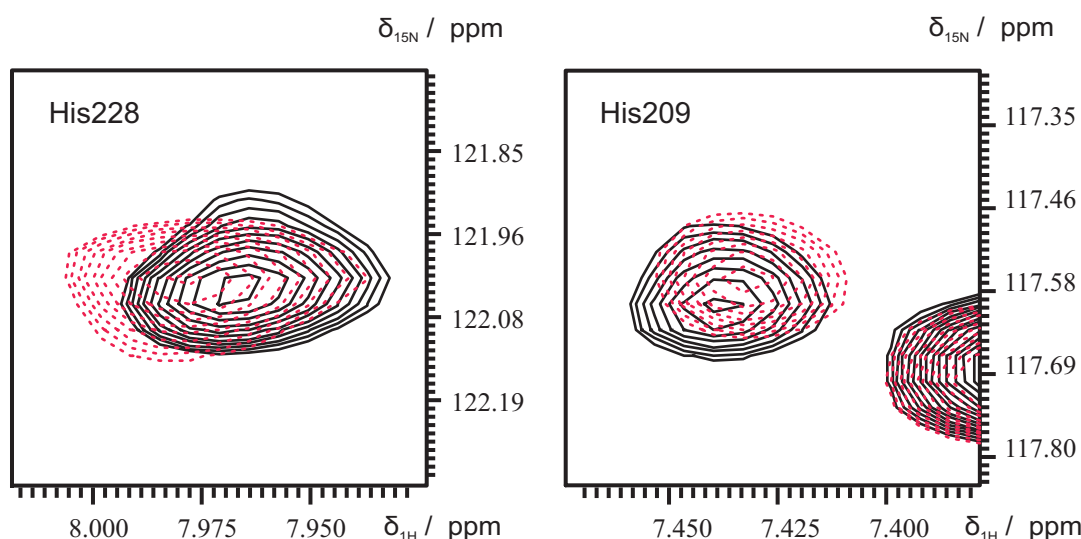


Abb. 4-14 Signale von His228 und His209 im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC bei $p\text{H}=7.5$ (schwarz, durchgezogen) und $p\text{H}=6.5$ (rot, gestrichelt). Bedingungen: 800 MHz; $T=298$ K; 150 mM Tris/HCl.

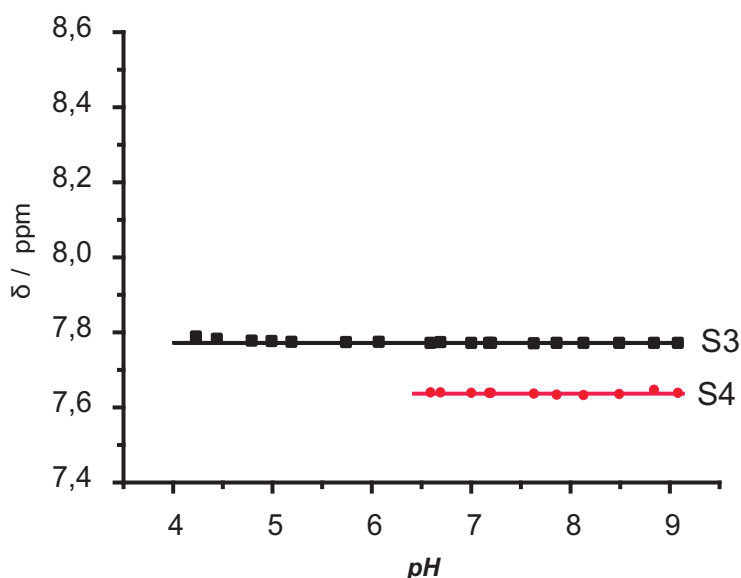


Abb. 4-15

Die zwei Signale der H_1^ϵ die His228 und His209 zugeordnet werden können zeigen keine signifikante Veränderung der chemischen Verschiebung im beobachteten $p\text{H}$ -Bereich. Bedingungen: 600 MHz; $T=298$ K; 20 mM Tris/HCl; 150 mM KCl; in D_2O .

4.3.3. Diskussion

Für die $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Signale der vier Histidine von HisF werden Titrations in 150 mM Tris/HCl und 50 mM Kalium-Phosphatpuffer durchgeführt. Für diese Signale ist die Zuordnung bekannt (vgl. Kapitel Zuordnung und Loria et al). His228 und His209 zeigen in Tris/HCl einen veränderten $p\text{H}_m$ -Wert. In Kalium-Phosphat-Puffer ist das für His209 der Fall, während His228 nicht detektierbar ist. His84 ist dagegen nur in Kalium-Phosphat-Puffer detektierbar und zeigt hier den typischen $p\text{H}_m$ -Wert (7.5) eines Histidins. His244 ist unter beiden Bedingungen detektierbar und zeigt geringfügig unterschiedliche $p\text{H}_m$ -Werte (His244 H_N -Kalium-Phosphat-Puffer: 6.9; His244 H_N -Tris/HCl: 6.8), die beide mit den Standard-Werten für Histidin vereinbar sind.

Die Signale der H_1^ϵ können über ihre typischen chemischen Verschiebungen $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$ -

HSQC-Spektrum als solche identifiziert werden. Allerdings fehlt eine genaue Zuordnung der vier Signale zu dem jeweiligen Histidin in HisF. Von den vier Signalen zeigen wiederum zwei einen ungewöhnlichen pK_a -Wert. Die Signale der Amidprotonen in Tris/HCl sollten sich auf jeden Fall ähnlich verhalten wie die Signale der H_1^ϵ , wenn man von kleineren Effekten, wie der unterschiedlichen Salzkonzentration und dem allgemeinen Unterschied zwischen pH_m - und pK_a -Wert absieht. Daher ist die Zuordnung der beiden Signale mit dem verschobenen pK_a -Wert zu His209/ His228 gerechtfertigt. Aus den Daten für die H_1^ϵ geht darüber hinaus hervor, dass His84 in Tris/HCl ebenfalls einen pK_a -Wert im Standardbereich von Histidin besitzt, auch wenn das H_N -Signal nicht detektierbar ist. Nur über den pK_a -Wert von His228 in Anwesenheit von Phosphat besteht keine Gewissheit. Das zugehörige H_N -Signal wird durch die Bindung von Phosphat stark verbreitert und kann nicht mehr detektiert werden. In Analogie zu dem Verhalten von Asp11 könnte es sein, dass die Phosphat-Bindung den pK_a -Wert von His228 verändert.

Der pK_a -Wert der beiden „ungewöhnlichen“ Histidinreste His228/ His209 lässt sich über den Kurvenverlauf der entsprechenden H_N -Signale in Tris/HCl abschätzen: geht man von einem ähnlichen Kurvenverlauf wie bei den anderen Histidinen aus (vgl. Abb. 4-13 und Abb. 4-15), wird der Wendepunkt frühestens nach weiteren 1.5 *pH*-Einheiten erreicht: also $pK_a \leq 5$. Nach derselben Überlegung gilt für His209 abgeschätzt $pK_a \leq 2.9$. Die Signale der H_1^ϵ von His228 und His209 sind mit sinkendem *pH* nicht mehr detektierbar, so dass hier kein pK_a -Wert bestimmt werden kann (vgl. Abb. 4-15, Abb. 4-12). Allerdings liegen die zugehörigen pK_a -Werte analog zu obiger Überlegung unter 5.2 bzw 2.7.

Theoretisch wäre für beide Histidine auch ein $pK_a \geq 9$ möglich. His228 liegt allerdings auffallend zwischen hydrophoben Aminosäuren (Val-Phe-His-Phe) eingebettet, so dass die ungeladene Umgebung auch eher die ungeladene Form des Histidins und damit einen niedrigen pK_a begünstigen würde. Auch in der Umgebung von His209 sind keine negativen Ladungen zugegen, die einen positiv geladenen Histidinring stabilisieren könnten.

Die eingangs erwähnt starke Konservierung von His209 und His228 könnte ein Hinweis auf eine funktionelle Bedeutung der beiden Reste sein. His228 liegt in unmittelbarer Nachbarschaft des katalytisch aktiven Asp11 am Rand der Ligandbindefurche von HisF.

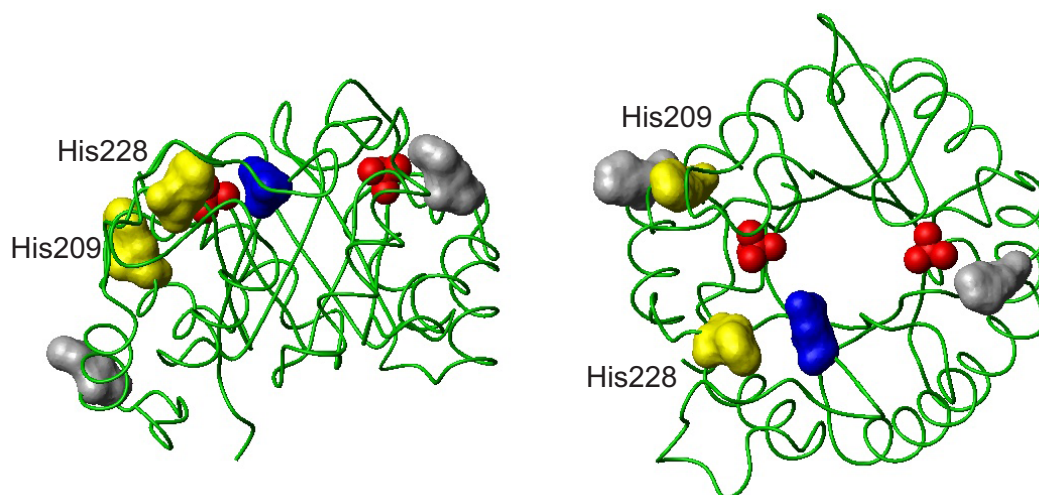


Abb. 4-16 In dieser Darstellung der Kristallstruktur (1THF [Lang et al., 2000]) ist die Nähe zwischen Asp11 (blau) und His228 (gelb) zu erkennen. Die beiden Histidine (gelb) His209 und His228 besitzen im Gegensatz zu His84 und His244 (grau) einen veränderten pK_a .

Die genaue Funktion von His228 ist bis jetzt jedoch unklar. Nichtsdestotrotz ist eine ungewöhnliche Verschiebung des pK_a -Wertes von His228 und His209 sicher feststellbar, wahrscheinlich zu niedrigeren Werten hin.

5. Xenon-Bindung und intramolekularer Substrat-Transport

5.1. Xenon als NMR-Sonde

In der vorliegenden Arbeit wird das Edelgas ^{129}Xe auf zwei unterschiedliche Arten für die NMR-spektroskopischen Experimente genutzt: zum einen wird das NMR-Signal des Xenon-Kerns selbst gemessen (^{129}Xe ; $I=1/2$; natürliche Häufigkeit 26.4 %), zum anderen werden die strukturellen Veränderungen, die durch die Bindung von Xenon ausgelöst werden in einem $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum detektiert (vgl. Abb. 5-1).

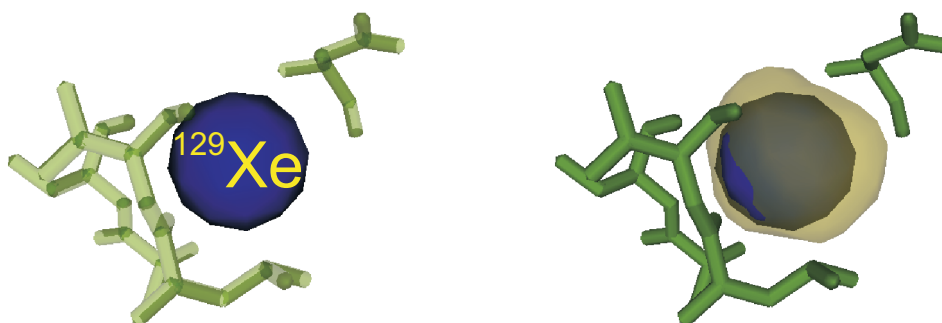


Abb. 5-1 ^{129}Xe lässt sich einerseits aufgrund seiner besonders empfindlichen chemischen Verschiebung als Sonde für einen Bindevorgang an ein Protein nutzen (linke Abbildung). Alternativ detektiert man die Auswirkungen der Bindung (Konformationsänderungen, Van-der-Waals-Kontakte) auf andere im Protein lokalisierte Atomkerne z.B. im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum (rechte Abbildung).

Xenon ist bereits seit längerem als geeignete Sonde für die Untersuchung hydrophober Kavitäten in Proteinen etabliert [Tilton Jr et al., 1984; Locci et al., 2001; Rubin et al., 2002, 2001; Gröger et al., 2003; Dubois et al., 2004; Anedda et al., 2008]. Als Edelgas ist Xenon chemisch inert und eignet sich aufgrund seiner Größe ($d=4.4 \text{ \AA}$), seiner Hydrophobizität und der großen Empfindlichkeit seiner chemischen Verschiebung, die es seiner großen, polarisierbaren Elektronenhülle verdankt, gut zur Untersuchung lipophiler Regionen in Proteinen.

Von HisF wird vermutet [Chaudhuri et al., 2001], dass es in der Lage ist, den bei der Spaltung von Glutamin durch HisH entstehenden Ammoniak durch einen intramolekularen Tunnel direkt zu seinem aktiven Zentrum zu leiten, wo er für die Reaktion benötigt wird. Dieser intramolekulare Transport erhält den nukleophilen Charakter des Stickstoffs,

da eine Protonierung durch das Lösungsmittel zu NH_4^+ vermieden werden kann. Das Ziel war es nun, diesen intramolekularen Tunnel mit Hilfe von ^{129}Xe -spektroskopischen Methoden zu untersuchen.

5.2. Nachweis der spezifischen Wechselwirkung zwischen Xenon und HisF

Die ^{129}Xe -chemische Verschiebung ändert sich meist linear mit der Proteinkonzentration [Tilton Jr et al., 1984; Rubin et al., 2001, 2002; Locci et al., 2001]. Findet eine spezifische Interaktion zwischen dem Protein und Xenon statt, ist eine größere Steigung der Geraden zu erwarten. Entfaltet man nun das Protein und zerstört damit den Bindeplatz, so wird die Steigung geringer [Rubin et al., 2001]. Nimmt die Steigung bei der Denaturierung dagegen zu, so liegt keine spezifische Bindung vor. Die Zunahme der Steigung erklärt sich dann vielmehr durch die größere Menge von Aminosäuren aus dem hydrophoben Kern des Proteins, die im entfalteten Zustand als Interaktionspartner zur Verfügung stehen. Im Falle von HisF nimmt die Steigung der Geraden bei der Denaturierung ab (vgl. Abb. 5-2). Dies zeigt eine spezifische Xenon-Protein Wechselwirkung.

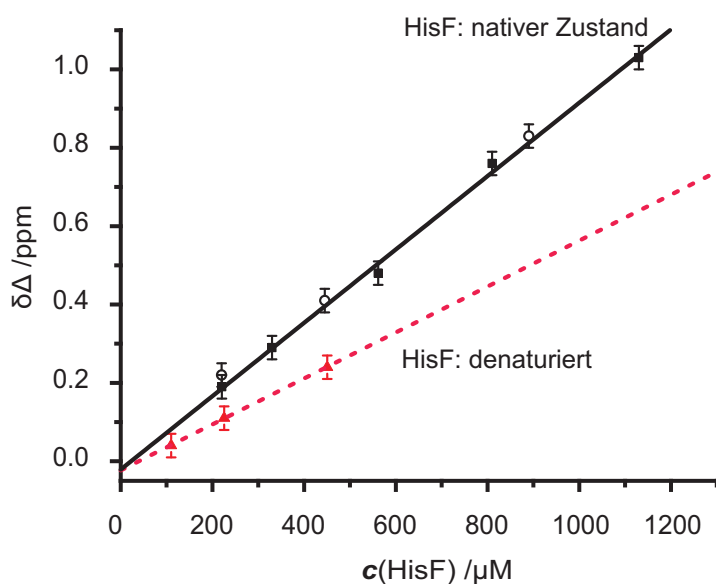


Abb. 5-2

Änderung der ^{129}Xe -chemischen Verschiebungen mit der Proteinkonzentration unter verschiedenen Bedingungen. Denaturiertes HisF (rote Dreiecke) zeigt eine deutliche Verringerung der Interaktion mit Xenon im Vergleich zu nativem HisF (schwarze Quadrate), was sich in einer verminderten Steigung der Geraden zeigt. Dagegen bewirkt die Anwesenheit von ImGP (leere Kreise) in der Probe keine Veränderung. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $\text{pH}=7.5$; $T=298\text{ K}$; 10 % D_2O ; 0.6 % 10 mM DSS; zusätzlich 13 mM ImGP bzw. 6 M Guanidiniumchlorid.

Konkurrieren ein Ligand und Xenon um denselben Bindeplatz, so verringern sich wieder-

um die Xenon-Protein-Interaktionen und die ^{129}Xe -chemische Verschiebung ändert sich weniger stark mit der Proteinkonzentration. Dasselbe gilt, wenn durch die Ligandbindung eine Konformationsänderung erfolgt, die den Bindeplatz zerstört [Rubin et al., 2002]. In Anwesenheit des Liganden ImGP von HisF ändert sich die Steigung allerdings nicht (vgl. Abb. 5-2). Somit ergibt sich auch keine Veränderung der Protein-Xenon-Interaktion als Folge der Ligandbindung. Die Steigungsparameter für die Änderung der ^{129}Xe -chemischen Verschiebung unter den unterschiedlichen Bedingungen (HisF: nativ, denaturiert und in Gegenwart eines Liganden) sind in Tab. 5-1 zusammengefasst.

Probe	Steigung /ppm*mM ⁻¹	σ / ppm
HisF-nativ	0.936	0.027
HisF-denaturiert	0.551	0.006
HisF-nativ+ ImGP	0.915	0.025

Tabelle 5-1

Steigungen der Geraden, die den Zusammenhang zwischen ^{129}Xe -Verschiebung und Proteinkonzentration beschreiben sind für den nativen und den denaturierten sowie in Anwesenheit des Liganden ImGP angegeben. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298$ K; 10 % D_2O ; 0.6 % 10 mM DSS; zusätzlich 13 mM ImGP bzw. 6 M Guanidiniumchlorid.

5.3. Detektion von Aminosäuren mit starker Xenon-Interaktion im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum

Nachdem eine spezifische Wechselwirkung zwischen Xenon und HisF mittels ^{129}Xe -Spektroskopie gezeigt ist, lässt sich mit Hilfe von $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren herausfinden, welche Aminosäuren an der Xenonbindung beteiligt sind. Dazu werden zwei $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren der xenonfreien Probe und einer Probe unter 11 bar Xenon-Druck miteinander verglichen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit früheren Daten, wird in diesem Fall als Maß für die Änderungen der chemischen Verschiebung im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum nicht die oben beschriebene „combined chemical shift“ $\Delta\delta_{comb}$ sondern die „total xenon induced shift“ Δ [Gröger et al., 2003] herangezogen.

$$\Delta = \sqrt{(w_H * \delta_H)^2 + \delta_N^2} \quad (5.1)$$

Der Gewichtungsfaktor w_H wird als Quotient der Standardabweichungen der chemischen Verschiebungen des jeweiligen Proteins in Stickstoff- bzw. Protonenrichtung berechnet.

HisF zeigt eine Häufung von großen Änderungen der chemischen Verschiebung an mehreren Stellen der Sequenz (vgl. Abb. 5-3).

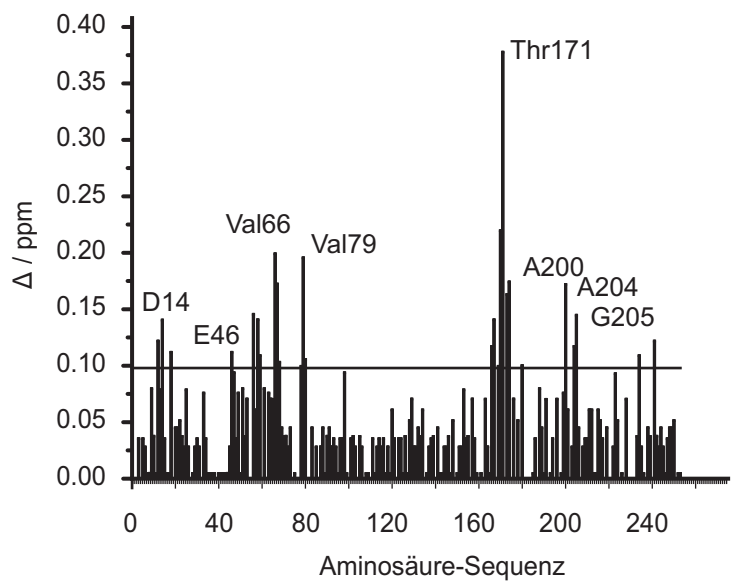


Abb. 5-3
Veränderung der chemischen Verschiebung im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum unter 11 bar Xenon-Druck berechnet als „total xenon induced shift“ Δ . An mehreren Stellen in der Sequenz häufen sich Xenon-induzierte chemische Verschiebungen, die über dem Mittelwert zuzüglich einer Standardabweichung liegen. Zur besseren Orientierung sind einige Aminosäuren benannt. Bedingungen: 1.1 mM ^{15}N -HisF; 50 mM Tris/HCl; $p\text{H}$ =7.5; T =298 K; zusätzlich 11 bar Xenon-Druck.

Zur Berechnung der inneren und äußeren Oberflächen von HisF werden Algorithmen (Implementierung in castp [Dundas et al., 2006] und HOLLOW [Ho & Gruswitz, 2008]) verwendet, die eine Kugel mit einem Radius von 1.4 Å über die Proteinoberfläche rollen lassen. Auf diese Weise werden drei abgeschlossene Kavitäten gefunden. Jeder dieser Hohlräume besitzt ein Volumen, welches ihn in die Lage versetzt ein Xenon-Atom aufzunehmen (vgl. Tab. 5-2).

	Molekulare Oberfläche / Å ²	Molekulares Volumen / Å ³	Wassermoleküle
Kavität I	153.61	119.32	2
Kavität II	101.55	83.10	3
Kavität III	114.06	75.57	1
Xenon	60.80	44.60	-

Tabelle 5-2
Mit castp berechnete Oberflächen und Volumen der inneren Kavitäten von HisF. Die Aussage über die Anzahl der Wassermoleküle in HisF stammt aus der Kristallstruktur von Lang et al. [2000] .

Zwei der Kavitäten (Kavität I und Kavität II) befinden sich links bzw. rechts der Ligandbindefurche am Aktivitätspol von HisF, während Kavität III, begrenzt von den inneren

Beta-Faltblättern von HisF, näher in Richtung der N-terminalen Seite des Proteins liegt. Markiert man nun diejenigen Aminosäuren in der Kristallstruktur [Lang et al., 2000], die eine starke Änderung der chemischen Verschiebung - berechnet als Mittelwert von Δ zuzüglich einer Standardabweichung - unter Xenon-Druck zeigen, so findet man eine deutliche Häufung von stark beeinflussten Resten in der Nachbarschaft der drei inneren Kavitäten von HisF (vgl. Abb. 5-4).

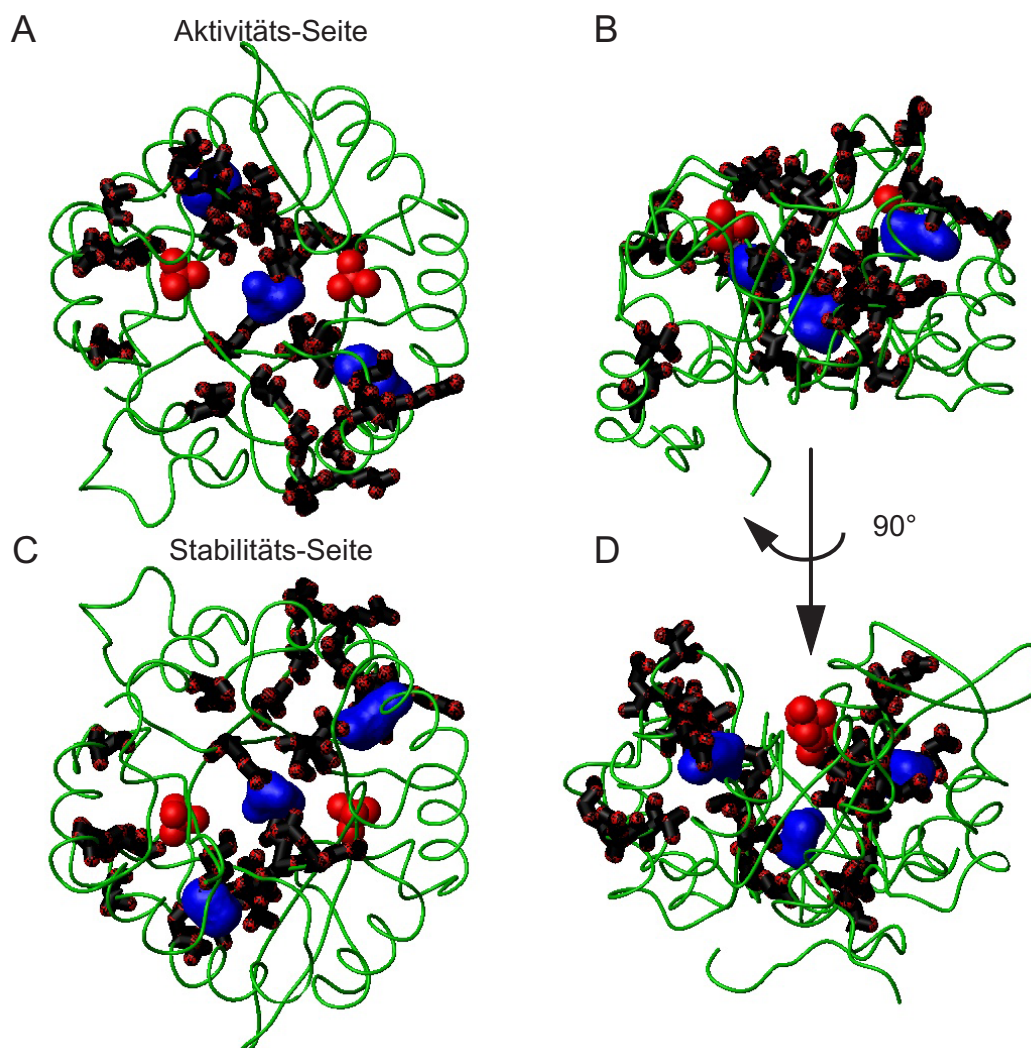


Abb. 5-4 Aminosäurereste mit starker Beeinflussung durch die Xenon-Bindung. Aminosäurereste die starke Xenon-induzierte chemische Verschiebungen (schwarz-rot) zeigen, finden sich vor allem um die drei internen Kavitäten (blau) von HisF. Gebundenes Phosphat ist zur besseren Orientierung wiederum rot dargestellt. Die Abbildung zeigt HisF vom Aktivitätspol (A) und vom Stabilitätspol (C) aus. Die räumliche Anordnung der interagierenden Reste, lässt sich vor allem in der Seitenansicht (B,D) gut erkennen: Bedingungen: 1.1 mM ^{15}N -HisF; 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298\text{ K}$; zusätzlich 11 bar Xenon-Druck; Kristallstruktur: 1THF [Lang et al., 2000].

28 Reste zeigen nach obigem Kriterium eine starke Xenon-induzierte Änderung der chemischen Verschiebung. Nur 10 dieser Reste sind mehr oder weniger zufällig über die Oberfläche des Proteins verstreut. Von dieser Gruppe besitzen 6 Aminosäuren einen hydrophoben Charakter, was eine Interaktion ihrer Seitenketten mit Xenon erklären könnte.

Die anderen 18 Aminosäuren befinden sich alle in der Nachbarschaft der drei internen Kavitäten von HisF. Zwei Signale (Asp183, Ser201) erfahren darüber hinaus eine starke Linienverbreiterung unter Anwendung von Xenon-Druck. Beide grenzen an Kavität II (vgl. Tab. 5-3). In dieser Kavität sind auch die gemessenen Δ -Werte am höchsten (bis zu 0.4 ppm).

	Interagierende Aminosäurereste
Kavität I	Val79,Gly80,(Val56),Lys58,Arg59,
Kavität II	Leu170,Thr171,(Ile173),(Asp174),(Ser180),Asp183,Ala200,Ser201
Kavität III	Thr78,Glu46,Glu167,Gly166,Leu169
weitere	Asp14,Val12,Val18,Val66,Glu67,Lys68,Ala205,Gly205,Val234,Leu241

Tabelle 5-3

Aminosäurereste mit starker Xenon-induzierter chemischer Verschiebung Δ finden sich vor allem um die berechneten Kavitäten. Die überwiegende Anzahl der verbleibenden interagierenden Aminosäuren ist hydrophob. Asp183 und Ser201 zeigen eine starke Linienverbreiterung. Bedingungen: 1.1 mM ¹⁵N-HisF; 50 mM Tris/HCl; pH=7.5; T= 298 K; zusätzlich 11 bar Xenon-Druck.

Aufgrund der von einer Kugel abweichenden Form der Kavitäten kann nur die Kavität II Xenon vollständig aufnehmen. Es ist allerdings bekannt, dass Kavitäten sich etwas weiten können, um ein Xenon-Atom zu binden [Gröger et al., 2003; Möglich et al., 2004]. Nach der Kristall-Struktur [Lang et al., 2000] befinden sich in allen Kavitäten Wassermoleküle (vgl. Tab. 5-2). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Wände der Kavitäten, neben einer überwiegenden Anzahl von hydrophoben Resten, auch durch einige hydrophile Aminosäuren ausgekleidet werden. Es ist allerdings bekannt, dass Xenon trotz seiner Vorliebe für hydrophobe Regionen auch an amphiphile Bereiche binden kann [Xu & Tang, 1997].

5.4. Untersuchung der Interaktionen zwischen NH₃ und HisF

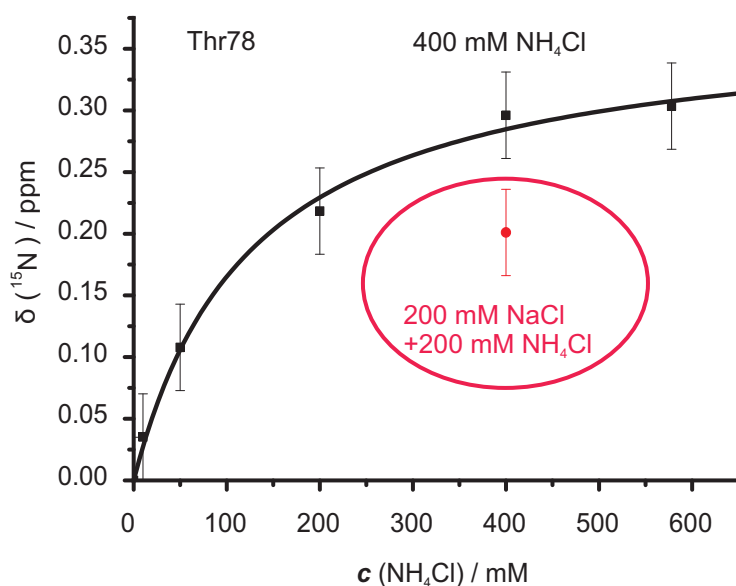
Die zentral gelegene Kavität III ist schon seit längerem als möglicher Transportweg von NH₃ zwischen den aktiven Zentren von HisH und HisF bekannt [Chaudhuri et al., 2001]. Wir untersuchen daher die Änderungen in der chemischen Verschiebung der Signale im [¹H,¹⁵N]-HSQC-Spektrum mit steigender Konzentration von Ammoniumchlorid (0 mM, 10 mM, 50 mM, 200 mM, 400 mM, 578 mM). Insbesondere sind die Reste, die die drei internen Kavitäten begrenzen von Interesse. Sollte ein Bindevorgang stattfinden, so ist zu erwarten, dass die Veränderungen der chemischen Verschiebungen das typische Sättigungsverhalten zeigen. Tatsächlich lassen sich insbesondere die ¹⁵N-chemischen Verschiebungen dieser Reste durch ein „Zwei-Zustands-Modell“ beschreiben.

Kavität I	K_D / mM	σ / mM	Kavität II	K_D / mM	σ / mM	Kavität III	K_D / mM	σ / mM
Arg59	-	-	Thr171	-	-	Glu46	-	-
Met62	-	-	Ser172	-	-	Val48-1	94	36
Leu63	285	94	Tyr182	-	-	Val48-2	109	31
Val79	161	79	Asp183	-	-	Thr78	127	29
Gly80	-	-	Ile187	-	-	Lys99	-	-
Gly81	109	31	Met186	-	-	Val126	127	65
Ile83	189	139	Ala200	-	-	Glu167	94	36
Thr88	129	41	Ser201	-	-	Leu169	94	36
Leu92	-	-	Gly202	290	65	Ile199	-	-
-	-	-	-	-	-	Leu222	-	-

Tabelle 5-4

Beschreibung der ¹⁵N-chemischen Verschiebungen mit steigender Ammoniumchlorid-Konzentration durch ein „Zwei-Zustands-Modell“. Fehlende Werte lassen sich nicht durch das Modell beschreiben oder aufgrund von Überlappung der entsprechenden Signale nicht ermitteln: Bedingungen: 1.2 mM ¹⁵N-HisF; 50 mM Tris/HCl; *pH*=7.5; *T*= 298 K; zusätzlich 0 mM, 10 mM, 50 mM, 200 mM, 400 mM, 578 mM NH₄Cl.

Dies steht in Übereinstimmung mit der Vorstellung, dass ein Bindungsvorgang beobachtet wird. Allerdings besitzt HisF auf seiner Oberfläche zahlreiche geladene Bereiche sowie die beiden Phosphatbindestellen, die auf Änderungen der Ionenstärke reagieren können. Um diese Ionenstärke-Effekte von der Bindung von NH₃ zu unterscheiden wird eine Probe mit 200 mM NaCl und 200 mM NH₄Cl mit einer Probe, die ausschließlich 400 mM NH₄Cl enthält, verglichen. Zwischen diesen beiden Proben treten signifikante Unterschiede, berechnet als Mittelwert von $\Delta\delta$ zuzüglich einer Standardabweichung, bei den ¹⁵N-chemischen Verschiebungen von 14 Aminosäuren auf.

**Abb. 5-5**

^{15}N -chemische Verschiebung von Thr78 mit steigender Ammoniumchlorid-Konzentration. Die Daten lassen sich mit einem „Zwei-Zustands-Modell“ beschreiben (schwarz). Der Datenpunkt für die gemischte Probe mit 200 mM NaCl / 200 mM NH_4Cl (rot) unterscheidet sich signifikant von der Probe mit gleicher Ionenkonzentration an reinem NH_4Cl . Bedingungen: 1.2 mM ^{15}N -HisF; 50 mM Tris/HCl; $\text{pH}=7.5$; $T=298\text{ K}$.

Davon sind 8 Aminosäuren hydrophob, vier ungeladen hydrophil und zwei geladen. Thr78 ist die einzige Aminosäure in Kavität III, welche durch den Austausch von NaCl gegen NH_4Cl beeinflusst wird (vgl. Abb. 5-5). Sechs weitere Aminosäuren (Ile73, Glu71, Ala70, Glu67, Gly80, Ala97) liegen in der Nähe von Thr78 in β -Faltblatt 3 und den α -Helices 2 und 3. Die Größe des beobachteten Effekts (0.095 ppm) ist bei Glu71 und Thr78 in dieser Proteinregion bei weitem am größten. Den größten Effekt insgesamt besitzt Leu241 mit 0.116 ppm. Andere Aminosäuren wie Cys9 bleiben dagegen unbeeinflusst (vgl. Abb. 5-6). Für Cys9 bewirken NaCl und NH_4Cl also denselben Effekt.

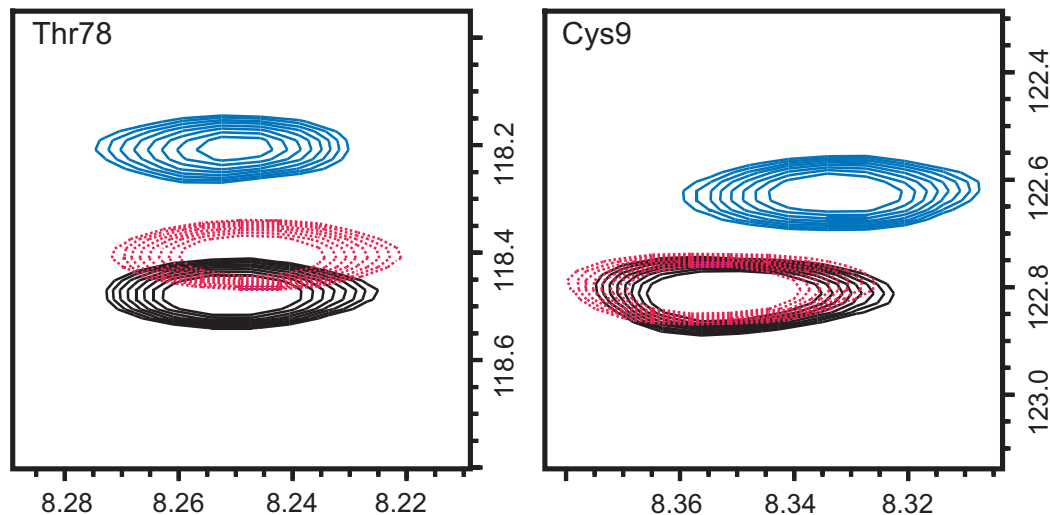


Abb. 5-6 Effekte von NaCl und NH_4Cl auf die chemischen Verschiebungen im $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum. Thr78 unterscheidet zwischen NaCl (rot) und NH_4Cl (schwarz), während die Effekte für Na^+ und NH_4^+ bei Cys9 vergleichbar sind. Die Positionen der Signale ohne Salzzugabe sind in blau dargestellt. Bedingungen: 1.2 mM ^{15}N -HisF; 50 mM Tris/HCl; $p\text{H}=7.5$; $T=298\text{ K}$.

5.5. Diskussion

5.5.1. Kavitäten von HisF und Xenon-Bindung

Die vorliegenden Daten zeigen eindeutig, dass HisF aus *Thermotoga maritima* Xenon spezifisch bindet. Darüber hinaus zeigt sich, dass insbesondere Aminosäuren, die in der Nachbarschaft der drei internen Kavitäten von HisF liegen, durch die Xenon-Bindung beeinflusst werden. Die Xenon-induzierten chemischen Verschiebungen Δ sind kleiner als im Falle anderer Proteine wie HPr(I14A) [Gröger et al., 2003; Möglich et al., 2004]. Allerdings sind die Hohlräume in HisF relativ groß, so dass im Gegensatz zu HPr(I14A) nur geringe strukturelle Veränderungen bei der Xenon-Bindung notwendig sind und daher auch geringere Änderungen in der chemischen Verschiebung erwartet werden können.

Es ist bekannt, dass Hohlräume in Proteinen Bewegungen auf molekularer Ebene erleichtern, was wiederum als Voraussetzung für Konformationsänderungen [Jänicke, 1999] gilt. Im Falle von HisF könnten solche Konformationsänderungen für die Substratbindung, Katalyse, die Signalübermittlung zwischen HisH und HisF, sowie den NH_3 -Transport notwendig sein. Der Ligand ImGP ändert allerdings die Xenon-Bindefähigkeit von HisF nicht. Jedoch besitzt ImGP im Gegensatz zum natürlichen Substrat PRFAR nur eine Phosphatgruppe und bindet daher gleichzeitig immer nur an eine Phosphatbindestelle. Die ausgelösten Veränderungen könnten daher geringer sein als im Falle des natürlichen Liganden.

5.5.2. NH_3 -Transport durch Kavität III

Unter den 14 Aminosäuren, die zwischen NH_3 / NH_4^+ und Na^+ unterscheiden können, sind nur zwei geladen. Das spricht dafür, dass in diesen Fällen tatsächlich Wechselwirkungen zwischen dem ebenfalls ungeladenen NH_3 und HisF detektiert werden. Im Falle von Thr78 gibt es allerdings noch eine andere Erklärung. Zwei geladene Aminosäuren auf der Oberfläche von HisF (Glu71, Glu67) beeinflussen möglicherweise andere Aminosäuren in ihrer Nachbarschaft, die in β -Faltblatt 3 sowie den α -Helices 2 und 3 liegen (Glu67, Ala70, Ile73, Thr78, Gly80, Ala97). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass der bei Thr78 beobachtete Effekt in Wirklichkeit durch die Veränderungen an Glu71 und Glu67 ausgelöst wird. Moleküldynamik-Simulationen [Amaro et al., 2003, 2005] weisen darauf hin, dass die konservierten Aminosäuren Thr78, Ser101 und Ser201 als Ammoniak-Relais beim Transport des Moleküls durch den intramolekularen Tunnel fungieren könnten. Während Ser101 die Substratbindefurche auskleidet, zeigt Thr78 mit seiner Seitenkette in die Kavität III und Ser201 bildet die Wand von Kavität II. Eine Bindung von NH_3 an Thr78, wie sie obiges Experiment nahelegt, stimmt mit der Vorstellung eines schrittweisen Transportes durch das Innere von HisF überein. Der durch die Titration von HisF mit Ammoniumchlorid bestimmte $K_D(\text{NH}_4^+)$, beträgt 127 ± 29 mM. Berücksichtigt man das Gleichgewicht zwischen NH_3 und NH_4^+ in wässriger Lösung, erhält man $K_D(\text{NH}_3) = 2.2 \pm 0.5$ mM. Daten für Ser101 können aufgrund von Signalüberlappung nicht aufgenommen werden. Allerdings zeigt das in der Wand von Kavität III gelegene Ser201, eine starke Linienverbreiterung unter Xe-Druck. Diese Kavität könnte somit für den NH_3 -Transport von Bedeutung sein indem sie Konformationsänderungen ermöglicht.

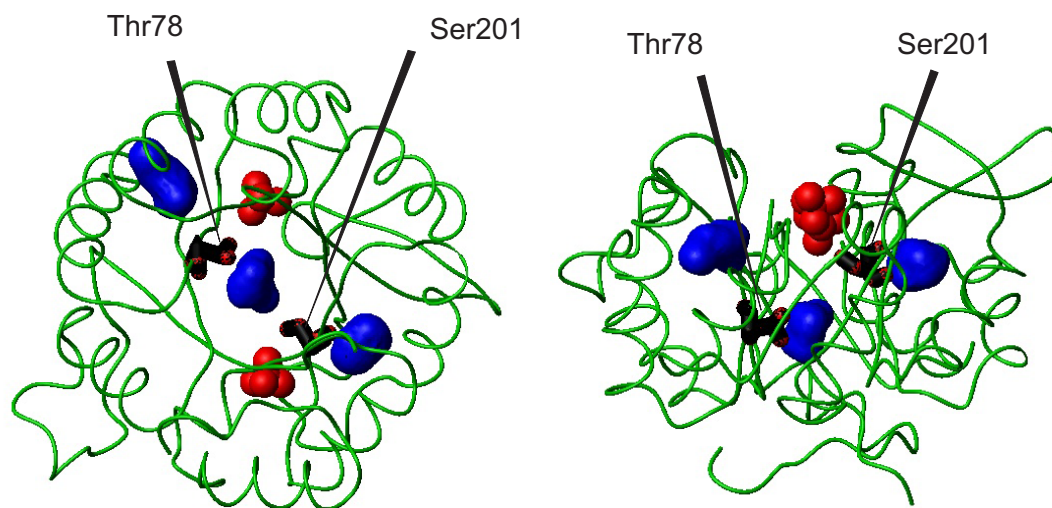


Abb. 5-7 Postulierte Stationen des NH_3 -Transportes in der Kristallstruktur (1THF; [Lang et al., 2000]) von HisF. Ser201 und Thr78 zeigen beide starke Xenon-induzierte Verschiebungen bzw. Signalverbreiterung. Thr78 darüber hinaus auch eine Wechselwirkung mit NH_3 . Beide Aminosäuren könnten in Übereinstimmung mit früheren Überlegungen am Transport von NH_3 durch das Innere von HisF beteiligt sein.

Ein ähnlicher Vorschlag wurde bereits für den Transport kleiner Liganden in Myoglobin gemacht [Brunori & Gibson, 2001].

Die Hemmung der Histidinbiosynthese stellt ein mögliches antibiotisches Prinzip zur Bekämpfung von Bakterien dar, das in speziellen Fällen bereits Anwendung gefunden hat [Breitbach et al., 2008; Gomez & Neyfakh, 2006]. Es sei darauf hingewiesen, dass die Kavitäten ein mögliches Ziel für neue Medikamente darstellen könnten. Es ist bereits gezeigt worden, dass kleine Moleküle Xenon-bindende Kavitäten besetzen können [Rubin et al., 2002]. Sollten die Kavitäten tatsächlich für die Funktion des Proteins essentiell sein, könnte das Enzym gehemmt werden, indem man die Kavitäten mit kleinen organischen Molekülen blockiert.

6. Methoden

6.1. Proteinexpression und Synthese von ProFAR

Die Proteinexpression und Aufreinigung sowie die Synthese von ProFAR wird freundlicherweise von Mitgliedern des Lehrstuhles Prof. Dr. Sterner in Regensburg, insbesondere von Dr. Felix List durchgeführt.

6.1.1. Heterologe Expression und Aufreinigung des Proteins

^1H , ^{15}N -markierte Probe

Zellen aus *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene) werden mit pET11c-hisF transformiert und in 1L Minimalmedium mit 150 μg /mL Ampicillin inkubiert. Das Minimalmedium enthält 7.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3 g KH_2PO_4 , 0.5 g NaCl, 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 0.014 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Nach dem Autoklavieren werden 1 g $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, 10 g Glukose und 10 ml Stammlösung von Spurenelementen (50 mg EDTA, 20 mg $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 mg MnCl_2 , 30 mg H_3BO_3 , 20 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) zugesetzt. Das Protein wird von der löslichen Fraktion des Rohextraktes durch einen Hitzeschritt (20 min bei 70°C) abgetrennt. Anschließend wird eine Anionenaustauschchromatographie mit einer MonoQ-Säule durchgeführt (HR 16/10, 20 ml, Pharmacia), die zuvor mit 50 mM Tris/HCl equilibriert wurde. Die Elution erfolgt mit dem Equilibrierungspuffer und einem linearen NaCl-Gradienten (0-1.5 M NaCl). Die Elutionsfraktionen werden vereinigt und gegen 50 mM Tris/HCl $\text{pH}=7.5$ dialysiert.

Herstellung der ^{15}N , ^{13}C Probe und der ^{15}N , ^{13}C perdeuterierten Probe

Expression und Aufreinigung erfolgen analog zum vorangegangenen Abschnitt. Statt 50 mM Tris/HCl $\text{pH}=7.5$ wird jedoch 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer $\text{pH}=7.5$ verwendet und statt Minimalmedium ein Vollmedium (Silantes): *E.Coli*-OD2 CN bzw. *E.Coli*-OD2 CDN für perdeuteriertes Protein.

Die Synthese von ProFAR sowie die Proteinexpression von HisF und verschiedenen HisH-Varianten erfolgt wie beschrieben [List, 2010].

6.2. Substanzen

KH_2PO_4 (p.a.)	Merck (Darmstadt)
K_2HPO_4 (p.a.)	Merck (Darmstadt)
NaCl (p.a.)	Merck (Darmstadt)
NH_4Cl (p.a.)	Merck (Darmstadt)
NH_4NO_3 (p.a.)	Merck (Darmstadt)
Tricin (analytical)	Gerbu Biotechnik GmbH
Tris (ultrapure)	usb corp. Cleveland, Ohio
Guanidinium Chlorid	Gerbu Biotechnik GmbH (Gaiberg)
0.1 N HCl	Merck (Darmstadt)
0.1 N NaOH	Merck (Darmstadt)
L-Histidin (99%)	Fluka (Neu-Ulm)
L-Glutamin (99 %, TLC)	Sigma Aldrich (Deisenhofen)
NAD^+	Merck (Darmstadt)
ImGP	Toronto Research chemicals (North York),
$^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$	Cambridge Isotope laboratories, GB
D_2O (99.9 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DSS	Cambridge Isotope laboratories, GB

6.3. NMR-Spektrometer

Alle Messungen werden an drei Spektrometern mit den Feldstärken 500 (Bruker DMX 500)-, 600 (Bruker DRX 600)- und 800 (Bruker DMX 800) MHz durchgeführt. Am 600 MHz- und 800 MHz-Spektrometer wird mit einem 5 mm CPTXI 1H-13C/15N/2H Z-GRD Z44866/0124, bzw. einem 5 mm CPTCI 1H-13C/15N/D Z-GRD Z44909/0002 Probenkopf gemessen. Bei 500 MHz wird für heteronukleare ^1H -, ^{15}N -Spekren ein 5 mm QXI 1H/31P/D-13C/15N Z8319/0013 für die ^{14}N und die ^{129}Xe -Messungen ein 10 mm BBO BB-1H Z01435/11023 Probenkopf eingesetzt.

6.4. Temperatureichung

Die Kalibrierung der Spektrometertemperatur erfolgt mit MeOH/HCl in D_2O [Van Geet, 1968].

6.5. Referenzierung der chemischen Verschiebung

6.5.1. ^1H -, ^{15}N -, ^{13}C -chemische Verschiebung

Die chemische Verschiebung von ^1H wird auf DSS, die von ^{15}N und ^{13}C indirekt nach Wishart et al. [1995] referenziert.

6.5.2. ^{129}Xe -chemische Verschiebung

Die chemische Verschiebung von ^{129}Xe wird extern auf die Verschiebung im entsprechenden Puffer referenziert.

6.5.3. ^{14}N -chemische Verschiebung

Die chemische Verschiebung von ^{14}N wird extern auf das Nitratsignal von 0.1 M NH_4NO_3 referenziert [Witanowski et al., 1993].

6.6. Pulsprogramme

HSQC-Experimente

Für die heteronuklearen [^1H - ^{15}N] bzw. [^1H - ^{13}C]-Single-Quanten-Korrelationspektren werden folgende Pulsprogramme verwendet:

- Eine Version von Frank Schumann erweitert um eine zusätzliche Vorsättigung für die Wasserunterdrückung: *trocyf3gppsi19pr.fs*
- Die Originalversion von Bruker: *trocyf3gppsi19*
- Aus Gründen des besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wird am 500 MHz-Spektrometer auf eine TROSY-Version verzichtet und stattdessen das Bruker-Pulsprogramm *hsqcetf3gpsi* verwendet.
- Für den Aromatenbereich des ^1H - ^{13}C -HSQC wird das Bruker-Pulsprogramm *hsqcetgpsi* eingesetzt.

Experimente für die sequentielle Zuordnung

- Für die dreifach ^2H -, ^{15}N -, ^{13}C -markierten Proben werden die Bruker Pulsprogramme *trhncagp2h3d2* (HNCA), bzw. *trhncacbgp2h3d* (HNCACB) zusammen mit der Option für deuteriertes Protein verwendet.
- Für die doppelt ^{15}N -, ^{13}C -markierten Proben werden die Bruker Pulsprogramme *hncagp3d* (HNCA), *trcbcaconhgp3d* (CBCACONH), *trhncocagp3d* (HNCOCA), *trhncogp3d* (HNCO) verwendet.

^{13}C -detektiertes CACO-Spektrum

In einem Bruker Pulsprogramm für ein COCA-Spektrum (*c_coca*: INEPT-Transfer von CO auf C_α) werden verschiedene Parameter so variiert, dass ein CACO (INEPT-Transfer von C_α auf CO) entsteht. Setzt man die Konstanten *cnst21* und *cnst22* auf 37 bzw. 175.5 ppm (d.h. man vertauscht die Anregungsfrequenzen für die selektiven Pulse) und *o1* ebenfalls auf 175.5 ppm so erreicht man bereits eine Anregung der C_α und einen

Transfer auf die CO. Durch Verringerung der Anregungsbreite für die selektiven Pulse auf 18 ppm mit Hilfe des shape-tool kann man außerdem erreichen, dass nur noch C_β , C_γ und zusätzlich die C_α Atome des Glycins angeregt werden. Auf diese Weise erhält man ein Spektrum, dass abgesehen von Glycin nur die Signale von Carbonyl-Kohlenstoffen in Seitenketten zeigt.

6.7. Puffer

6.7.1. Kalium-Phosphat-Puffer

Herstellung von 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer $pH=7.5$ erfolgt aus Mischen entsprechender Stammlösungen der Base K_2HPO_4 und der Säure KH_2PO_4 .

6.7.2. Tricin/KOH für ^{14}N -Messungen der NH_3 -Freisetzung

Die Herstellung von 50 mM Tricin/KOH erfolgt durch Lösen von N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin in Wasser und anschließende Einstellung des pH mit KOH auf 8.0.

6.7.3. Tricin-Puffer für Zuordnung

Die Herstellung von 50 mM Tricin/KOH erfolgt durch Lösen von N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin in Wasser und anschließende Einstellung des pH mit KOH auf 7.5.

6.7.4. Tris/HCl für die Ligandtitrationen und die $[^1H, ^{15}N]$ -HSQC-Messungen unter Xenon-Druck

Die Herstellung von 50 mM Tris/HCl erfolgt durch Lösen der Base in Wasser und anschließende Einstellung des pH mit HCl auf 7.5.

6.8. pH-Messungen

Alle pH -Messungen werden mit einem pH -Meter (Beckmann Φ 340 pH Temp Meter) pH -Meter mit einer für Proteinlösungen geeigneten Elektrode (Hamilton Spintrode P) vermessen.

6.8.1. Proteinproben für Zuordnung, Ligandtitrationen, $[^1H, ^{15}N]$ -HSQC unter Xenon-Druck

Der pH -Wert wird unmittelbar vor der Messung nach dem letzten Konzentrationsschritt bestimmt, da sich der pH meist dabei noch einmal in Richtung einer basischen Lösung verschiebt.

6.8.2. pH-Titration

Die pH -Werte werden vor und nach der Messung bestimmt. Für die Auswertung wird der Mittelwert verwendet.

6.8.3. Messung des pH in D₂O

Die Werte für pH -Messungen in D₂O werden unkorrigiert verwendet [Bundi, 1979].

6.9. Bestimmung der Proteinkonzentration

6.9.1. photometrische Konzentrationsbestimmung mit UV-Spektroskopie

Es werden molare Extinktionskoeffizienten bei $\lambda=280$ nm von $11460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (natives HisF) und $10810 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (denaturiertes HisF) verwendet [Pace et al., 1995; Gill & von Hippel, 1989].

6.10. Auswertung mit Computerprogrammen

6.10.1. Prozessierung und Darstellung von NMR-Daten

Die Prozessierung der Daten erfolgte mit dem Programmpaket topspin (Bruker) die Darstellung und Auswertung mit Auremol [Gronwald et al., 2002].

6.10.2. Auswertung der Ligandtitrationen mit Matlab

Alle Daten für die Ligand-Titrationen (ImGP, ProFAR, NH₄Cl) werden mit einem einfachen „Zwei-Zustands-Modell“ beschrieben. Das Signal $S(c)$ (chemische Verschiebungsänderung $\Delta\delta$, „combined chemical shift“ $\Delta\delta_{komb}$, Änderung des Signalvolumens δV) wird mit durch den apparenten K_D und einen Skalierungsfaktor B in Abhängigkeit von der Konzentration des Liganden beschrieben.

$$S(c) = B * \frac{c}{c + K_D} \quad (6.1)$$

Matlab berechnet zusätzlich einen Standard-Fehler für die Abweichung zwischen experimentellen Daten und Modell sowie die Standardabweichung des Parameters K_D .

6.10.3. Maple

Maple wird für die Planung der Ligandtitrationen, pH -Wert-Berechnungen, Berechnungen der Ionenstärke und die Entwicklung eines Modelles für den Einbau markierten ¹⁵N in unmarkiertes Glutamin verwendet.

6.10.4. Origin

Origin wird für die Datenvisualisierung, die Berechnung der Kurven für die pK_a -Wert Bestimmung und lineare und nichtlineare Regression verwendet. Darüber hinaus wird es für den „globalen fit“ mehrerer Datensätze an dasselbe Modell verwendet. Die Funktion „frequency count“ wird verwendet, um auszuzählen wie oft ein bestimmter Wert in einem definierten Intervall vorkommt.

6.10.5. MolMol

Alle Abbildungen der Kristallstruktur von HisF (mit Ausnahme 6-1) werden mit MolMol dargestellt [Koradi et al., 1996].

6.11. Zuordnung

Für die Zuordnung von 0.9 mM perdeutertem Protein in 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer werden 2 HNCA-Spektren bei 800 MHz ($pH=7.5$) und 600 MHz ($pH=7.2$), sowie ein HNCACB-Spektrum bei 800 MHz ($pH=7.5$) aufgenommen. Für die Überprüfung der Zuordnung in 50 mM Tricin ($pH=7.4$) wird bei 600 MHz ein HNCA-Spektrum aufgenommen. Die Proben enthalten zusätzlich 0.54 % 10 mM DSS und 9 % D_2O . Die Temperatur beträgt 298 K. Der Austausch des Phosphatpuffers gegen Tricin erfolgt mit einem Konzentrator (Vivaspin 6 MWCO, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen). Die Probenlösung wird 8 Mal aufkonzentriert und nach jedem Schritt mit dem Ziel-Puffer aufgefüllt.

SF	pH	Puffer	Experiment	1H -TD	^{15}N -TD	^{13}C -TD	1H -SW	^{15}N -SW	^{13}C -SW
600	7.4	T	HNCA	2048	64	128	13.98	36	40
800	7.5	P	HNCA	2048	64	128	13	37	40
800	7.5	P	HNCACB	2048	80	64	13	37	75
600	7.2	P	HNCA	2048	64	128	13.98	36	40

Tabelle 6-1

Übersicht über die experimentellen Parameter der Zuordnungsexperimente. SF: Spektrometerfrequenz, T: 50 mM Tricin, P: 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer, TD: Anzahl der Datenpunkte, SW: spektrale Breite.

Bei der in dieser Arbeit erstellten Zuordnungen und der von [Lipchock & Loria, 2008] publizierten wurden unterschiedliche Referenzierungsverfahren (auf DSS bzw. H_2O) verwendet. Daher werden zunächst die Differenzen für die chemischen Verschiebungen der Protonen und der Stickstoffe getrennt berechnet. Nach Korrektur um den Mittelwert wird die „combined chemical shift“ [Schumann et al., 2007] wie im Kapitel (Zuordnung Seite 13) angegeben berechnet. Beim Vergleich der in dieser Arbeit erstellten Zuordnungen untereinander wird keine Korrektur vorgenommen.

6.12. Ligandbindung an HisF und Aktivierung von HisH

6.12.1. ^{14}N -Experimente zur Detektion des aus der HisH-Reaktion freigesetzten NH_3

Experiment

Probenzusammensetzung:

Alle Proben werden in 50 mM Tricin/KOH $pH=8$ hergestellt und enthalten 0.1 mM Glutamin und 2.7 % D_2O . Die Proben für die Endpunktmessungen enthalten zusätzlich: 50 /50 μM WT-HisH/HisF bzw. 50 /50 μM Y138A-HisH/HisF. Die zugehörige Probe für die Kinetik von Y138A enthält 50 /63 μM Y138A-HisH/HisF. Die Proben zur Bestimmung des NAD^+ -Effektes enthalten zusätzlich 10 mM NAD^+ und jeweils 50 /50 μM Y138A-HisH/HisF bzw 50 /50 μM WT-HisH/HisF. Die Probe für den Einfluss der NAD^+ -Konzentration auf den WT-HisH enthält zusätzlich 45 /68 μM WT-HisH/HisF.

NMR-Experiment:

Die ^{14}N -Detektion erfolgt bei 500 MHz (Breitband-Probenkopf 10 mm) und $T=298\text{ K}$ mit Hilfe eines einfachen zg in 5 mm Röhrchen mit einem Füllvolumen von 500-600 μL . Die Referenzierung erfolgt extern auf das Nitrat-Signal von 0.1 M NH_4NO_3 [Witanowski et al., 1993]. Die Quantifizierung des NH_3 -Signales erfolgt mit Hilfe von Vergleichslösungen bekannten NH_4NO_3 Gehaltes.

Auswertung

Die Hydrolseraten unter den verschiedenen Messbedingungen werden mit Origin durch lineare Regression bestimmt.

6.12.2. $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum in Anwesenheit von NAD^+

Experiment

1.1 mM ^{15}N -HisF in 50 mM Tris/HCl bei $T=298\text{ K}$ mit 10 % D_2O und 0.6 % 10 mM DSS enthält 45 mM NAD^+ bei $pH=7.5$ und wird mit einem NAD^+ -freien Referenzspektrum unter sonst gleichen Bedingungen verglichen. Die TROSY-HSQC-Spektren (*tro-syf3gppsi19pr.fs*) werden bei 800 MHz mit 1048 (spektrale Weite: 13.9 ppm) in Protonenrichtung und mit 512 Datenpunkten (spektrale Weite: 36 ppm) in Stickstoffrichtung aufgenommen.

Auswertung

Die Änderungen der chemischen Verschiebung werden als „combined chemical shift“ berechnet. Als Grenzwert für signifikant von der NAD^+ -Bindung betroffene Reste wird $2 \cdot \sigma_{\text{kor}}^*$ verwendet.

6.12.3. Nachweis der Rückreaktion für die Spaltung von Glutamin

Experiment

Die Proben enthalten in 50 mM Tris/KOH Glutamin mit einer Anfangskonzentration von $c_0(\text{Gln})=0.1$ M, 500 mM $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$, 8.7 % D_2O und 0.52 % 10 mM DSS bei $pH=8.5$; und $T=298$ K sowie zusätzlich entweder WT-HisH-HisF je 50 μM + 10 mM NAD^+ oder Y138A-K181A-HisH/HisF 3.1/6.2 μM . Das 1D-TROSY- $[\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum (*trotyf3gpppsi19pr.fs*) wird bei 600 MHz mit 2048 Datenpunkten (Spektrale Weite 14 ppm) aufgenommen, wobei jeweils 1024 FID aufsummiert werden (ns=1024).

Modell der Rückreaktion

Das hier verwendete vereinfachte Modell wird durch folgenden Differentialgleichungen beschrieben:

$$\frac{dc(\text{Glutamin})}{dt} = -k * c(\text{Glutamin})(t) \quad (6.2)$$

$$\frac{dc(\text{Gln}_{15})}{dt} = -k * c(\text{Gln}_{15})(t) + k * r * c(\text{Glutamin})(t) \quad (6.3)$$

Die Abnahme der Glutaminkonzentration pro Zeiteinheit ist proportional zur Glutaminkonzentration ($c(\text{Glutamin})$) mit der Geschwindigkeitskonstante k . Die Änderung der Konzentration markierten Glutamins ($c(\text{Gln}_{15})$) erfolgt vereinfacht mit der gleichen Geschwindigkeitskonstante k . Es ist also nicht berücksichtigt, dass manche Enzyme zwischen unterschiedlichen Isotopen unterscheiden können. Die Entstehung markierten Glutamins pro Zeiteinheit ist wiederum proportional zur Konzentration unmarkierten Glutamins und zur Geschwindigkeitskonstante k mit der dieses umgesetzt wird. Bei jeder Reaktion kann Glutamin, statt mit H_2O zu Glutamat und NH_3 gespalten zu werden, mit $^{15}\text{N-NH}_3$ zu ^{15}N -markierten Glutamin und unmarkiertem NH_3 zurückreagieren. Die Häufigkeit dieses Vorganges wird mit r ausgedrückt. Es wird vereinfachend angenommen, dass r eine Konstante ist. r hängt sicherlich vom Konzentrationsverhältnis zwischen markiertem und unmarkiertem NH_3 ab, gegen Ende der Reaktion ist die Näherung also sicher nicht mehr gültig. Außerdem geht auch die Zugänglichkeit von NH_3 zum aktiven Zentrum von HisH mit ein sowie evtl. der Reaktivitätsunterschied zwischen NH_3 und H_2O . Man könnte sich vorstellen, dass HisH-Varianten, die ein „Loch“ in der Nähe der Kontaktfläche besitzen eine verbesserte Zugänglichkeit von NH_3 zum aktiven Zentrum gewährleisten. Damit würden sie ein größeres r besitzen als solche bei denen das nicht der Fall ist. Alternativ könnte NH_3 auch anstelle von H_2O zwischen den beiden Untereinheiten mit eingeschlossen werden. r wäre in diesem Fall ein Maß für die Wahrscheinlichkeit mit der das passiert. Die Schwierigkeit besteht darin r für Enzyme zu bestimmen, die praktisch keinen Umsatz haben, wie WT-HisH.

Mit den Anfangsbedingungen $c(\text{Glutamin})(0)=c_0$ und $c(\text{Gln}_{15})(0)=0$ findet Maple als Lösung folgende Gleichung:

$$c(\text{Gln}_{15})(t) = c_0 * k * r * t * e^{(-k*t)} \quad (6.4)$$

Die Beschreibung der Daten mit obigem Modell erfolgt mit Origin.

6.12.4. ImGP-Titration

Experiment

0.8 mM ^{15}N -HisF in 50 mM Tris/HCl bei $T=298\text{K}$ mit 10 % D_2O und 0.6 % 10 mM DSS enthalten in aufsteigender Konzentration 0.5, 1, 3, 8, 12 mM ImGP bei $\text{pH}=7.5$ und werden mit einem ImGP-freien Referenzspektrum unter sonst gleichen Bedingungen verglichen. Die TROSY-HSQC-Spektren (*trosyf3gppsi19pr.fs*) werden bei 800 MHz mit 2096 (spektrale Weite: 13.9 ppm) in Protonenrichtung und mit 512 Datenpunkten (spektrale Weite: 36 ppm) in Stickstoffrichtung aufgenommen.

Auswertung

Zur Bewertung der Güte des „Zwei-Zustands-Modelles“ wurden folgende Kriterien herangezogen. A) Es sind mehr als 4 der insgesamt 6 Datenpunkte vorhanden. B) Der Quotient aus Standard-Fehler und der Amplitude \mathbf{B} ist kleiner 0.1. C) K_D -Werte liegen nicht an den Grenzen des Definitionsbereiches (0, 4000 mM).

Datensätze die diese Kriterien nicht erfüllen werden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

6.12.5. ProFAR-Titration

Experiment

1 mM ^{15}N -HisF in 50 mM Tris/HCl bei $T=298\text{K}$ mit 10 % D_2O und 0.6 % 10 mM DSS enthalten in aufsteigender Konzentration 200, 410, 829, 1846 μM ProFAR bei $\text{pH}=7.5$ und werden mit einem ProFAR-freien Referenzspektrum unter sonst gleichen Bedingungen verglichen. Die TROSY-HSQC-Spektren (*trosyf3gppsi19pr.fs*) werden bei 800 MHz mit 2096 (spektrale Weite: 13.9 ppm) in Protonenrichtung und mit 256 Datenpunkten (spektrale Weite: 36 ppm) in Stickstoffrichtung aufgenommen.

Auswertung

Auswertung anhand der „combined chemical shift“ Die Daten werden mit dem oben erwähnten „Zwei-Zustands-Modell“ beschrieben. Zur Bewertung ob der Güte des „Zwei-Zustands-Modelles“ wurden folgende Kriterien herangezogen. A) Es sind mehr als 3 der insgesamt 5 Datenpunkte vorhanden. B) Der Quotient aus Standard-Fehler und der Amplitude \mathbf{B} ist kleiner 0.1. C) K_D -Werte liegen nicht an den Grenzen des Definitionsbereiches (0, 4000 μM).

Datensätze die diese Kriterien nicht erfüllen werden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Auswertung anhand der Volumina der aufgespaltenen Signale Es werden nur eindeutig aufgespaltene Signale für die Auswertung verwendet. Folgende Kriterien werden angewandt: 1) unzweifelhafte Zuordnung 2) keine Signalüberlappung 2) Zugehörigkeit des

neu entstehenden Signals eindeutig (nicht zu viele Signale in der Umgebung) 3) nicht weniger als vier Datenpunkte 4) der zweite Zustand darf erst mit Bindung des Liganden auftreten (betrifft Gly136).

Die Volumina der Signale und der zugehörige Fehler werden mit Auremol berechnet. Das Volumen des neu entstehenden Signals wird durch das Gesamtvolumen der beiden Signale geteilt. Der Fehler für den berechneten Quotienten wird aus den Auremol-Volumenfehlern bei einer ProFAR-Konzentration von 1846 μM nach der Fehlerfortpflanzung berechnet.

6.13. pK_a -Werte ausgewählter protonierbarer Gruppen in HisF

6.13.1. Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wird anhand von Vergleichsproben bekannten Gehaltes über das Integral von DSS bestimmt.

6.13.2. Auswertung

Die Auswertung erfolgt nach der modifizierten Hill-Gleichung [Markley, 1975] wie im Ergebnisteil (pK_a -Werte ausgewählter protonierbarer Gruppen in HisF Seite 56) beschrieben.

6.13.3. Zuordnung der Histidin-Signale

0.4 mM ^{13}C , ^{15}N -HisF in 20 mM Tris/HCl/150 mM KCl bei $pH=6.99$ und $T=298$ K mit 0.52 % 10 mM DSS werden mit einem Standard Bruker [^1H , ^{13}C]-HSQC Pulsprogramm (*hsqcetgpsi*) vermessen. Das Spektrum wird bei 800 MHz mit 8192 in Protonenrichtung (spektrale Weite: 12 ppm) und mit 256 Datenpunkten in ^{13}C -Richtung (spektrale Weite: 40 ppm) mit einem offset der Anregungsfrequenz für ^{13}C von $\omega_2=120$ ppm aufgenommen.

6.13.4. pH-Titration in 50 mM KP-Puffer

[^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum

0.5 mM ^{15}N , ^{13}C -HisF in 50 mM Phosphatpuffer bei $T=298$ K mit 9 % D_2O und 0.54 % 10 mM DSS werden mit 0.1 N HCl und 0.1 N NaOH titriert. Die TROSY-HSQC-Spektren (*trofys3gpppsi19pr.fs*) werden bei 800 MHz mit 1048 (spektrale Weite: 13.9 ppm) in Protonenrichtung und mit 64 Datenpunkten (spektrale Weite: 36 ppm) in Stickstoffrichtung aufgenommen.

CACO-Spektrum

0.4 mM ^{15}N , ^{13}C perdeutiertes -HisF in 50 mM Phosphatpuffer bei $T=298$ K mit 9 % D_2O und 0.18 % 10 mM DSS werden mit 0.1 N HCl und 0.1 N NaOH titriert. Die CACO-

Spektren werden bei 800 MHz mit 1024 Datenpunkten (spektrale Weite: 25 ppm) in der Richtung der CO und mit 82 Datenpunkten (spektrale Weite: 25 ppm) in der Richtung der C α aufgenommen.

6.13.5. pH-Titration in 50 mM Tris/HCl

0.3 mM ^{15}N -HisF in 50 mM Tris/HCl bei $T=298$ K mit 9 % D_2O und 0.54 % 10 mM DSS werden mit 0.1 N HCl und 0.1 N NaOH titriert. Zwei Messpunkte werden zusätzlich in Anwesenheit von 75 mM Na_2SO_4 aufgezeichnet. Die TROSY-HSQC-Spektren (*tro-syf3gpphsi19pr.fs*) werden bei 800 MHz mit 1048 (spektrale Weite: 13.9 ppm) in Protonenrichtung und mit 512 Datenpunkten (spektrale Weite: 36 ppm) in Stickstoffrichtung aufgenommen.

6.13.6. pH-Titration in 20 mM Tris/HCl/150 mM KCl in D_2O

0.8 mM HisF in 20 mM Tris/HCl/150 mM KCl in D_2O bei $T=298$ K mit 0.52 % 10 mM DSS werden mit 0.1 N DCl und 0.1 N NaOD titriert. Es werden eindimensionale ^1H -Spektren mit „excitation sculpting“ (Bruker Pulsprogramm *zgpgw5*) zur Wasserunterdrückung verwendet. Dabei werden bei 600 MHz 65k Datenpunkte (spektrale Weite: 13,9 ppm) aufgenommen. H_2O wird durch Lyophilisation entfernt und anschließend durch D_2O ersetzt.

6.14. Xenon-Bindung und intramolekularer Substrat-Transport

6.14.1. Proteinkonzentration

Alle Proteinkonzentrationen in diesem Kapitel werden mit UV-Spektroskopie bestimmt.

6.14.2. Messung der ^{129}Xe -chemischen Verschiebung

Alle Proben werden in 50 mM Tris/HCl bei $pH=7.5$ und $T=298$ K mit 10 % D_2O und 0.6 % 10 mM DSS hergestellt. Die Konzentrationen werden jeweils vor und nach der Messung photometrisch bestimmt und der Mittelwert bestimmt. Die Probe mit Ligand enthält zusätzlich 13 mM ImGP (Toronto Research chemicals, Canada), die denaturierte Probe 6 M Guanidiniumchlorid. Wahrscheinlich aufgrund der hohen Salzkonzentration kann für letztere Probe nicht auf D_2O „gelockt“ werden, daher wird der „lock“ abgeschaltet. Die Messung erfolgt bei 500 MHz mit einem einfachen *zg*. Die Auswertung erfolgt durch lineare Regression unter Origin.

Hochdruckapparatur

Für alle Experimente unter Xenon-Druck wird eine Apparatur aus einer Titanhülse mit Saphirröhrchen (Saphicon, USA) ähnlich der von Baumer et al. [2003] verwendet. Die Probe wird über den sogenannte Pumpstand mit einem definierten Volumen verbunden, das mittels einer Hochvakuumpumpe evakuiert und anschließend mit einem definierte Xenon-Druck (natürliche Häufigkeit; Xenon 4.0 \geq 99.99 %, Linde Gas AG, Deutschland) befüllt werden kann. Die ^{129}Xe -chemische Verschiebung ist druckabhängig, daher wird der Druck nach Beendigung der Messung jeweils in ein definiertes Volumen entlassen. Der Druck in diesem Volumen wird gemessen (Sensor Ceravac CTR 90 0.01...100 Torr; Center One instrument, Leybold Vakuum GmbH, Deutschland). Nur Proben bei denen die Abweichung unter 5 % liegt werden akzeptiert.

6.14.3. [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektren

[^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektren unter 11 bar Xenon Druck

1.1 mM ^{15}N -HisF in 50 mM Tris/HCl bei $p\text{H}$ =7.5 und T =298 K mit 8 % D_2O und 0.45 % 10 mM DSS werden unter 11 bar Xenon-Druck gemessen und mit dem Xenon-freien Referenzspektrum verglichen. Die HSQC-Spektren (*hsqcetf3gpsi*) werden bei 500 MHz mit 2048 (spektrale Weite: 16.0 ppm) in Protonenrichtung und mit 512 Datenpunkten (spektrale Weite: 36 ppm) in Stickstoffrichtung aufgenommen.

Auswertung Die Unterschiede zwischen der Xenon-freien und der Probe unter 11 bar Xenon-Druck werden als „total induced chemical shift“ berechnet (vgl. Kapitel *Xenon-Bindung und intramolekularer Substrat-Transport* Seite 75). Als signifikant gelten Veränderungen, die den Mittelwert um eine Standardabweichung überschreiten.

[^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektren in Anwesenheit von NH_4Cl und NaCl

1.2 mM ^{15}N -HisF in 50 mM Tris/HCl bei $p\text{H}$ =7.5 und T =298 K mit 10 % D_2O und 0.6 % 10 mM DSS werden in Anwesenheit von 10,50,200,400,578 mM NH_4Cl bzw. von 200 mM NH_4Cl + 200 mM NaCl gemessen und mit dem Referenzspektrum verglichen. Die HSQC-Spektren (*hsqcetf3gpsi*) werden bei 800 MHz mit 2096 (spektrale Weite: 13.9 ppm) in Protonenrichtung und mit 512 Datenpunkten (spektrale Weite: 36 ppm) in Stickstoffrichtung aufgenommen.

Auswertung Die Auswertung anhand eines „Zwei-Zustands-Modelles“ erfolgt mit Hilfe von Matlab (siehe oben). Für den Vergleich zwischen NH_4Cl und NaCl wird die Differenz der ^{15}N -chemischen Verschiebungen gebildet. Als signifikant gelten Veränderungen, die den Mittelwert um ein Standardabweichung überschreiten.

6.14.4. Berechnung der Kavitäten

Die in der Kristallstruktur (1THF Lang et al. [2000]) vorhandenen inneren Kavitäten werden mit Hilfe von HOLLOW [Ho & Gruswitz, 2008] und Pymol [DeLano, 2002] visualisiert. Die Berechnung der Volumina erfolgt mit dem Webserver castp [Dundas et al., 2006] nach einem „rolling sphere algorithm“ mit einer Kugel von 1.4 Å Radius.

A. Zuordnung

Zuordnung in 50 mM Phosphatpuffer bei pH=7.2

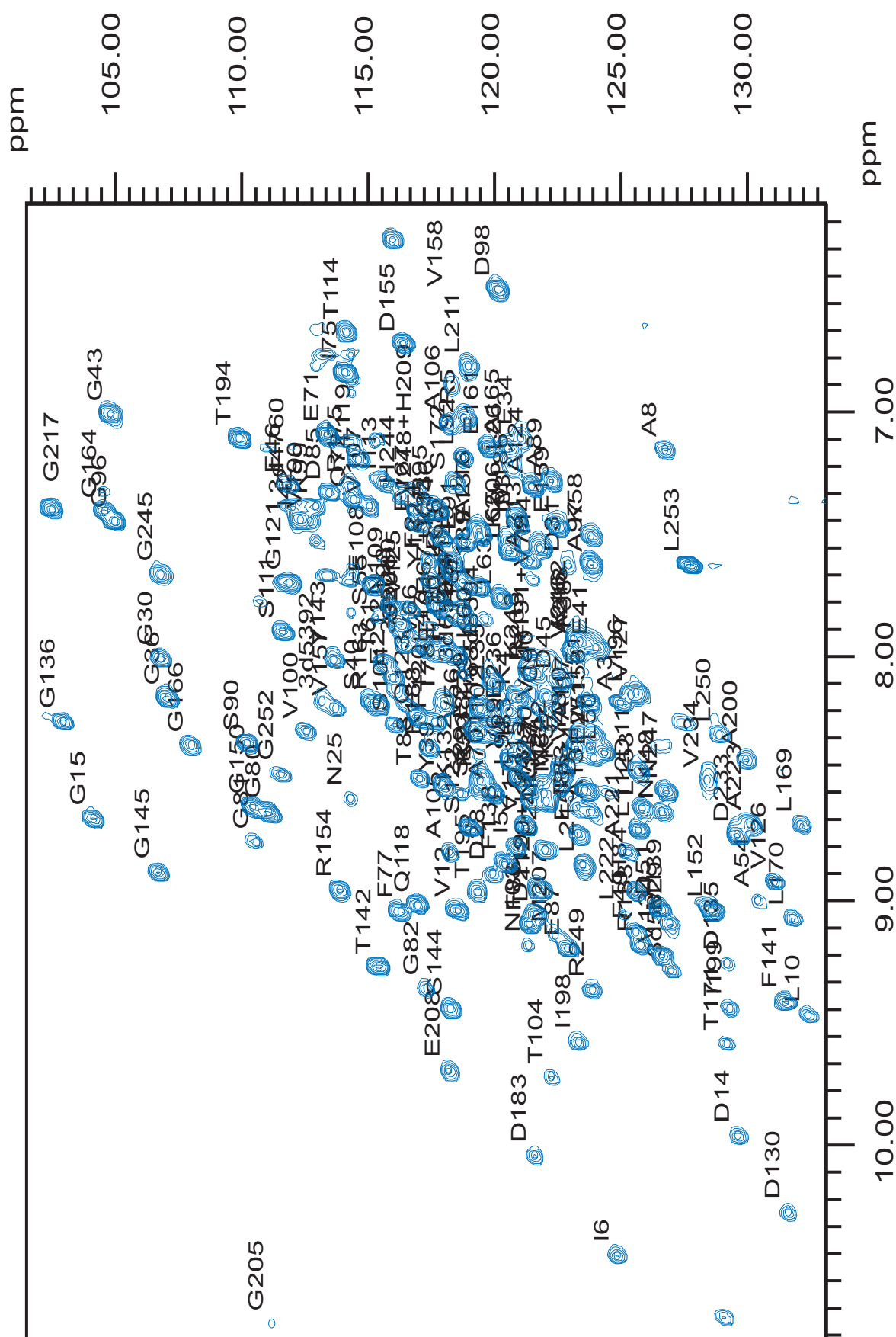


Abb. 1-1 Zugeordnetes $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum. 600 MHz; 0.9 mM ^{15}N , ^{13}C perdeuteriertes HisF; 298 K; $p\text{H}=7.2$; 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer.

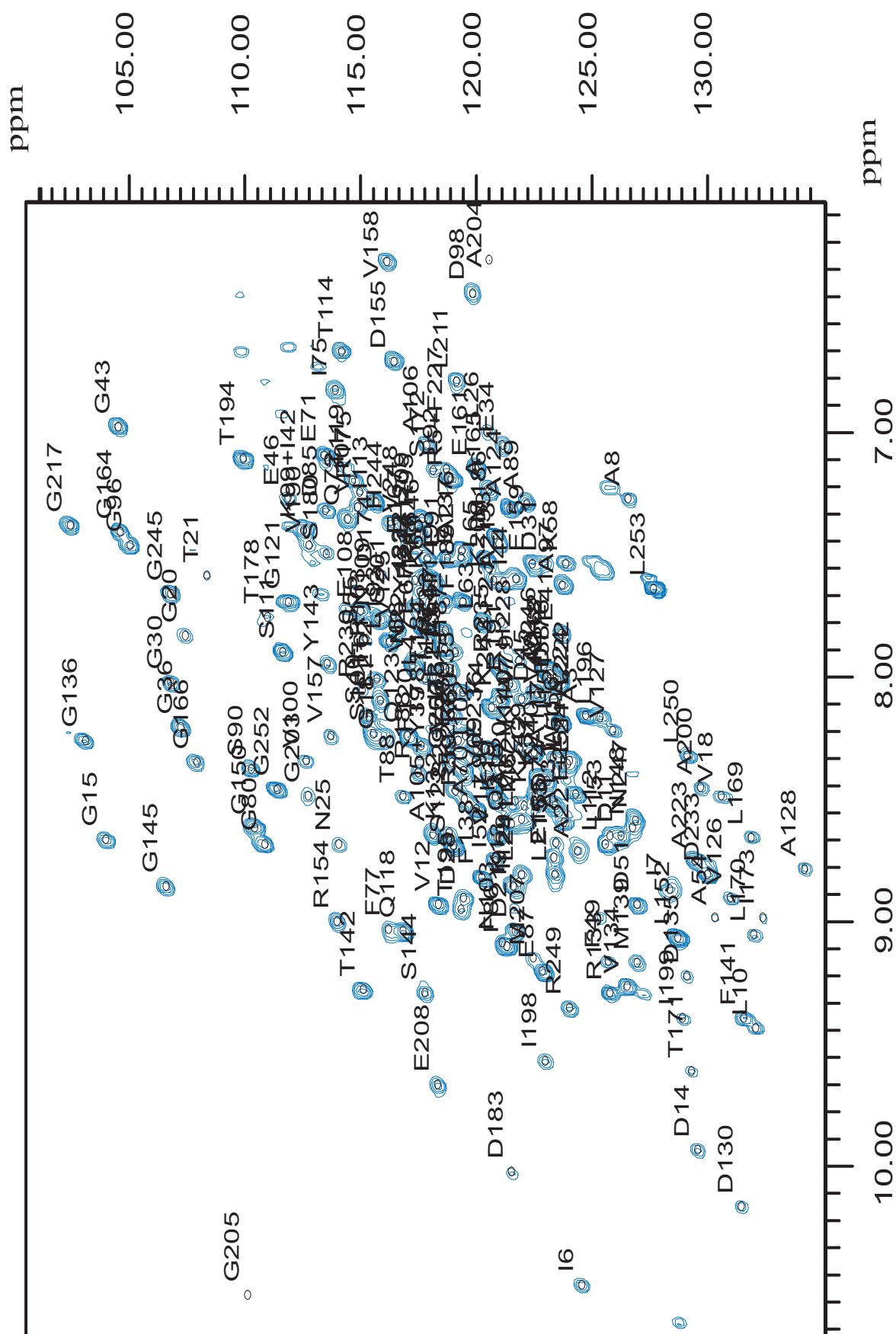


Abb. 1-2 Zugeordnetes $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum. 600 MHz; 0.9 mM ^{15}N , ^{13}C perdeuteriertes HisF; 298 K; $pH=7.4$; 50 mM Tricin.

$[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum in 50 mM Tris/HCL bei pH=7.5

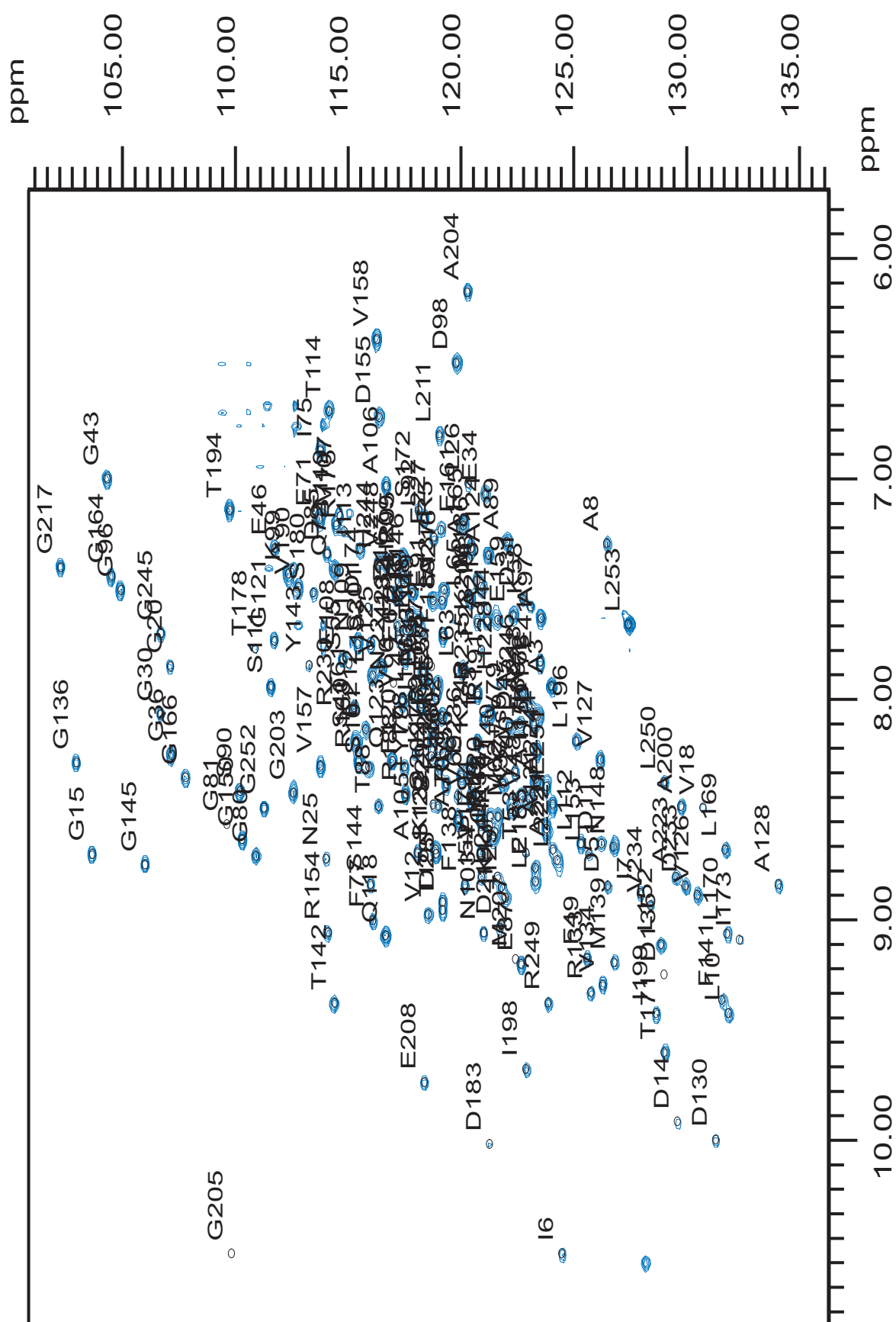


Abb. 1-3 800 MHz; 1 mM ^{15}N -HisF; 298 K; pH=7.5; 50 mM Tris/HCl.

A.1. Zuordnungstabelle

No.	Aminosäure	C α -P	C α -T	C β -P	CO-P	H N -P	N H -P	H N -T	N H -T
1	MET	-	-	-	-	-	-	-	-
2	LEU	54,68	54,8	41,32	177,13	-	-	-	-
3	ALA	51,63	51,68	17,74	177,99	8,19	124,96	8,16	124,72
4	LYS	53,12	53	29,89	176,36	8,17	120,94	8,12	120,66
5	ARG	54,84	54,8	33,7	174,55	7,02	118,75	7,19	118,93
6	ILE	58,82	58,71	36,05	174,47	10,45	124,85	10,48	124,56
7	ILE	59,68	59,8	39,4	173,95	-	-	8,87	128,35
8	ALA	49,29	49,25	20,37	174,9	7,15	126,72	7,27	126,56
9	CYS	55,69	55,43	27,55	173,18	8,16	122,03	8,31	122,49
10	LEU	54,68	54,57	41,91	174,04	9,47	132,39	9,43	132,06
11	ASP	53,51	53,86	40,29	176,53	8,46	125,67	8,65	126,24
12	VAL	58,27	58,16	34,87	173,35	9,04	118,56	8,93	118,35
13	LYS	55,23	55,27	35,31	176,79	8,95	121,75	8,85	121,59
14	ASP	55,3	55,43	38,98	175,67	9,96	129,61	9,93	129,56
15	GLY	45,07	45,11	Gly	173,18	8,66	104,14	8,66	103,98
16	ARG	52,1	52,22	31,36	175,84	7,62	118,21	7,59	117,77
17	VAL	62,57	62,54	31,21	-	8,69	121,21	8,66	120,89
18	VAL	-	64,04	-	-	-	-	8,48	130,58
19	LYS	-	57,6	-	-	-	-	8,52	121,17
20	GLY	-	44,64	-	-	-	-	7,83	107,41
21	THR	-	60,07	-	-	-	-	7,58	108,35
22	ASN	-	51,6	-	-	-	-	7,92	117,3
23	PHE	-	58,39	-	-	-	-	7,77	121,09
24	GLU	57,57	57,22	-	175,93	-	-	8,71	124,13
25	ASN	53,27	53,32	36,63	-	8,58	114,3	8,68	114,05
26	LEU	53,51	53,55	-	-	7,21	120,59	7	120,46
27	ARG	57,96	58,32	-	178,08	-	-	-	-
28	ASP	52,57	52,3	40,73	176,79	8,89	119,92	8,9	119,45
29	SER	59,52	59,57	62,85	173,52	8,54	119,26	8,46	119,09
30	GLY	44,13	44,02	Gly	173,26	8,01	106,8	8,02	106,79
31	ASP	50,23	50,35	41,47	-	7,62	122,89	7,54	122,96
32	PRO	64,21	64,25	-	177,9	Pro	Pro	Pro	Pro
33	VAL	65,46	65,43	29,31	177,04	7,81	117,96	7,83	118,51
34	GLU	58,82	58,71	28,43	179,79	7,1	121,02	7,05	121,13
35	LEU	57,1	57,07	40,44	177,82	8,11	119,92	8,06	119,41
36	GLY	47,33	47,46	Gly	176,79	8,17	107,07	8,2	107,22
37	LYS	58,9	58,79	31,21	180,31	8,47	122,66	8,42	122,81
38	PHE	60,54	60,58	37,8	177,22	7,94	123,36	8,04	123,51
39	TYR	58,43	58,94	34,87	-	8,52	117,93	8,64	117,94
40	SER	60,85	60,89	62,27	-	8,19	114,96	8,16	115,34
41	GLU	58,35	58,16	28,72	178,85	7,96	123,99	7,82	123,67
42	ILE	61,55	61,44	36,93	175,58	7,44	112,31	7,4	112,46
43	GLY	44,99	44,96	Gly	174,55	7,01	104,81	6,98	104,52
44	ILE	58,98	58,32	35,46	174,9	7,55	121,76	7,6	121,71
45	ASP	57,26	57,14	41,47	176,19	8,1	122,54	8,07	122,61
46	GLU	53,66	53,86	33,85	-	7,3	111,84	7,27	111,83
47	LEU	52,49	52,46	-	175,15	7,99	117,7	8,01	117,77
48	VAL	60,85	60,6	-	173,18	8,4	123,17	8,4	122,73
49	PHE	55,85	55,82	40,15	174,04	9,12	125,59	9,16	125,7
50	LEU	52,18	52,22	41,91	-	8,39	124,34	8,34	124,02
51	ASP	53,66	53,78	43,66	177,13	9,03	126,49	8,93	126,95
52	ILE	59,99	59,96	36,93	176,19	8,78	120,86	8,75	120,81
53	THR	65,62	65,58	66,96	-	8,61	123,25	8,68	123,43
54	ALA	51,63	51,83	18,32	177,22	8,99	130,39	8,98	130,31
55	SER	59,05	59,18	63,73	-	7,84	115,28	7,84	115,23
56	VAL	64,21	64,25	30,33	176,87	8,31	118,91	8,27	118,98
57	GLU	55,62	55,74	28,72	176,79	7,81	118,67	7,81	118,66
58	LYS	60,23	60,19	32,24	-	7,51	123,79	7,54	123,86
59	ARG	59,13	59,1	28,58	178,76	8,5	119,42	8,5	119,49
60	LYS	58,82	58,79	31,36	178,68	8,22	119,36	8,24	119,52
61	THR	65,85	65,89	67,98	177,22	8,03	115,63	8,01	115,7
62	MET	59,44	59,49	31,51	177,22	8,52	122,46	8,53	122,06
63	LEU	58,12	58,16	40,73	178,76	7,76	120,2	7,77	120,23
64	GLU	58,74	58,71	28,43	178,51	7,84	118,64	7,88	118,63
65	LEU	57,8	57,77	40,29	177,65	7,57	120,55	7,52	120,42
66	VAL	66,87	66,83	30,33	176,61	7,96	117,27	7,95	117,22
67	GLU	59,05	59,02	29,31	179,11	7,8	117,67	7,8	117,65
68	LYS	58,59	58,47	32,09	179,54	7,65	118,28	7,61	118,08
69	VAL	66,32	66,21	30,92	177,56	8,43	120,59	8,42	120,58
70	ALA	54,29	54,25	17,59	179,19	8,55	119,89	8,54	119,99
71	GLU	57,49	57,46	29,6	177,73	7,09	113,36	7,09	113,43
72	GLN	56,24	56,29	31,21	175,33	7,36	114,42	7,35	114,45

siehe folgende Seite

fortgesetzte Tabelle									
No.	Aminosäure	C α -P	C α -T	C β -P	CO-P	H N -P	N H -P	H N -T	N H -T
73	ILE	60,3	60,27	38,24	174,72	8,22	119,36	8,15	118,9
74	ASP	53,19	53,08	41,03	176,27	8,54	123,56	8,53	123,39
75	ILE	58,9	58,86	36,19	-	6,84	114,06	6,83	113,9
76	PRO	62,26	62,22	31,21	175,76	Pro	Pro	Pro	Pro
77	PHE	54,84	54,88	42,35	171,89	9,04	116,29	9,03	116,2
78	THR	59,91	59,88	69,89	-	8,2	117,97	8,21	118,12
79	VAL	58,35	58,55	33,7	173,01	8,03	121,61	8,09	121,95
80	GLY	44,52	44,57	Gly	170,68	8,63	111,06	8,68	110,85
81	GLY	45,23	45,13	Gly	174,98	8,76	110,59	8,61	110,07
82	GLY	46,32	46,44	Gly	174,64	9,36	117,31	-	-
83	ILE	61,79	61,68	34,87	175,76	8,38	120,98	8,3	120,62
84	HIS	53,35	53,55	30,92	173,69	8,96	125,55	8,98	125,26
85	ASP	52,41	52,46	42,49	174,38	7,33	113,44	7,32	113,47
86	PHE	60,85	60,89	38,68	176,79	9,09	121,37	9,1	121,32
87	GLU	60,15	60,19	27,84	178,76	9,19	122,89	9,2	122,84
88	THR	66,09	65,97	67,25	176,1	8,5	117,03	8,48	116,83
89	ALA	54,99	55,03	17,59	177,73	7,28	122,19	7,29	122,18
90	SER	60,3	60,35	62,27	175,41	8,35	110,2	8,38	110,27
91	GLU	58,66	58,63	28,28	178,76	7,53	118,79	7,52	118,74
92	LEU	57,57	57,61	40,44	178,25	7,19	118,71	7,15	118,7
93	ILE	63,35	63,32	36,19	180,91	7,47	120,94	7,45	120,97
94	LEU	57,1	57,14	40,15	179,28	8,5	120,9	8,49	120,81
95	ARG	54,21	54,18	29,01	176,01	7,4	117,66	7,35	117,65
96	GLY	44,05	44,1	Gly	172,83	7,45	104,96	7,46	105,03
97	ALA	51,94	51,99	16,56	176,61	7,62	123,79	7,62	123,7
98	ASP	56,79	56,75	40,73	176,1	6,5	120,12	6,43	119,84
99	LYS	53,04	53,08	-	175,24	7,38	112,93	7,39	112,46
100	VAL	57,18	57,22	33,41	173,52	8,31	112,54	8,34	112,65
101	SER	54,76	54,8	63,88	175,07	8,28	116,1	8,23	115,69
102	ILE	59,44	59,33	41,03	174,12	8,32	119,92	8,29	119,99
103	ASN	53,9	53,86	38,39	179,02	9,18	121,33	9,09	121,13
104	THR	68,43	68,16	-	175,84	9,72	122,23	-	-
105	ALA	53,74	53,78	19,2	179,54	8,8	118,21	8,66	118,08
106	ALA	53,82	53,86	17	177,04	7,05	118,17	7,05	117,84
107	VAL	64,52	64,49	30,48	178,94	7,38	115,04	7,3	114,88
108	GLU	57,73	57,77	28,58	177,22	7,7	115,16	7,73	114,99
109	ASN	50,3	50,27	37,51	-	7,8	115,9	7,76	115,73
110	PRO	65,15	65,11	30,92	178,33	Pro	Pro	Pro	Pro
111	SER	60,85	60,82	61,98	175,58	7,9	111,6	7,9	111,63
112	LEU	57,49	57,54	41,17	178,76	8,71	125,67	8,68	125,58
113	ILE	64,84	64,8	37,95	176,44	7,29	115,67	7,28	115,66
114	THR	64,68	64,64	68,71	175,76	6,67	114,14	6,67	114,17
115	GLN	58,82	58,86	27,99	179,54	8,59	121,41	8,6	121,52
116	ILE	66,01	66,05	37,3	177,73	7,99	118,4	7,99	118,47
117	ALA	54,21	54,18	17,59	181,08	8,31	123,28	8,33	123,31
118	GLN	57,8	57,77	27,4	177,3	9,02	116,96	9,04	116,83
119	THR	65,54	65,5	69,15	-	7,19	114,61	7,19	114,64
120	PHE	58,82	58,71	40,15	175,33	8,26	117,62	8,28	117,61
121	GLY	44,13	44,17	Gly	174,98	7,7	111,88	7,69	111,87
122	SER	62,34	62,3	62,85	174,9	8,69	118,95	8,69	119,02
123	GLN	56,94	56,99	25,65	175,67	8,24	116,96	8,24	117,02
124	ALA	51,94	51,99	18,91	175,41	7,3	121,45	7,31	121,44
125	VAL	60,93	61,05	32,3	173,78	7,81	116,6	7,81	116,63
126	VAL	59,6	59,72	32	175,93	8,92	131,06	8,9	130,97
127	VAL	60,4	60,58	31,21	174,9	8,15	125,59	8,22	125,89
128	ALA	49,68	49,72	18,32	175,5	8,73	134,15	8,79	134,17
129	ILE	59,3	59,49	-	174,04	8,95	121,61	8,84	121,83
130	ASP	52,18	52,07	40	174,38	10,27	131,61	10,16	131,44
131	ALA	49,44	49,49	23,3	176,19	8,63	123,83	8,59	123,78
132	LYS	54,76	54,64	36,19	174,55	8,56	118,64	8,63	118,82
133	ARG	56,01	56,13	28,87	176,36	9,18	125,78	9,29	125,78
134	VAL	61,79	61,75	33,26	-	9,22	126,61	9,26	126,52
135	ASP	55,15	55,11	39,12	175,76	9,25	129,18	9,22	129,1
136	GLY	44,68	44,64	Gly	173,69	8,26	102,93	8,26	103,12
137	GLU	52,96	52,93	31,8	176,27	7,51	119,38	7,51	119,33
138	PHE	57,73	57,61	40	175,67	8,84	120,39	8,82	120,23
139	MET	53,43	53,55	33,85	174,9	9,09	126,92	9,17	126,95
140	VAL	63,12	63,16	31,3	176,61	8,22	121,84	8,29	121,87
141	PHE	55,62	55,66	42,2	176,79	9,41	131,49	9,39	131,56
142	THR	59,37	59,33	69,45	174,55	9,27	115,43	9,28	115,11
143	TYR	59,52	59,49	33,56	176,7	8,01	113,64	7,95	113,55
144	SER	57,41	57,38	60,66	175,76	9,44	118,24	9,29	117,77
145	GLY	44,76	44,8	Gly	173,69	8,88	106,68	8,85	106,59
146	LYS	56,63	56,68	32,82	177,22	7,52	117,89	7,52	117,88

siehe folgende Seite

fortgesetzte Tabelle									
No.	Aminosäure	C α -P	C α -T	C β -P	CO-P	H N -P	N H -P	H N -T	N H -T
147	LYS	54,68	54,72	33,12	174,04	8,59	122,03	8,58	122,02
148	ASN	51,94	52,07	36,49	176,87	8,63	126,61	8,61	126,75
149	THR	63,12	63,08	69,9	176,7	7,7	118,71	7,69	118,7
150	GLY	45,15	45,19	Gly	172,83	8,61	110,43	8,61	110,42
151	ILE	60,23	60,27	38,1	175,33	8,19	123,71	8,18	123,63
152	LEU	54,84	54,88	40,29	178,85	9,04	128,56	9,06	128,71
153	LEU	57,88	57,85	42,05	176,87	8,62	125,82	8,65	125,78
154	ARG	58,04	58,16	29,31	175,84	8,95	113,87	9	113,98
155	ASP	55,69	55,74	40,44	178,85	6,72	116,37	6,71	116,44
156	TRP	57,34	57,46	31,8	176,79	8,33	123,91	8,36	123,94
157	VAL	66,01	65,97	-	175,41	8,21	113,71	8,24	113,7
158	VAL	64,91	64,88	31,36	178,51	6,3	115,94	6,3	116,13
159	GLU	58,43	58,55	28,43	-	7,47	122,46	7,54	122,42
160	VAL	65,77	65,66	-	177,82	-	-	-	-
161	GLU	59,52	59,57	27,55	179,19	7,15	119,69	7,15	119,95
162	LYS	59,05	59,02	31,21	178,94	7,93	123,13	7,99	123,2
163	ARG	55,3	55,5	30,04	177,13	8,19	115,28	8,23	115,41
164	GLY	44,44	44,41	Gly	173,18	7,4	104,57	7,41	104,6
165	ALA	52,26	52,3	18,91	175,15	7,15	120,51	7,24	120,54
166	GLY	45,54	45,43	Gly	174,64	8,36	108,01	8,35	107,92
167	GLU	55,07	55,19	-	173,61	7,46	116,96	7,47	117,14
168	ILE	58,7	58,58	-	173,26	8,24	119,69	8,29	119,91
169	LEU	53,82	53,78	-	174,12	8,69	132,07	8,66	131,87
170	LEU	53,27	53,39	43,58	174,38	9,07	131,76	9,05	131,99
171	THR	60,93	60,97	68,27	174,21	9,58	129,18	9,61	129,29
172	SER	54,52	54,41	62,71	-	7,29	118,36	7,15	118,12
173	ILE	-	63,63	-	-	-	-	8,98	132,38
174	ASP	56,32	56,75	-	-	-	-	7,58	115,85
175	ARG	53,59	53,32	-	-	7,3	114,3	7,24	114,95
176	ASP	-	56,29	-	-	-	-	8,01	123,51
177	GLY	-	45,03	-	-	-	-	-	-
178	THR	-	60,66	-	-	-	-	7,75	110,97
179	LYS	-	55,11	-	-	-	-	-	-
180	SER	-	59,02	-	-	-	-	7,5	113,51
181	GLY	41,63	41,75	-	174,12	-	-	8,27	115,93
182	TYR	58,12	57,85	37,95	176,96	7,69	117,46	7,71	117,41
183	ASP	51,16	51,21	38,98	176,01	10,04	121,57	10,02	121,52
184	THR	64,99	64,96	66,66	176,7	7,98	117,89	8	118,12
185	GLU	59,13	59,1	28,72	179,02	8,72	123,28	8,74	123,35
186	MET	58,27	58,24	33,12	177,56	7,43	120,86	7,42	120,77
187	ILE	65,46	65,5	-	178,08	7,85	118,91	7,9	119,09
188	ARG	59,21	59,25	29,6	178,51	8,37	117,39	8,39	117,38
189	PHE	60,23	60,27	38,83	-	7,72	119,38	7,69	119,41
190	VAL	63,2	63,24	31,1	-	7,45	112,7	7,46	112,77
191	ARG	-	59,57	-	-	8,03	121,47	8,03	121,44
192	PRO	63,98	63,94	30,19	177,3	Pro	Pro	Pro	Pro
193	LEU	54,37	54,33	41,91	175,93	7,86	116,21	7,86	116,24
194	THR	57,34	57,38	69,59	172,58	7,1	109,88	7,11	109,91
195	THR	60,93	60,97	69,3	175,33	8,96	119,34	8,95	119,33
196	LEU	52,96	53	39,56	-	8,16	125,39	8,16	125,35
197	PRO	61,55	61,44	29,9	175,84	Pro	Pro	Pro	Pro
198	ILE	59,37	59,41	40,88	176,1	9,58	123,32	9,57	122,96
199	ILE	58,98	58,94	38,1	174,81	9,44	129,3	9,39	128,9
200	ALA	51,16	51,36	18,91	175,07	8,42	129,93	8,45	129,68
201	SER	57,18	57,14	63	-	7,91	116,49	7,75	116,4
202	GLY	-	44,64	-	-	-	-	8,35	118,94
203	GLY	-	43,94	-	-	-	-	8,48	112,73
204	ALA	-	53,86	-	-	-	-	6,29	120,54
205	GLY	45,07	45,15	-	171,8	10,73	111,17	10,53	110,11
206	LYS	53,74	53,63	35,31	-	7,53	120,55	7,6	120,74
207	MET	61,01	61,05	30,63	178,16	9,14	122,39	9,15	122,45
208	GLU	58,74	58,71	28,28	178,25	9,69	118,17	9,67	118,31
209	HIS	56,24	56,21	30,9	-	7,4	117,11	7,41	117,45
210	PHE	61,55	61,52	38,39	175,93	7,98	118,21	8,05	118,74
211	LEU	58,35	58,47	41,17	177,73	6,81	118,95	6,79	119,13
212	GLU	58,74	58,86	28,87	179,54	8,09	115,98	8,1	115,85
213	ALA	54,99	55,03	15,39	178,94	7,61	121,37	7,61	121,17
214	PHE	59,52	59,33	36,63	180,57	7,61	117,35	7,65	117,57
215	LEU	57,26	57,3	39,71	178,85	8,85	123,48	8,81	123,39
216	ALA	52,49	52,46	18,17	176,44	7,48	119,34	7,48	119,37
217	GLY	43,27	43,39	Gly	174,55	7,4	102,5	7,38	102,45
218	ALA	52,88	52,93	17,15	176,19	7,96	123,21	8,01	123,2
219	ASP	55,38	55,35	42,49	175,07	9,06	121,64	9,04	121,67
220	ALA	49,52	49,57	-	-	8,52	121,8	8,51	121,67

siehe folgende Seite

fortgesetzte Tabelle								
No.	Aminosäure	C α -P	C α -T	C β -P	CO-P	H N -P	N H -P	H N -T
221	ALA	50,69	51,05	-	-	8,8	125,28	8,69
222	LEU	52,1	52,53	44,98	-	9,05	125,04	8,72
223	ALA	51,4	51,6	21,4	-	8,68	130,08	8,75
224	ALA	-	-	-	-	-	-	-
225	SER	-	-	-	-	-	-	-
226	VAL	-	64,02	-	-	-	-	-
227	PHE	-	56,36	-	-	-	7,19	118,79
228	HIS	-	56,99	-	-	-	7,93	121,83
229	PHE	-	55,85	-	-	-	8,48	112,6
230	ARG	-	57,22	-	-	-	8,05	115,07
231	GLU	-	57,85	-	-	-	7,97	118,82
232	ILE	59,13	59,57	40,73	173,52	-	7,6	117,34
233	ASP	52,41	52,53	42,79	-	8,73	129,57	8,81
234	VAL	66,71	66,75	30,04	-	8,5	128,4	8,86
235	ARG	59,52	59,33	-	179,11	8,07	121,49	7,95
236	GLU	58,82	58,86	28,72	179,79	8,22	120,59	8,3
237	LEU	57,34	57,38	-	178,16	8,56	121,96	8,57
238	LYS	61,71	61,83	32,82	178,08	8,48	119,34	8,38
239	GLU	59,52	59,49	28,43	179,02	8,31	119,26	8,26
240	TYR	60,85	60,89	37,95	177,82	8,37	123,17	8,42
241	LEU	57,65	57,69	40	178,94	8,79	122	8,81
242	LYS	58,35	58,47	-	-	8,5	122,35	8,48
243	LYS	58,27	58,32	30,92	177,56	8,06	121,29	8,09
244	HIS	56,79	56,68	28,87	174,55	7,34	116,37	7,37
245	GLY	45,46	45,58	Gly	174,21	7,66	106,8	7,66
246	VAL	61,24	61,21	30,92	175,24	7,98	123,13	7,96
247	ASN	52,57	52,69	36,63	173,95	8,55	126,76	8,59
248	VAL	58,59	58,47	33,85	174,64	7,4	116,83	7,38
249	ARG	55,69	55,66	28,87	176,27	9,36	123,87	9,35
250	LEU	54,05	54,18	43,08	176,01	8,32	128,87	8,32
251	GLU	56,48	56,36	29,16	176,61	8,41	123,91	8,47
252	GLY	44,83	44,88	Gly	173,26	8,48	111,56	8,46
253	LEU	56,09	56,05	42,05	182,32	7,62	127,62	7,64

Tabelle A.1.: Zuordnungstabelle. 50 mM Phosphatpuffer (P): 800 MHz; 0.9 mM ^{15}N , ^{13}C perdeuteriertes HisF; 298 K; $pH=7.5$; 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer 50 mM Tricin (T) 600 MHz; 0.9 mM ^{15}N , ^{13}C perdeuteriertes HisF; 298 K; $pH=7.4$; 50 mM Tricin
CO-P:600 MHz; ^{15}N , ^{13}C HisF; 298 K; $pH=7.5$; 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer

A.2. Vollständigkeit der Zuordnung

Vorliegende Arbeit							Loria et al		
No.	Aminosäure	C α -P	C α -T	C β -P	CO-P	H N -P	H N -T	H N -C α -C β -CO	
	%	90.48	99.21	79.57	77.38	87.45	95.95	96.76	100 97.45 94.84
1	MET								
2	LEU								
3	ALA								
4	LYS								
5	ARG								
6	ILE								
7	ILE								
8	ALA								
9	CYS								
10	LEU								
11	ASP								
12	VAL								
13	LYS								
14	ASP								
15	GLY			G					
16	ARG								
17	VAL								
18	VAL								
19	LYS								
20	GLY								
21	THR								
22	ASN								
23	PHE								

siehe folgende Seite

fortgesetzte Tabelle								
Vorliegende Arbeit							Loria et al	
No.	Aminosäure	C $_{\alpha}$ -P	C $_{\alpha}$ -T	C $_{\beta}$ -P	CO-P	H $_N$ -P	H $_N$ -T	H $_N$ -C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ -CO
24	GLU							
25	ASN							
26	LEU							
27	ARG							
28	ASP							
29	SER							
30	GLY			G				G
31	ASP							
32	PRO					P	P	P
33	VAL							
34	GLU							
35	LEU							
36	GLY			G				G
37	LYS							
38	PHE							
39	TYR							
40	SER							
41	GLU							
42	ILE							
43	GLY			G				G
44	ILE							
45	ASP							
46	GLU							
47	LEU							
48	VAL							
49	PHE							
50	LEU							
51	ASP							
52	ILE							
53	THR							
54	ALA							
55	SER							
56	VAL							
57	GLU							
58	LYS							
59	ARG							
60	LYS							
61	THR							
62	MET							
63	LEU							
64	GLU							
65	LEU							
66	VAL							
67	GLU							
68	LYS							
69	VAL							
70	ALA							
71	GLU							
72	GLN							
73	ILE							
74	ASP							
75	ILE					P	P	
76	PRO					P	P	P
77	PHE							
78	THR							
79	VAL							
80	GLY			G				G
81	GLY			G				G
82	GLY			G				G
83	ILE							
84	HIS							
85	ASP							
86	PHE							
87	GLU							
88	THR							
89	ALA							
90	SER							
91	GLU							
92	LEU							
93	ILE							
94	LEU							
95	ARG							
96	GLY			G				G
97	ALA							

siehe folgende Seite

fortgesetzte Tabelle								
Vorliegende Arbeit								Loria et al
No.	Aminosäure	C α -P	C α -T	C β -P	CO-P	H N -P	H N -T	H N -C α -C β -CO
98	ASP							
99	LYS							
100	VAL							
101	SER							
102	ILE							
103	ASN							
104	THR							
105	ALA							
106	ALA							
107	VAL							
108	GLU							
109	ASN							
110	PRO					P	P	P
111	SER							
112	LEU							
113	ILE							
114	THR							
115	GLN							
116	ILE							
117	ALA							
118	GLN							
119	THR							
120	PHE							
121	GLY			G				
122	SER							
123	GLN							
124	ALA							
125	VAL							
126	VAL							
127	VAL							
128	ALA							
129	ILE							
130	ASP							
131	ALA							
132	LYS							
133	ARG							
134	VAL							
135	ASP							
136	GLY			G				
137	GLU							
138	PHE							
139	MET							
140	VAL							
141	PHE							
142	THR							
143	TYR							
144	SER							
145	GLY			G				
146	LYS							
147	LYS							
148	ASN							
149	THR							
150	GLY			G				
151	ILE							
152	LEU							
153	LEU							
154	ARG							
155	ASP							
156	TRP							
157	VAL							
158	VAL							
159	GLU							
160	VAL							
161	GLU							
162	LYS							
163	ARG							
164	GLY			G				
165	ALA							
166	GLY			G				
167	GLU							
168	ILE							
169	LEU							
170	LEU							
171	THR							

siehe folgende Seite

fortgesetzte Tabelle								
Vorliegende Arbeit							Loria et al	
No.	Aminosäure	C α -P	C α -T	C β -P	CO-P	H N -P	H N -T	H N -C α -C β -CO
172	SER							
173	ILE							
174	ASP							
175	ARG							
176	ASP							
177	GLY							
178	THR							
179	LYS							
180	SER							
181	GLY							
182	TYR							
183	ASP							
184	THR							
185	GLU							
186	MET							
187	ILE							
188	ARG							
189	PHE							
190	VAL							
191	ARG							
192	PRO					P	P	P
193	LEU							
194	THR							
195	THR							
196	LEU							
197	PRO					P	P	P
198	ILE							
199	ILE							
200	ALA							
201	SER							
202	GLY							
203	GLY							
204	ALA							
205	GLY							
206	LYS							
207	MET							
208	GLU							
209	HIS							
210	PHE							
211	LEU							
212	GLU							
213	ALA							
214	PHE							
215	LEU							
216	ALA							
217	GLY			G				G
218	ALA							
219	ASP							
220	ALA							
221	ALA							
222	LEU							
223	ALA							
224	ALA							
225	SER							
226	VAL							
227	PHE							
228	HIS							
229	PHE							
230	ARG							
231	GLU							
232	ILE							
233	ASP							
234	VAL							
235	ARG							
236	GLU							
237	LEU							
238	LYS							
239	GLU							
240	TYR							
241	LEU							
242	LYS							
243	LYS							
244	HIS							
245	GLY			G				G

siehe folgende Seite

fortgesetzte Tabelle								
		Vorliegende Arbeit						Loria et al
No.	Aminosäure	C $_{\alpha}$ -P	C $_{\alpha}$ -T	C $_{\beta}$ -P	CO-P	H $_N$ -P	H $_N$ -T	H $_N$ -C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ -CO
246	VAL	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z Z Z Z
247	ASN	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z Z Z Z
248	VAL	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z Z Z Z
249	ARG	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z Z Z Z
250	LEU	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z Z Z Z
251	GLU	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z Z Z Z
252	GLY	Z	Z	G	Z	Z	Z	Z Z G Z
253	LEU	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z Z Z N

Tabelle A.2.: Die erste Zeile gibt die Vollständigkeit der zugeordneten Signale in % an. N (rot) steht für nicht zugeordnet, Z (blau) steht für zugeordnete Signale. Die Abkürzungen CA,CB,CO,H,N bedeuten C $_{\alpha}$,C $_{\beta}$, CO, H $_N$, N $_H$ während T für 50 mM Tricin,und P für 50 mM Phosphatpuffer steht.

B. Bindung von Liganden

verbreiterte Signale in 0.49 mM ImGP

14, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 28, 53, 58, 59, 62,
81, 129, 130, 144, 173, 174, 175, 176, 178, 179,
181, 183, 202, 204, 230

verbreiterte Signale in 8.24 mM ImGP

5, 9, 10, 11, 12, 14, 18, 19, 20, 22, 23, 25, 26,
28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 37, 41, 46, 47, 49, 51,
52, 53, 55, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 69, 73, 74, 75,
77, 78, 79, 80, 81, 85, 91, 98, 99, 102, 129, 130,
143, 144, 145, 146, 172, 173, 174, 175, 176, 178,
179, 180, 181, 183, 201, 202, 203, 204, 207, 210,
218, 221, 223, 227, 228, 230, 231, 232, 234, 237

Tabelle 2-1

Signale im [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum, die aufgrund von Linienverbreiterung bei 0.49 bzw. 8.24 mM ImGP nicht mehr detektierbar sind. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl; $pH=7.5$; $T=298\text{ K}$; 0.8 mM ^{15}N -HisF.

C. Xenon-NMR-Spektroskopie

Folgende Diagramme zeigen die Befüllung des Xenon-Pumpstandes. Es folgt eine Beschreibung, wie beim Befüllen vorzugehen ist. Allerdings sollte sich jeder immer bewusst machen, welche Konsequenzen, das Öffnen eines Ventils hat, bevor er es tut.

C.1. Probenbefüllung

- Probenhülse zerlegen (maximal drei Teile: Saphirröhrchen, Titanhülse, Verschluss der Titanhülse)
- ca. 400 μl in Saphirröhrchen füllen (Eppendorf-Pipetten; an der Wand herunterlaufen lassen, evtl. in Tischzentrifuge (Mittellabor-NMR) herunterzentrifugieren)
- Saphirröhrchen in Titanhülse einbauen (Achtung: schwarzer Dichtungsring muss einliegen) und mit Schraubenschlüssel fest verschließen
- oberen Schraubverschluss der Titanhülse für Evakuierung des Pumpstandes verschließen (mit Schraubenschlüssel etwa handfest; aber sobald Druck in der Probe ist *fest* mit Schraubenschlüssel verschließen)
- zeitweise muss der weiße Dichtungsstempel am oberen Verschluss der Titanhülse und der schwarze Dichtungsring zwischen Saphirröhrchen und Titanhülse ausgetauscht werden.

C.2. Probenentleerung: Druckkontrolle / Druckabbau

- Probe einbauen
- alle Ventile schließen
- Pumpstand evakuieren (siehe dort)
- wenn 0 bar an S1: V4 öffnen und S2 (empfindlich!) einschalten
- weitere 5 min evakuieren und kontrollieren ob Pumpstand dicht bleibt
- V2 schließen:
- Probe zu Pumpstand öffnen (zwei Schraubenschlüssel gegenläufig drehen): beobachten: wenn es schäumt sofort schließen: möglichst zügig Druck an S2 ablesen

- alle Ventile schließen (v.a. V4!) und S2 abschalten
- Raumdruck über Probe herstellen: H2 öffnen
- falls noch nicht offen: Verschluss der Titanhülse aufdrehen um Raumdruck in der Probe herzustellen
- Probenhülse zerlegen: Flüssigkeit in Epi ausschütteln oder zentrifugieren (kann noch einmal schäumen)
- Röhrchen immer erst mit Wasser spülen (mit Alkohol fallen Proteine aus, schlecht zu reinigen da eng)

C.3. Evakuierung des Pumpstandes

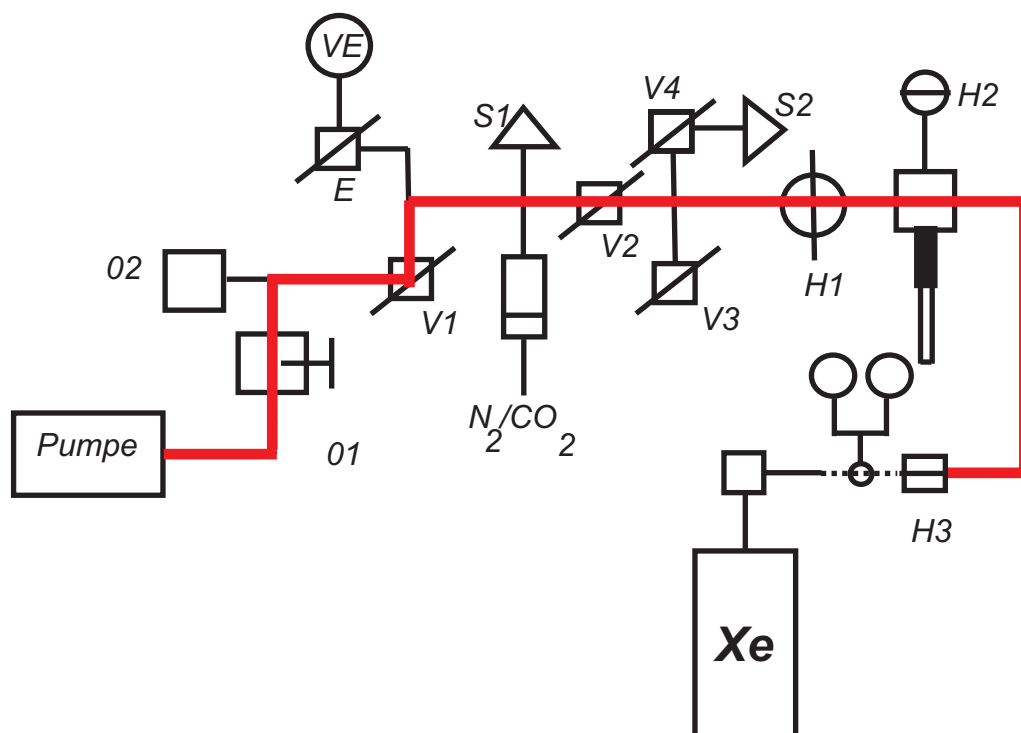


Abb. 3-1 Evakuierung des Gasraumes im Pumpstand bis zur Probenhülse.

- alle Ventile schließen
- Probe einsetzen (Kontrolle ob gegen Pumpstand dicht!)
- Pumpe 20-30 min Laufen lassen
- Messgerät S1 anschalten
- folgende Ventile öffnen: O1, V1, V2, H1
- warten bis S1 Null anzeigt

- definierte Zeit (z.B 30 sec. bei Druckreihen evtl. kürzer) equilibrieren lassen
- Gasraum der Probe gegen Pumpstand **fest** verschließen (2 Schraubenschlüssel! gegenläufig)
- H3 schließen
- H2 vorsichtig öffnen und Druck ablassen (wichtig damit die Probe beim Ausbauen aus dem Pumpstand nicht durch den Gasdruck herausgeschossen wird)

C.5. Originalfoto des Pumpstandes

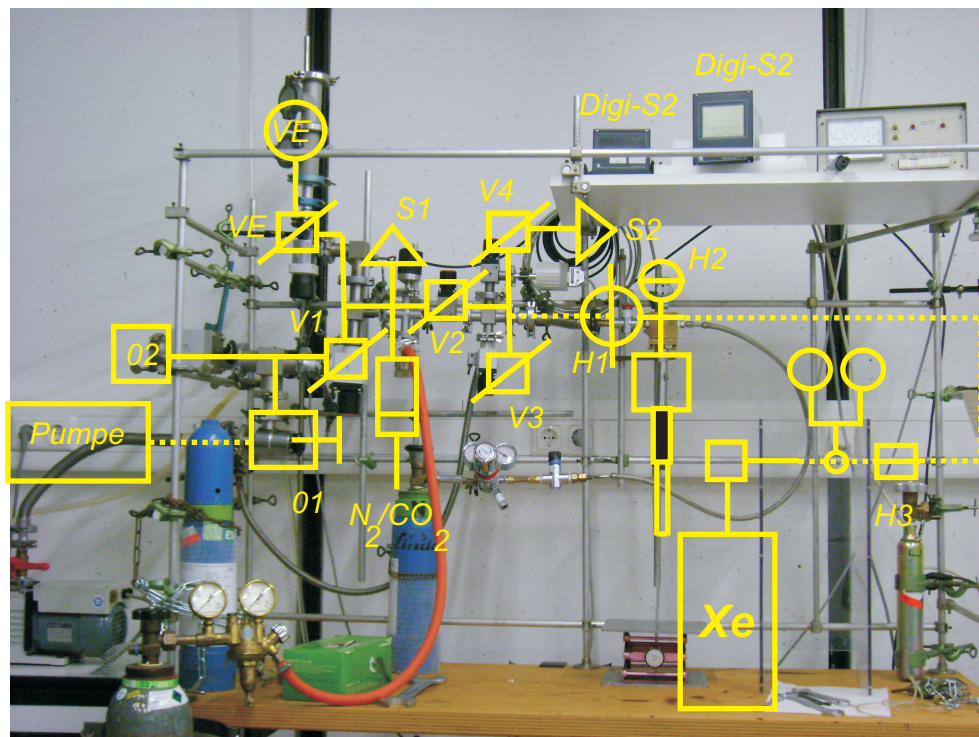


Abb. 3-3 Originalfoto des Pumpstandes.

D. Zusammenfassung

D.1. Zuordnung

In dieser Arbeit wurde eine Zuordnung der chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrates der Imidazolglycerinphosphatsynthase HisF aus *Thermotoga maritima* in Anwesenheit von anorganischem Phosphat erstellt. Diese Zuordnung ergänzt die bereits vorhandene von Lipchock & Loria [2008], die im Phosphat-freien Zustand angefertigt wurde. Der Phosphat-gebundene Zustand von HisF ist sowohl für die Weiterleitung des Bindesignales als auch als Modell für den ligandgebundenen Zustand in Bezug auf den katalytischen Aminosäurerest Asp11 von Interesse (vgl. Ligandbindung und pK_a -Wert Bestimmung).

D.2. Xenon-Bindung und intramolekularer Substrattransport

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HisF das Edelgas Xenon spezifisch bindet. In der zentralen Kavität des Enzymes, für die bereits postuliert wurde, dass sie als Kanal dem intramolekularen Transport von NH_3 dient [Chaudhuri et al., 2001], treten starke Veränderungen der chemischen Verschiebung auf. Selbst ein deutlich größeres Molekül als Ammoniak ist also in der Lage diesen Kanal zu besetzen. Interessanterweise erzeugt Xenon zusätzlich starke Veränderungen der chemischen Verschiebung in zwei seitlich gelegenen Hohlräumen, deren Funktion allerdings bisher unbekannt ist. Für die Aminosäurereste Ser201 und Thr78 wurde bereits zuvor eine Beteiligung am NH_3 -Transport postuliert [Amaro et al., 2003, 2005]. Beide liegen in der zentralen bzw. einer der beiden seitlichen Kavitäten und werden in den aufgenommenen $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren stark durch die Xenon-Bindung beeinflusst. In einer Titration mit NH_4Cl wurden im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum zusätzlich Belege für eine spezifische Interaktion von Thr78 mit NH_4Cl gefunden. Aufgrund des Gleichgewichtes zwischen NH_3 und NH_4^+ könnte dies ein Hinweis auf die Anwesenheit von NH_3 in der zentralen Kavität sein.

D.3. Ligandbindung

Es ist gelungen NAD^+ als neuen aktivierenden Liganden für HisF zu identifizieren. Darüber hinaus konnte mit $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren gezeigt werden, dass anorganisches Phosphat, obwohl es nicht zu einer Aktivierung führt, ausgeprägte strukturelle Veränderungen an

HisF verursacht. Diese Veränderungen sind nicht auf die Phosphatbindestellen selbst beschränkt, sondern setzen sich bis zur gegenüberliegenden Seite des Proteins fort. Überdies wurden in dieser Arbeit erstmalig NMR-Untersuchungen für die Bindung von ProFAR an HisF durchgeführt. ProFAR ist von den bisher untersuchten Effektoren als einziger in der Lage, wie das natürliche Substrat beide Phosphatbindestellen von HisF zu verbrücken. Aus den $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren in Anwesenheit von ProFAR geht eindeutig hervor, dass dieses im Gegensatz zu allen anderen Liganden zum Aufspalten von Signalen führt. Es ist also davon auszugehen, dass HisF im ProFAR-gebundenen Zustand eine andere Konformation einnimmt als im freien. Es ist anzunehmen, dass dieser Zustand die aktive Form des Enzymes darstellt. Die Untersuchungen dieser Arbeit haben den Vergleich zwischen Phosphat und NAD^+ sowie den bereits bekannten Liganden ImGP und ProFAR ermöglicht. Die Auswirkungen der Bindung der einzelnen Effektoren wurden im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum sichtbar. Somit konnte weiter eingegrenzt werden, welche Aminosäurereste für die Aktivierung von HisH durch ligandgebundenes HisF notwendig sind. Interessanterweise findet sich bei dieser Analyse wiederum das bereits aus Mutationsstudien [Myers et al., 2005; List, 2010] als essentiell bekannte Asp98.

D.4. pK_a -Wert Bestimmung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der katalytische Aminosäurerest Asp11 im Phosphat-gebundenen Zustand einen deutlich erhöhten pK_a -Wert nahe des Neutralpunktes besitzt ($pK_a=6.9$). Aufgrund der Nähe einer der beiden Phosphatbindestellen zu diesem Aminosäurerest dient Phosphat als einfaches Modell für die Anwesenheit eines Liganden, da alle bekannte Effektoren ebenfalls über Phosphatgruppen an das Protein binden. NAD^+ scheidet wegen seiner schlechten Affinität zu dieser Bindestelle aus. ImGP und ProFAR konnten ebenfalls nicht verwendet werden, da, wie sich zeigte, das Signal von Asp11 im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum in Anwesenheit dieser Liganden nicht detektierbar war. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die stark konservierten Aminosäurereste His228 und His209 im Gegensatz zu His241 und His84 einen deutlich veränderten pK_a -Wert (kleiner als 5.2 bzw. 2.7) besitzen. Die Bedeutung dieser beiden Aminosäurereste ist bisher unbekannt allerdings liegt His228 in unmittelbarer Nähe des katalytischen Asp11.

Literaturverzeichnis

- R. Amaro, E. Tajkhorshid, & Z. Luthey-Schulten. Developing an energy landscape for the novel function of a (β/α) 8 barrel: Ammonia conduction through HisF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13):7599, 2003.
- R.E. Amaro, R.S. Myers, V.J. Davisson, & Z.A. Luthey-Schulten. Structural elements in IGP synthase exclude water to optimize ammonia transfer. *Biophysical journal*, 89(1): 475–487, 2005.
- R. Anedda, B. Era, M. Casu, A. Fais, M. Ceccarelli, M. Corda, & P. Ruggerone. Evidences of Xenon-Induced Structural Changes in the Active Site of Cyano-MetMyoglobins: A (1) H NMR Study. *The journal of physical chemistry. B*, 2008.
- A.D. Bain. Chemical exchange in NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 43(3-4):63–103, 2003.
- M.J. Banfield, J.S. Lott, V.L. Arcus, A.A. McCarthy, & E.N. Baker. Structure of HisF, a histidine biosynthetic protein from *Pyrobaculum aerophilum*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 57(11):1518–1525, 2001.
- D.W. Banner, A.C. Bloomer, G.A. Petsko, D.C. Phillips, C.I. Pogson, I.A. Wilson, P.H. Corran, A.J. Furth, J.D. Milman, R.E. Offord, et al. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5Å resolution: using amino acid sequence data. *Nature*, 255:609–614, 1975.
- D. Baumer, A. Fink, & E. Brunner. Measurement of the ^{129}Xe NMR Chemical Shift of Supercritical Xenon. *Zeitschrift für Physikalische Chemie/International journal of research in physical chemistry and chemical physics*, 217(3/2003):289–293, 2003.
- S. Beismann-Driemeyer & R. Sterner. Imidazole Glycerol Phosphate Synthase from *Thermotoga maritima*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23):20387, 2001.
- K. Breitbach, J. Köhler, & I. Steinmetz. Induction of protective immunity against *Burkholderia pseudomallei* using attenuated mutants with defects in the intracellular life cycle. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102:S89–S94, 2008.
- M. Brunori & Q.H. Gibson. Cavities and packing defects in the structural dynamics of myoglobin. *EMBO reports*, 2(8):674, 2001.

- A. Bundi, Wüthrich, K.(1979) ^1H -NMR parameters of the common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly-XL-Ala-OH. *Biopolymers*, 18, 1979.
- B.N. Chaudhuri, S.C. Lange, R.S. Myers, S.V. Chittur, V.J. Davisson, & J.L. Smith. Crystal Structure of Imidazole Glycerol Phosphate Synthase:: A Tunnel through a $(\beta\alpha)_8$ Barrel Joins Two Active Sites. *Structure*, 9(10):987–997, 2001.
- B.N. Chaudhuri, S.C. Lange, R.S. Myers, V.J. Davisson, & J.L. Smith. 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):7003–7012, 2003.
- A.T. Clark, K. Smith, R. Muhandiram, S.P. Edmondson, & J.W. Shriver. Carboxyl pKa Values, Ion Pairs, Hydrogen Bonding, and the pH-dependence of Folding the Hyperthermophile Proteins Sac7d and Sso7d. *Journal of molecular biology*, 372(4):992–1008, 2007.
- R.T. Clubb, V. Thanabal, & G. Wagner. A constant-time three-dimensional triple-resonance pulse scheme to correlate intraresidue ^1HN , ^{15}N , and ^{13}C chemical shifts in ^{15}N — ^{13}C -labelled proteins. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 97(1):213–217, 1992.
- W.L. DeLano. The PyMOL molecular graphics system v.099.rc6. USA: DeLano Scientific, San Carlos, 2002.
- A. Douangamath, M. Walker, S. Beismann-Driemeyer, M.C. Vega-Fernandez, R. Sterner, & M. Wilmanns. Structural Evidence for Ammonia Tunneling across the $(\beta\alpha)_8$ Barrel of the Imidazole Glycerol Phosphate Synthase Bienenzyme Complex. *Structure*, 10(2):185–193, 2002.
- L. Dubois, P. Da Silva, C. Landon, J.G. Huber, M. Ponchet, F. Vovelle, P. Berthault, & H. Desvaux. Probing the hydrophobic cavity of lipid transfer protein from *Nicotiana tabacum* through xenon-based NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc*, 126(48):15738–15746, 2004.
- J. Dundas, Z. Ouyang, J. Tseng, A. Binkowski, Y. Turpaz, & J. Liang. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server issue):W116, 2006.
- W.R. Forsyth, J.M. Antosiewicz, & A.D. Robertson. Empirical relationships between protein structure and carboxyl pKa values in proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 48(2):388–403, 2002.

- W.L. Galanter & R.J. Labotka. The binding of nitrate to the human anion exchange protein (AE1) studied with 1^{14}N nuclear magnetic resonance. *Biochimica et biophysica acta*, 1079(2):146, 1991.
- S.C. Gill & P.H. von Hippel. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical biochemistry*, 182(2):319–326, 1989.
- M.J. Gomez & A.A. Neyfakh. Genes involved in intrinsic antibiotic resistance of *Acinetobacter baylyi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11):3562, 2006.
- C. Gröger, A. Möglich, M. Pons, B. Koch, W. Hengstenberg, H.R. Kalbitzer, & E. Brunner. NMR-spectroscopic mapping of an engineered cavity in the I14A mutant of HPr from *Staphylococcus carnosus* using xenon. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(29):8726–8727, 2003.
- W. Gronwald, S. Moussa, R. Elsner, A. Jung, B. Ganslmeier, J. Trenner, W. Kremer, K.P. Neidig, & H.R. Kalbitzer. Automated assignment of NOESY NMR spectra using a knowledge based method (KNOWNOE). *Journal of Biomolecular NMR*, 23(4):271–287, 2002.
- S. Grzesiek & A. Bax. An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins. *Journal of magnetic resonance*, 99(1):201–207, 1992a.
- S. Grzesiek & A. Bax. Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *Journal of the American Chemical Society*, 114(16):6291–6293, 1992b.
- B.K. Ho & F. Gruswitz. HOLLOW: generating accurate representations of channel and interior surfaces in molecular structures. *BMC Structural Biology*, 8(1):49, 2008.
- X. Huang, H.M. Holden, & F.M. Raushel. Channeling of Substrates and Intermediates in Enzyme-Catalyzed Reactions. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1):149–180, 2001.
- R. Jänicke. Stability and Folding of Domain Proteins. *Progress in biophysics and molecular biology*, 71(2):155–241, 1999.
- L.E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, & A. Bax. Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 89(3):496–514, 1990.
- T.J. Klem & V.J. Davisson. Imidazole glycerol phosphate synthase: the glutamine amidotransferase in histidine biosynthesis. *Biochemistry*, 32(19):5177–5186, 1993.
- R. Koradi, M. Billeter, & K. Wüthrich. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of molecular graphics*, 14(1):51–55, 1996.

- M. Kuenzler, T. Balmelli, CM Egli, G. Paravicini, & GH Braus. Cloning, primary structure, and regulation of the HIS7 gene encoding a bifunctional glutamine amidotransferase: cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 175(17):5548, 1993.
- R.J. Labotka, P. Lundberg, & P.W. Kuchel. Ammonia permeability of erythrocyte membrane studied by ^{14}N and ^{15}N saturation transfer NMR spectroscopy. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*, 268(3):C686, 1995.
- D. Lang, R. Thoma, M. Henn-Sax, R. Sterner, & M. Wilmanns. Structural evidence for evolution of the beta/alpha barrel scaffold by gene duplication and fusion. *Science*, 289(5484):1546, 2000.
- H. Li, A.D. Robertson, & J.H. Jensen. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK_a values. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 61(4):704–721, 2005.
- K.K. Li, W.T. Beeson IV, I. Ghiviriga, & N.G.J. Richards. A Convenient gHMQC-Based NMR Assay for Investigating Ammonia Channeling in Glutamine-Dependent Amidotransferases: Studies of *Escherichia coli* Asparagine Synthetase B. *Biochemistry*, 46(16):4840–4849, 2007.
- J. Lipchock & J.P. Loria. Millisecond dynamics in the allosteric enzyme imidazole glycerol phosphate synthase (IGPS) from *Thermotoga maritima*. *Journal of Biomolecular NMR*, 45(1):73–84, 2009.
- J.M. Lipchock & J.P. Loria. ^1H , ^{15}N and ^{13}C resonance assignment of imidazole glycerol phosphate (IGP) synthase protein HisF from *Thermotoga maritima*. *Biomolecular NMR Assignments*, 2(2):219–221, 2008.
- F. List. Die Imidazolglycerinphosphatsynthase aus *Thermotoga maritima*; Struktur Regulation und Evolution einer Glutaminamidotransferase. Dissertation, Universität Regensburg, 2010.
- Y. Liu, J.B. Thoden, J. Kim, E. Berger, A.M. Gulick, F.J. Ruzicka, H.M. Holden, & P.A. Frey. Mechanistic Roles of Tyrosine 149 and Serine 124 in UDP-galactose 4-Epimerase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 36(35):10675–10684, 1997.
- E. Locci, Y. Dehouck, M. Casu, G. Saba, A. Lai, M. Luhmer, J. Reisse, & K. Bartik. Probing proteins in solution by ^{129}Xe NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 150(2):167–174, 2001.
- P. Lundberg, R.G. Weich, P. Jensen, & H.J. Vogel. Phosphorus-31 and nitrogen-14 NMR studies of the uptake of phosphorus and nitrogen compounds in the marine macroalgae *Ulva lactuca*. *Plant physiology*, 89(4):1380, 1989.

- J.L. Markley. Observation of histidine residues in proteins by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Acc. Chem. Res.*, 8(2):70–80, 1975.
- A. Möglich, B. Koch, W. Gronwald, W. Hengstenberg, E. Brunner, & H.R. Kalbitzer. Solution structure of the active-centre mutant I14A of the histidine-containing phosphocarrier protein from *Staphylococcus carnosus*. *FEBS Journal*, 271, 23(24):4815–4824, 2004.
- B.W. Miles, J.A. Banzon, & F.M. Raushel. Regulatory control of the amidotransferase domain of carbamoyl phosphate synthetase. *Biochemistry*, 37(47):16773–16779, 1998.
- R.S. Myers, R.E. Amaro, Z.A. Luthey-Schulten, & V.J. Davisson. Reaction Coupling through Interdomain Contacts in Imidazole Glycerol Phosphate Synthase. *Biochemistry*, 44(36):11974–11985, 2005.
- N. Nagano, C.A. Orengo, & J.M. Thornton. One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *Technology (AIST)*, 2:41–6, 2002.
- A. Nühns. ³¹P-NMR-Untersuchungen an Guaninnukleotiden und Ran-Nukleotid-Komplexen. Diplomarbeit, Universität Regensburg, 2003.
- Y. Oda, T. Yamazaki, K. Nagayama, S. Kanaya, Y. Kuroda, & H. Nakamura. Individual ionization constants of all the carboxyl groups in ribonuclease HI from *Escherichia coli* determined by NMR. *Biochemistry*, 33(17):5275, 1994.
- P. O'Donoghue, RE Amaro, & Z. Luthey-Schulten. On the structure of hish: Protein structure prediction in the context of structural and functional genomics. *Journal of Structural Biology*, 134(2-3):257–268, 2001.
- D.L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolov, S.M. Franken, M. Harel, S.J. Remington, I. Silman, J. Schrag, et al. The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering Design and Selection*, 5(3):197, 1992.
- R. Omi, H. Mizuguchi, M. Goto, I. Miyahara, H. Hayashi, H. Kagamiyama, & K. Hirotsu. Structure of imidazole glycerol phosphate synthase from *Thermus thermophilus* HB8: Open-closed conformational change and ammonia tunneling. *Journal of biochemistry*, 132(5):759, 2002.
- C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, & T. Gray. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 4(11):2411, 1995.
- M. Pujato, C. Bracken, R. Mancusso, M. Cataldi, & M.L. Tasayco. pH dependence of amide chemical shifts in natively disordered polypeptides detects medium-range interactions with ionizable residues. *Biophysical journal*, 89(5):3293–3302, 2005.

- S. Raychaudhuri, F. Younas, P.A. Karplus, C.H. Faerman, & D.R. Ripoll. Backbone makes a significant contribution to the electrostatics of α/β -barrel proteins. *Protein Science*, 6(9):1849–1857, 1997.
- S.M. Rubin, S.Y. Lee, E.J. Ruiz, A. Pines, & D.E. Wemmer. Detection and characterization of xenon-binding sites in proteins by ^{129}Xe NMR spectroscopy. *Journal of molecular biology*, 322(2):425–440, 2002.
- S.M. Rubin, M.M. Spence, A. Pines, & D.E. Wemmer. Characterization of the effects of nonspecific xenon-protein interactions on ^{129}Xe chemical shifts in aqueous solution: Further development of xenon as a biomolecular probe. *Journal of Magnetic Resonance*, 152(1):79–86, 2001.
- M. Sattler, J. Schleucher, & C. Griesinger. Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 34(2):93–158, 1999.
- W. Schaller & A.D. Robertson. pH, ionic strength, and temperature dependences of ionization equilibria for the carboxyl groups in turkey ovomucoid third domain. *Biochemistry*, 34(14):4714–4723, 1995.
- F.H. Schumann, H. Riepl, T. Maurer, W. Gronwald, K.P. Neidig, & H.R. Kalbitzer. Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions. *Journal of Biomolecular NMR*, 39(4):275–289, 2007.
- T. Schweins, K. Scheffzek, R. Abheuer, & A. Wittinghofer. The role of the metal ion in the p21ras catalysed GTP-hydrolysis: Mn^{2+} versus Mg^{2+} 1. *Journal of molecular biology*, 266(4):847–856, 1997.
- Y. Seo & M. Murakami. Monitoring of intracellular ammonium in perfused rat salivary gland by nitrogen-14 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Proceedings: Biological Sciences*, 244(1311):191–196, 1991.
- M. Spoerner, A. Nuehs, P. Ganser, C. Herrmann, A. Wittinghofer, & H.R. Kalbitzer. Conformational States of Ras Complexed with the GTP Analogue GppNHp or GppCH2p: Implications for the Interaction with Effector Proteins. *Biochemistry*, 44(6):2225–2236, 2005.
- J.B. Thoden, X. Huang, F.M. Raushel, & H.M. Holden. The Small Subunit of Carbamoyl Phosphate Synthetase: Snapshots along the Reaction Pathway. *Biochemistry*, 38(49):16158–16166, 1999.
- R.F. Tilton Jr, I.D. Kuntz Jr, & G.A. Petsko. Cavities in proteins: structure of a metmyoglobin-xenon complex solved to 1.9 Å. *Biochemistry*, 23(13):2849, 1984.
- A.L. Van Geet. Calibration of the methanol and glycol nuclear magnetic resonance thermometers with a static thermistor probe. *Analytical Chemistry*, 40(14):2227–2229, 1968.

- Y. Wang & O. Jardetzky. Probability-based protein secondary structure identification using combined NMR chemical-shift data. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 11(4):852, 2002.
- R.E. Wasylishen & G. Tomlinson. pH-dependence of ^{13}C chemical shifts and ^{13}C , ^1H coupling constants in imidazole and L-histidine. *Biochemical Journal*, 147(3):605, 1975.
- M.E. Winkler. Biosynthesis of histidine. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, 1:395–411, 1987.
- D.S. Wishart, C.G. Bigam, J. Yao, F. Abildgaard, H.J. Dyson, E. Oldfield, J.L. Markley, & B.D. Sykes. ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *Journal of biomolecular NMR*, 6(2):135–140, 1995.
- M. Witanowski, L. Stefaniak, & GA Webb. Nitrogen NMR spectroscopy. *Annual Reports of NMR Spectroscopy*, 25, 1993.
- M. Wittekind & L. Mueller. HNCACB, a high-sensitivity 3 D NMR experiment to correlate amide-proton and nitrogen resonances with the alpha- and beta-carbon resonances in proteins. *Journal of magnetic resonance. Series B(Print)*, 101(2):201–205, 1993.
- Y. Xu & P. Tang. Amphiphilic sites for general anesthetic action? Evidence from - $\{^1\text{H}\}$ intermolecular nuclear Overhauser effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1323(1):154–162, 1997.
- H. Zalkin & JL Smith. Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 72:87, 1998.
- E.R.P. Zuiderweg & S.W. Fesik. Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of the inflammatory protein C5a. *Biochemistry*, 28(6):2387–2391, 1989.

E. Danksagung

Dank allen, die dazu beigetragen haben, diese Arbeit zu einem erfolgreichen Ende zu bringen.

Allen voran danke ich Prof. Dr. Eike Brunner für das entgegengebrachte Vertrauen und für die Gelegenheit in seiner Arbeitsgruppe dieses Thema bearbeiten zu können. Sein Motivationstalent sowie sein fachlicher Rat und seine Zielstrebigkeit haben sehr dazu beigetragen diese Arbeit zu einem guten Abschluss zu bringen.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer dafür bedanken, dass er großzügig die Spektrometer zur Verfügung gestellt und später die Fortsetzung dieser Arbeit ermöglicht hat. Von seinen kreativen Ideen und seiner großen Erfahrung habe ich sehr profitiert.

Prof. Dr. Reinhard Sterner danke ich für seinen Einsatz für dieses Projekt und die Bereicherung die es durch die biochemischen Fragestellungen erhalten hat.

Dr. Felix List danke ich für den großen Beitrag, den er zum Verständnis des biochemischen Teils meiner Arbeit geleistet hat, die vielen interessanten Diskussionen und die stets erfreuliche Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Frank Schumann, Dr. Claudia Munte und Dr. Wolfram Gronwald für ihre Unterstützung bei meinen ersten Experimenten in der dreidimensionalen Spektroskopie. Dr. Werner Kremer danke ich ebenfalls für seine große Hilfe beim Aufsetzen von Experimenten und sein stets schnelles Einschreiten bei rätselhaften Spektrometerproblemen jeder Art. Dr. Michael Spörner danke ich für seine fachliche Unterstützung auf dem Gebiet der ^{31}P -Spektroskopie, Hilfe bei Laborfragen und seine große Hilfsbereitschaft bei allen Fragen zu Publikationen und der Formulierung meiner Arbeit. Dr. Reto Bader danke ich für die Durchführung von Moleküldynamiksimulationen und viele anregende Diskussionen zur Auswirkung der Umladung protonierbarer Gruppen auf die chemische Verschiebung.

Paul Ramm gebührt ein besonderer Dank für seine Einführung in die Benutzung von Matlab, das furchtlose Umschreiben von Pulsprogrammen, sein großes Engagement zur Förderung des Verständnisses der NMR-Spektroskopie sowie viele spannende Diskussionen in und außerhalb des Büros.

Den ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Dr. Katharina Lutz und Dr. Christian Gröger danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre, Christian auch besonders dafür, dass er mir den L^AT_EX-Code seiner Dissertation zur Verfügung gestellt hat.

Dr. Konrad Brunner, Harald Donaubauer und Tobias Harsch gilt mein Dank für ihre schnellen Reaktionen bei allen Anfragen rund um Auremol. Allen Mitgliedern des Lehrstuhles danke ich für die angenehme und kooperative Arbeitsatmosphäre. Meiner Büronachbarin Ina Rosnizeck sowie den Kollegen Maren Schmidt, Daniela Baumstark, Sandra und Raphael Kreitner sowie Tanja Meierhofer danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre freundliche Hilfe in allen Laborfragen sowie ihre aufmunternden Worte, wenn mal etwas nicht klappte.

Vielen Dank an Ingrid Cuno, Ingrid Kulbartz, Dörte Rochelt, Emmi Fuchs, Sabine Ruppel, Robert Bobardt und Simon Peter Grunert dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für meine Anliegen hatten und die Infrastruktur am Lehrstuhl am Laufen hielten.

Meiner Frau Tanja danke ich für ihre immerwährende Unterstützung, Aufmunterung, Motivation und große Geduld - vor allem in der letzten Phase dieser Arbeit. Meiner Mutter Monika danke ich für ihr unerschütterliches Vertrauen und ihren Optimismus - Gisela, Roland sowie Raphael und Manuel für ihren Rückhalt.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen Hilfsmittel außer den angegebenen verwendet habe.

Regensburg, den 11.05.2010 _____