Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Bienzymkomplexes Imidazolglycerinphosphat-Synthetase aus *Thermotoga maritima*

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Silke Beismann-Driemeyer

aus Preetz

2000

Berichterstatter:

Prof. Dr. R. Sterner

Prof. Dr. H. W. Klein

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 16.01.2001

Es gibt nur ein einziges Gut für den Menschen: die Wissenschaft,

und nur ein einziges Übel: die Unwissenheit.

Sokrates

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1998 bis Oktober 2000 in der Abteilung für Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen und am Institut für Biochemie der Universität Köln unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Sterner angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung 1
2 Einleitung 4
2.1 Der Histidin-Biosyntheseweg 4
2.2 Die Familie der Glutamin-Amidotransferasen 7
2.3 Zwei Klassen von Glutamin-Amidotransferasen: Gemeinsamkeiten und Unterschiede 9
2.4 Koordination der Glutaminase- und Synthase-Aktivität 10
2.5 Modell der Evolution der Glutamin-Amidotransferasen 12
2.6 Substrat-Channeling 14
2.7 Zielsetzung 17
3 Material und Methoden 18
3.1 Material 18
3.1.1 Bakterienstämme 18
3.1.2 Plasmide 18
3.1.3 Oligonukleotide 19
3.1.4 DNA-Standard 23
3.1.5 Protein-Längenstandard 24
3.1.6 Enzyme 24
3.1.7 Chemikalien, Geräte und Kits 24
3.1.8 Lösungen und Puffer 27
3.1.9 Nährmedien 31
3.2 Methoden 32
3.2.1 Mikrobiologische Methoden 32
3.2.1.1 Sterilfiltration von Lösungen 32
3.2.1.2 Abtötung von Mikroorganismen 33
3.2.1.3 Vermehrung und Konservierung von *E. coli*-Kulturen 33
3.2.1.4 *In vivo*-Komplementationstest 33
3.2.1.5 Präparation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen 33
3.2.1.6 Vorbereitung von Plasmid-DNA für die Elektrotransformation 35
3.2.1.7 Elektrotransformation nach Dower et al. (1988) 35
3.2.2 Molekularbiologische Methoden 36
3.2.2.1 Bestimmung der DNA-Konzentration 36
3.2.2.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen 36

3.2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten ... 37
3.2.2.4 Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen ... 37
3.2.2.5 Extraktion von DNA aus wässrigen Lösungen ... 37
3.2.2.6 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA ... 38
3.2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab ... 38
3.2.2.8 Isolierung von genomischer DNA aus *Thermotoga maritima* ... 39
3.2.2.9 Amplifikation von DNA-Fragmenten ... 39
3.2.2.10 Einführung von Punktmutationen ... 40
3.2.2.11 Randomisierung eines Codons mittels „NNS-PCR“ ... 41
3.2.2.12 Insert-Screening ... 41
3.2.2.13 Agarosegelelektrophorese ... 41
3.2.2.14 DNA-Sequenzierung ... 42
3.2.3 Präparative proteinchemische Methoden ... 44
3.2.3.1 Expression und Anreicherung im analytischen Maßstab ... 44
3.2.3.2 Expression und Anreicherung im präparativem Maßstab ... 45
3.2.3.3 Dialyse von Proteinlösungen ... 46
3.2.3.4 Anionenaustauschchromatographie ... 46
3.2.3.5 Hydroxylapatit-Chromatographie ... 47
3.2.3.6 Ammoniumsulfatpräzipitation ... 48
3.2.3.7 Präparative Gelfiltration ... 48
3.2.4 Analytische proteinchemische Methoden ... 49
3.2.4.1 Analytische Ultrazentrifugation ... 49
3.2.4.2 Analytische Gelfiltration ... 50
3.2.4.3 Trypsinverdau von tHisH, tHisF und tHisH:F ... 51
3.2.4.4 Polyacrylamidgelelektrophorese ... 52
3.2.4.5 Western-Blotting ... 54
3.2.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration ... 55
3.2.4.7 Fluoreszenzspektroskopie ... 56
3.2.4.8 Fluorimetrische Titration von tHisH mit tHisF ... 57
3.2.4.9 Steady-state-Enzymkinetik ... 57
4 Ergebnisse und Diskussion ... 62
4.1 Klonierung und Expression von tHisH und tHisF ... 62
4.1.1 tHisH-Wildtyp ... 62
4.1.2 tHisH-W123F ... 63
4.1.3 tHisF-Wildtyp ... 63

4.1.4 tHisF-Varianten ... 64
4.1.5 Diskussion ... 66
4.2 Reinigung von tHisH, tHisF und tHisH:F ... 67
4.2.1 tHisH ... 67
4.2.2 tHisF ... 70
4.2.3 Herstellung von Bienzymkomplexen aus tHisH und tHisF ... 73
4.2.4 Diskussion ... 74
4.3 Biophysikalische Charakterisierung von tHisH und tHisF und des tHisH:F-Komplexes ... 75
4.3.1 Bestimmung des apparenten Molekulargewichts und des Oligomerisierungszustands mittels analytischer Gelfiltration ... 75
4.3.2 Stabilität von tHisH, tHisF und tHisH:F gegenüber Trypsin ... 76
4.3.3 Fluoreszenzspektroskopie ... 79
4.3.3.1 Fluoreszenzspektren von tHisH, tHisF und tHisH:F ... 79
4.3.3.2 Fluorimetrische Titration von tHisH mit tHisF ... 82
4.3.4 Diskussion ... 83
4.4 Funktionelle Charakterisierung ... 88
4.4.1 tHisH-Kinetik ... 88
4.4.2 tHisF-Kinetik ... 91
4.4.3 Diskussion ... 95
4.4.3.1 tHisH-Kinetik ... 95
4.4.3.2 tHisF-Kinetik ... 98
4.4.4 Reaktionsmechanismen von tHisH und tHisF ... 106
4.4.4.1 tHisH: Hydrolyse der Glutamin-Amidbindung ... 106
4.4.4.2 tHisF: Bildung des Imidazolrings und Spaltung einer C-N-Bindung 109
4.5 In vivo-Komplementationstest von thisF-Varianten in UTH860 („ΔhisF“) ... 112
4.5.1 Diskussion ... 117
5 Strukturelle Charakterisierung ... 118
5.1 Die Strukturen von tHisH und tHisF ... 118
5.1.1 tHisH: „Triaden“-Glutamin-Amidotransferase-Faltung ... 118
5.1.2 tHisF: TIM-Barrel-Faltung ... 122
5.2 Die Kontaktfläche zwischen tHisH und tHisF ... 125
5.3 Substrat-Channeling in Glutamin-Amidotransferasen ... 129

5.4 Gibt es einen Ammoniak-Kanal in der tImGP-S ? ... 131
6 Ausblick ... 135
7 Literaturverzeichnis ... 137
8 Anhang ... 152
8.1 Abkürzungsverzeichnis ... 152
8.2 HisH-Alignment ... 156
8.3 HisF-Alignment ... 161
8.4 Alignment tHisA-tHisF ... 166
8.5 Plasmide ... 167
8.6 Kalibrierung der Superdex-75-Gelfiltrationssäule ... 168

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur biochemischen, biophysikalischen und enzymatischen Charakterisierung der Imidazolglycerinphosphat-Synthetase aus *Thermotoga maritima* (tImGP-S) durchgeführt. Die tImGP-S ist ein Bienzymkomplex aus der Klasse der Glutamin-Amidotransferasen, in der der an der Glutaminase-Untereinheit (tHisH) gebildete Ammoniak an der Synthase-Untereinheit (tHisF) mit N'-[(5'-phosphoribulosyl)formimino]- 5-aminoimidazol-4-carboxamidribo-nukleotid (5'-PRFAR) zu 5'-Phosphoribosyl-4-carboxamid-5-aminoimidazol (AICAR) und Imidazolglycerinphosphat (ImGP) reagiert. Die Bildung eines stabilen 1:1-Komplexes zwischen tHisH und tHisF zum tImGP-S-Holoenzym wurde biochemisch nachgewiesen und anhand der Röntgenstruktur belegt.

Die Komplexbildung mit tHisF führt zur Abschirmung des einzigen Tryptophanrestes (W123) von tHisH. Der Komplex aus tHisH-W123F und Wildtyp-tHisF besitzt die gleiche Glutaminase-Aktivität wie die Wildtyp-tImGP-S.

Durch ortsspezifische Mutagenese in *this*F wurden acht Varianten der tImGP-S-Synthase-Untereinheit (tHisF) erzeugt, bei denen jeweils eine Aminosäure im Bereich des aktiven Zentrums ausgetauscht wurde. Diese Varianten unterschieden sich in ihrer Stabilität und in ihren spektroskopischen Eigenschaften nicht signifikant vom Wildtyp-Enzym.

Die tHisF-Varianten D11N und D130N wiesen sehr geringe enzymatische Aktivitäten unter Fließgleichgewichtsbedingungen auf; die Aminosäuren D11 und D130 wurden deshalb als "katalytisch essentiell" definiert. Während bei tHisF-D11N der Haupteffekt in einer Erniedrigung des k_{cat}-Wertes lag, wurden bei D130N k_{cat}- und K_M-Effekte festgestellt.

D11 kann durch keine andere Aminosäure substituiert werden. Die Variante D130E komplementierte einen *E. coli-his*F-Defizienzstamm *in vivo,* wobei sichtbare Kolonien einen Tag später erschienen als bei Wildtyp-tHisF. Im *in vitro*-Assay zeigte tHisF-D130E eine Aktivität, die zwischen der des Wildtyps und der Variante D130N lag.

Die enzymkinetische Analyse der übrigen tHisF-Varianten ergab Hinweise auf die Beteiligung der Aminosäuren K19, D51, N103 und D183 an der Signalübertragung zwischen tHisF und tHisH sowie auf eine Beteiligung von N103 und D176 an der Bindung und Ausrichtung des tHisF-Substrates, 5'-PRFAR.

Die Identifizierung der zwei katalytisch essentiellen Aspartate führte zur Formulierung eines potentiellen, auf Säure-Base-Katalyse basierenden Reaktionsmechanismus für die HisF-Reaktion.

tHisH wies im *in vitro*-Assay bei Raumtemperatur eine meßbare Aktivität nur in Anwesenheit von ligandiertem tHisF. Daraus kann abgeleitet werden, daß die Bindung des tHisF-Liganden zu einem Signaltransfer zu tHisH führt, der die Aktivierung der Glutaminase-Aktivität bewirkt.

Es wurden große Mengen an tHisH:F- und tHisH:F-D11N-Komplexen gereinigt und Dr. Martina Walker (Arbeitsgruppe Dr. Matthias Wilmanns, EMBL Außenstation Hamburg) zur Kristallisation zur Verfügung gestellt. Dadurch gelang die Lösung der Struktur des tHisH:F-D11N-Komplexes in der Auflösung von 2.4 Å. Während die Struktur von isoliertem tHisF, das zur Klasse der $(\beta/\alpha)_8$- bzw. TIM-Barrels gehört, bereits bekannt war, zeigt der tHisH:F-Komplex erstmals die Struktur der Glutaminase-Untereinheit einer ImGP-S. tHisH besitzt wie andere Glutaminase-Domänen von Klasse-I-Glutaminamidotransferasen eine der α/β-Hydrolase-Faltung ähnliche Struktur. Die katalytischen Triaden Cys-His-Glu verschiedener Klasse-I-Glutaminase-Domänen lassen sich gut superpositionieren.

Im nichtligandierten tHisH:F-Komplex sind die Glutaminbindungsstelle an tHisH und die 5'-PRFAR-Bindungsstelle an tHisF lösungsmittelzugänglich, so daß die Bindung beider Substrate unabhängig voneinander erfolgen könnte. An der Bildung der Kontaktfläche sind Reste der N-terminalen Seite des zentralen Fasses von tHisF und Reste nahe dem aktiven Zentrum von tHisH beteiligt. Zwischen den aktiven Zentren von tHisH und tHisF befindet sich ein Kanal im Faßinneren von tHisF, doch ist dieser Kanal in der vorliegenden Kristallstruktur durch ein aus vier Aminosäuren gebildetes Salzbrückennetzwerk verschlossen. Die Bewegung einer einzigen Aminosäure könnte zur Öffnung des Kanals führen.

Der Kanal könnte als molekularer Tunnel fungieren, durch den nascenter Ammoniak von tHisH zum aktiven Zentrum in tHisF gelangen könnte. Falls dieser Kanal tatsächlich dem Ammoniaktransport dient, wäre das der erste Fall eines Substrat-Channeling durch das Innere eines TIM-Barrel-Proteins.

2 Einleitung

2.1 Der Histidin-Biosyntheseweg

Histidin ist eine für Säuger essentielle Aminosäure, während die meisten Bakterien, Archaea und Pilze Histidin selbst produzieren können. Die Histidin-Biosynthese stellt einen energetisch sehr teuren Syntheseweg dar: pro Mol Histidin werden 41 Mole Adenosintriphosphat (ATP) benötigt (Brenner & Ames, 1971). Um unnötigen Energieaufwand zu vermeiden, wird die Histidin-Synthese streng reguliert, und zwar einerseits auf der Ebene der Transkription durch Repression (Ames & Garry, 1959; Kovach et al., 1969) und Attenuation (Kasai, 1974), andererseits auf Proteinebene durch Feedback-Inhibition (Umbarger, 1956; Blasi et al., 1971).

Die Anordnung der *his*-Gene ist in Bakterien, Archaea und Eukarya unterschiedlich. In einigen Bakterien, z. B. *Escherichia coli* (Carlomagno et al., 1988), *Thermotoga maritima* (Thoma et al., 1998; Nelson et al., 1999) und Archaea, z. B. *Sulfolobus solfataricus* (Charlebois et al., 1997) und *Methanococcus jannaschii* (Bult et al., 1996) sind die *his*-Gene in einem einzigen Operon organisiert, während sie in anderen Bakterien sowie in Eukarya über das Chromosom verstreut vorliegen (Beckler & Reeve, 1986). Die *his*-Gene spielten eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Operon-Theorie (Ames et al., 1960; Ames et al., 1961).

Der Histidin-Biosyntheseweg ist zur Aufklärung von Evolutionsmechnismen gut geeignet, da es sich um einen sehr alten metabolischen Weg handelt. Dieser Schluß wurde zum einen aus der Beobachtung gewonnen, daß viele Enzyme Histidinreste in ihrem aktiven Zentrum besitzen (Weber & Miller, 1981); sein Imidazolring kann dort leicht zwischen der ungeladenen und der protonierten Form wechseln. Ferner sind die *his*-Gene universell, d. h. daß es Histidin-Biosynthese schon im letzten gemeinsamen Vorfahren aller rezenten Organismen gegeben haben muß (Lazcano et al., 1992).

Die Erforschung der Histidin-Biosynthese begann in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts (Haas et al., 1952). Seitdem sind in zahlreichen Organismen sämtliche *his*-Gene identifiziert, und aus einigen Organismen, z. B. *E. coli*, wurden auch die entsprechenden Proteine exprimiert und charakterisiert. In *E. coli* und *S. typhimurium* erfolgt die Histidin-Biosynthese in 11 Reaktionen unter Beteiligung von acht Enzymen, von denen drei (*his*D, *his*B und *his*I-E) bifunktionell sind (Abb. 2.1; Fani et al., 1995; Winkler, 1986). Zwei der Enzyme, die Genprodukte von *his*H und *his*F, liegen in Prokaryoten in einem Bienzymkomplex vor, der Imidazolglycerinphosphat-Synthetase (ImGP-S).

Die ImGP-S katalysiert die Schritte fünf und sechs im Histidin-Weg. Dieses Enzym spielt eine Schlüsselrolle im Syntheseweg, da die Histidin-Biosynthese an dieser Stelle sowohl über Glutamin/Glutamat mit dem Stickstoffmetabolismus als auch über 5'-Aminoimidazol-4-carboxamid-5-aminoimidazol (AICAR) mit der *de novo* Purin-Biosynthese verknüpft ist (Winkler, 1987). Nichtsdestotrotz wurden bislang nur wenige Untersuchungen an der ImGP-S vorgenommen. Die ImGP-S ist in Prokaryoten ein Heterodimer aus dem *his*H- und dem *his*F-Genprodukt (Klem & Davisson, 1993), in Hefe dagegen sind die Gene fusioniert (*HIS7*; Kuenzler et al., 1993). HisH (EC 2.4.2.-) besitzt eine Glutaminase-Aktivität, HisF (noch keine EC-Nummer zugeteilt) katalysiert eine Cycloligase-Lyase-Reaktion (Smith & Ames, 1964; Martin et al., 1971).

Das ImGP-S-Holoenzym wurde aufgrund der glutaminabhängigen Amidotransferase-Aktivität als Glutamin-Amidotransferase (GATase) klassifiziert (Martin et al., 1971; Buchanan, 1973).

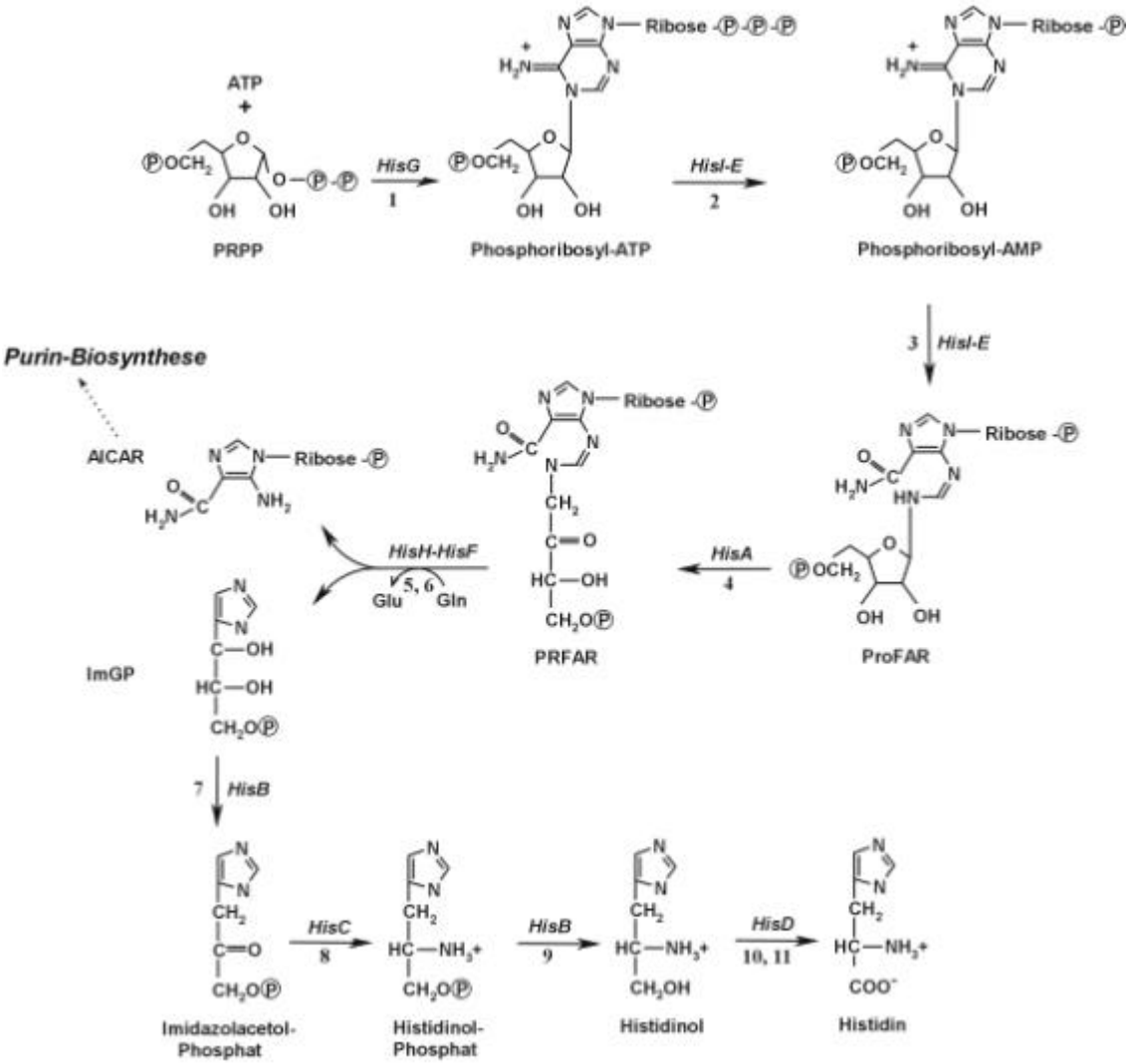


Abbildung 2.1: Die Biosynthese von L-Histidin erfolgt in einer Abfolge von 11 Reaktionen, die von 8 Enzymen katalysiert werden.

Intermediate: PRPP: 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat; 5'-ProFAR: N'-[(5'-phosphoribosyl)formimino]- 5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid; 5'-PRFAR: N'-[(5'-phosphoribulosyl)formimino]- 5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid; ImGP: Imidazolglycerinphosphat; AICAR: 5'-Phosphoribosyl-4-carboxamid-5-aminoimidazol; ImAP: Imidazolacetolphosphat.

Genprodukte: (1) *his*G: ATP-Phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.17); (2), (3) *his*I-E: Phosphoribosyl-ATP-Pyrophosphohydrolase: Phoshoribosyl-AMP-Cyclohydrolase (EC 3.5.4.19); (4) *his*A: Phosphoribosyl-Formimino-1-Phosphoribosyl-4 Imidazol-Carboxamid-Isomerase (EC 5.3.1.16); (5) *his*H: Glutaminase-Untereinheit der Imidazolglycerinphosphat-Synthetase (EC 2.4.2.-); (6) *his*F: Synthase-Untereinheit der Imidazolglycerinphosphat-Synthetase (EC n. z.); (7), (9) *his*B: Imidazolglycerinphosphat-Dehydratase: L-Histidinol-Phosphatase (EC 4.2.1.19 für die Dehydratase-Aktivität, EC 3.1.3.15 für die Phosphatase-Aktivität); (8) *his*C: Histidinolphosphat-Aminotransferase (EC 2.6.1.9); (10), (11) *his*D: Histidinol-dehydrogenase (EC 1.1.1.23).

n. z.: nicht zugeteilt

aus: Hamilton (1995), verändert

2.2 Die Familie der Glutamin-Amidotransferasen

Die Amidgruppe von Glutamin ist die Hauptstickstoffquelle für die Synthese verschiedener Biomoleküle wie zum Beispiel Aminosäuren, Purin- und Pyrimidin-Nukleotide und Coenzyme (Zalkin & Smith, 1998; Abb. 2.2). Bislang sind 16 GATasen bekannt, deren funktionelle Gemeinsankeit darin besteht, daß Glutamin hydrolysiert und die Amidgruppe in Form von nascentem Ammoniak auf ein Akzeptorsubstrat übertragen wird (Zalkin & Smith, 1998; Massière & Badet-Denisot, 1998).

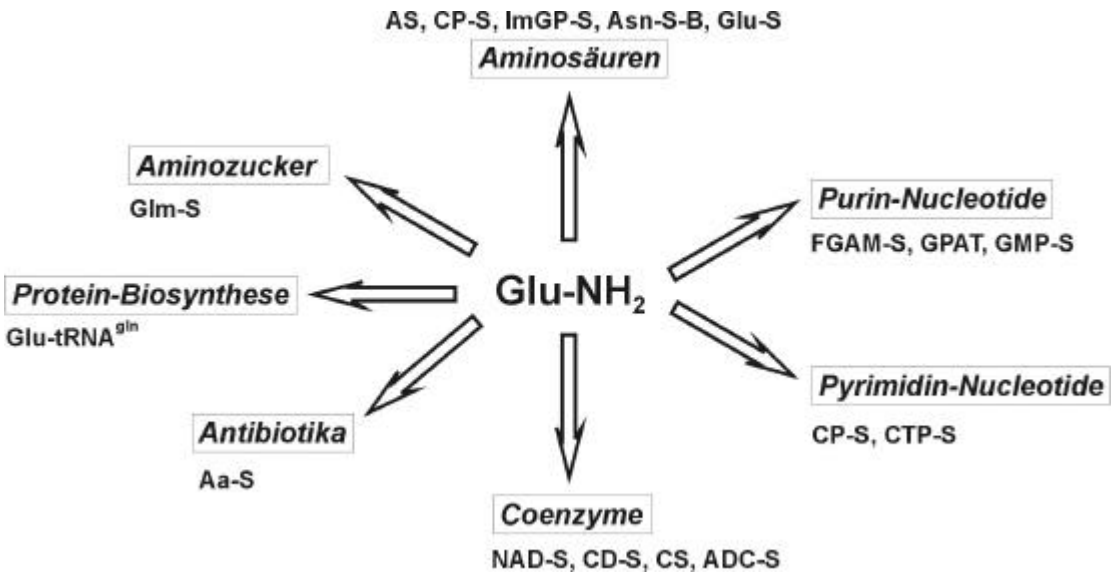


Abbildung 2.2: Die Glutamin-Amidotransferasen stellen Stickstoff für die Aminosäure- und Proteinbiosynthese sowie für die Synthese von Purin- und Pyrimdinnukleotiden, Aminozuckern, Coenzymen und Antibiotika bereit.

Aa-S: Acrylamin-Synthetase (EC n. z.); ADC-S: Aminodeoxychorismat-Synthase (EC n. z.); AS: Anthranilat-Synthase (EC n. z.); Asn-S: Asparagin-Synthetase (EC 1.4.1.13); CD-S: Cobyrinat-a, c-Diamin-Synthetase (EC n. z.); CP-S: Carbamoylphosphat-Synthetase (EC 6.3.5.5); CS: Cobyrinat-Synthase (EC n. z.); CTP-S: Cytidintriphosphat-Synthetase (EC 6.3.4.2); FGAM-S: Formylglycinamid-Synthetase (EC 6.3.5.3); Glm-S: Glucosamin-6-Phosphat-Synthetase (EC 2.6.1.16);Glu-S: Glutamat-Synthase (EC 1.4.1.13); Glu-tRNA^{gln}: Glutamat-tRNA^{gln}-Amidotransferase (EC n. z.); GMP-S: Guanosinmonophosphat-Synthetase (EC 6.3.5.2); GPAT: Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (EC 2.4.2.14); ImGP-S: Imidazolglycerinphosphat-Synthetase (EC n. z.); NAD-S: Nicotinamid-Adenindinukleotid-Synthase (EC 6.3.5.1)
n. z.: nicht zugeteilt

Neben Glutamin können die meisten GATasen auch externen Ammoniak in Form von Ammoniumsalzen als Amiddonor verwenden; Ausnahmen sind die Glucosamin-6-Phosphat-Synthetase (Glm-S, Badet-Denisot et al., 1993) und die *Rhodococcus capsulatus*-Glutamat-Synthase (Glu-S, Igeno et al., 1993).

Während für die Anthranilat-Synthase (AS, Zalkin & Murphy, 1975), die Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (GPAT, Mantsala & Zalkin, 1984) und die Carbamoylphosphat-Synthetase (CP-S) ammoniumabhängige Reaktionen *in vivo* nachgewiesen wurden, ist die Affinität anderer GATasen, z. B. Aminodeoxychorismat-Synthase (ADC-S) und der Formylglycinamid-Synthetase (FGAM-S), zu externem Ammoniak so gering (ADC-S: K_M^{NH3} = 0.4 M, Viswanathan et al., 1995; FGAM-S: K_M^{NH3} = 1M, Schendel et al., 1989), daß diese Reaktion in der Zelle nicht ablaufen kann. Die Glutamat-tRNA^{gln}-Amidotransferase (Glu-tRNA^{gln}) besitzt neben der glutamin- und der ammoniumabhängigen Aktivität auch eine schwache asparaginabhängige Aktivität (Jahn et al., 1990).

Die Bedeutung von GATasen für den Zellmetabolismus geht daraus hervor, daß GATasen oft Schlüsselpositionen des entsprechenden Stoffwechselweges einnehmen. Als jeweils erste Enzyme in der *de novo*-Purin- (GPAT) bzw. Hexosamin-Biosynthese (Glm-S) nehmen die Aktivitäten von GPAT und Glm-S entscheidenen Einfluß auf die Gesamtproduktion an Purinen bzw. Hexosaminen (Muchmore et al., 1998; Zalkin & Smith, 1998). Die bakterielle CP-S katalysiert den die Gesamtgeschwindigkeit der Arginin- und Pyrimidin-Biosynthese bestimmenden Schritt (Meister, 1989), und durch die ImGP-S wird eine Verknüpfung der Histidin- mit der Purin-Biosynthese hergestellt (s. o.).

2.3 Zwei Klassen von Glutamin-Amidotransferasen: Gemeinsamkeiten und Unterschiede

GATasen sind modulare Enzyme (Buchanan, 1973), die aus einer Glutaminase-Domäne (GAT-Domäne) und einer Synthase-Domäne aufgebaut sind. Die Domänen können auf einem Polypeptid liegen wie zum Beispiel bei der GMP-S und der Glm-S oder auf verschiedenen Untereinheiten (UE) wie der bakteriellen ImGP-S und der CP-S.

Die Synthase-Domänen verschiedener GATasen unterscheiden sich in ihren Substraten, der Reaktion, die sie katalysieren sowie ihrer Faltungstopologie (Massière & Badet-Denisot, 1998).

Aufgrund der katalytisch essentiellen Aminosäuren und konservierter Aminosäuremotive wurden die Glutaminase-Domänen in zwei Klassen eingeteilt, und diese Einteilung wird auf die GATase-Holoenzyme übertragen (Zalkin, 1993a; Zalkin & Smith, 1998).

Zurzeit werden der Klasse I der GATasen sieben und der Klasse II vier bekannte Enzymen zugeordnet; die übrigen fünf GATasen wurden noch nicht klassifiziert (Massière & Badet-Denisot, 1998):

Klasse I-GATasen: ADC-S, AS, CP-S, CTP-S, FGAM, GMP-S, ImGP-S
Klasse II-GATasen: Asn-S, GPAT, Glm-S, Glu-S
Nicht klassifizierte GATasen: Aa-S, CD-S, CS, Glu-tRNA^{gln}, NAD-S

Abkürzungen: s. Abbildung 2.2

Aufgrund der fehlenden Sequenzhomologie zwischen Klasse-I- und Klasse-II-GATasen sowie unterschiedlicher Proteinfaltungstopologien kann man davon ausgehen, daß die beiden GATase-Klassen nicht miteinander verwandt sind.

Die Klasse-II-GATasen sind Mitglieder der großen Familie der „Ntn“-Hydrolasen (Brannigan et al., 1995). Zu dieser Familie gehören zahlreiche hydrolytische Enzyme, z. B. das Proteasom und die Penicillin-Acylase. „Ntn“ steht für N-terminales Nucleophil und deutet damit auf eine Gemeinsamkeit dieser Enzyme. Das N-terminale Nucleophil ist in den Klasse-II-GATasen ein Cystein, im Proteasom ein Threonin und in der Penicillin-Acylase ein Serin. Der erste Schritt in der Substrathydrolyse besteht stets in dem Angriff dieses Nucleophils.

In der Klasse I der GATasen gibt es neben einem katalytisch essentiellen Cystein zwei weitere für die Katalyse essentielle Aminosäuren, ein Histidin und ein Glutamat. Diese Aminosäuren bilden eine katalytische Triade wie sie bei verschiedenen hydrolytischen Enzymen, z. B. den α/β-Hydrolasen (Ollis et al., 1992) vorkommen. Das Fehlen von Sequenzhomologien zu anderen Proteinfamilien zeigt, daß die Klasse-I-GATasen nicht verwandt mit anderen bekannten Proteinfamilien sind (Zalkin & Smith, 1998).

Obwohl die GAT-Domänen der Klasse-II-GATasen nur eine katalytisch essentielle Aminosäure besitzen, die GAT-Domänen der Klasse-I-GATasen dagegen drei, verläuft die Glutaminhydrolyse in allen GATasen nach einem ähnlichen Schema ab (Smith, 1995; Thoden et al., 1998; Thoden et al., 1999; Massière & Badet-Denisot, 1998): Der nukleophile Angriff des katalytisch essentiellen Cysteins führt zur Bildung eines negativ geladenen tetraedrischen Intermediates, dessen Ladung in einer Oxyanion-Tasche stabilisiert wird. Nach Freisetzung von Ammoniak wird ein weiteres tetraedrisches Intermediates gebildet, dessen Kollabieren zum Ablösen von Glutamat führt.

Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden GATase-Klassen besteht in der Protonierung der NH_2-Gruppe des ersten tetraedrischen Intermediates. In Klasse-I-GATasen übernimmt das Histidin der katalytischen Triade diese Aufgabe, in Klasse-II-GATasen dagegen die freie Aminogruppe des N-terminalen Cysteins.

2.4 Koordination der Glutaminase- und Synthase-Aktivität

Alle GATasen sind komplexe Enzyme, wobei die Komplexität in der strengen Koordination der an getrennten aktiven Zentren ablaufenden Reaktionen liegt. Allosterische Signale werden von der Synthase- zur GAT-Domäne und in umgekehrter Richtung transferiert. Die Kommunikation zwischen den Domänen wurde zum Beispiel bei der CP-S nachgewiesen, in der Mutationen in der Synthase-Untereinheit die Glutaminase-Aktivität beeinträchtigen (Lusty & Liao, 1993; Guillou et al., 1992) und umgekehrt (Rubino et al., 1986; Mareya & Raushel, 1994).

In den meisten GATasen ist die Glutaminase-Aktivität in Abwesenheit von Synthase-Liganden gering bzw. nicht meßbar (Massière & Badet-Denisot, 1998), was auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden konnte.

So wird die Glutaminbindungstasche in der Guanosinmonophosphat-Synthetase (GMP-S, Tesmer et al., 1996), der AS (Knöchel et al., 1999) und der GPAT (Muchmore et al., 1998; Bera et al., 1999) erst durch Bindung eines Synthase-Liganden ausgebildet, d. h. die Glutaminase-Aktivität wird durch die Glutaminbindung kontrolliert. In der FGAM-S (Schendel et al., 1989) und der CP-S (Chaparian & Evans, 1991) wird Glutamin dagegen vor dem Synthase-Liganden gebunden.

Die Bindung der Synthase-Liganden führt zu einer Konformationsänderung an der GAT-Untereinheit, durch die die katalytische Triade optimal ausgerichtet wird.

In der GPAT wurde die Koordination der Aktivitäten an der GAT- und der Synthase-Domäne durch den Vergleich der Kristallstrukturen von unliganditem und liganditen Enzym (Krahn et al., 1997; Muchmore et al., 1998) sowie steady-state- und pre-steady-state-Fluoreszenzanalysen untersucht (Bera et al., 1999, Bera et al., 2000a). Die GPAT liegt in Abhängigkeit der Phase des Katalysezyklus in einer von drei Konformationen (I – III) vor.

Konformation I: In Abwesenheit von Liganden liegt die GPAT in einer „offenen“, inaktiven Konformation vor. Die Glutaminbindungsstelle ist nicht zugänglich. Die Bindungsstelle des Synthase-Liganden PRPP ist lösungsmittelexponiert. Die beiden aktiven Zentren sind durch einen 16Å langen lösungsmittelzugänglichen Spalt voneinander getrennt.

Konformation II: PRPP wird gebunden, wodurch eine eine Konformationsänderung an der GAT-Domäne induziert wird. Diese führt zur Öffnung der Glutaminbindungsstelle, so daß Glutamin mit hoher Affinität gebunden werden kann.

Konformation III: Die PRPP-Bindungsstelle wird durch einen flexiblen Loop (Aminosäuren 326-350) geschlossen. Die Glutaminbindungsstelle wird ebenfalls geschlossen und Glutamin wird hydrolysiert. Gleichzeitig wird ein 20 Å langer hydrophober Kanal ausgebildet, der die beiden aktiven Zentren miteinander verbindet und durch den der Ammoniak von der Glutaminase- zur Synthase-Domäne transportiert wird, um mit PRPP unter ATP-Hydrolyse zu Phosphoribosylamin und Pyrophosphat zu reagieren.

2.5 Modell der Evolution der Glutamin-Amidotransferasen

Die zum Teil geringen, aber signifikanten Sequenzhomologien innnerhalb der GAT-Domänen einer Klasse (18-45% in Klasse I, 17-34% in Klasse II), im Gegensatz zum Fehlen von Homologien zwischen den beiden Klassen, sind ein Hinweis darauf, daß die GAT-Domänen in der Klasse I und der Klasse II trotz funktioneller Gemeinsamkeiten unabhängig voneinander entstanden sind (Zalkin, 1993a).

Beide GAT-Klassen müssen bereits vor der Auftrennung der Bacteria, Archaea und Eukaryota vorhanden gewesen sein, da alle GATasen in diesen drei Hauptentwicklungslinien des Lebens zu finden sind. Durch Rekrutierung dieser glutaminhydrolisierenden Enzyme durch bislang ammoniumabhängige Enzyme, die rezenten Synthase-Domänen, könnten dann die Glutamin-Amidotransferasen entstanden sein (Rubino et al., 1987; Zalkin, 1993b). Diese Rekrutierungstheorie wird durch verschiedene Beobachtungen gestützt:

1. Die Asparagin-Synthetase (Asn-S) kann als eine Chimäre aus GPAT- und GMP-S-Domänen betrachtet werden (Larsen et al., 1999).

   Die Asn-S-GAT-Domäne besitzt eine hohe Sequenzhomologie zur GAT-Domäne der GPAT sowie eine für die Klasse II der GATasen typische Ntn-Hydrolase-Faltung. Dagegen ist die Asn-S-Synthase-Domäne homolog zur Synthase-Domäne der zur Klasse I gehörenden GMP-S. Es könnte demnach ein Vorläufergen eines ammoniumabhängigen Enyzms gegeben haben, durch dessen Duplikation und Diversifikation die Synthase-Domänen der Asn-S und der GMP-S entstanden wären. Die Rekrutierung einer Klasse-II- bzw. Klasse-I-GAT-Domäne führte zur Entstehung der Asn-S bzw. der GMP-S.

2. In zwei *Pyrococcus*-Spezies wurden CP-S entdeckt, denen die GAT-Domäne fehlt (Purcarea et al., 1996; Durbecq et al., 1997).

Bei der *Escherichia coli*-CP-S wurde eine hohe Übereinstimmung der N-terminalen Sequenz (Aminosäuren 1-400) mit der C-terminalen Sequenz (Aminosäuren 553-933) festgestellt. Dieser Befund führte zu der Hypothese, daß die heutige CP-S durch eine Abfolge von Genduplikation, Diversifikation, Genfusion und späterer Assoziation mit einer Glutaminase entstanden ist (Nyunoya & Lusty, 1983). Diese Annahme wird dadurch gestützt, daß die hyperthermophilen Archaea *Pyrococcus abyssi* (Purcarea et al., 1996) und *Pyrococcus furiosus* (Durbecq et al., 1997) CP-S besitzen, die nur etwa halb so groß wie die Synthase-UE der übrigen bekannten CP-S sind. Diese Enzyme sind strikt ammoniumabhängig, da ihnen eine GAT-Domäne fehlt.

3. HisA und HisF sind nahe verwandte Enzyme, aber nur HisF ist mit einer Glutaminase assoziert.

*his*A und *his*F sind mit großer Wahrscheinlichkeit Paraloge, die durch Genduplikation, Genfusion und Diversifikation entstanden (Fani et al., 1994). Diese Theorie wird durch zahlreiche Fakten gestützt. Beide Genprodukte besitzen eine $(\beta/\alpha)_8$-Barrelstruktur, dessen Hälften $(\beta/\alpha)_{1\text{-}4}$ und $(\beta/\alpha)_{5\text{-}8}$ sich auf Sequenz- und Strukturebene gut superpositionieren lassen (Höcker, 1999; Lang et al., 2000).

HisA und HisF besitzen strukturell ähnliche Substrate (5'-ProFAR bzw. 5'-PRFAR, s. Abb. 2.1), und HisF zeigt schwache, aber signifikante HisA-Aktivität (Lang et al., 2000).

Ein wichtiger Unterschied zwischen HisA und HisF liegt in ihrem Assoziationsgrad. Während HisA als Monomer vorliegt, liegen HisF-Homologe in Prokaryoten als Heterodimere mit einer Glutaminase (HisH) assoziiert vor (Buchanan, 1973), in Eukaryota dagegen sind die Gene der *his*F- und *his*H-Homologen fusioniert (*HIS7* in Saccharomyces, Kuenzler et al., 1993). Ähnlich wie bei der CP-S (s. o.) ist auch in diesem Fall anzunehmen, daß es nach Duplikation und Diversifikation eines gemeinsamen Vorläufergens von *his*A und *his*F zur Rekrutierung einer Glutaminase durch HisF kam.

Ein Vorteil der Assoziation eines ammoniumabhängigen Enzyms mit einer Glutaminase besteht darin, daß die beiden Aktivitäten miteinander gekoppelt werden können, wodurch überflüssige Glutaminhydrolyse und Produktion von cytotoxischem Ammoniak vermieden werden. Der in der Glutaminase-Reaktion gebildete Ammoniak wird nicht in die Umgebung freigesetzt, sondern mittels „Channeling" zur Synthase weitergeleitet (Zalkin, 1985; Thoden et al., 1997; Krahn et al., 1997; Miles & Raushel, 2000; Larsen et al., 1999).

2.6 Substrat-Channeling

Als Channeling wird der direkte Transfer eines Intermediates von einem aktiven Zentrum zu einem anderen bezeichnet (Srere, 1987; Ovadi, 1991). Mehrere Vorteile, die sich durch Substrat-Channeling ergeben können, wurden diskutiert, z. B. der Schutz labiler Intermediate vor dem Lösungsmittel und den darin enthalten Substanzen sowie die Regulation der Reaktionen an den beteiligten aktiven Zentren (Miles et al., 1999; Anderson, 1999).

Es werden drei Arten von Channeling unterschieden: 1. elektrostatisches Channeling (Knighton et al., 1994), 2. intermolekulares Channeling und 3. intramolekulares Channeling.

Für elektrostatisches Channeling sind bislang erst zwei Beispiele bekannt, die bifunktionelle Thymidilat-Synthase/Dihydrofolat-Reduktase (Knighton et al., 1994, Liang & Anderson, 1998) und das Aspartat-Aminotransferase/Dehydrogenase-System (Morgunov & Srere, 1998; Geck & Kirsch, 1999). Die hydrophilen Intermediate der Reaktionen, Dihydrofolate und Oxalacetat, werden auf „Bahnen“ positiv geladener Reste an der Enzymoberfläche von einem aktiven Zentrum zum nächsten transportiert.

Intermolekulares Channeling wird bei vielen aufeinanderfolgenden Enzymen eines Reaktionsweges vermutet (Anderson, 1999), aber nur in wenigen Fällen gibt es konkrete Hinweise darauf. Ein Beispiel ist das Enzympaar GPAT/Glycinamid-Ribonukleotid-Synthetase (GAR-S) aus der Purinbiosynthese von *Aquifex aeolicus*, bei dem das extrem labile Phosphoribosylamin während einer transienten Wechselwirkung der Enzyme von der GPAT zur GAR-S transferiert wird (Bera et al., 2000b).

Bei intramolekularem Channeling wird ein Intermediat zwischen permanent assoziierten Enzymuntereinheiten transferiert. Mehrere Beispiele für intramolekulares Channeling sind bekannt, von denen das am besten untersuchte die Tryptophan-Synthase ist (Hyde et al., 1988; Hyde & Miles, 1990; Miles, 1991). In der Röntgenkristallstruktur der Tryptophan-Synthase aus *Salmonella typhimurium* wurde ein 25 Å langer hydrophober Kanal nachgewiesen, durch den das in der α-Reaktion erzeugte Indol zum aktiven Zentrum an der β-Untereinheit transportiert wird (Hyde et al., 1988). Dadurch wird verhindert, daß das hydrophobe Indol durch Diffusion durch die Cytoplasmamembran verloren geht.

Biochemische Studien an verschiedenen GATasen haben gezeigt, daß entstehender Ammoniak nicht ins Lösungsmittel abgegeben wird (Buchanan, 1973; Zalkin, 1985; Miles & Raushel, 2000). Es wurde daher postuliert, daß es in Glutamin-Amidotransferasen einen Channeling-Mechanismus geben muß, mit Hilfe dessen der Ammoniak von der Glutaminase zum aktiven Zentrum der Synthase gelangt. Dadurch wird verhindert, daß Ammoniak in Lösung zu Ammonium protoniert wird und seine Reaktivität für den nukleophilen Angriff auf das Substrat der Synthasedomäne verliert.

Deutliche Hinweise auf ein intramolekulares Channeling des Ammoniaks geben die Röntgenkristallstrukturen der CP-S (Thoden et al., 1997; Thoden et al., 1998; Thoden et al., 1999; Holden et al., 1998), der GPAT (Krahn et al., 1997, Smith, 1998; Bera et al., 2000a) und der Asn-S (Larsen et al., 1999), in denen Kanäle nachgewiesen wurden, die die aktiven Zentren der GAT-Domäne und der Synthase-Domäne miteinander verbinden. Durch gezielten Einbau voluminöser Aminosäuren in die innere Tunnelwand der CP-S konnte der Ammoniaktransfer blockiert werden, was für die Funktionalität des Kanals beim Ammoniaktransport spricht (Huang & Raushel, 2000a; Huang & Raushel, 2000b).

2.7 Zielsetzung

Die Imidazolglycerinphosphat-Synthetase (ImGP-S) ist eine bislang wenig untersuchte Glutamin-Amidotransferase des Histidin-Biosynthesewegs.

Das ImGP-S-Holoenzym ist in Prokaryoten ein 1:1-Bienzymkomplex aus der Glutaminase-Untereinheit HisH und der Synthase-Untereinheit HisF. Als einfachster Fall eines „Multienzymkomplexes“ kann die ImGP-S als Modell zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen und allosterischer Kommunikation zwischen mehreren aktiven Zentren in einem Enzym dienen.

Aus praktischen Gründen wurde für die Charakterisierung der ImGP-S der Komplex aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* ausgewählt. Proteine aus thermophilen Organismen besitzen in der Regel eine große intrinsische Stabilität, die die Reinigung und die anschließenden Untersuchungen erleichtern. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß diese Proteine meist leicht kristallisieren und daher für die Strukturlösung mittels Röntgenkristallographie gut geeignet sind.

Zu Beginn der Arbeit lag das *his*F-Gen aus *Thermotoga maritima* (t*his*F) bereits kloniert vor, ebenso stand gereinigtes Genprodukt tHisF zur Verfügung. Zunächst sollte daher t*his*H kloniert, in *Escherichia coli* überexprimiert und das Genprodukt tHisH gereinigt werden. Der *in vitro* rekonstruierte tHisH:F-Komplex sollte biochemisch, spektroskopisch und enzymatisch charakterisiert werden.

Durch den Austausch einzelner Aminosäuren am aktiven Zentrum von tHisF sollten Einblicke in den tHisF-Reaktionsmechanismus sowie der allosterischen Kommunikation zwischen tHisF und tHisH gewonnen werden.

Da Ammoniak-Channeling als ein allgemeiner Mechanismus des Ammoniaktransportes in Glutamin-Amidotransferasen diskutiert wird, sollte anhand der kürzlich gelösten Kristallstruktur der tImGP-S die Möglichkeit eines intramolekularen Transportes von Ammoniak überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Es wurde ausschließlich mit *E. coli*-Stämmen gearbeitet.

BL21 (DE3) (Studier & Moffatt, 1986)

*hsd*S, gal, [λcI, *ts*857, *cnd*1, *hsd*R17, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*1, *rel*A1]

KK8 (=W3110 ΔtrpEA2; Schneider et al., 1981)

W3110 *trp*R, *tna*2, Δ*trp*EA2 (das gesamte trp-Operon wurde deletiert)

3.1.2 Plasmide

pET11c

Gene in pET-Vektoren (Novagen, *plasmid for expression by T7 RNA polymerase*) werden von der T7-Polymerase transkribiert (Studier et al., 1990). Sie können daher nur in Stämmen exprimert werden, die eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerasegens besitzen, z. B. *E. coli* BL21 (DE3). Die Zugabe von Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) führt zur Expression der unter der Kontrolle des *lac*UV5-Promotors stehenden T7-RNA-Polymerase. Die Expression des in den pET-Vektor einklonierten Gens erfolgt über einen T7-Promotor und ist in den meisten pET-Vektoren ebenso über einen lac-Operator reguliert, welcher aber in pET11c fehlt. Der lac-Repressor (lacI) ist plasmidkodiert und wird konstitutiv exprimiert.

pDS56/RBSII/*Sph*I

Der Vektor pDS56/RBSII (Bujard et al., 1987; Stüber et al., 1990) besitzt ein regulierbares Promotor/Operator-Element, bestehend aus einem modifizierten T5-Promotor und zwei Kopien von dem den Promotor regulierenden lac-Operator. Das Promotor/Operator-Modul wird durch den lac-Repressor reprimiert und durch Zugabe von IPTG induziert.

pTNA

Der pTNA-Vektor (C. Yanofsky, Stanford) entspricht dem pDS56/RBSII/*SphI*, außer daß er eine verkürzte Variante des Tryptohanase-Operon-Promotors von *E. coli* trägt anstelle des induzierbaren Lac-Promotor-Operator-Moduls. Diese Konstruktion führt zur schwachen konstitutiven Expression des einklonierten Gens.

pDmI,1

Das in hoher Kopienzahl in der Zelle vorliegende Repressor-Plasmid pDMI,1 (Stüber et al., 1990) kodiert den konstitutiv exprimierten lac-Repressor, so daß das pDS56/RBSII-Promotor/Operator-Element inaktiviert wird. IPTG inaktiviert den lac-Repressor und gibt so den Promotor für die Transkription frei.

Plasmidkarten sind im Anhang zu finden (8.5).

3.1.3 Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide (*Primer*) wurden, sofern nicht anders angegeben, von Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Sequenzierprimer für pDS- und pTNA-Konstrukte

Cy*RI* (Charles Yanofsky/*Eco*RI)

5’ TCA CGA GGC CCT TTC GCT TT 3’

Cy*Pst*I (Charles Yanofsky/*Pst*I)

5’ TCT TAG GTT CGA TCG AAC CGC T 3’

Zur Sequenzierung auf einem Li-COR-Sequenzer wurden die Oligos auch in IRD-800-markierter Form hergestellt (MWG Biotech, Ebersberg).

Sequenzierprimer für pET-Konstrukte

T7-Prom

5’ TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3’

T7-Term

5’ GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3’

Zur Sequenzierung auf einem Li-COR-Sequenzer wurden die Oligos auch in IRD-800-markierter Form hergestellt (MWG Biotech, Ebersberg).

Sequenzierprimer für chromosomales hisF von *E. coli* UTH860 (Goldschmidt et al., 1970; „Δ*his*F“)

gen-*his*F_U

5’ GCG CGG CGT AAT AGT TGG TCG GGC 3’

primt in *ehis*A, dem *ehis*F vorangehenden Gen

gen-*his*F_L

5’ GCA CAA TCA CCG GCA TAA GTC CG 3’

primt in *ehis*IE, dem auf *ehis*F folgendem Gen

Klonierungsprimer

pET-*his*F *Nde*I (Microsynth)

5’ TGA TGA AGA **CAT ATG** CTC GCT AAA AG 3’

pET-*his*F *Sph*I

5’ TAT AC**G CAT GC**T CGC TAA AAG AAT AAT CGC 3’

5’-Primer zum Umklonieren von pET-Konstrukten in pTNA

pET-*his*F BamHI

5’ CC**G GAT CC**A GCG TCA TCA CAA 3’

pTNA-*his*F *Sph*I

5’ TAT AC**G CAT GC**T CGC TAA AAG AAT AAT CGC 3’

pTNA-*his*F *Nde*I

5’ GAG AAA TTA AG**C ATA TG**C TCG CTA AAA G 3’

5’-Primer zum Umklonieren von hisF-D130E von pTNA in pET

pTNA-hisF *Bam*HI

5’ GTC GAC **GGA TCC** ACA ACC CCT CCA G 3’

pET-hisF_C9A *Nde*I

5’ TGA TGA AGA **CAT ATG** CTC GCT AAA AGA ATA ATC GCG GCT CTC GAT 3’

Die unterstrichenen Nukleotide wurden gegenüber der Wildtypsequenz verändert, wodurch der Aminosäureaustausch C9A bewirkt wurde.

pET-*his*F_D11N *Nde*I

5’ TGA TGA AGA **CAT ATG** CTC GCT AAA AGA ATA ATC GCG TGC CTC AAT GTG AAA GAC 3’

Die unterstrichenen Nukleotide wurden gegenüber der Wildtypsequenz verändert. Das Codon für Aspartat an Position 11 wurde durch ein Codon für Asparagin ausgetauscht.

pET-*his*F_K19S *Nde*I

5’ TGA TGA AGA **CAT ATG** CTC GCT AAA AGA ATA ATC GCG TGT CTC GAT GTG AAA GAC GGT CGT GTG GTG AGC GGA ACG AAC TTC 3’

Die unterstrichenen Nukleotide wurden gegenüber der Wildtypsequenz verändert, wodurch der Aminosäureaustausch K19S bewirkt wurde.

pET-*his*F_D51N *Ssp*I

5’ CGC GGT **AAT ATT** CAG AAA AAC GAG 3’

Die unterstrichenen Nukleotide wurden gegenüber der Wildtypsequenz verändert, wodurch eine *Ssp*I-Schnittstelle kreiert sowie das Codon 51 von Asp zu Asn verändert wurde.

pET-*his*F_N103A *Tsp*RI

5’ CAC AGC **CGC AGT GGC** TAT GCT CAC CTT GTC 3’

Die unterstrichenen Nukleotide wurden gegenüber der Wildtypsequenz verändert, wodurch eine *Tsp*RI-Schnittstelle kreiert sowie das Codon 103 von Asn zu Ala verändert wurde.

pET-*his*F_D130N *Vsp*I

5’ CAC TCT TTT TGC **ATT AAT** CGC CAC GAC 3’

Die unterstrichenen Nukleotide wurden gegenüber der Wildtypsequenz verändert, wodurch eine *Vsp*I-Schnittstelle kreiert sowie das Codon 130 von Asp zu Asn verändert wurde.

pET-*his*F_D176N *Bsh*NI

5’ GAC AGA AAC G**GC ACC** AAA TCG G 3’

Die unterstrichenen Nukleotide wurden gegenüber der Wildtypsequenz verändert, wodurch eine *Bsh*NI-Schnittstelle kreiert sowie das Codon 176 von Asp zu Asn verändert wurde.

pET-*his*F_D183N *Tsp*RI

5’ GGC ACA AAA TCG GGT TAC **AAC ACT GAG** ATG ATA AGG 3’

Die unterstrichenen Nukleotide wurden gegenüber der Wildtypsequenz verändert, wodurch eine *Tsp*RI-Schnittstelle kreiert sowie das Codon 183 von Asp zu Asn verändert wurde.

pDS-*his*H *Sph*I (Microsynth)

5’ GGT GTG ATA **GCA TGC** GTA TCG G 3’

pDS-*his*H *Hin*dIII (Microsynth)

5’ CTA CC**A AGC TT**C TGA AGA GAT CTA TCG 3’

pDS-*his*H_W123F *Tfi* I

5’ CTT CCC CAC ATG G**GA TTC** AAC GAG GTG ATC 3’

Die unterstrichenen Nukleotide wurden gegenüber der Wildtypsequenz verändert, wodurch eine *Tfi* I-Schnittstelle kreiert sowie das Codon 123 von Trp zu Phe verändert wurde.

pTNA-*his*F-D11NNS

5’-TAT ACG CAT GCT CGC TAA AAG AAT AAT CGC GTG CCT CNN SGT GAA GAC-3’

Dieser degenerierte Primer enthielt an zwei Positionen eine Mischung aller vier Nukleotide (N) und an einer Position G oder C (S). Durch diese Basenmischung konnten Codone für alle 20 natürlichen Aminosäuren entstehen.

pTNA-*his*F-D130NNS

5’-GTC GTG GCG ATT NNS GCA AAA AGA-3’

Dieser degenerierte Primer enthielt an zwei Positionen eine Mischung aller vier Nukleotide (N) und an einer Position G oder C (S). Durch diese Basenmischung konnten Codone für alle 20 natürlichen Aminosäuren entstehen.

3.1.4 DNA-Standard

SmartLadder: Eurogentec (Seraing, Belgien)

Die SmartLadder enthält eine exakte Menge an DNA in jeder Bande und ist daher außer zur Bestimmung der Größe auch zur Quantifizierung von DNA-Proben geeignet.

Bandengröße (bp[(1)])	ng/Bande
10 000	100
8000	80
6000	60
5000	50
4000	40
3000	30
2500	25
2000	20
1500	15
1000	100
800	80
600	60
400	40
200	20

(1): Basenpaare

3.1.5 Protein-Längenstandard

MidRange Marker: Promega (Mannheim)

Protein	M_R[(1)]
Phosphorylase A	97 400
Bovines Serum-Albumin	66 200
Glutamat-Dehydrogenase	55 000
Ovalbumin	42 700
Aldolase	40 000
Carbonic-Anhydrase	31 000
Sojabohnen Trypsin-Inhibitor	21 500
Lysozym	14 400

(1): relatives Molekulargewicht

3.1.6 Enzyme

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

Benzonase: Merck Eurolabs (Lohmar)

Rinderserumalbumin (BSA): MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)

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

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

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

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

Glutamat-Dehydrogease (GDH) aus Rinderleber: Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

3.1.7 Chemikalien, Geräte und Kits

Alle für molekularbiologische Arbeiten benötigten Chemikalien besaßen den größtmöglichen Reinheitsgrad. Andere Chemikalien waren in der Regel zu > 99% rein. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von Merck Eurolabs (Lohmar), Fluka (Neu-Ulm), Riedel-de Haen (Seelze), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Absorptionsspektrophotometer:

- Zweistrahl-UV/VIS-Spektralphotometer Uvicon 933 (Kontron, Eching)

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

Bacto Agar, Trypton Pepton, Hefeextrakt: Difco (Dreiech)

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

Blotting-Membran: Immobilon-P ODVF-Transfermembran, 0.45 µm; Millipore (Eschborn)

Blotting-Papier, 1.4 mm stark: Schleicher und Schuell (Dassel)

Dialyseschläuche Visking: Serva (Heidelberg) oder Spectra/Por, Spectrum Laboratories (Rancho Domiguez, Californien, USA)

Elektroporator 2510: Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg)

Elektroporationsküvetten: 2mm Gap, Molecular BioProducts (San Diego, Californien, USA)

Fluoreszenz-Spektrophotometer:

- Fluoreszenz-Spektrometer F-4500: Hitachi (Tokio, Japan)

- Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse, Varian Inc. (Palo Alto, Californien, USA)

FPLC-Anlage: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

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

Hoefer Elektrophoresekammer: Mighty Small II, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

Hoefer TE 70- Blottingkammer: SemiPhor Semi-Dry Transfer-Einheit; Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

Kits:

- NucleobondAX DNA-Extraktionskit, NucleoTrap DNA-Purification Kit, NucleoSpin Plus: Macherey-Nagel (Düren)

- QIAquick Gel Extraction Kit: Qiagen (Hilden)

- JetStar 2.0 Midipräp Kit: Genomed (Bad Oeynhausen)

- GeneClean Kit zur Isolierung genomischer DNA: AGS GmbH (Heidelberg)

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

Mikroliterpipetten Gilson Pipetman P20, P200, P1000: Abimed Analysen Technik (Langenfeld)

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

pH-Meter InoLab: WTW (Weilheim)

Ponceau S-Lösung: 0.1% Ponceau S (w/v) in 5 % Essigsäure (v/v); Sigma (Deisenhofen)

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

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

Protogel: BioZym (Hessisch Oldendorf)

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

Quarzküvetten: Hellma (Müllheim)

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

Thermocycler T3: Biometra (Göttingen)

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

Vortexer Reax Top: Heidolph (Kelheim)

Waagen:

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

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

Zentrifugen:

- Hettich Rotixa/RP, Hettich Roto Silenta/RP: Hettich (Tuttlingen)

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

3.1.8 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer, die nicht fertig gekauft wurden, wurden wie folgt hergestellt. Die Lagerung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur. Feststoff wurden, wenn nicht anders angegeben, in Wasser gelöst.

Ampicillin-Stammlösung

150 mg ml^{-1} des Na^{+}-Ampicillin-Salzes in Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei –20° C gelagert

APS-Stammlösung

250 mg ml^{-1} Ammoniumperoxodisulfat in Wasser gelöst, bei –20° C gelagert

Ammoniumacetat-Stammlösung

7 M Ammoniumacetat

10 x Blotting-Puffer

100 mM CAPS

pH 11 mit NaOH einstellen

Coomassie-Färbelösung

50% Ethanol (96%ig)

10% Essigsäure (100%ig, „Eisessig“)

0.1% (w/v) Coomassie Brillantblau G250

in Wasser lösen und durch einen Papierfilter filtrieren

dNTP-Stammlösung

Die 100 mM-Stammlösungen der einzelnen Desoxynukleotidtriphosphate wurden zusammengegeben und mit TE auf eine Konzentration von 10 mM verdünnt.

Formamid-Probenpuffer

0.1% (w/v) Xylencyanol FF

0.1% (w/v) Bromphenolblau

2 % (v/v) 0.5 M EDTA-Stammlösung

in Formamid

EDTA-Stammlösung

0.5 M Na-EDTA

unter Zugabe von NaOH lösen und pH auf 8.0 einstellen

$FeCl_3$-Stammlösung

10 mM $FeCl_3$

sterilfiltriert

GET-Lösung

50 mM Glucose

10 mM EDTA

in 25 mM Tris/HCl, pH 8.0

IPTG-Stammlösung

1 M IPTG, bei –20 °C gelagert

KAc-Lösung

3 M Kaliumacetat/ Eisessig, pH 5.5

Kanamycin-Stammlösung

75 mg ml^{-1} Kanamycin-Sulfat in Wasser, sterilfiltriert, bei –20° C gelagert

LiCl-Lösung

5 M Lithiumchlorid

1 x native PAGE-Laufpuffer

5 mM Tris

38 mM Glycin

Durch das Glycin wird ein pH-Wert von 8.3 eingestellt.

2 x native PAGE-Probenpuffer

55% (v/v) native PAGE-Sammelgelpuffer

40% (w/v) Saccharose

0.05% (w/v) Bromphenolblau

native PAGE-Sammelgelpuffer

0.5 M Tris

pH-Wert mit HCl auf 6.8 einstellen

native PAGE-Trenngelpuffer

1.5 M Tris

pH-Wert mit HCl auf 8.8 einstellen

SDS-NaOH-Lösung

1% (w/v) SDS

0.2 N NaOH

die Lösung wurde jeweils vor Verwendung frisch angesetzt

1 x SDS-PAGE-Laufpuffer

25 mM Tris

192 mM Glycin

0.1% (w/v) SDS

2 x SDS-PAGE-Probenpuffer

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

35% (v/v) Glycerin

1.7% (w/v) SDS

5% (v/v) β-Mercaptoethanol

0.05% (w/v) Bromphenolblau

SDS-PAGE-Sammelgelpuffer

0.5 M Tris

0.4% (w/v) SDS

pH-Wert mit HCl auf 6.8 einstellen

SDS-PAGE-Trenngelpuffer

1.5 M Tris

0.4% (w/v) SDS

pH-Wert mit HCl auf 8.8 einstellen

SDS-Stammlösung

10% (w/v) SDS

Sucrose-Farbmarker

60% (w/v) Saccharose

0.05% (w/v) Bromphenolblau

0.05% Xylencyanol FF

in 0.5 x TBE-Puffer

5 x TBE-Puffer

90 mM Tris

90 mM Borsäure

2.5 mM EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris

mM EDTA

pH-Wert mit HCl auf 8.0 eingestellt

Thiamin-Stammlösung

1 mg ml^{-1} Thiamin

sterilfiltriert, gelagert bei 4° C

Tris-Tricin-Gelpuffer

3 M Tris

0.3 % (w/v) SDS

pH-Wert mit HCl auf 8.45 eingestellt

Tris-Tricin-Anodenpuffer

0.1 M Tris

0.1 M Tricin

0.1 % (w/v) SDS

pH-Wert mit HCl auf 8.45 eingestellt

Tris-Tricin-Kathodenpuffer

0.2 M Tris

pH-Wert mit HCl auf 8.9 eingestellt

3.1.9 Nährmedien

dYT

1% (w/v) Hefeextrakt

1.6% (w/v) Trypton

0.5% (w/v) NaCl

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

0.5% (w/v) Hefeextrakt

1% (w/v) Trypton

1% (w/v) NaCl

LB-Platten

LB

1.5% (w/v) Bacto-Agar

SOB

2% (w/v) Trypton

0.5% (w/v) Hefeextrakt

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

in Wasser, autoklavieren.

Nach dem Autoklavieren hinzufügen:

10 mM $MgCl_2$ x 6 H_2O

10 mM $MgSO_4$ x 7 H_2O

SOC

SOB

20 mM Glucose

Vogel-Bonner-Minimalmedium-Platten (Vogel & Bonner, 1956)

20% (w/v) Glucose

1.7% (w/v) Bacto-Agar

in Wasser, autoklavieren

Nach dem Autoklavieren der lauwarmen Lösung hinzufügen:

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

0.01 mM $FeCl_3$

1 mg Thiamin

25 x Vogel-Bonner-Mineralsalz (Vogel & Bonner, 1956)

0.5% (w/v) $MgSO_4$ x 7 H_2O

5% (w/v) Citric acid x H_2O

12.5% (w/v) K_2HPO_4 (anhydrous)

4.4% (w/v) $NaNH_4HPO_4$ x 4 H_2O

Die Komponenten werden zunächst einzeln in etwas Wasser gelöst, die Lösungen zusammengegeben und auf das Endvolumen gebracht. Die fertige Lösung wird autoklaviert.

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Sterilfiltration von Lösungen

Hitzelabile Lösungen wurden durch Minisart NML Sterilfilter mit einer Porengröße von 0.22 µm filtriert, wodurch Partikel und Mikroorganismen aus der Lösung entfernt wurden.

3.2.1.2 Abtötung von Mikroorganismen

Zur Abtötung nicht mehr benötigter *E. coli*-Kulturen sowie zur Sterilisation von hitzestabilen Gebrauchslösungen wurden die Lösungen für 20 min bei 121° C autoklaviert. Hitzestabile Geräte wurden zur Sterilisation für 20 min trocken auf 121° C erhitzt.

3.2.1.3 Vermehrung und Konservierung von *E. coli*-Kulturen

E. coli-Stämme wurden bei 37° C und 150-220 Upm in dYT oder LB vermehrt. Plasmidtragenden Stämmen wurde Antibiotikum entsprechend ihrer Resistenz zugesetzt. Die Endkonzentration von Ampicillin betrug 150µg ml^{-1}, die von Kanamycin 75 µg ml^{-1}.

Zum Anlegen von Glycerinkulturen wurden Aliquots von Übernachtkulturen mit 10% (v/v) autoklaviertem Glycerin versetzt und bei –70° C gelagert. Das Ansetzen frischer Kulturen erfolgte durch Entnahme eines Aliquots aus der Glycerinkultur und Übertrag in frisches dYT- oder LB-Medium.

Die Zellvermehrung konnte durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm spektrophotometrisch verfolgt werden.

3.2.1.4 *In vivo*-Komplementationstest

Der histidinauxotrophe *E. coli*-Stamm UTH869 („ΔhisF“, Goldschmidt et al., 1970) wurde durch Elektroporation (3.2.1.7) transformiert. Vor dem Ausplattieren auf Minimalmedium wurde die Zellen mindestens viermal mit Wasser gewaschen, um anhaftendes nährstoffreiches Medium zu entfernen.

3.2.1.5 Präparation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Alle verwendeten Stämme wurden durch Elektroporation (Dower et al., 1988, s. 3.2.1.7) mit Plasmid-DNA transformiert.

Zur Präparation elektrokompetenter Zellen wurden 2 ml LB-Medium mit einem Aliquot einer Glycerinkultur inokuliert und über Nacht bei 37° C und 200 Upm inkubiert. Diese Vorkultur wurde zum Animpfen von 1 L frischem LB-Medium verwendet. Die Kulturen wurden unter Schütteln bei 37° C solange inkubiert, bis die optische Dichte bei 600 nm 0.5-0.8 betrug. Das weitere Vorgehen war wie folgt:

30 min Inkubation auf Eis
15 min bei 4° C und 4000 x g zentrifugieren (Sorvall, GS-A)
Pellet in 1 L kaltem Wasser resuspendieren
15 min Inkubation auf Eis
15 min bei 4000 x g zentrifugieren (Sorvall, GS-A)
Pellet in 500 ml kaltem Wasser resuspendieren
15 min Inkubation auf Eis
15 min bei 4000 x g zentrifugieren (Sorvall, GS-A)
Pellet in 20 ml 10%igem Glycerin resuspendieren
10 min bei 4000 x g zentrifugieren (Sorvall, SS34)
Pellet in 2 ml 10%igen Glycerin resuspendieren
Aliquots à 50 µl in Mikroreaktionsgefäße pipettieren und bis zur Verwendung bei –70° C lagern.

Alternativ wurde, wenn eine besonders hohe Transformationseffizienz erzielt werden sollte, ein anderes Protokoll verfolgt:
5 ml LB-Medium wurden mit einem Aliquot einer Glycerinkultur inokuliert und über Nacht bei 37° C und 200 Upm inkubiert. Diese Vorkultur wurde zum Animpfen von 400 ml frischem SOB-Medium verwendet. Die Kulturen wurden unter Schütteln bei 37° C solange inkubiert, bis die optische Dichte bei 600 nm 0.5-0.6 betrug.

Weiteres Vorgehen:
30 min Inkubation auf Eis
10 min bei 4° C und 4000 x g zentrifugieren (Sorvall, GS-A)
Pellet in 50 ml kaltem Wasser resuspendieren
15 min Inkubation auf Eis
10 min bei 4000 x g zentrifugieren (Sorvall, SS34)
Pellet in 20 ml kaltem Wasser resuspendieren
15 min Inkubation auf Eis
10 min bei 4000 x g zentrifugieren (Sorvall, GS-A)
Pellet in 10 ml kaltem Wasser resuspendieren
10 min bei 5000 Upm zentrifugieren (Heraeus *fresco*-Tischzentrifuge)
Pellet in anhaftendem Wasser resuspendieren

Die auf diese Weise hergestellten elektrokompetenten Zellen wurden sofort zur Elektroporation verwendet.

3.2.1.6 Vorbereitung von Plasmid-DNA für die Elektrotransformation

Sofern die Plasmid-DNA in einem salzhaltigen Puffer gelöst vorlag, wurde sie vor der Elektrotransformation mittels Dialyse entsalzt. Dazu wurde maximal 15 µl der Plasmid-DNA auf eine VS-Membran (Porengröße 0.0025 µm, Millipore) getropft und mindestens eine Stunde lang gegen einen großen Volumenüberschuß 10% Glycerin dialysiert.

3.2.1.7 Elektrotransformation nach Dower et al. (1988)

Elektrokompetente Zellen wurden, sofern sie gefroren vorlagen, auf Eis aufgetaut. 1- 5 µl salzfreier Plasmid-DNA wurden mit einem Aliquot elektrokompetenter *E. coli*-Zellen vermischt. Für die Transformation mit „Midipräp-DNA“ wurden 10-50 ng DNA eingesetzt, von „Minipräp-DNA“ wurden in der Regel 5 µl verwendet.

Der Transformationsansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Molecular BioProducts) gegeben und die Zellen wurden durch einen elektrischen Puls (2500 V, 25 µF, 200 Ω) im Elektroporator (Eppendorf-Netheler-Hinz) transformiert.

Sofort im Anschluß wurden die Zellen in 1-1.5 ml LB- oder SOC-Medium für 1 h bei 37° C und 200 Upm gekurt. Aliquots wurden auf Platten mit geeignetem Medium ausgestrichen und bei 37° C über Nacht oder bis zum Erscheinen von Kolonien inkubiert. Sollten die Transformationsansätze auf Vogel-Bonner-Minimalmediumplatten (VB) ausgestrichen werden, wurden die Zellen nach dem Kuren durch Zentrifugation pelletiert und durch viermaliges Waschen mit Wasser von anhaftendem nährstoffreichen Medium befreit.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen konnte über die Bandenintensität im Agarosegel im Vergleich zu einer Bande der SmartLadder (Eurogentec) abgeschätzt werden. Zur genauen Bestimmung wurde die Absorption bei 260 nm photometrisch gemessen und die Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet. Dabei entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm eine Absorption von 1.0 einer DNA-Konzentration von 50 µg ml^{-1} bei doppelsträngiger DNA (dsDNA). Es gilt daher folgender Zusammenhang:

$$c_{dsDNA}\ (\mu g\ ml^{-1}) = (A_{260} \times 50 \times f) / 1.0 \qquad (3.1)$$

c = Konzentration
f = Verdünnungsfaktor

Ferner wurde die Reinheit einer „Midipräp“ über ein Absorptionsspektrum geprüft. Dabei sollte der Quotient A_{260}/A_{280} mindestens 1.8 betragen und bei Wellenlängen oberhalb von 300 nm keine Absorption mehr detektierbar sein.

3.2.2.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen wurden unter den vom Hersteller beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Für analytische Zwecke wurden 300-500 ng DNA in einem Volumen von 20-25 µl eingesetzt. Im Gesamtansatz lag maximal 10% Enzymlösung vor, da das darin enthaltenen Glycerin sich in höherer Konzentration negativ auf die Aktivität der Restriktionsendonukleasen auswirken kann.

Bei Doppelverdaus wurden Puffer eingesetzt, in denen beide Enzyme 100%ige Aktivität besaßen.

Der Erfolg der Spaltung wurde gelelektrophoretisch überprüft.

3.2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in einen geeigneten Vektor wurde die durch Gelelektrophorese (s. 3.2.2.13) oder Extraktion (s. 3.2.2.5) gereinigte Fragment- und Vektor-DNA mit T4-DNA-Ligase ligiert. Dazu wurde ein 3-5facher molarer Überschuß an Fragment mit dem Vektor zusammengegeben und beides für zwei Minuten auf 60° C erhitzt. Anschließend wurden Ligase-Puffer und T4-Ligase zugefügt, wobei das Volumen eines Ansatzes maximal 20 µl betrug. Die Ligation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 14-16° C über Nacht.

3.2.2.4 Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Zur Verringerung der Konzentration an Salzen und Proteinen sowie zur Konzentration wurde DNA aus wässrigen Lösungen gefällt. Dazu wurde die DNA-haltige Lösung mit 1/10 Volumen 7 M Ammoniumacetat-Lösung und 3 Volumina 96%igen Ethanol versetzt, mindestens 30 min bei –20° C inkubiert und anschließend in einer Kühlzentrifuge (Heraeus Biofuge *frisco*) bei 13 000 Upm bei 4° C 30 min zentrifugiert. Alternativ konnte die DNA auch durch Zugabe von 0.7 Volumina Isopropanol und anschließender Zentrifugation gefällt werden. Das Pellet wurde mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (Heraeus Biofuge *fresco*) bei 13 000 Upm bei 4° C für 15 min wurde das DNA-Pellet entweder in TE-Puffer oder in Wasser aufgenommen.

3.2.2.5 Extraktion von DNA aus wässrigen Lösungen

Zum Entfernen von Proteinen, Ethidiumbromid und hydrophoben Verunreinigungen wurde eine Extraktion der DNA-Lösung mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1 (v/v)) vorgenommen. Zu der DNA-Lösung wurde 1 Volumen des Extraktionsgemisches gegeben, gevortext und 5 min bei 13 000 Upm in einer Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge *pico*) abzentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde in ein sauberes Mikroreaktionsgefäß überführt und erneut mit 1 Volumen des Extraktionsgemisches versetzt.

Nach erneuter Zentrifugation wurde die wässrige Oberphase in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und die DNA nach 3.2.2.4 gefällt.

3.2.2.6 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA

Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Die Isolierung und Reinigung von Plasmiden aus *E. coli* im analytischen Maßstab („Minipräp“) erfolgte mittels einer Modifikation der Methode von Le Gouill et al. (1994). 1.5 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum wurden mit plasmidtragenden Bakterienzellen inokuliert und über Nacht bei 37° C inkubiert. Die Zellen wurden in Mikroreaktionsgefäßen durch Zentrifugation für 5 min bei 6000 Upm (Heraeus Biofuge *pico*) sedimentiert und das Pellet in 100 µl GET-Lösung resuspendiert. Im weiteren wurde folgendermaßen vorgegangen:

5 min Inkubation auf Eis
+ 200 µl SDS-NaOH-Lösung, vorsichtig Schwenken
5 min Inkubation auf Eis
+ 150 µl KAc-Lösung
5 min Inkubation auf Eis
+ 450 µl 5 M LiCl
5 min Inkubation auf Eis
5 min bei 13 000 Upm (Heraeus Biofuge *pico*) bei RT zentrifugieren
Überstand in neues Mikroreaktionsgefäß überführen
+ 650 µl Isopropanol
30 min bei 13 000 Upm und 4° C (Heraeus Biofuge *fresco*) zentrifugieren
Pellet trocknen, in TE oder Wasser aufnehmen

Alternativ zur oben beschriebenen Methode wurden Minipräps mit einem NucleoSpin Plus-Kit (Macherey-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers angefertigt.

3.2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA in größeren Mengen (bis ca. 150 µg, „Midipräp“) erfolgte mit Hilfe des JetStar 2.0 Midipräp-Kits (Genomed) oder dem Nucleobond AX DNA-Extraktionskit (Macherey-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers.

3.2.2.8 Isolierung von genomischer DNA aus *Thermotoga maritima*

Zur Isolierung von genomischer DNA wurde der Gene Clean-Kit (AGS GmbH) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.2.9 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Amplifizierung bestimmter Fragmente mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion (PCR; Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) aus Plasmid-DNA wurde in folgendem Standardansatz in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt:

DNA-Matrize	50-200 ng
dNTP-Gemisch	200 nM
Primer, je	100 pmol
Polymerase	1 u

Die Reaktion fand in dem für die verwendete Polymerase empfohlenen Puffer statt. Standardmäßig wurde *Pfu*-Polymerase (Promega) verwendet. In Insert-Screens wurden die preiswertere *Taq*- (Roche Diagnostics) oder *Tfl*-Polymerase (Stratagene) eingesetzt, welche im Gegensatz zur *Pfu*-Polymerase keine Proof Reading-Aktivität aufweisen. Die fehlende Proof Reading-Aktivität wurde gezielt bei mutagener PCR (s. 3.2.2) ausgenutzt.

Bei der Amplifikation des chromosomalen *his*F-Gens mit angrenzenden Bereichen aus *his*A und *his*IE aus dem *E. coli*-Stamm UTH860 (Goldschmidt et al., 1970, „Δ*his*F“) wurde als Template einer auf Platte gewachsenen Einzelkolonie etwas Zellmaterial entnommen und direkt in den PCR-Ansatz gegeben.

In einem Thermocycler (Biometra) erfolgte die PCR, die in folgenden Schritten ablief:

1.	Denaturierung	95° C	1 min
2.	Denaturierung	95° C	45 s
3.	Annealing	48°-55° C	40 s- 1.5 min
4.	Elongation	72° C	40 s- 1.5 min
5.	Elongation	72° C	7 –10 min

Die Schritte 2. bis 4. wiederholten sich zyklisch 25-35mal.

Die Annealing-Temperatur konnte aus dem in Gleichung (3.2) und (3.3) dargestellten Zusammenhang berechnet werden (Chester & Marshak, 1993):

$$T_M = 69.3 + 0.41 * (\%G + C) - 650/n \qquad (3.2)$$

und

$$T_A = \left((T_{M1} + T_{M2}) / 2 \right) - 3°C \qquad (3.3)$$

T_M: Schmelztemperatur des Primers (° C)
T_A: Annealing-Temperatur für die PCR (° C)
% G+C: GC-Gehalt des Primers
n: Zahl der Nukleotide des Primers

Die Dauer des Annealings und der Elongation in den Zyklen hing von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes sowie der verwendeten Polymerase ab. Sie richtete sich nach den Empfehlungen des Herstellers der entsprechenden Polymerase oder wurde durch eigene Tests optimiert.

3.2.2.10 Einführung von Punktmutationen

Zur Erzeugung von einfachen Punktmutationen wurden zwei verschiedene auf PCR basierende Verfahren (s. 3.2.2) angewandt. Lagen die zu verändernden Nukleotide nahe am 5'- oder 3'-Ende des zu klonierenden Gens, wurden Primer mit den gewünschten Nukleotiden definiert und in einer PCR mit *Taq*- oder *Tfl*-Polymerase die veränderten Gene erhalten. Wenn dagegen der Ort der Mutation weit von den Genenden entfernt lag, wurde die Megaprimer-Methode (Sarkar and Sommer, 1990) angewandt. Dabei werden in einer ersten PCR mit *Taq*- oder *Tfl*-Polymerase ein unveränderter flankierender und ein den gewünschten Basenaustausch tragender, interner Primer eingesetzt.

Das erhaltene PCR-Produkt wird als Megaprimer zusammen mit dem zweiten flankierenden Primer in einer zweiten PCR eingesetzt, wodurch das gesamte Gen mit der Punktmutation amplifiziert wird. Die empirisch ermittelte optimale Menge an Megaprimer in der zweiten PCR betrug ca. 150-200 ng.

3.2.2.11 Randomisierung eines Codons mittels „NNS-PCR“

Um in einem einzigen Ansatz die Codone für alle zwanzig natürlich vorkommenden Aminosäuren an einer bestimmten Position im Zielgen zu erhalten, wurde dieses Codon mit Hilfe der „NNS“-PCR randomisiert. Der in der PCR eingesetzte Primer enthielt am zu randomisierenden Codon an den ersten beiden Positionen eine Mischung aller vier Nukleotide, an der dritten Position waren nur G und C zugelassen, wodurch das Auftreten von „nonsense“-Codonen verhindert wurde. Als Konsequenz daraus wurde die Zahl der möglichen Codone auf 32 limitiert, gleichzeitig aber die Wahrscheinlichkeit des Auftretens jeder Aminosäure kaum verringert. Die Stop-Codone „ambre“ und „ochre“ wurden ausgeschlossen. Die „NNS-PCR“ konnte nach dem Standardverfahren (s. 3.2.2) erfolgen oder als Megaprimer-PCR (s. 3.2.2).

3.2.2.12 Insert-Screening

Zur schnellen Kontrolle, ob die nach einer Transformation erhaltenen Klone das klonierte Gen enthielten, wurden Insert-Screens durchgeführt. Dazu wurde von einem auf einer Agar-Platte gewachsenem Klon mit einer sterilen Pipettenspitze etwas Zellmaterial entnommen und dieses direkt in den PCR-Ansatz überführt. Nach erfolgter PCR wurde das erhaltene Fragment anhand seiner auf einem Agarosegel abgeschätzen Größe identifiziert.

3.2.2.13 Agarosegelelektrophorese

Zur Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen oder Restriktionsverdaus sowie zur Analyse der Fragmentgröße nach DNA-Manipulationen wurde Agarose-gelelektrophorese eingesetzt, durch die eine Auftrennung von DNA-Fragmenten aufgrund ihrer Größe erfolgt.

Die Agarosegele enthielten 1- 1.2 % (w/v) Agarose und 0.5 µg/ml (Endkonzentration) des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Sucrosefarbmarker versetzt und in die Probentaschen gegeben. Als Längenstandard wurde ein Aliquot der SmartLadder (Eurogentec) mitaufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 160 mA. Nach Beendigung des Laufs wurde die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm sichtbar gemacht und gegebenenfalls mit einem sterilen Skalpall ausgeschnitten. Ausgeschnittene DNA-Banden wurden unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerprotokoll isoliert.

3.2.2.14 DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz klonierter Gene sowie des chromosomalen *his*F vom *E. coli*-Stamm UTH860 (Goldschmidt et al., 1970, „Δ*his*F“) wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte sequenziert. Dabei wurde das Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger et al. (1977) verwendet.

Bei den Auftragssequenzierungen im Göttinger Genomlabor (Göttingen Genomics Laboratory) an der Universität Göttingen oder im Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin der Universität Köln wurden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte 2’,3’-Didesoxynukleotide zusätzlich zu den 2’-Desoxynukleotiden eingesetzt werden. Die Didesoxynukleotide führen in einer polymerasekatalysierten Amplifizierungsreaktion, der Zyklus-Sequenzierungs-reaktion („thermal cycle sequencing“, Sears et al., 1992; Slatko, 1994), zu statistische Kettenabbrüchen. Die erhaltenen Fragmente wurden gelelektro-phoretisch aufgetrennt, und das endständige Nukleotid wurde aufgrund der Fluoreszenzmarkierung identifiziert.

Als Matrize wurden 150-300 ng doppelsträngige zirkuläre oder lineare DNA eingesetzt. Als Primer wurde Oligonukleotide definiert, die beidseitig des klonierten Gens mit dem Plasmid bzw. Chromosom hybridisierten. Die im ABI-Format erhaltenen Daten wurden mit dem Programm Chromas (Version 1.45 32-bit) durchgeführt.

Zum Teil wurden die Sequenzierungen selbst durchgeführt, wobei der „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet wurde. In ein Reaktionsgefäß kam nur Didesoxynukleotid, welches als Reaktionsmix mit dNTP, einem ddNTP bzw. 7-deaza-dGTP, Polymerase und Puffer geliefert wurde. Es wurden Primer eingesetzt, die an ihrem 5’-Ende mit dem Infrarotfluoreszenzfarbstoff IRD-800 (Kodak) markiert waren, welcher ein Absorptionsmaximum bei 780 nm und ein Fluoreszenzemissionsmaximum bei 820 nm besitzt. Fragmente, die während der Elektrophorese das Gel durchlaufen, werden mit einer Laserdiode angeregt und mit einer Fotodiode detektiert. Für jedes 2’, 3’-Didesoxynukleotid mußte ein eigener Ansatz pipettiert werden.

Cycle Sequencing-Ansatz,Volumen = 8 µl:

2 pmol IRD-800-gelabelter Primer

100-200 ng Matrizen-DNA

120 µM DMSO

2 µl eines ddNukleotids

Cycle Sequencing-Bedingungen:

95° C	2 min
95° C	30 s
T_A*	30 s
70° C	30 s
Schritte 2.- 4. 20 x	
95° C	30 s
70° C	30 s
Schritte 6.- 7. 10 x	

* T_A: Annealing-Temperatur, berechnet nach Gleichungen (3.2) und (3.3).

Nach der zyklischen Sequenzierreaktion wurden die Ansätze 1:1 mit Formamid-Probenpuffer verdünnt. Auf das Sequenziergel wurden 1-2 µl aufgetragen.

Gelzusammensetzung:

40 ml SequaGel XR-Puffer

10 ml SequaGel Complete

40 µl 10%ige APS-Lösung

Es wurden Gele von 41 cm Länge und einer Dicke von 0.2 mm gegossen.

Laufbedingungen:

1500 V

35 mA

31.5 W

50° C

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Base ImageIR-Softwarepaket (Version 2.21, Li-COR) und Chromas (Version 1.45 32-bit).

3.2.3 Präparative proteinchemische Methoden

3.2.3.1 Expression und Anreicherung im analytischen Maßstab

Durch Anzucht von frisch transformierten Zellen in kleinem Kulturvolumen („Probeexpression“) wurde untersucht, ob sich die klonierten Gene durch Zugabe von IPTG überexprimieren ließen. Ein Klon wurde von einer Agarplatte mit Selektivmedium gepickt und über Nacht in 3 ml Selektivmedium inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden je 100 µl zum Inokulieren von zwei Röhrchen mit je 10 ml Selektivmedium verwendet. Bei einer OD_{600} von ca. 0.6 wurde zu einer Kultur 1 mM (Endkonzentration) IPTG gegeben, zur anderen nicht. Nach Wachstum über Nacht wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 x g (Sorvall, SS34, 4° C) pelletiert und anschließend in 1 ml Aufschlußpuffer 1 (100 mM KP, pH 7.5) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Ultraschall (Stufe 1, 45-60 s) aufgeschlossen.

Zur Analyse des unlöslichen Zellextrakts (Pellet, **P**) wurden 100 µl abgenommen, durch Zentrifugation pelletiert (Heraeus Biofuge *fresco*, 3 min 13 000 Upm, 4° C) und zweimal mit Aufschlußpuffer 1 gewaschen. Die Probe wurde mit einem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt.

Zum Untersuchen der löslichen Fraktion wurde die restliche Probe abzentrifugiert (Heraeus Biofuge fresco, 10 min 13 000 Upm, 4° C). Ein 100 µl Aliquot des Rohextrakts (crude extract, **C**) wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und ein Volumen SDS-Probenpuffer zugegeben.

Der Rest der löslichen Fraktion wurde im Heizblock 20 min auf 75° C erhitzt, anschließend abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 10 min 13 000 Upm, RT) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu dieser hitzestabilen Fraktion (Hitzeschritt, **H**) wurde ein Volumen SDS-Probenpuffer gegeben.

Alle drei mit SDS-Probenpuffer versetzten Aliquots (**P**, **C**, **H**) wurden zur Denaturierung 3 min auf 95° C erhitzt und anschließend mittels SDS-PAGE (s. 3.2.4.4) analysiert.

3.2.3.2 Expression und Anreicherung im präparativem Maßstab

Um Protein im Milligramm-Maßstab zu reinigen, wurden elektrokompetente *E. coli*-Zellen frisch mit dem Plasmid, in welches das zu exprimierende Gen einkloniert war, transformiert und auf Selektivmedium plattiert (s. 3.2.1). Ein Einzelklon wurde gepickt und über Nacht in 10 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde 1 L LB-Medium mit Antibiotikum inokuliert. Wenn in der „Probeexpression" (s. 3.2.3.1) festgestellt worden war, daß eine Induktion mit IPTG zur Überexpression notwendig war, wurde 1 mM IPTG (Endkonzentration) bei einer OD_{600} von 0.5-0.8 zugegeben. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen abzentrifugiert (Hettich Roto Silenta/RP, 4000 Upm, 20 min, 4° C) und in 20 ml Aufschlußpuffer 2 (100 mM KP, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) resuspendiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (Sorvall, SS34, 7000 x g, 20 mn, 4° C), das Naßgewicht bestimmt (*fresh weight*) und das Pellet erneut in 20 ml Aufschlußpuffer 2 aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte durch Ultraschall (50% output, 2 x 2 min, auf Eis). Ein Aliquot der unlöslichen Fraktion (Pellet, **P**) wurde wie unter 3.2.3.1 beschrieben behandelt. Der Rest der Probe wurde mit 40 u Benzonase (Merck Eurolabs) versetzt und eine Stunde bei 37° C inkubiert, wodurch die Nukleinsäuren fragmentiert werden, so daß sie später durch Dialyse aus der Proteinfraktion entfernt werden können. Die Probe wurde abzentrifugiert (Sorvall, SS34, 15 min, 27 0000 x g, 4° C). Vom Überstand wurde ein Aliquot (*crude extract*, **C**) abgenommen. Der Rest wurde einem Hitzeschritt im Wasserbad (20 min, 75° C) unterzogen und abzentrifugiert (Sorvall, SS34, 30 min, 27 000 x g, 4° C).

Ein Aliquot des Hitzeschritt-Überstands (**H**) sowie die Aliquots P und C wurden entsprechend 3.2.3.1 für die Analyse durch SDS-PAGE aufbereitet.

3.2.3.3 Dialyse von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden zwischen Reinigungsschritten, die unterschiedliche Puffer verlangten, gegen einen mindestens 100fachen Volumenüberschuß Puffer über Nacht bei 4° C dialysiert (Spectra/Por 2- oder Visking 16/36-Dialyseschläuche, Ausschlußgröße 12 000-14 000), wobei der Puffer 2-3mal gewechselt wurde. Die Probe wurde anschließend scharf abzentrifugiert (Sorvall, SS34, 30 min, 27 000 x g).

3.2.3.4 Anionenaustauschchromatographie

Bei der Anionenaustauschchromatographie werden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung getrennt (Rossomando, 1990). Die Proteine binden entsprechend ihrer Ladung unterschiedlich stark an auf der Säulenmatrix fixierten funktionellen Gruppen anderer Ladung. Je nach Bindungsstärke werden sie bei verschiedenen Salzkonzentrationen eluiert.

Nach dem Hitzeschritt wurde eine Anionenaustauschchromatographie an einer Perfusionschromatographie-Anlage (BioCAD oder BioCAD *Sprint*, PE Biosystems) durchgeführt. Als Säulenmaterial wurde Poros HQ20, ein starkes Anionenaustauschermaterial mit einer Partikelgröße von 20 µm, verwendet. Das Säulenvolumen (SV) betrug 7.8 ml. Die Säule wurde mit Ionenaustauschpuffer äquilibriert, die Probe aufgetragen und nach dem Waschen mit einem NaCl-Gradienten eluiert (Tab. 1). Die Detektion erfolgte über die Absorption bei 280 nm und zusätzlich bei 260 nm oder 254 nm.

Tabelle 1: Programm der Anionenaustauschchromatographie zur Reinigung von tHisH und tHisF

Äquilibrierungspuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8.0
Laufgeschwindigkeit	5-10 ml/min
Äquilibrierung	4 SV Äuqilibrierungspuffer
Probenauftrag	Probenvolumen (20-50 ml)
Waschen	2 SV Äuquilibrierungspuffer
Elution	linearer Gradient von 0-1.5 M NaCl in Äquilibrierungspuffer
Regeneration	2 SV Äuquilibrierungspuffer
Fraktionsgröße	4 ml

Zusätzlich zur Detektion durch UV-Absorption wurden von Stichproben über den gesamten Lauf Bradford-Assays (Bio-Rad Protein Assay, s. 3.2.4.6) durchgeführt und Fraktionen, in denen Protein nachgewiesen wurde, wurden mittels SDS-PAGE (s. 3.2.3) analysiert.

3.2.3.5 Hydroxylapatit-Chromatographie

Aus HisH-Präparationen ließen sich Nukleinsäuren und Nukleotide nur sehr schwer entfernen. Als effektive Methode erwies sich eine Hydroxylapatit-Chromatographie. Proteine können sowohl über die Amino- als auch über die Carboxylgruppen ihrer Aminosäuren an die Hydroxylapatitmatrix binden. Eluiert werden können die meisten Proteine mittels eines Phosphatgradienten (Gorbunoff, 1985).

Zur Reinigung von *t*HisH wurde eine Hydroxylapatitsäule mit einem Volumen von 12.5 ml verwendet. Die Chromatographie wurde entsprechend dem angegebenen Programm (Tab. 2) an einer Pharmacia-FPLC-Anlage durchgeführt.

Tabelle 2: Programm der Hydroxylapatitchromatoggraphie zur Reinigung von tHisH.

Äquilibrierungspuffer Laufgeschwindigkeit	10 mM KP, pH 7.5, 10 mM KCl 0.5 ml/min
Äquilibrierung	4 SV Äuqilibrierungspuffer
Probenauftrag	Probenvolumen (20-50 ml)
Waschen	2 SV Äuquilibrierungspuffer
Elution	linearer Gradient von 10-500 mM KP, pH 7.5m, 100 mM KCl
Regeneration	2 SV Äuquilibrierungspuffer
Fraktionsgröße	3 ml

3.2.3.6 Ammoniumsulfatpräzipitation

Alternativ zur Hydroxylapatit-Chromatographie wurden HisH-Präparationen mittels Ammoniumsulfatpräzipitation (Englard & Seifter, 1990) von Nukleinsäuren befreit. Dazu wurde bei 4° C unter vorsichtigem Rühren nach und nach Ammoniumsulfat bis zur 80%iger Sättigung (516 mg/ml) in die Proteinlösung gegeben und danach das Rühren für eine weitere halbe Stunde fortgesetzt. Durch Zentrifugation (10 min, 10 000 x g, Sorvall, SS34) wurde das Protein pelletiert und anschließend in einem geeigneten Puffer aufgenommen. Das Ammoniumsulfat wurde durch Dialyse (s. 3.2.3) gegen ammoniumsulfatfreien Puffer entfernt.

3.2.3.7 Präparative Gelfiltration

Zur Reinigung von tHisH:HisF-Komplexen von Aggregaten und eventuellem Überschuß einer Proteinspezies wurden gleiche molare Mengen der beiden Proteine zusammengegeben und mit Hilfe von Centriprep 10-Konzentratoren nach Protokoll des Herstellers einkonzentriert auf ein Volumen von maximal 2 ml. Der Proteinkomplex wurde mit NAP-10- oder NAP-20-Säulchen nach Anweisung des Herstellers in Gelfiltrationspuffer ohne Salz (50 mM KP, pH 7.5) umgepuffert. Anschließend wurden die Proben mit Centricon 10-Konzentratoren auf weniger als 1 ml einkonzentriert.

Eine präparative Gelfiltrationssäule (HiLoad 26/60 Superdex 75 pg, Bettvolumen: 320 ml) wurde mit zwei Säulenvolumina Gelfiltrationspuffer (50 mM KP, pH 7.5, 300 mM NaCl) äqulibriert und anschließend die Probe über den Probenloop aufgespritzt. Bei einer Laufgeschwindigkeit von 0.3 ml/min oder 0.4 ml/min (max. Rückdruck: 0.3 MPa) wurde die Probe durch das Molekularsieb gegeben. Der Fraktionssammler wurde manuell bei Beginn des ersten Peaks gestartet. Es wurden bis zum Ende des Laufes durchgehend 3 ml-Fraktionen gesammelt. Alle Fraktionen wurden mittels Bradford-Assay (s. 3.2.4.6) auf Protein getestet. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen, die im SDS-Gel zwei gleichstarke Banden mit den Größen von *t*HisH und *t*HisF aufwiesen, wurden als Komplex identifiziert. Diese Fraktionen wurden gepoolt, mit Centriprep 10-Konzentratoren einkonzentriert und über NAP-10- oder NAP-20-Säulchen umgepuffert in 50 mM KP, pH 7.5, E1, D1.

3.2.4 Analytische proteinchemische Methoden

3.2.4.1 Analytische Ultrazentrifugation

Das Molekulargewicht und der Assoziationsgrad von tHisH, tHisF und tHisH:F wurden durch analytische Ultrazentrifugation in einer mit einer Absorptionsoptik ausgestatteten Beckman XLA Ultrazentrifuge bestimmt (Ariel Lustig, Biozentrum der Universität Basel). Die Gleichgewichts- und Sedimentationsläufe wurden bei 20° C durchgeführt.

Bedingungen für tHisH:

Gleichgewichtsläufe

c= 23 µM und 11.5 µM in 50 mM KP-Puffer, pH 7.5, 25 mM KCl

v= 24 000 Upm

Sedimentationslauf

c = 23 µM in 50 mM KP-Puffer, pH 7.5, 25 mM KCl

v= 56 000 Upm

Bedingungen für tHisF:

Gleichgewichtslauf

c= 20 µM 50 mM KP-Puffer, pH 7.5

v= 19 000 Upm und 24 000 Upm

Sedimentationslauf

c = 20 µM in 50 mM KP-Puffer, pH 7.5

v= 52 000 Upm

Bedingungen für tHisH:F:

Gleichgewichtslauf

c= 20 µM in 50 mM KP-Puffer, pH 7.5, 300 mM NaCl

v= 18 000 Upm und 24 000 Upm

Sedimentationslauf

c = 20 µM in 50 mM KP-Puffer, pH 7.5, 300 mM NaCl

v= 56 000 Upm

3.2.4.2 Analytische Gelfiltration

Mit analytischer Gelfiltration kann das apparente Molekulargewicht und bei Kenntnis des theoretischen Molekulargewichts auch der Oligomerisierungzustand von Proteinen bestimmt werden. Dabei wird ausgenutzt, daß bei globulären Proteinen ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und dem Elutionsvolumen besteht. Bei einem Protein unbekannten Molekulargewichts oder Oligomerisierungszustands kann daher durch Vergleich des Elutionsvolumens mit dem Elutionsvolumen von Standardproteinen das apparente Molekulargewicht ermittelt werden.

Eine analytische Gelfiltrationssäule (Superdex 75 HR10/30, Bettvolumen: 24 ml, kurz: Superdex-75) wurde an eine FPLC-Apparatur (Amersham Pharmacia Biotech) angeschlossen und mit zwei Säulenvolumina Gelfiltrationspuffer (50 mM KP, pH 7.5, 300 mM NaCl) äqulibriert.

Zum Erstellen einer Kalibrierungsgeraden wurden die Proteine und Blue Dextran des LMW-Gelfiltrationskalibrierungskits (Amersham Pharmacia Biotech) sowie Aceton nach Anweisung des Herstellers auf die Säule gegeben und durch Auftragen des Verteilungskoeffizienten K_{AV} gegen den Logarithmus des Molekulargewichts wurde eine Kalibrierungskurve erstellt. K_{AV} wurde wie in Gleichung (3.4) dargestellt ermittelt:

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \qquad (3.4)$$

V_e: Elutionsvolumen der Probe
V_t: Totalvolumen der Säule, entspricht dem Elutionsvolumen von Aceton
V_0: Totvolumen, entspricht dem Elutionsvolumen von Blue Dextran

Anschließend wurde die zu analysierende Proteinprobe über den Probenloop aufgespritzt und bei gleicher Laufgeschwindigkeit wie die Standards (0.5-1.0 ml/min, max. Rückdruck: 1.7 MPa) durch das Molekularsieb gegeben. Die aufgetragene Menge lag bei 3-10 nmol Protein. Anhand der Kalibrierungsgeraden wurde die apparente molekulare Masse des Proteins bestimmt.

3.2.4.3 Trypsinverdau von tHisH, tHisF und tHisH:F

Die Serinprotease Trypsin spaltet Peptidbindungen C-terminal von Lysin und Arginin, sofern diese Bindungen nicht im Enzyminneren verborgen liegen.

Für die Spaltung wurde jeweils 1 ml einer 10 µM tHisH-, tHisF bzw. tHisH:F-Lösung in 10 mM KP-Puffer, pH 7.5, vorgelegt und mit 1.6 µg (Endkonzentration: 0.064 µM) Trypsin versetzt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 100 µl-Aliquots entnommen, mit 100 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt und der Verdau durch fünfminütiges Erhitzen auf 95° C gestoppt. Die Proben wurden anschließend durch Gelelektrophorese mit Tris-Tricin-Gelen (s. 3.2.4.4) analysiert.

3.2.4.4 Polyacrylamidgelelektrophorese

Tris-Polyacrylamid-Gele

Durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Anwesenheit des Detergens Natriumlaurylsulfat (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) können Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Die durchwanderte Strecke im Gel ist dabei dem Logarithmus des Molekulargewichts in etwa proportional. Durch Vergleich mit mitgeführten Proteinstandards kann so das Molekulargewicht einer Probe abgeschätzt werden.

Die Konzentration an Polyacrylamid betrug 12.5%, die Dimensionen der Gele waren 10 x 6 x 0.075 cm (Breite x Höhe x Dicke) für das Trenngel und 10 x 2 x 0.75 cm für das Sammelgel. In einer Gelgießapparatur (Multi Gel Caster, Amersham Pharmacia Biotech) wurden nach dem Rezept in Tabelle 3 10-12 Gele gleichzeitig gegossen.

Die Proteinproben wurde mit einem Volumen 2 x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt, 3 min auf 95° C erhitzt und anschließend 1 min abzentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*, 13 000 Upm). Mit einer Hamiltonspritze (Hamilton, Banaduz, Schweiz) wurden Aliquots, in der Regel 10 µl, in die Probentaschen gegeben.

Die Elektrophorese fand bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel statt. Nach ca. 70 min hat der Farbmarker im Probenpuffer das Gel durchlaufen und die Elektrophorese ist abgeschlossen.

Die Gele wurden für mind. 20 min unter leichtem Wippen in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend durch zwei- bis dreimaliges Aufkochen in einer Mikrowelle entfärbt.

Tabelle 3: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für 12 Tris-Polyacrylamidgele

	Trenngel	Sammelgel
Trenn-/ Sammelgelpuffer	14.8 ml	6.8 ml
Acrylamid-Stammlösung (30% w/v)	27.1 ml	4.4 ml
H_2O	23.0 ml	15.2 ml
TEMED	32.5 µl	22 µl
APS-Stammlösung (250 mg/ml)	130 µl	100 µl

Tris-Tricin-Polyacrylamid-Gele

Durch Verwendung einer Tris-Tricin-Puffermischung werden Gele erhalten, mit denen eine bessere Auftrennung von Proteinen unter 100 kDa erhalten wird als mit Tris-Polyacrylamidgelen (Schägger & von Jagow, 1987). Tris-Tricin-Gele wurden zur Analyse von Trypsinverdauen (s. 3.2.4.3) verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 4: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für 2 Tris-Tricin-Polyacrylamidgele

	Trenngel	Sammelgel
Tris-Tricin-Gelpuffer	10.0 ml	3.1 ml
Acrylamid-Stammlösung (30% w/v)	20.0 ml	1.6 ml
H_2O	-	7.6 ml
TEMED	10 µl	10 µl
APS-Stammlösung (250 mg/ml)	100 µl	100 µl

Die Probenvorbereitung, das Färben und Entfärben des Gels erfolgte wie bei den Tris-Polyacrylamidgelen. Tris-Tricin-Anodenpuffer wurde in die obere Elektrophoresekammer gefüllt, Tris-Tricin-Kathodenpuffer in die untere. Die Laufzeit betrug 3-4 h bei einer Spannung von 20 mA.

Native PAGE

Bei der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird dem Gel und dem Probenpuffer kein Detergens zugesetzt, so daß die native Konformation und der Assoziationszustand der Proteine erhalten bleiben. Die Trennung der Proteine erfolgt anders als bei der SDS-PAGE nicht ausschließlich nach der Größe, sondern nach Ladung und Größe.

Um die Auftrennung der Proben zu verbessern, wurden Gele mit einem linearen Polyacrylamidgradienten von 5 bis 20% verwendet. Der Gradient wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers aus Trenngellösungen mit 5% und 20% Polyacrylamid hergestellt. Die verwendeten Trenngele hatten eine Größe von 20 x 20 x 0.1 cm (Breite x Höhe x Dicke), die Sammelgele von 20 x 6 x 0.1 cm.

Die Proteinproben wurden mit einem Volumen 2 x native PAGE-Probenpuffer versetzt und ein Aliquot mit Hilfe einer Microliterspritze (Hamilton) in die Probentaschen gegeben. Die Elektrophorese fand bei einer konstanten Spannung von 300 V und einer maximalen Stromstärke von 70 mA statt und dauerte 16 h.

Anschließend wurden die Gele für mind. 1 h unter leichtem Wippen in Coomassie-Färbelösung gefärbt und durch vier- bis fünfmaliges Aufkochen in einer Mikrowelle entfärbt.

Tabelle 5: Zusammensetzung eines nativen Polyacrylamidgels

	Trenngel 5 %	20 %	Sammelgel
Trenn-/ Sammelgelpuffer	8.33 ml	8.33 ml	1.93 ml
Acrylamid-Stammlösung (30% w/v)	4.17 ml	16.67 ml	2.5 ml
H_2O	12.5 ml	-	10.5 ml
TEMED	12 µl	12 µl	12 µl
APS-Stammlösung (250 mg/ml)	50 µl	50 µl	36 µl

3.2.4.5 Western-Blotting

Proteinfragmente wurden aus einem Tris-Tricin-Gel im Semi-Dry-Verfahren auf eine PDVF-Membran übertragen („Western-Blotting“, nach Towbin et al., 1979, verändert). Dazu wurden vier Stücke Blotting-Papier sowie ein Stück PDVF-Membran auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel sowie das Blotting-Papier wurden für ca. 10 min in 1 x Blotting-Puffer äquilibriert. Die Transfermembran wurde mit Methanol angefeuchtet und anschließend für 2 min. in 1 x Blotting-Puffer äquilibriert. Für die Assemblierung des Transferstapels wurden als unterste Schicht zwei Lagen Blotting-Papier auf die Basis der Transfer-Einheit gelegt. Es folgten die PDVF-Membran und das Gel. Die oberste Schicht bestand erneut aus zwei Lagen Blotting-Papier.

Der Transfer erfolgte für 30 min. bei 150 mA (max. 50 V). Die Proteinbanden wurden durch ca. 1minütiges Schwenken der Transfer-Membran in Ponceau-S-Lösung angefärbt und der Hintergrund durch Spülen mit Wasser entfärbt. Die Banden wurden gekennzeichnet und ausgeschnitten.

3.2.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Zur schnellen Abschätzung des Proteingehalts einer Lösung wurde die Quantifizierungsmethode nach Bradford (1976) verwendet. Der in der Assay-Färbelösung enthaltene Farbstoff Coomassie Brillantblau bindet unspezifisch an Proteine, besonders an kationische, nichtpolare und hydrophobe Reste, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Die Absorption hängt in einem Bereich von ca. 0.2-1.4 mg ml^{-1} (20-140 µg Gesamtprotein) linear vom Proteingehalt der Lösung ab.

Es wurden 800 µl Proteinlösung mit 200 µl Bio-RAD Protein Assay-Färbelösung versetzt und gevortext. Innerhalb weniger Minuten bildete sich ein blauer Protein-Farbstoff-Komplex der nach ca. 5 min durch Absorptionsmessung bei 595 nm gegen eine Referenz mit gleichem Puffer im Spektrophotometer gemessen wurde. Die ungefähre Proteinkonzentration der Probe wurde durch Vergleich mit einer Kalibrierungskurve mit BSA festgestellt.

Proteinbestimmung durch UV-Absorption

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sowie Disulfidbrücken (Cystine) absorbieren in unterschiedlichem Maße UV-Licht im Bereich von 250-300 nm. Mit der von Pace et al. (1995) entwickelten Formel (Gleichung (3.5)) kann aus Proteinen bekannter Aminosäurezusammensetzung der molare Extinktionskoeffizient ε_{280} berechnet werden:

$$\varepsilon_{280}(M^{-1}cm^{-1}) = \sum Trp \times 5500 + \sum Tyr \times 1490 + \sum Cystine \times 125 \qquad (3.5)$$

ε_{280}: molarer Absorptionskoeffizient bei 280 nm

Durch Einsetzen des berechneten molaren Absorptionskoeffizienten ins Lambert-Beersche Gesetz kann aus der Absorption bei 280 nm die Konzentration eines Proteins berechnet werden (Gleichung (3.6):

$$A = e \times c \times d \Leftrightarrow c = \frac{A}{e \times d} \qquad (3.6)$$

A: Absorption
c: Konzentration (M)
d: Schichtdicke (cm)

3.2.4.7 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine empfindliche Methode für den Nachweis von Konformationsänderungen in Proteinen. Die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen beruht auf der Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren, wobei der Beitrag von Tryptophanen mit Abstand am größten ist. Die Fluoreszenz von Tryptophanresten kann selektiv bei einer Anregungswellenlänge von $\geq$ 295 nm untersucht werden, da Tyrosine und Phenylalanine bei so hohen Wellenlängen praktisch kein Licht mehr absorbieren.

Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen kann Aufschluß darüber gewonnen werden, ob ein Protein in nativer oder denaturierter Form vorliegt. Ferner kann bei Proteinenvarianten festgestellt werden, ob sich ihre Konformation gegenüber der Wildtypform verändert hat. Ein vollständig lösungsmitelexponierter Tryptophanrest, wie er in einem denaturierten Protein vorliegt, weist ein Fluoreszenzmaximum bei ca. 350 nm auf, während das Fluoreszenzmaximum in hydrophober Umgebung zu niedrigeren Wellenlängen hin verschoben wird. Weiterhin wirkt sich eine Änderung der Umgebung von Tryptophanresten auf die Fluoreszenzintensität aus.

Tyrosinfluoreszenz alleine ist dagegen nicht geeignet zur Analyse der Proteinkonformation, da das Maximum unabhängig vom Grad der Lösungsmittelexposition bei 303 nm liegt und auch die Fluoreszenzintensität gleich bleibt.

Die Fluoreszenzmessungen wurden entweder an einem Fluoreszenz-Spektrometer F-4500 von Hitachi (Tokio, Japan) oder einem Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse (Varian Inc., Palo Alto, Californien, USA) durchgeführt.

Zur Aufnahme von Emissionsspektren wurde das Protein auf eine Konzentration von 10 µM in 10 mM KP, pH 7.5 eingestellt. Es wurden Spektren von 300-400 nm bei Anregungswellenlängen von 280 nm und 295 nm aufgenommen.

3.2.4.8 Fluorimetrische Titration von tHisH mit tHisF

Mit Hilfe der fluorimetrischen Titration von tHisH mit tHisF sollte die Komplexbildung analysiert werden. tHisH wurde in einer Konzentration von 10 µM vorgelegt und tHisF in Titrationsschritten von 2.5 µM bis zu einer Endkonzentration von 20 µM zugegeben. Nach jedem Titrationsschritt wurden Fluoreszenzemissionspektren von 300-400 nm aufgenommen. Die übrigen Einstellungen waren wie folgt:

excitation slit	5 nm
emission slit	5 nm
Photomultiplier voltage	400 V
response time	0.5 s
scan speed	60 nm/min

Bedingungen:
50 mM KP, pH 7.6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, T= 25° C

Die erhaltenen Spektren wurden zur Bestimmung des isoemissiven Punktes superpositioniert.

3.2.4.9 Steady-state-Enzymkinetik

Die katalytischen Parameter K_M und k_{cat} wurden für die tHisH-Glutaminase-Aktivität, für die ammoniumabhängige tHisF-Aktivität sowie für die glutaminabhängige tHisF-Aktivität unter Fließgleichgewichtsbedingungen („steady-state“) bestimmt. Für tHisF wurde ebenfalls die thermodynamische Dissoziationskonstante (K_D) für ImGP und 5’-ProFAR ermittelt. Alle Enzymtests wurden bei 25°C durchgeführt.

Messung der HisH-Aktivität

Die Glutaminase-Aktivität von tHisH ist, wenn tHisH nicht im Komplex mit tHisF vorliegt, so gering, daß sie mit der verwendeten Methode nicht von der spontanen Hydrolyse des Glutamins unterschieden werden konnte. Neben der Bindung von tHisF an tHisH muß ferner ein Ligand an HisF gebunden sein, um die Glutaminase-Aktivität zu stimulieren. Neben dem HisA-Substrat 5'-ProFAR hat sich das HisF-Produkt ImGP als wirksamer Ligand erwiesen (Klem & Davisson, 1993).

Die Reaktion von HisH besteht in der Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und Ammoniak. Da diese Reaktion mit keiner Absorptionsänderung verbunden ist, wurde die HisH-Reaktion für einen photometrischen Assay an die Glutamat-Dehydrogenase-Reaktion gekoppelt.

In der Glutamat-Dehydrogenase-Reaktion wird Glutamat unter Reduktion von NAD^+ zu 2-Oxoglutarat oxidiert. Die NAD^+-Reduktion ist durch eine Zunahme der Absorption bei 340 nm nachweisbar. Die Reaktionsfolge ist schematisch in Abbildung. 3.3 dargestellt.

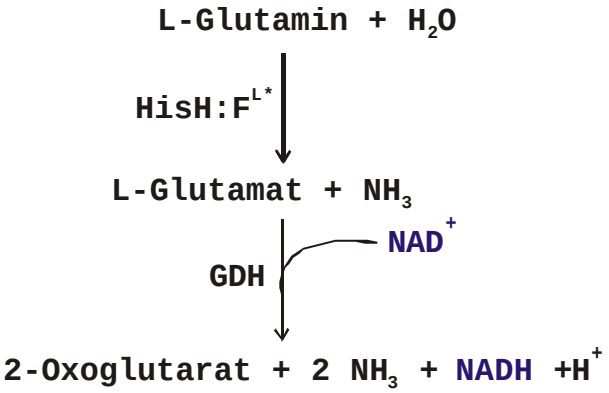


Abbildung. 3.3: Schema des gekoppelten Assays zur Bestimmung der HisH-Glutminase-Aktivität

* $HisF^L$: HisF mit gebundenem Liganden. Als Ligand kann das Substratanalogon 5'-ProFAR oder das HisF-Produkt ImGP dienen.

Für die tHisH-Reaktion wurden der k_{cat} sowie der K_D-Wert für ImGP und 5'-ProFAR bestimmt.

Die Reaktionsansätze sahen wie folgt aus:

50 mM Tricin/KOH, pH 8.0
0-8 mM Glutamin
5 mM NAD^+
0.75 mg GDH
0-10 mM ImGP oder 0- 100 µM 5'-ProFAR
1 µM tHisF
1 µM tHisH

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von tHisH oder von Glutamin. Da keine Gesamtumsatzkurven aufgenommen werden konnten, wurde v_{max} und daraus k_{cat} aus der Anfangssteigung der Reaktion unter Vollsättigung bestimmt. Der K_D-Wert für den HisF-Liganden wurde aus Reaktionsansätzen mit unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen bestimmt.

Messung der HisF-Aktivität

Die katalytischen Parameter k_{cat} und K_M von tHisF wurden in einem gekoppelten enzymatischen Test bestimmt, in dem der HisF-Reaktion die HisA-Reaktion vorangestellt war. Dies war notwendig, weil das HisF-Substrat 5'-PRFAR zu instabil ist, um gelagert werden zu können. Es wurde daher *in situ* durch Umsatz des stabileren HisA-Substrats 5'-ProFAR hergestellt. Das entstandene 5'-PRFAR wurde von tHisF in die Produkte ImGP und AICAR umgewandelt. Der Umsatz von 5'-PRFAR zu AICAR läßt sich photometrisch über die Abnahme der Absorption bei 300 nm bestimmen (ΔA_{300} (5'-PRFAR-AICAR)=5.64 mM^{-1} cm^{-1}, Klem & Davisson, 1993).

Ein Schema des Assays ist in Abbildung 3.4 gezeigt.

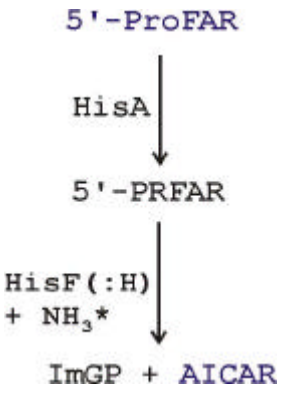


Abbildung. 3.4: Schema des gekoppelten Assays zur Bestimmung der tHisF-Aktivität

* Als Ammoniakquelle diente in Anwesenheit von HisH *in situ* hergestellter Ammoniak, in Abwesenheit von HisH wurde Ammoniumacetat zugegeben.

Ein Reaktionsansatz zur Bestimmung der glutaminabhängigen HisF-Reaktion war wie folgt zusammengesetzt:

50 mM Tris/Acetat, pH 8.0
5 mM Glutamin
600 nM tHisA
0-20 µM 5'-ProFAR
100 nM tHisH:F-Komplex

Die Enzymkonzentration betrug bei Wildtyp-tHisF bzw. des Wildtyp-tHisH:F-Komplexes 100 nM. Bei den tHisF-Varianten wurden je nach Aktivität 100 nM bis 20 µM Enzym eingesetzt. Der Ansatz zur Messung der ammoniumabhängigen HisF-Reaktion unterschied sich von dem zur Messung der glutaminabhängigen Reaktion darin, daß ein Tris/Acetat-Puffer mit pH 8.5 verwendet wurde, und als Amiddonor diente 0-200 mM NH_4-Acetat (entspr. 0-34.8 mM NH_3, berechnet mit Hilfe der Henderson-Haselbalch-Gleichung) anstelle von Glutamin. Die Anwesenheit von tHisH ist in dieser Reaktion nicht erforderlich.

Die Reaktion wurde durch Enzymzugabe gestartet. Voll aktives tHisF (Wildtyp und einige der Varianten) setzte das produzierte 5'-PRFAR innerhalb weniger Minuten vollständig um. Aus den Umsatzkurven wurden mit dem Programm COSY (Eberhard, 1990) v_{max} und K_M mittels der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung (3.7) bestimmt.

$$K_M \ln \frac{A_0}{A_t} - A_0 + A_t = V_{max}\, t \qquad (3.7)$$

A_0, A_t: Absorption zum Zeitpunkt 0 bzw. t

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Klonierung und Expression von tHisH und tHisF

4.1.1 tHisH-Wildtyp

Das Gen für die Glutaminase-Untereinheit der ImGPS aus *Thermotoga maritima*, t*his*H, wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Als Matrize diente genomische *T. maritima*-DNA, die mit Hilfe des GeneClean Kits (AGS GmbH) isoliert wurde. Die Primer für die PCR pDS-*his*H *Sph*I und pDS-*his*H *Hin*dIII fügten die Schnittstellen *Sph*I und *Hin*dIII ein, mit welchen das Gen in den mit diesen Restriktionsenzymen verdauten Vektor pDS56/RBSII (kurz „pDS“) kloniert wurde. Elektrokompetente *E. coli*-KK8-Zellen, die das Repressorplasmid pDMI,1 enthielten („KK8+ pDM“), wurden mit dem Plasmid pDS-t*his*H transformiert. Von mehreren auf Selektivmedium (LB-Amp-Kana) gewachsenen Klonen wurde Plasmid-DNA präpariert und eine Sequenzierung mit den Primern CyRI und CyPstI durchgeführt, wodurch die publizierte t*his*H-Sequenz (Thoma et al., 1998) bestätigt werden konnte.

Eine Expression im analytischen Maßstab zeigte, daß erst nach Inkubation der mit IPTG induzierten Zellen über Nacht (ca. 16 h) eine deutliche Überexpression erfolgte. Von positiven Klonen wurden 1 L-Kulturen angezogen und nach Wachstum über Nacht geerntet.

4.1.2 tHisH-W123F

Um über Fluoreszenzspektroskopie Hinweise auf mögliche Konformationsänderungen in tHisF bei der Bindung von tHisH oder von tHisF im tHisH:F-Komplex bei Bindung des Substratanalogons 5'-ProFAR zu bekommen, sollte eine tryptophanfreie tHisH-Variante hergestellt werden. Die Fluoreszenzemmission im Komplex würde dann nur von tHisF abhängen. In tHisH gibt es ein Tryptophan an Position 123, dessen Codon mit Hilfe der Megaprimer-Methode (s. 3.2.2.9) gegen ein Phenylalanin-Codon ausgetauscht wurde. Durch Sequenzierung wurde der Nukleotidaustausch in einem Klon bestätigt.

Die Expression von *this*H-W123F erfolgte analog zum Wildtyp-*this*H (s. 4.1.1).

4.1.3 tHisF-Wildtyp

Das Gen für die Synthase-Untereinheit der ImGPS aus *Thermotoga maritima*, *this*F, wurde mit den Primern pET-*this*F *Nde*I und pET-*this*F *Bam*HI aus dem Plasmid SK^+/III-P-P (Thoma, 1998) amplifiziert und mit dem *Nde*I/*Bam*HI geschnittenen Vektor pET 11c ligiert. Das resultierende Konstrukt pET11c-*this*F wurde zu Beginn der Arbeit von Reinhard Sterner zur Verfügung gestellt. Elektrokompetente *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen wurden mit dem Plasmid transformiert. Von auf Selektivmedium (LB-Amp) gewachsenen Klonen wurde Plasmid-DNA präpariert und eine Sequenzierung mit den Primern T7 prom und T7 term durchgeführt, wodurch die publizierte *this*F-Sequenz (Thoma et al., 1998) bestätigt wurde.

Die Expression im analytischen Maßstab zeigte, daß erst nach Inkubation der Zellen über Nacht (ca. 16 h) eine deutliche Überexpression erfolgte. Außerdem wurde festgestellt, daß in den meisten Fällen eine IPTG-unabhängige Expression erfolgte, IPTG teilweise sogar hemmend wirkte; deshalb wurde auf die Induktion mit IPTG verzichtet. Von positiven Klonen wurden 1 L-Kulturen angezogen und nach Wachstum über Nacht geerntet.

4.1.4 tHisF-Varianten

Zur Identifizierung an der Katalyse der HisF-Reaktion beteiligter Aminosäuren wurden ausgewählte Reste durch ortsspezifische, konservative Mutagenese ausgetauscht. Die Auswahl potentiell katalytischer Reste erfolgte nach folgenden Kriterien:

1. Die Aminosäure sollte in allen oder fast allen bekannten HisF-Sequenzen konserviert sein. Alle veröffentlichten HisF-Sequenzen wurden mit Hilfe des *Sequence Retrieval System* aus den Datenbanken Swiss-Prot, TrEMBL und TrEMBL-New extrahiert. In einem multiplen Alignment (*pile up* aus dem GCG-Paket, s. Anhang) wurden die Reste identifiziert, die streng konserviert waren (max. 2 Abweichungen).

Eine Ausnahme stellte der Rest T171 dar, der diesem Kriterium nicht entsprach. Er wurde dennoch als potentiell katalytischer Rest betrachtet, da er den unter 2.-3. genannten Kriterien entsprach und außerdem in HisA an gleicher Stelle ein streng konserviertes und katalytisch wichtiges Threonin liegt (Martina Henn-Sax, persönliche Mitteilung; s. tHisF-tHisA-Alignment, 8.4). In HisF liegt an Position 171 in 8 Organismen anstelle des Threonins ein Asparagin, aber keine der anderen Aminosäuren.

2. Da in allen bekannten Enzymen mit $(\beta/\alpha)_8$-barrel-Faltung das aktive Zentrum am C-terminalen Ende des Fasses, d. h. am Ende der β-Stränge oder in den Loops nach den β-Strängen, liegt, wurden nur Aminosäuren berücksichtigt, die nach der zu der Zeit verfügbaren Sekundärstrukturvorhersage (PHD-Programm, Rost & Sander, 1993; Rost, 1996) an diesen Positionen lagen.

3. Es wurde vermutet, daß an der Reaktion Schritte beteiligt sind, die durch allgemeine Säure/Base-Katalyse katalysiert werden. Aus diesem Grund wurden nur Aminosäuren betrachtet, die als allgemeine Säure oder Base wirken können.

Mit Hilfe der oben genannten Kriterien wurden 9 Aminosäuren in tHisF gefunden, bei denen eine Beteiligung an der Katalyse möglich erschien. Ferner soll für Fluoreszenzanalysen (4.3.3.) das einzige Tryptophan (W156 in α-Helix 5, Tab. 6, Abb. 4.1) gegen Phenylalanin ausgetauscht werden. Es wurden die in Tabelle 6 gezeigten Austausche vorgenommen bzw. geplant. Die Lage dieser gezielt veränderten Aminosäuren in der Sekundärstruktur ist in Abbildung 4.1 gezeigt.

Tabelle 6: Punktmutationen in tHisF und Lage der Aminosäuren in der Sekundärstruktur

Austausch	Lage des Restes(1)
C9A	in β1
D11N	in β1
K19S	in β1'
D51N	in β2
N103A	im Loop nach β4
D130E/N	in β5
W156F	in α5
T171A	in β6
D176N	in α6'(2)
D183N	im Loop nach β6

(1): in der Röntgenkristallstruktur
(2): Die Lage des Reste nach der Sekundärstrukturvorhersage war in β6

Die Varianten t*his*F-W156F und t*his*F-T171A wurden bislang noch nicht hergestellt.

Zur Klonierung der übrigen t*his*F-Varianten wurden die im Methodenteil aufgeführten Primer eingesetzt, als Matrize diente das Konstrukt pET11c-t*his*F-wt. Die Variante t*his*F-D130E lag aus den Komplementationsexperimenten in pTNA kloniert vor (s. 4.5) und wurde über die *Sph*I- und *Bam*HI-Restriktionsschnittstellen in pDS umkloniert. Die Varianten C9A, D11N und K19S wurden unter Verwendung eines mutagenen 5'-Primers hergestellt. Zur Herstellung der übrigen Varianten wurde die Megaprimer-Methode (s. 3.2.2.9) verwendet. Die t*his*F-Mutanten wurden über die *Nde*I- und *Bam*HI-Schnittstellen in pET11c ligiert. Die Expression erfolgte analog zum Wildtyp-tHisF (s. 4.1.3).

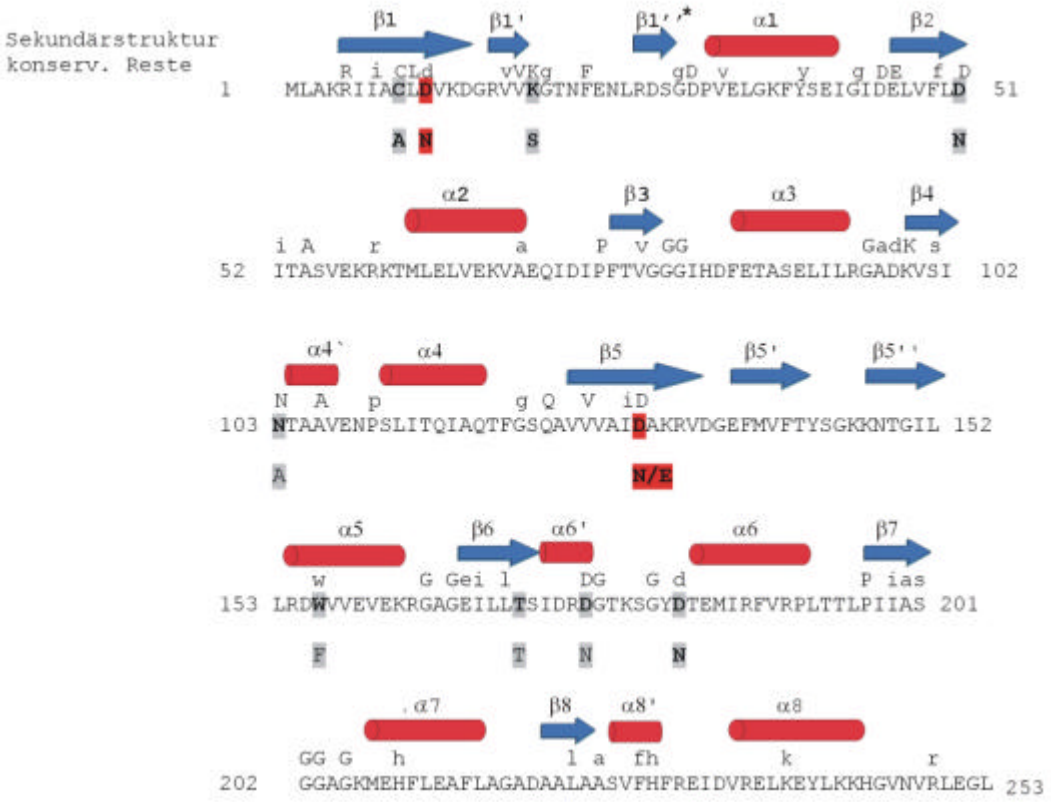


Abbildung 4.1: Durchgeführte bzw. geplante Aminosäureaustausche in tHisF.

Die durchgeführten bzw. geplanten A minosäureaustausche sind durch Schattierung gekennzeichnet. Die Austausche von D11 und D130 sind rot markiert.
konservierte Reste: Großbuchstaben, total konservierte Reste in 25 verglichenen HisF-Sequenzen, Kleinbuchstaben: in max. drei der 25 HisF-Sequenzen nicht konserviert
*: Die Aminosäuren Arg-27-Ser-29 wurden in der Röntgenstruktur des isolierten tHisF (Lang et al., 2000) als Teil des Loops nach β1', in der tHisH:F-Komplexstruktur (M. Walker, M. Wilmans, persönliche Kommunikation) dagegen als β1'' definiert. Im folgenden wird vom Vorliegen von β1'' ausgegangen, da Reste in β-Strängen über Wasserstoffbrücken mit einem benachbarten β-Strang verbunden sind.

4.1.5 Diskussion

Die Expression der pET11c-Konstrukte erwies sich in einigen Fällen als konstitutiv und nicht als IPTG-abhängig. Der Grund könnte darin bestehen, daß Lactose im Trypton oder Hefeextrakt des LB-Mediums vorhanden war, wodurch die Expression induziert wurde. Eine mögliche Abhilfe wäre, dem LB-Medium Glucose zuzugeben, um das Lac-Operon zu reprimieren. Auf diese Maßnahme wurde jedoch verzichtet, da auch bei der IPTG-unabhängigen Expression eine hohe Proteinausbeute erzielt wurde.

4.2 Reinigung von tHisH, tHisF und tHisH:F

4.2.1 tHisH

Nach Expression der klonierten Gene *this*H-wt und *this*H-W123F (s. 4.1.1 und 4.1.2) wurden die Zellkulturen abzentrifugiert und die Zellen in Kaliumphosphatpuffer (KP) aufgenommen. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Reinigung des Wildtyp-Proteins erfolgte durch Benzonase-Behandlung, Hitzeschritt (s. 3.2.3.2), Anionenaustauschchromatographie (s. 3.2.3.4) und Hydroxylapatitchromatographie (s. 3.2.3.5). Alternativ zur Hydroxylapatitchromatographie wurde in einigen Präparationen eine Ammoniumsulfatpräzipitation (s. 3.2.3.6) durchgeführt. Die Reinigungsstrategie ist schematisch in Abbildung 4.2 dargestellt.

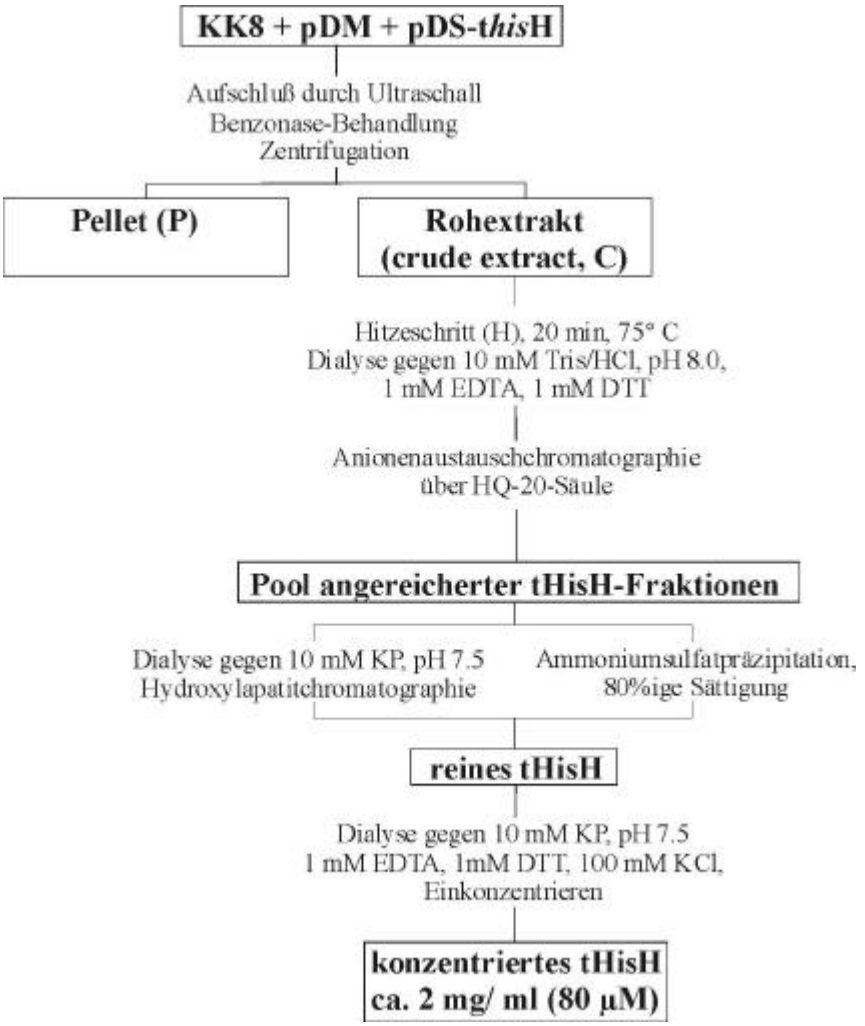


Abbildung 4.2: Fließdiagramm der tHisH-wt-Reinigung

Die Anreicherung und Reinigung des Proteins wurde mittels SDS-Page verfolgt (Abb. 4.3).

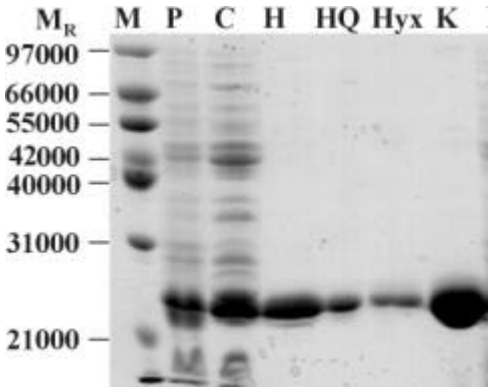


Abbildung 4.3: Die Reinigung von tHisH wurde mittels SDS-PAGE verfolgt

12.5%iges SDS-Gel, Auftrag 10 µl pro Spur.
M: Marker (Promega midrange)
P: unlöslicher Rohextrakt (Pellet)
C: löslicher Rohextrakt
H: Hitzeschritt-Überstand
HQ: gepoolte Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie
Hyx: gepoolte Fraktionen nach Hydroxylapatitchromatographie
K: mit Centriprep-10-Konzentratoren einkonzentriertes tHisH

Nach Abschätzen vom SDS-Gel befand sich tHisH zu ca. 60% im löslichen Zellextrakt (Spur „C“). Durch die nachfolgenden Reinigungsschritte konnte das lösliche tHisH in reiner Form gewonnen werden. Nukleinsäuren konnten durch die angeführte Prozedur vollständig entfernt werden, wie durch Absorptionsspektren der Proteinfraktionen gezeigt werden konnte. Die Identität des Proteins wurde durch N-terminale Sequenzierung von sieben Aminosäuren bestätigt (Paul Jenö, Biozentrum der Universität Basel). Dabei wurde gezeigt, daß das N-terminale Methionin in tHisH nicht abgespalten wurde.
tHisH-wt ließ sich in 10 mM KP, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT bis zu einer Konzentration von ungefähr 2 mg/ml einkonzentrieren. Bei höherer Konzentration wurde eine Aggregationstendenz beobachtet.

Die Proteinausbeute betrug pro Liter Zellkultur etwa 20 mg bzw. ca. 4 mg pro Gramm Zellen (Frischgewicht).

Bei der Reinigung von tHisH-W123F wurde wie beim Wildtyp-Enzym verfahren, allerdings mit der Einschränkung, daß die Konzentration des Enzyms stets gering (< 10 µM) gehalten wurde, da tHisH-W123F stärker als das Wildtyp-Enzym zur Aggregation neigt. Das gereinigte Enzym wurde auf ca. 30 µM einkonzentriert. Die Ausbeute an tHisH-W123F lag mit 1.3 mg pro Gramm Zellen (Frischgewicht) bei etwa einem Drittel der Ausbeute an Wildtyp-Enzym, die Reinheit betrug nach Abschätzen vom SDS-Gel ca. 90 % (Abb. 4.4 A). Absorptionsspektren der tHisF-W123F-Fraktion zeigte, daß Nukleotide nicht vollständig abgetrennt werden konnten. Es wurde daher ein alternatives Reinigungsprotokoll entwickelt, in dem tHisH-W123F im Komplex mit tHisF-wt gereinigt wurde.

In diesem alternativen Reinigungsverfahren wurde zum Hitzeschrittüberstand eine äquimolare Menge an tHisF-wt gegeben, ein weiterer Hitzeschritt (H') durchgeführt (20 min, 75° C) und der tHisH-W123F:F-Komplex mit Centriprep-Konzentratoren einkonzentriert. Über eine präparative Gelfiltration an einer Superdex-75-Säule wurde der Komplex teilweise von Nukleinsäuren befreit. Die in der Proteinfraktion verbliebenen Nukleinsäuren und Nukleotide konnten durch anschließende Dialyse gegen 10 mM KP, pH 7.5 und Einkonzentrieren in Centriprep-10-Konzentratoren jedoch nicht vollständig entfernt werden, wie durch Absorptionsspektroskopie nachgewiesen wurde (Absorptionsmaximum bei 260 nm). Die Konzentration wurde daher mit Hilfe des Bradford-Assays sowie durch Vergleich mit Banden bekannter Proteinmenge vom SDS-Gel abgeschätzt.

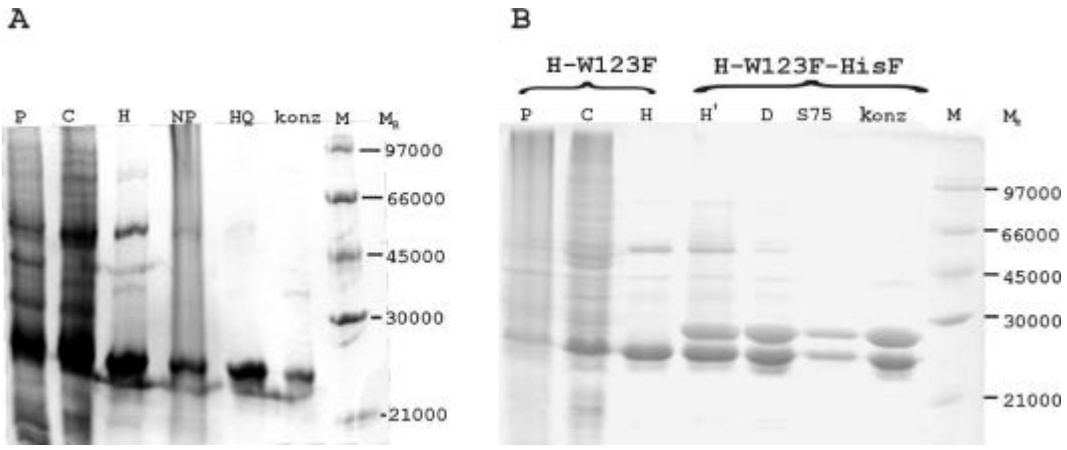


Abbildung 4.4: Die Reinigung von isoliertem tHisH-W123F (A) und tHisH-W123F:F (B) wurde mittels SDS-PAGE verfolgt.

12.5%iges SDS-Gel, Auftrag 10 µl pro Spur
P: unlöslicher Rohextrakt (Pellet)
C: löslicher Rohextrakt
H: Hitzeschritt-Überstand
NP: resuspendiertes $(NH_4)_2SO_4$-Pellet
HQ: gepoolte Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie
konz: mit Centriprep-10-Konzentratoren einkonzentriertes Protein
M: Marker (Amersham Pharmacia Biotech low range)
D: resuspendiertes $(NH_4)_2SO_4$-Pellet
S75: gepoolte Fraktionen nach Gelfiltration

4.2.2 tHisF

Das wildtypische tHisF und alle tHisF-Varianten wurden nach dem gleichen Protokoll gereinigt.

Nach dem Abzentrifugieren der Zellkulturen wurden die Zellen in Kaliumphosphatpuffer (KP) resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Reinigung erfolgte durch Benzonase-Behandlung, Hitzeschritt (s. 3.2.3.2) und Anionenaustauschchromatographie (s. 3.2.3.4). Die Reinigungsstrategie ist schematisch in Abbildung 4.5 dargestellt.

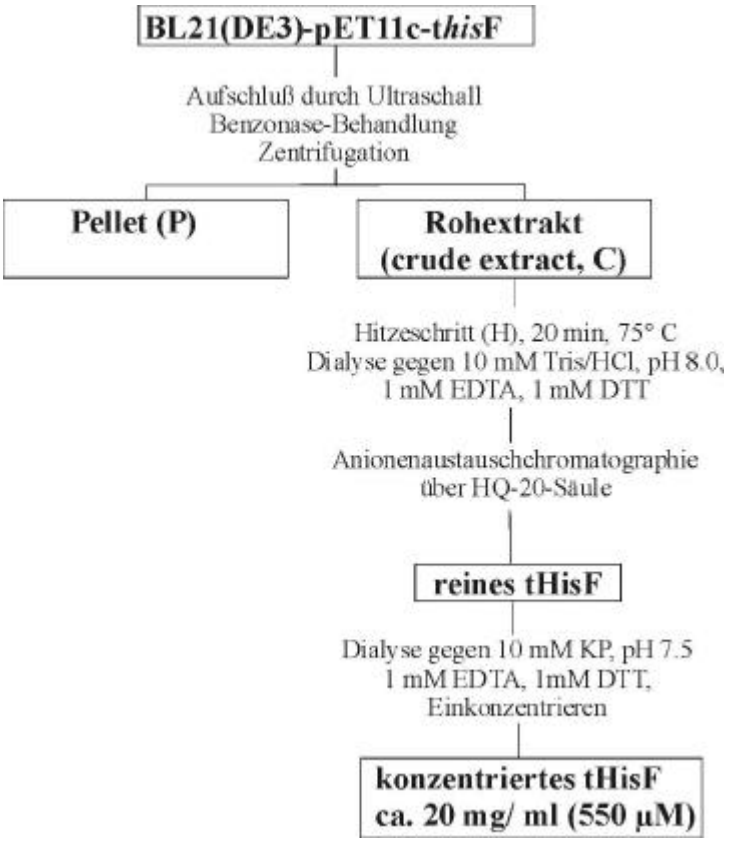


Abbildung 4.5: Reinigungsschema für tHisF

Die Anreicherung und Reinigung des Proteins wurde mittels SDS-PAGE verfolgt. In Abbildung 4.6 ist als Beispiel ein SDS-Gel der Reinigung von tHisF-D11N gezeigt.

Nach Abschätzen vom SDS-Gel befand sich tHisF zu ca. 70% im löslichen Zellextrakt (Spur „C“). Durch die nachfolgenden Reinigungsschritte konnte das lösliche tHisF in hochreiner Form gewonnen werden. Die Identität des Proteins wurde durch N-terminale Sequenzierung von zehn Aminosäuren bestätigt (Zentrum für Molekulare Medizin der Universität Köln). Dabei wurde gezeigt, daß das N-terminale Methionin in tHisF nicht abgespalten wurde.

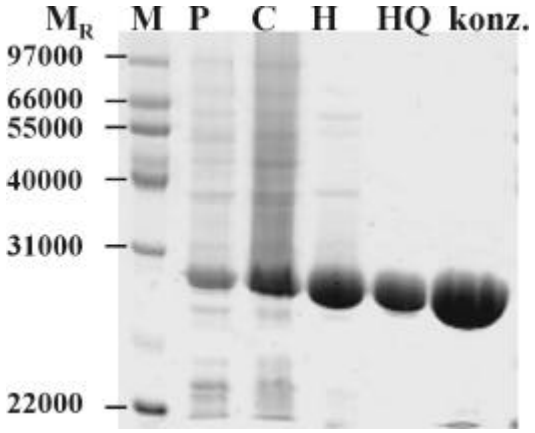


Abbildung 4.6: Die Reinigung von tHisF (hier: tHisF-D11N) wurde mittels SDS-PAGE verfolgt.

12.5%iges SDS-Gel, Auftrag 10 µl pro Spur
M: Marker (Promega midrange)
P: Pellet
C: löslicher Rohextrakt
H: Hitzeschritt-Überstand
HQ: gepoolte Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie
K: mit Centriprep-10-Konzentratoren einkonzentriertes HisF-D11N

tHisF ließ sich in 10 mM KP, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT bis zu einer Konzentration von ungefähr 15 mg/ml (ca. 415 µM) einkonzentrieren. Bei höherer Konzentration trat Aggregation auf.

Die Proteinausbeuten aller tHisF-Varianten sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tab. 7).

Tabelle 7: Proteinausbeute der verschiedenen tHisF-Varianten.

HisF-Variante	Proteinausbeute		
	fw (g/l)[(1)]	(mg/ l)	(mg/g fw)
wt	3.7	40	10.8
C9A	3.7	31	8.4
D11N	4.9	84	17.1
K19S	4.7	64	13.6
D51N	3.6	45	12.5
N103A	3.6	38	10.6
D130N	5.1	66	12.9
D130E	3.3	54	16.4
D176N	3.0	52	17.3
D183N	3.1	21	6.8

[(1)]: Zellfrischgewicht

4.2.3 Herstellung von Bienzymkomplexen aus tHisH und tHisF

Zur Herstellung von Komplexen aus tHisH und tHisF (wt oder eine der Varianten) wurden äquimolare Mengen der beiden in 10 mM KP vorliegenden Enzyme zusammengegeben. Zur Abtrennung eines möglichen Überschusses einer Komponente oder von Aggregaten wurde die tHisH:F-Mischung über präparative Gelfiltration gereinigt und anschließend mit Centriprep-10-Konzentratoren einkonzentriert. Bis zur maximal erreichten Konzentration von ca. 10 mg/ml (ca. 200 µM) wurden keine Aggregate beobachtet. Durch native PAGE wurde gezeigt, daß sich ein stabiler Komplex aus tHisH und tHisF bildet (Abb. 4.7). Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter den gegebenen Bedingungen in Abhängigkeit vom isoelektrischen Punkt (pI). Der berechnete pI von tHisH beträgt 6.79, der von tHisF 5.06 (GCG-Package, Wisconsin University). Entsprechend seinem niedrigeren pI-Wert wanderte tHisF weiter als tHisH. Der Komplex, für den ein pI-Wert zwischen dem der beiden Komponente angenommen werden kann, wanderte zwischen den einzelnen Proteinen. Anhand der nativen PAGE kann allerdings nicht entschieden werden, wieviele tHisH- und tHisF-Einheiten pro Komplexmolekül vorliegen. Hierfür wurden andere Methoden, die analytische Gelfiltration (s. 4.3.1) und die analytische Ultrazentrifugation (s. 4.3.4) verwendet.

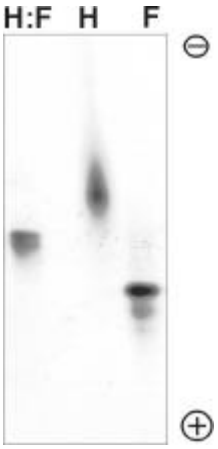


Abbildung 4.7: Die Ausbildung eines stöchiometrischen Komplexes aus tHisH und tHisF wurde durch native PAGE nachgewiesen.

Auftrag: je 10 µg tHisH, tHisF bzw. tHisH:F
Laufpuffer: 5 mM Tris, 38 mM Glycin, pH 8.3

Alle tHisF-Varianten verhielten sich in bezug auf die Komplexbildung genau wie der Wildtyp. Die Komplexe bildeten sich in jedem Fall innerhalb der Zeit zwischen dem Mischen der Komponenten und dem Auftrag auf das Gel.

4.2.4 Diskussion

Alle untersuchten Varianten von tHisF sowie der tHisH-Wildtyp ließen sich mit hohen Ausbeuten zur Homogenität reinigen. Während bei tHisF Benzonase-Behandlung, eine Dialyse und anschließende Anionenaustauschchromatographie zur quantitativen Entfernung der Nukleinsäuren ausreichte, mußte bei tHisH ein weiterer Reinigungsschritt angeschlossen werden. Neben einer Hydroxylchromatographie erwies sich eine Ammoniumsulfatpräzipitation als geeignetes Mittel. Durch Zugabe des Salzes konnte das Protein präzipitiert werden, während die Nukleinsäuren im Überstand blieben. tHisH-W123F erwies sich als deutlich aggregationsanfälliger als das Wildtyp-Enzym. Diese Variante befand sich nach dem Hitzeschritt fast vollständig im löslichen Überstand und erwies sich damit als thermostabil. Auch bei der Anionenaustauschchromatographie verhielt sich tHisH-W123F wie der Wildtyp, doch bei der anschließenden Dialyse der gepoolten Fraktionen kam es zum Ausfall eines großen Teils des Proteins. Daher wurde tHisH-W123F bei der weiteren Aufreinigung stets in verdünnter Lösung (Konzentration maximal 10 µM) gehalten, wodurch die Aggregation weitgehend verhindert wurde. Auch durch Reinigung im Komplex mit tHisF-wt wurde die Aggregation vermieden, doch trat dabei das Problem auf, daß Nukleinsäuren und Nukleotide nicht vollständig aus der Proteinfraktion entfernt werden konnten. Die Ursache für die ineffiziente Nukleinsäureentfernung aus der tHisH-W123F:F-Fraktion ist nicht bekannt.

Die Reinigung der tHisH:F-Komplexe erfolgte durch Zusammengeben äquimolarer Mengen der beiden Enzyme. Die Komplexe wiesen wie die einzelnen Komponenten eine hohe thermische Stabilität auf. Beim Einkonzentrieren der tHisH:F-Komplexe auf maximal 10 mg/ml (200 µM) traten keine Aggregate auf.

4.3 Biophysikalische Charakterisierung von tHisH und tHisF und des tHisH:F-Komplexes

4.3.1 Bestimmung des apparenten Molekulargewichts und des Oligomerisierungszustands mittels analytischer Gelfiltration

Die apparenten Molekulargewichte der gereinigten Proteine und Proteinkomplexe wurden mittels Gelfiltration auf einer kalibrierten Superdex-75-Säule eine Kalibrierungsgerade bestimmt (s. Kalibrierungsgerade in 8.6). Aus dem Elutionsvolumen von tHisH wurde ein deutlich von dem berechneten Molekulargewicht (23 100) abweichendes apparentes Molekulargewicht von ca. 17 000 ermittelt. tHisH liegt demnach als Monomer vor. Dieses Ergebnis wurde durch analytische Ultrazentrifugation (Ariel Lustig, Biozentrum der Universität Basel) bestätigt. Es wurde ein apparentes Molekulargewicht von 24 600 ermittelt. Aggregate lagen praktisch nicht vor. Im Sedimentationslauf mit 23 µM tHisH-Lösung in 50 mM KP-Puffer, pH 7.5, 25 mM KCl wurde bei 56 000 Upm ein $S_{20,w}$ von 2.45 ermittelt.

Das Elutionsvolumen von tHisF ergab ein apparentes Molekulargewicht von 26 400 und stimmte damit gut mit dem berechneten Molekulargewicht von monomerem tHisF (27 700) überein. Das Vorliegen von tHisF-Monomeren wurde ebenfalls durch analytische Ultrazentrifugation (Ariel Lustig, Biozentrum der Universität Basel) bestätigt. Es wurde ein apparentes Molekulargewicht von 28 000 ermittelt. Aggregate lagen praktisch nicht vor, doch wurde eine Dimerisierungstendenz von tHisF nachgewiesen (Höcker et al., 2001).

Nach Mischen äquimolarer Mengen von tHisH und tHisF ergab sich bei der Gelfiltration ein einziger Peak mit einem apparenten Molekulargewicht von 41 800. Dies deutet auf einen 1:1-Komplex aus tHisH und tHisF hin, dessen berechnetes Molekulargewicht 50 800 beträgt. Offensichtlich überträgt sich das zu geringe apparente Molekulargewicht von tHisH auf den tHisH:F-Komplex. Gelfiltrationsläufe von tHisH, tHisF und tHisH:F sind in Abbildung 4.8 dargestellt.

Von Ariel Lustig (Biozentrum der Universität Basel) wurde in Gleichgewichtsläufen bei 18 000 Upm von 20 µM tHisH:F in 50 mM KP-Puffer, pH 7.5, 300 mM NaCl ein apparentes Molekulargewicht von 49 800 ermittelt, wodurch ebenfalls das Vorliegen eines 1:1-Komplexes bestätigt wurde. Der Sedimentationslauf im gleichen Puffer bei 52 000 Upm ergab einen $S_{20,w}$ von 3.8, es lagen ca. 5% Aggregate vor.

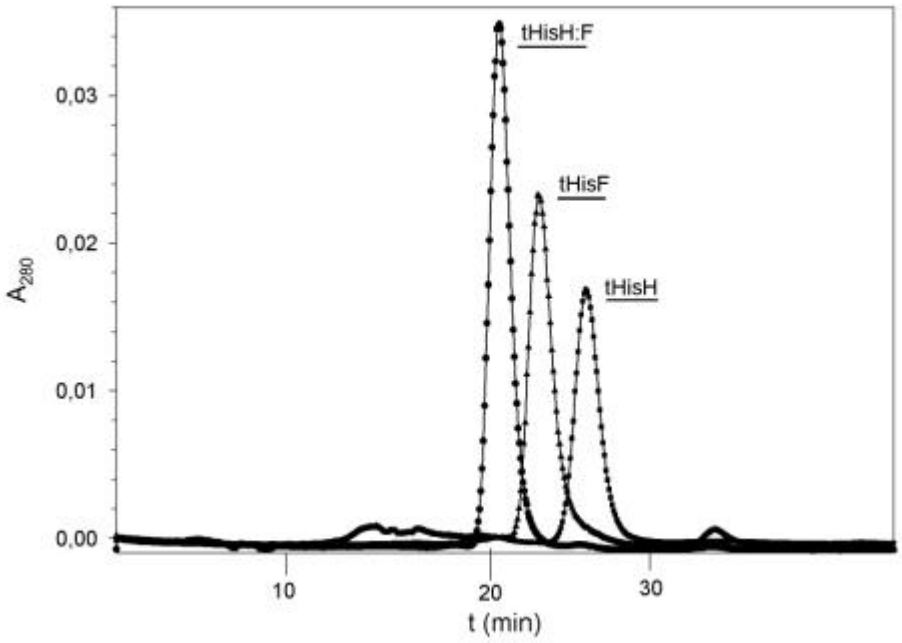


Abbildung 4.8: Durch analytische Gelfiltration wurde nachgewiesen, daß tHisH und tHisF Monomere sind, die einen 1:1-Komplex ausbilden.

Bedingungen:
Laufpuffer: 50 mM KP-Puffer, pH 7.5
Geschwindigkeit: 0.5 ml/min
Proben: 5 nmol in 100 µl
T= 25° C

4.3.2 Stabilität von tHisH, tHisF und tHisH:F gegenüber Trypsin

Die Spaltbarkeit eines Proteins durch Trypsin gibt Auskunft über seine Stabilität sowie die Flexibilität und Zugänglichkeit der potentiellen Schnittstellen, die C-terminal von Lysin- und Arginginresten liegen (Hubbard, 1998). tHisH und tHisF besitzen 30 bzw. 27 potentielle Trypsin-Schnittstellen.

Je 10 µM tHisH, tHisF und tHisH:F wurden mit 0.064 µM Trypsin versetzt und in 10 mM KP, pH 7.5 bei Raumtemperatur inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden Aliquots entnommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und der Verdau durch Erhitzen der Proben (5 min, 98° C) gestoppt.

Das Ergebnis des Trypsinverdaus wurde durch Polyacrylamidgelelektrophorese auf Tris-Tricin-Gelen analysiert (Abb. 4.9).

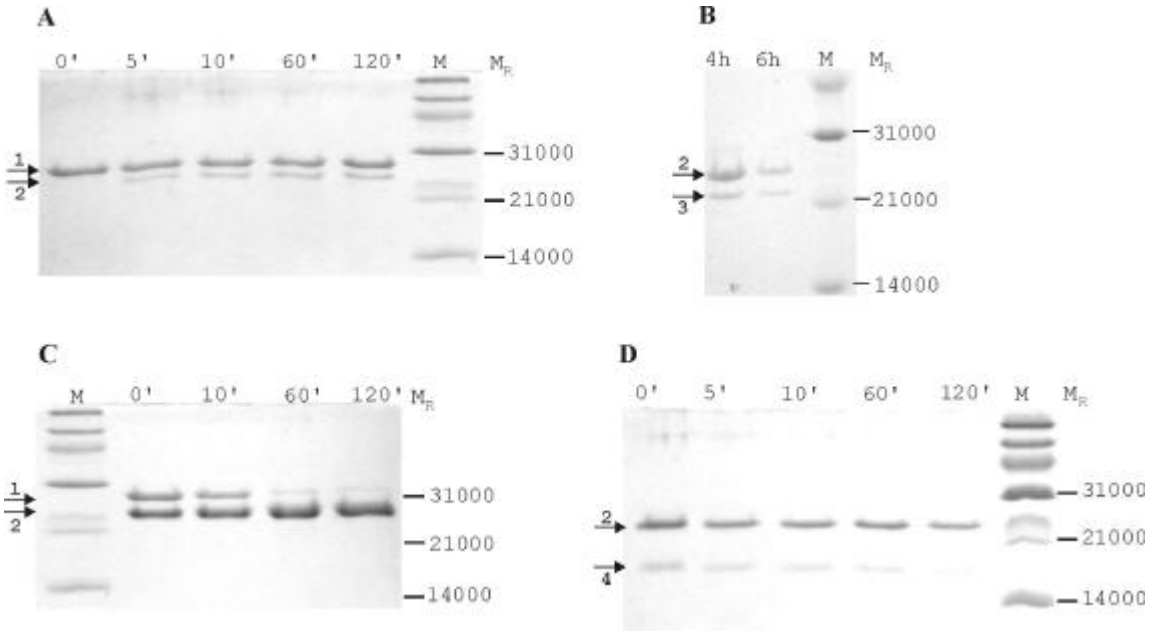


Abbildung 4.9: tHisH, tHisF und der tHisH:F-Komplex sind unterschiedlich empfindlich gegenüber Trypsin.

10 µl Aliquots der Proben wurden auf einem 20%igen Tris-Tricin-Gel nach unterschiedlich langer Inkubation mit Trypsin (0-120 min) analysiert.
A, B: tHisF
C: tHisH:F
D: tHisH
Pfeil 1: M_R 28 000 (tHisF in A und C)
Pfeil 2: M_R 24 000 (1. tHisF-Fragment in A, B, C und D, tHisH in C und D)
Pfeil 3: M_R 22 000 (2. tHisF-Fragment in B)
Pfeil 4: M_R 17 000 (Verunreinigung in der tHisH-Probe in D)

In der tHisH-Probe ist neben der 23 100 Bande eine weitere Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 17 000 zu sehen. Dieses Protein wurde nach 120 minütigem Typsinverdau nahezu vollständig verdaut, Abbaufragmente sind nicht detektierbar. tHisH selbst erwies sich während der zwei Stunden dauernden Inkubation als trypsinresistent (Abb. 4.9 D).

Bei tHisF war bereits nach 5 Minuten ein Abbauprodukt mit einem apparenten Molekulargewicht (M_R) von ca. 24 000 im Gel sichtbar, dessen Menge mit zunehmender Inkubationsdauer zunahm (Abb. 4.9 A).
Nach 4 h war alles tHisF auf das Fragment mit einem M_R von ca. 24 000 verkürzt, gleichzeitig wird ein weiteres Fragment von tHisF mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 22 000 sichtbar (Abb. 4.9 B).
Überaschenderweise erfolgte im tHisH:F-Komplex die Verkürzung von tHisF auf ein Fragment mit einem M_R von ca. 24 000 schneller als im nichtkomplexierten tHisF: nach 120 min lag praktisch alles tHisF des Komplexes als Fragment mit einem M_R von 24 000 vor, während nichtkomplexiertes tHisF erst zu ca. 30 % abgebaut worden war (vergl. Abb. 4.9 C und Abb. 4.9 A).

Die tHisF-Fragmente wurden durch Western Blotting auf eine PDVF-Membran übertragen und mit Ponceau S angefärbt. Neben den Banden mit M_R von 24 000 und 22 000 war im Blot auch eine unscharfe Bande von ca. 3000- 4000 sichtbar. Die beiden Banden höheren Molekulargewichts wurden vollständig ausgeschnitten, von der Bande mit niedrigerem Molekulargewicht der obere Bereich (M_R ca. 3500-4000). Im Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin der Universität Köln wurden diese drei Fragmente durch Edman-Abbau N-terminal ansequenziert. Es wurden folgende Sequenzen erhalten:

1. Fragment (M_R 24 000): D S G D P V E L G L F

2. Fragment (M_R 22 000): R W T M L E X V E X

3. Fragment (M_R 4000): D Y K D P V E L G L

Die Sequenz des 1. Fragments stimmt vollständig mit den in tHisF auf Arg-27 folgenden Aminosäuren überein. Beim 2. Fragment konnten die siebte und die zehnte Aminosäuren (X) nicht bestimmt werden, da aufgrund der geringen Proteinmenge relativ schwache Signale erhalten wurden. Der Vergleich mit der tHisF-Sequenz zeigt jedoch eindeutig, daß es sich um die auf Lys-58 folgende Sequenz handeln muß. Daher konnten die 7. Aminosäure als Leu und die 10. als Lys identifiziert werden. Demnach muß es sich bei der 2. Aminosäure um ein Lys anstelle eines Trp handeln.
Das 3. Fragment ergab eine dem 1. Fragment sehr ähnliche Sequenz.

Der Austausch der zweiten und dritten Aminosäure gegen Ser und Gly führt zur vollständigen Übereinstimmung. Es handelt sich daher mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Fragment zwischen Arg-27 und Lys-58.

Die „falschen“ Signale stammen wahrscheinlich von einem weiteren Fragment in der Bande, da Peptide mit einem Molekulargewicht von weniger als ca. 10 000 in dem verwendeten Gel nur schlecht getrennt werden. Die Positionen der Trypsinschnitte sind in Abbildung 4.10 gezeigt. Das 1. Fragment entsteht durch Spaltung von tHisF nach Arg-27 in β1'', einem β-Strang in einem sehr flexiblen Bereich des Proteins (s. Abb. 4.20). Durch einen Schnitt nach Lys-58 wurden das 2. Fragment und das 3. Fragment erhalten.

```
                        β1        β1'         β1''     α1          β2
2° Struktur          SSSSSSS     SSS         SSS  HHHHHHHHHH    SSSSSS
Sequenz      1  MLAKRIIACLDVKDGRVVKGTNFENLRDSGDPVELGKFYSEIGIDELVFLD 51

                        α2          β3        α3         β4
2° Struktur          HHHHHHHHH     SSSS     HHHHHHHHH   SSSS
Sequenz     52  ITASVEKRKTMLELVEKVAEQIDIPFTVGGGIHDFETASELILRGADKVSI..102
```

Abbildung 4.10: Die Trypsinspaltung in tHisF erfolgt nach Arg-27 und Lys-58 (jeweils unterstrichen).

4.3.3 Fluoreszenzspektroskopie

4.3.3.1 Fluoreszenzspektren von tHisH, tHisF und tHisH:F

Um einen Hinweis auf mögliche Denaturierung zu erhalten und zur Bestimmung der relativen Lösungsmittelexposition der einzigen Tryptophanreste in tHisH (W123) bzw. in tHisF (W156) wurden Fluoreszenzemissionsspektren von 300-400 nm bei Anregung bei 280 nm und 295 nm aufgenommen (Abb. 4.11). Der Verlauf der tHisH-Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 280 nm und 295 nm ist praktisch identisch, das Maximum liegt bei ca. 340 nm. Dies deutet darauf hin, daß W123 stark lösungsmittelexponiert ist (Schmid, 1997). Von tHisF sind der Übersichtlichkeit halber nur die Fluoreszenzemissionsspektren des Wildtyps gezeigt.

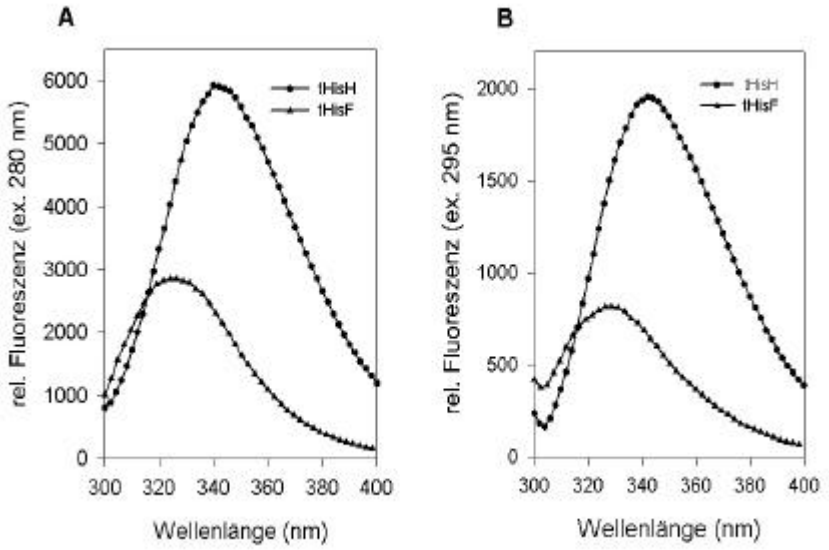


Abbildung 4.11: Das einzige Tryptophan von tHisH ist weitgehend lösungsmittelexponiert, das von tHisF ist dagegen vom Lösungsmittel abgeschirmt.

A: Fluoreszenzemissionsspektren von tHisH und tHisF nach Anregung bei 280 nm
B: Fluoreszenzemissionsspektren von tHisH und tHisF nach Anregung bei 295 nm
Bedingungen:
10 µM tHisH bzw. tHisF, 10 mM KP, pH 7.5, T= 25° C

Die Fluoreszenzemissionsmaxima aller tHisF-Varianten sind in Tabelle 8 aufgeführt. Bei tHisF liegt das Emissionsmaximum nach Anregung bei 295 nm bei 328 nm bzw. bei den Varianten C9A und D176N bei 330 nm. Wird mit Licht der Wellenlänge 280 nm angeregt, liegt das Emissionsmaximum bei 325 nm bzw. bei C9A bei 327 nm. Dies bedeutet, daß die tHisF-Fluoreszenzemission außer vom Tryptophanrest auch merklich von den vier Tyrosinen bestimmt wird. Die Lage des Fluoreszenzmaximums bei maximal 330 nm deutet eine weitgehende Abschirmung des W156 hin.

Tabelle 8: Fluoreszenzemissionsmaxima aller tHisF-Varianten

tHisF-Variante	F_{280}-Max. (nm)[1]	F_{295}-Max. (nm)[2]
Wildtyp	325	328
C9A	327	330
D11N	325	328
K19S	325	328
D51N	325	328
N103A	325	328
D130E	325	328
D130N	325	328
T171A	325	328
D176N	325	330
D183N	325	328

1: Lage des Fluoreszenzemissionsmaximums nach Anregung bei 280 nm
2: Lage des Fluoreszenzemissionsmaximums nach Anregung bei 295 nm
Bedingungen:
10 µM tHisF (wt oder einer Variante), 10 mM KP, pH 7.5, Anregung bei 280 nm bzw. 295 nm, Emission bei 300-400 nm, T= 25° C

Nach Anregung bei 280 nm weist tHisH-W123F ein typisches Tyrosinspektrum mit einem Emissionsmaximum bei 307 nm auf (Abb. 4.12).

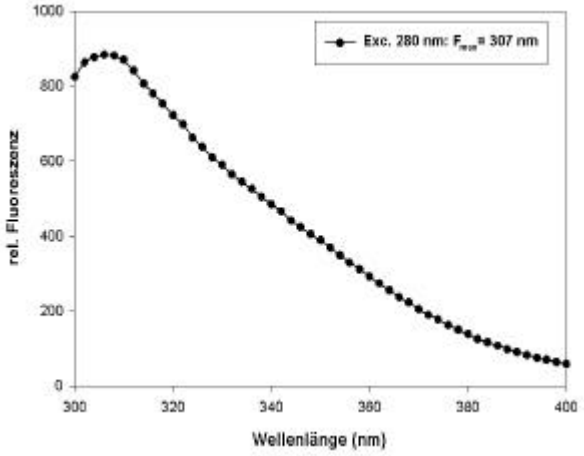


Abbildung 4.12: tHisH-W123F weist nach Anregung bei 280 nm ein typisches Tyrosinspektrum auf.

Bedingungen:
10 µM tHisH-W123F, 10 mM KP, pH 7.5, T= 25° C

Bei den tHisH:F-Komplexen sowohl mit Wildtyp-tHisH als auch mit tHisH-W123F liegt das Fluoreszenzemissionsmaximum nach Anregung bei 295 nm bei 324 nm (Abb. 4.13 A und B).

Nach Anregung bei 280 nm weist der Komplex mit tHisH-W123F ein Emissionsmaximum bei 318 nm auf, während das des Wildtypkomplexes bei 325 nm liegt (Abb. 4.13 A und B).

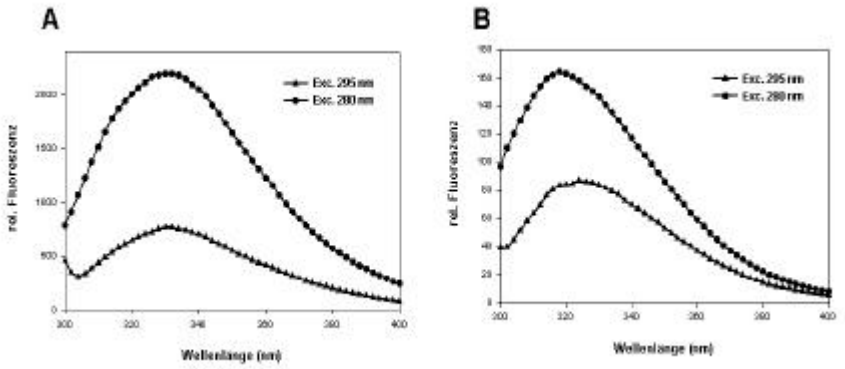


Abbildung 4.13: Die Fluoreszenzemissionsspektren der tHisH:F-Komplexe werden nur geringfügig vom tHisH-Tryptophan beeinflußt.

A: Fluoreszenzemissionsspektren des Komplexes aus tHisH-W123F und tHisF-wt nach Anregung bei 280 nm und 295 nm.
B: Fluoreszenzemissionsspektren des Wildtyp-tHisH:F-Komplexes nach Anregung bei 280 nm und 295 nm.
Bedingungen:
10 µM tHisH-W123F bzw. tHisH-wt + tHisF-wt, 10 mM KP, pH 7.5, T= 25° C

4.3.3.2 Fluorimetrisch verfolgte Titration von tHisH mit tHisF

Mit Hilfe der fluorimetrischen Titration kann in einigen Fällen die Bindung von Liganden an ein Protein nachgewiesen werden. Um zu testen, ob die Bildung des Bienzymkomplexes aus tHisH und tHisF mit einer Änderung des Fluoreszenzsignals verbunden ist, wurde tHisH mit tHisF titriert (Abb. 4.14).

Dazu wurden in einem Volumen von 1 ml 10 nmol tHisH vorgelegt und pro Titrationsschritt 2.5 nmol tHisF zugegeben. Nach jedem Titrationsschritt wurden Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 295 nm aufgenommen. Insgesamt wurden 20 nmol tHisF zu den 10 nmol tHisH zugefügt. In Abbildung 4.14 ist zu sehen, daß es bis zur Zugabe von 10 nmol tHisF einen isoemissiven Punkt bei 344 nm gibt. Bei weiterer tHisF-Zugabe schneiden sich die Kurven nicht mehr in einem Punkt. Dies deutet auf die Bildung eines stöchiometrischen und hochaffinen Komplexes aus tHisH und tHisF hin.

Die Anwesenheit von 0-10 mM Glutamin hatte keine in der fluorimetrischen Titration detektierbare Auswirkung auf die Bindung von tHisF an tHisH (Daten nicht gezeigt).

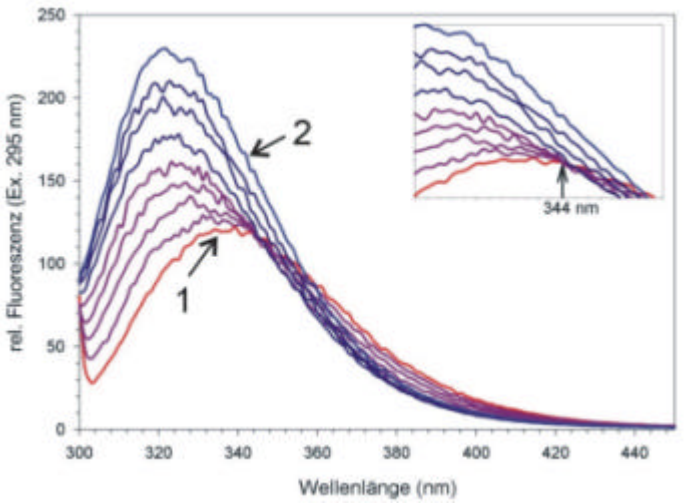


Abbildung 4.14: Die fluorimetrische Titration von tHisH mit tHisF gab Hinweise auf die Bildung eines hochaffinen 1:1-Komplex tHisH:F.

Bedingungen:
10 µM tHisH (rote Linie, Pfeil 1)
Zugabe von 2.5 µM tHisF pro Titrationsschritt (2.5-17.5 µM: violette Linien; 20 µM: blaue Linie, Pfeil 2)
Anregung bei 295 nm, Emission bei 300-450 nm
50 mM KP, pH 7.5, T= 25° C

4.3.4 Diskussion

Atypisches apparentes Molekulargewicht von tHisH

In der Gelfiltration auf einer Superdex-75-Säule zeigte tHisH ein atypisches Laufverhalten. Das apparente Molekulargewicht betrug reproduzierbar ca. 17 000, während das berechnete Molekulargewicht 23 078 beträgt. Der Vergleich mit Gelfiltrationsläufen über eine Superose-12-Säule zeigte, daß tHisH auf dieser Säule mit einem noch kleinerem apparenten Molekulargewicht von ca. 11 000 läuft. Klem & Davisson (1993) beobachteten für *E. coli*-HisH (eHisH) ebenfalls ein atypisches Laufverhalten auf zwei verschiedenen Gelfiltrationssäulen.

Sie erhielten apparente Molekulargewichte von 11 600 auf einer Sephacryl-S-100-Säule und 11 8000 auf einer Superose-12-Säule, wohingegen das berechnete Molekulargewicht von *E. coli*-HisH bei 21 700 liegt (Carlomagno et al., 1988). Die Ursache des atypischen Laufverhaltens der HisH-Proteine ist nicht bekannt.
Für den eHisH:F-Komplex erhielten Klem & Davisson (1993) auf der Sephacryl-S-100-Säule ein apparentes Molekulargewicht von 47 500, das dem berechneten Molekulargewicht von 50 100 recht nahe kommt. Dagegen lief der Komplex aus tHisH und tHisF auf der Superdex-75-Säule bei 41 800, und damit ebenfalls deutlich unter dem berechneten Molekulargewicht von 50 100. Unklar ist, warum sich das zu niedrige apparente Molekulargewicht von tHisH, nicht aber von eHisH, im HisH:F-Komplex niederschlägt. Insgesamt lassen die Ergebnisse darauf schließen, das tHisH und tHisF Monomere sind und beim Mischen einen stabilen 1:1-Komplex bilden.

Limitierte Proteolyse mit Trypsin

Der Test der Stabilität von tHisH, tHisF sowie des tHisH:F-Komplexes gegenüber Trypsin erwies, daß tHisH während eines zweistündigen Verdaus vollständig trypsinresistent war. Bei tHisF trat dagegen zunächst ein Fragment mit einem M_R von ca. 24 000 auf, das nach vierstündiger Inkubation auf ca. 22 000 verkürzt wurde. Durch N-terminale Sequenzierung der Fragmente wurden die Schnittstellen identifiziert. Die Spaltung erfolgte danach im N-terminalen Bereich der Sequenz, zunächst nach Arg-27 in β1'' und anschließend nach Lys-58 im Loop nach β2. Beide Reste sind am C-terminalen Ende des β-Fasses lokalisiert (Abb. 4.15). Schnitte in diesem Bereich wurden auch mit einem Proteolyse-Vorhersageprogramm (Nickpred, http://sjh.bi.umist.ac.uk/nickpred.html) aus den Sequenz- und Strukturdaten von tHisF berechnet. Die Vorhersage dieses Programms beruht darauf, daß sechs Konformationsparameter (Zugänglichkeit, Herausragen aus dem Proteincore, kristallographischer Temperaturfaktor, Packungsdichte, Sekundärstruktur, Wasserstoffbrücken) in einem gewichteten Vorhersageschema kombiniert werden (Hubbard et al., 1998).

Die größte Wahrscheinlichkeit einer Spaltung wurde für Lys-58, Arg-59, Lys-19 und Arg-27 (in dieser Reihenfolge) berechnet, d. h. die tatsächlichen Schnittstellen erhielten den ersten und den vierten Rang.

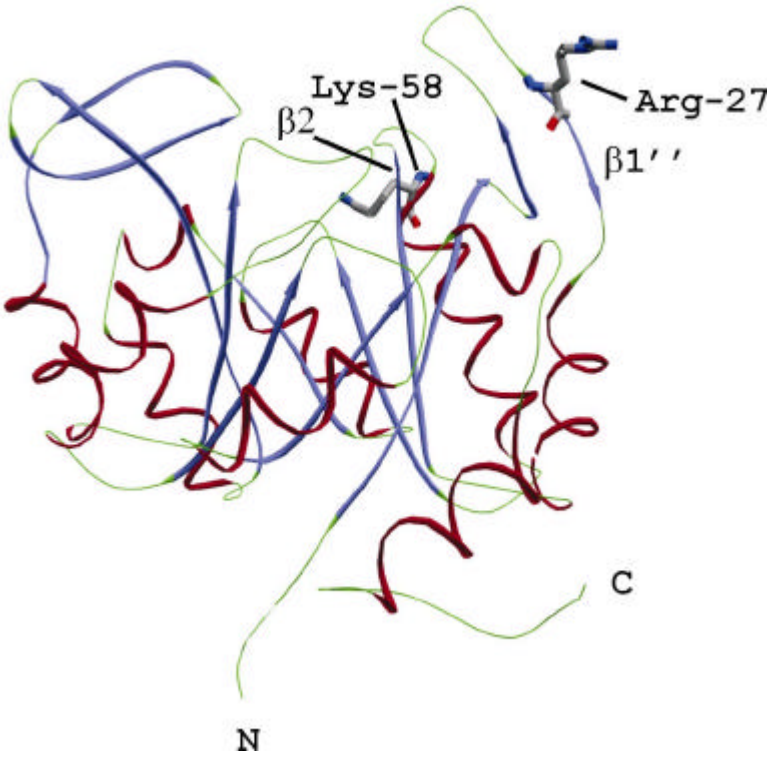


Abbildung 4.15: Trypsin schneidet tHisF nach Arg-27 in β1'' und nach Lys-58 im Loop nach β2.

β1'' und β2 liegen am C-terminalen Ende des Fasses, d. h. nahe dem aktiven Zentrum von tHisF. Das aktive Zentrum eines Enzyms weist oft eine erhöhte Flexibilität auf, wodurch sich die Anfälligkeit gegenüber Trypsin erklären ließe. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese nimmt der Bereich von β1' bis einschließlich des Loops nach β1'' in der Struktur des einzeln kristallisierten tHisF eine andere Konformation ein als im Komplex mit tHisH (Abbildung 4.20).

Loops am N-terminalen Ende des Fasses, welche in $(\beta/\alpha)_8$-Barrel-Proteinen eine Rolle in der Stabilisierung spielen (Thoma et al., 2000) und in tHisF die Kontaktfläche zu tHisH bilden (s. 5.2), sind dagegen trypsinresistent.

Die N-terminale Hälfte der tHisF-Sequenz erwies sich auch in einem anderen Experiment als trypsinempfindlicher als die C-terminale Hälfte (Höcker, 1999); (Höcker et al., 2001). Beide Hälften (HisF-N: Aminosäuren 1-122, HisF-C: Aminosäuren 123-253) wurden getrennt voneinander exprimiert, die Genprodukte gereinigt und mit Trypsin inkubiert. Während die vollständige Degradation von HisF-N innerhalb von fünf Minuten erfolgte, war HisF-C nach dieser Zeit noch intakt.

Fluorimetrisch verfolgte Komplexbildung von tHisH und tHisF

Die Fluoreszenzemissionsspektren von tHisH nach Anregung bei 280 nm sind von der Tryptophan-Fluoreszenz dominiert. Das einzige Tryptophan (W123) scheint ungewöhnlich stark lösungsmittelexponiert zu sein, da das Emissionsmaximum bei ca. 340 nm liegt. Bei Zugabe von tHisF kommt es zur Komplexbildung tHisH:F. Das Emissionsmaximum des Komplexes von ca. 324 nm entspricht dem von tHisF. Daraus ist zu schließen, daß sich durch die Komplexbildung die „hydrophobe Wunde“, in der das tHisH-Tryptophan lösungsmittelexponiert liegt, verschlossen wird. Diese Daten legen die Vermutung nahe, daß der Tryptophanrest von tHisH an der tHisH:F-Kontaktfläche zu liegen kommt. Die kürzlich gelöste Röntgenstruktur des tHisH:F-Komplexes (M. Walker, M. Wilmanns, persönliche Kommunikation; s. 5.2) bestätigt diese Annahme. Im Komplex von tHisH-W123F mit tHisF-wt liegt das Emissionsmaximum nach Anregung bei 280 nm bei ca. 320 nm und ist gegenüber dem Wildtypkomplex zu kürzerer Wellenlänge hin verschoben. Dieses Ergebnis könnte auf eine Verschiebung des tHisF-Tryptophans in eine hydrophobere Umgebung hindeuten. Da die Röntgenstruktur des tHisH:F-Komplexes zeigt, daß W156 nicht an der Kontaktfläche zu tHisH liegt, könnte eine weitreichende Konformationsänderung bei der Komplexbildung zu dieser Verschiebung führen.

Die Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften von tHisH bei der Komplexbildung mit tHisF wurde genutzt, um die Bindung der beiden Enzyme zu verfolgen. Bei der fluorimetrischen Titration von tHisH mit tHisF wurde bis zum Vorliegen von äquimolaren Mengen der beiden Proteine (10 µM) ein isoemissiver Punkt gefunden.

Solange ein isoemissiver Punkt vorhanden ist, liegen genau zwei Molekülspezies mit unterschiedlichen spektroskopischen Eigenschaften vor, bei denen es sich in diesem Fall mit größter Wahrscheinlichkeit um freies tHisH und tHisH:F-Komplex handelt. Dies bedeutet, daß die Bindung stöchiometrisch erfolgt und praktisch kein freies HisF vorzuliegen scheint. Daraus ist zu schließen, daß tHisF und tHisH mit großer Affinität ($K_D << 10$ µM) aneinander binden. Eine genauere Bestimmung des K_D-Wertes ist mit dem Fluorimeter aufgrund der technischen Limitierung nicht möglich. Es müßten dazu empfindlichere Methoden, z. B. isothermische Kalorimetrie oder Bindungsstudien an einem BiaCore eingesetzt werden.

In einem weiteren Titrationsversuch wurden zunächst 5 mM L-Glutamin zu tHisH gegeben, bevor mit tHisF titriert wurde. Da das Ergebnis mit dem des Versuches in Abwesenheit von Glutamin übereinstimmt, ist zu schließen, daß Glutamin keinen Einfluß auf die Komplexbildung hat. Sofern es zu einer mit Konformationsänderungen einhergehenden Glutaminbindung kommt, betreffen diese nicht die Umgebung der Tryptophanreste in tHisH und tHisF. Allerdings ist aus dem Versuch nicht ersichtlich, ob Glutamin an tHisH gebunden wird. Es ist auch denkbar, daß entweder erst die Bindung von tHisF an tHisH die Glutaminbindung ermöglicht, oder aber, daß zusätzlich ein tHisF-Ligand gebunden sein muß, um die Glutaminbindungsstelle auszubilden, wie es zum Beispiel bei der Glucosamin-6-Phosphat-Synthase der Fall ist (Isupov et al., 1996). Das aktive Zentrum von tHisH liegt nahe der Kontaktfläche zu tHisF (s. 5.2), so daß eine von der Ligandenbindung an tHisF induzierte Konformationsänderung in tHisH gut vorstellbar ist.

4.4 Funktionelle Charakterisierung

4.4.1 tHisH-Kinetik

HisH katalysiert die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und Ammoniak. Die eHisH-Glutaminase-Aktivität kann durch Zugabe von eHisF aktiviert werden (Klem & Davisson, 1993). Eine weitere Aktivierung erfolgt, wenn ein Ligand an eHisF gebunden ist. Sowohl das HisA-Substrat 5'-ProFAR als auch das HisF-Produkt ImGP bewirkten eine deutliche Aktivierung der eHisH-Aktivität. Dagegen führte das HisF-Produkt AICAR zu keiner meßbaren Glutaminase-Aktivität.

Für tHisH wurden die kinetischen Parameter k_{cat} und K_M^{Gln} unter Fließgleichgewichtsbedingungen („steady-state") mit Hilfe eines gekoppelten enzymatischen Tests bestimmt, bei dem das entstehende Glutamat durch die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) zu 2-Oxoglutarat oxidiert wird (Abb. 4.16). Die bei der Oxidation abgegebenen Elektronen werden zur Reduktion von NAD^+ zu NADH + H^+ genutzt, womit eine Zunahme der Absorption bei 340 nm einhergeht.

Die Messungen wurden unter Sättigung von tHisF mit ImGP durchgeführt, um die maximale Katalyserate zu erreichen. Für die Variante tHisH-W123F wurde nur der k_{cat}-Wert bestimmt.

Da das Gleichgewicht der GDH-Reaktion weit auf der Seite des Glutamats liegt (Fisher, 1985), konnten keine vollständigen Umsatzkurven aufgenommen werden. Die kinetischen Parameter wurden daher aus den Anfangssteigungen über die direkte lineare Auftragung (Cornish-Bowden & Eisenthal, 1974; Eisenthal & Cornish-Bowden, 1974) ermittelt (Abb. 4.16).

Alternativ wurde unter Sättigung mit Glutamin die Abhängigkeit der Katalyserate von der Konzentration an ImGP bzw. 5'-ProFAR gemessen. Dadurch konnte der K_D-Wert der beiden tHisF-Liganden bestimmt werden (Abb. 4.17 B, C). Die Zugabe von AICAR bis zu einer Konzentration von 20 mM führte zu keiner Stimulierung der Glutaminase-Aktivität von tHisH.

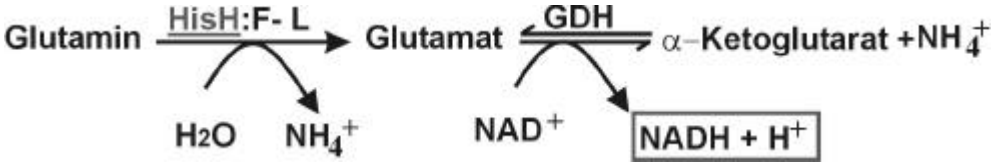


Abbildung 4.16: Die tHisH-Aktivität wird in Anwesenheit von tHisF und einem Liganden (L) über einen gekoppelten enzymatischen Test nachgewiesen.

Das von tHisH in Anwesenheit von tHisF und ImGP gebildete Glutamat wird von der GDH unter Reduktion von NAD^+ zu NADH + H^+ in α–Ketoglutarat und NH_4^+ umgesetzt. Die Menge des gebildeten NADH wird anhand der Absorptionsänderung bei 340 nm berechnet ($\Delta\varepsilon_{340}$ (NADH-NAD^+) = 6300 M^{-1} cm^{-1}).

Alle tHisH-Enzymassays wurden bei Raumtemperatur (25° C) in 50 mM Tricin/KOH, pH 8.0 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

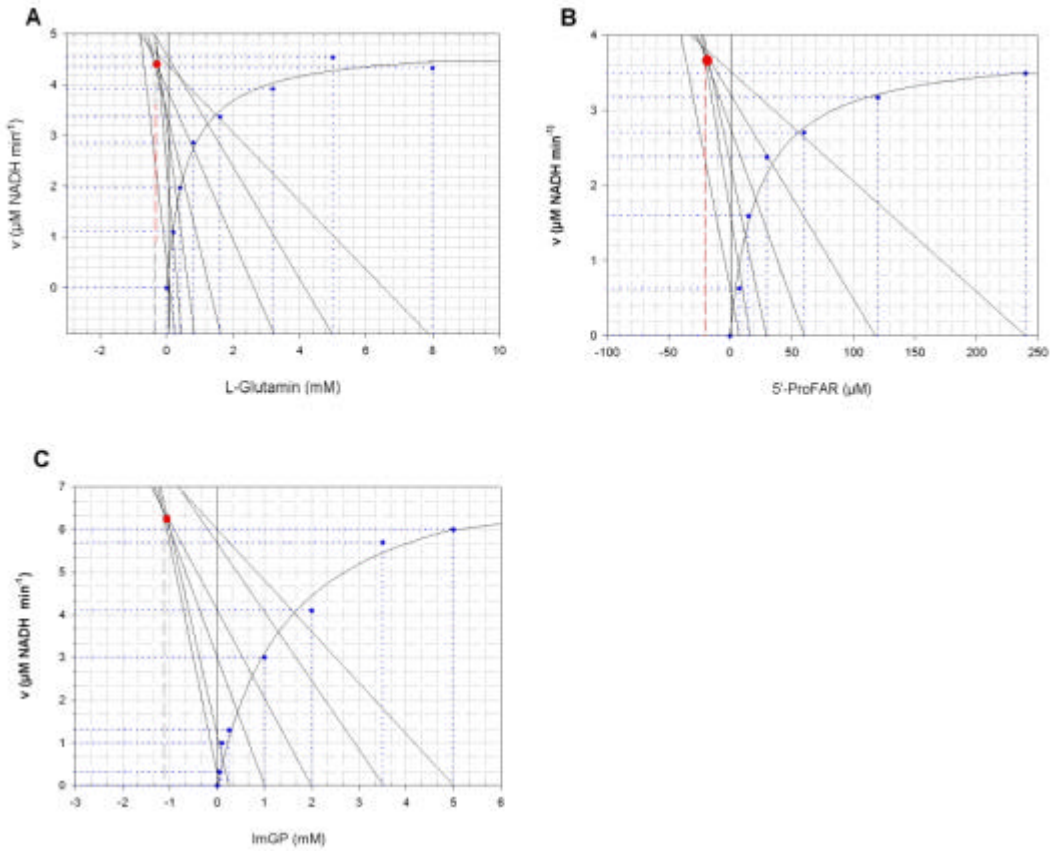


Abbildung 4.17: Katalytische Parameter von tHisH wurden aus Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit des Substrates oder eines tHisF-Liganden bestimmt.

A: Bestimmung des K_M^{Gln}
B: Bestimmung des $K_D^{5'\text{-ProFAR}}$
C: Bestimmung des K_D^{ImGP}

Tabelle 9: Abgeleitete Parametern aus der Glutaminase-Aktivität von tHisH

Protein	Ligand	K_M (1)/K_D (2) (µM)	v_{max} (µM NADH min^{-1})	k_{cat} (min^{-1})
tHisH:F	Glutamin, 0-8 mM	~ 500 (1)	6	6
tHisH :F	ImGP, 0-5 mM	~ 1500 (2)	7	7
tHisH:F	5'-ProFAR, 0-0.24 mM	~ 23 (2)	6	6

In dem gekoppelten Enzymassay (s. Abb. 4.16) wurde die Glutaminase-Aktivität von tHisH indirekt durch Messung der Zunahme an $NADH^+$ bestimmt. Alle Reaktionen wurden mit einer Enzymkonzentration von 1 µM und bei 25° C in 50 mM Tricin/KOH, pH 8.0 durchgeführt.
(1): Für das Substrat Glutamin wurde der K_M-Wert bestimmt
(2): Für die tHisF-Liganden ImGP und 5'-ProFAR wurden die Dissoziationskonstante K_D bestimmt

Der k_{cat}-Wert von tHisH-W123F entsprach dem des Wildtyp-Proteins.

Um zu testen, ob die katalytisch inaktiven tHisF-Varianten D11N und D130N (s. 4.4.2) im tHisH:F-Komplex die Glutaminase-Aktivität beeinträchtigen, wurde die 5'-ProFAR- und die ImGP-abhängige Stimulierung der tHisH-Aktivität gemessen (Abb. 4.18 und Tab. 10). Es zeigte sich, daß die Stimulierung durch 5'-ProFAR in den beiden Varianten nicht beeinträchtigt war, jedoch eine gegenüber Wildtyp-tHisF deutlich verringerte ImGP-abhängige Aktivierung beobachtet wurde (Tab. 10).

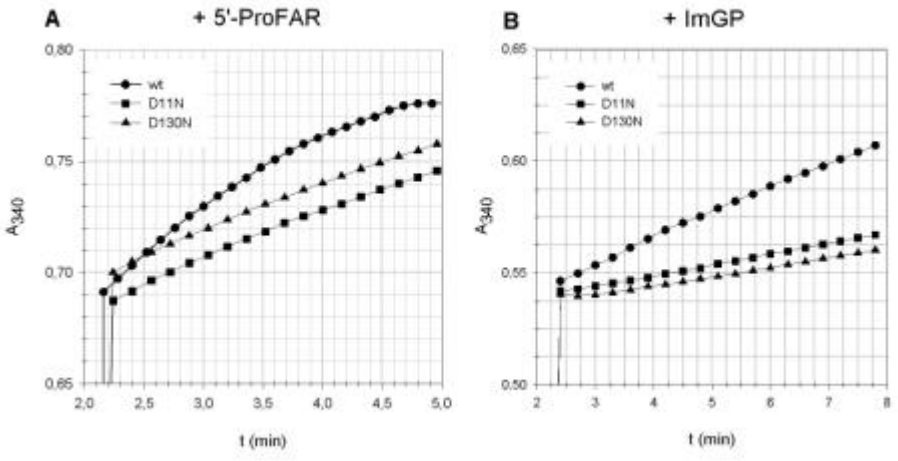


Abbildung 4.18: Stimulierung der Glutaminase-Aktivität in HisH:F-Komplexen mit HisF-wt, HisF-D11N und HisF-D130N.

A: Aktivierung der tHisH-Aktivität im Komplex mit tHisF-wt , tHisF-D11N und tHisF-D130N durch Zugabe von 240 µM 5'-ProFAR als tHisF-Ligand.
B: Aktivierung der tHisH-Aktivität im Komplex mit tHisF-wt , tHisF-D11N und tHisF-D130N durch Zugabe von 10 mM ImGP als tHisF-Liganden.

Tabelle 10: 5'-ProFAR und ImGP als tHisF-Liganden stimulieren die tHisH-Aktivität im tHisH:F-Komplex in unterschiedlichem Ausmaße.

tHisF-Variante im tHisH:F-Komplex	V_{ini} (µM NADH min^{-1}); 240 µM 5'-ProFAR	$\frac{v_{ini}(tHisH : F - wt)}{v_{ini}(tHisH : F - Mut.)}$	V_{ini} (µM NADH min^{-1}); 10 mM ImGP	$\frac{v_{ini}(tHisH : F - wt)}{v_{ini}(tHisH : F - Mut.)}$
wt	5.98		4.80	
D11N	4.10	1.5	0.66	7.3
D130N	3.89	1.5	0.48	10

Bedingungen:
1 µM tHisH:F in 50 mM Tricin/KOH, pH 8.0, 25° C

4.4.2 tHisF-Kinetik

HisF katalysiert die Reaktion von Ammoniak mit 5'-PRFAR zu AICAR und ImGP. Bei der Messung der tHisF-Aktivität wurde dazu Ammoniumacetat als Amiddonor verwendet, da Vorversuche gezeigt haben, daß mit diesem Ammoniumsalz die höchste Aktivität erzielt wurde.

Die steady-state-Parameter K_M^{PRFAR}, K_M^{NH3} und k_{cat} wurden für das Wildtyp-tHisF und für die tHisF-Varianten durch Aktivitätsmessungen bei Raumtemperatur (25° C) bestimmt.

Analog zum Verfahren mit *E. coli*-Enzymen (Klem & Davisson, 1993) wurde 5'-PRFAR *in situ* aus 5'-ProFAR mit Hilfe von HisA aus *Thermotoga maritima* (tHisA) hergestellt. Zur Bestimmung der tHisF-Aktivität im tImGP-S-Holoenzym (tHisH:F-Komplex) wurde als Amiddonor entweder L-Glutamin oder Ammoniumacetat verwendet.

Die 5'-PRFAR-Abnahme wurde über die Abnahme der Absorption bei 300 nm verfolgt (ε_{300} [5'-PRFAR – AICAR] = 5.637 mM^{-1} cm^{-1}, Klem & Davisson, 1993, Abbildung 4.19 A, B). Es wurden vollständige Umsatzkurven aufgenommen. Alle ammoniumabhängigen Reaktionen wurden in 50 mM Tris/Acetat, pH 8.5 durchgeführt, da bei diesem pH-Wert das Gleichgewicht zwischen Ammoniak und Ammonium auf die Seite des Ammoniaks verschoben und maximale tHisF-Aktivität gemessen wurde. Die Konzentration an Ammoniak wurde mit Hilfe der

Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechnet. Die glutaminabhängige Reaktion wurde in 50 mM Tris/Acetat, pH 8.0 gemessen. Die Ergebnisse der enzymatischen Assays sind in den Tabellen 11-15 dargestellt.

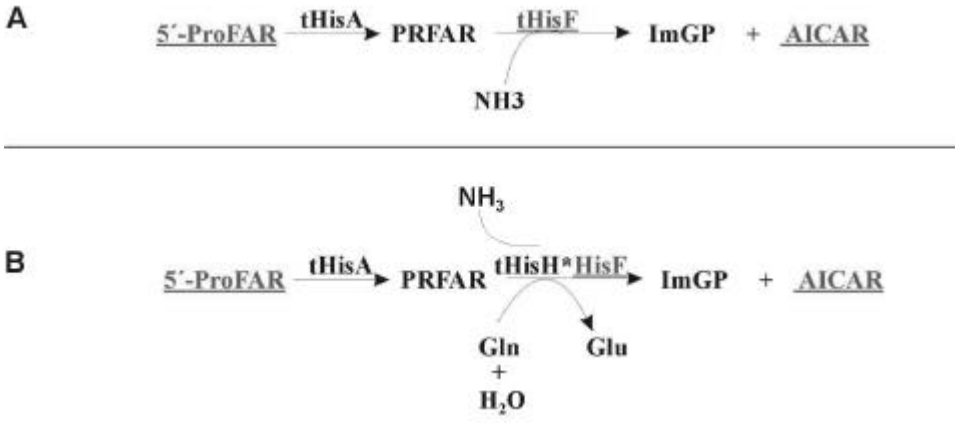


Abbildung 4.19: Gekoppelter Assay zur Bestimmung der tHisF- bzw. tHisH:F-Aktivität

A: isoliertes tHisF: Messung der ammoniumabhängigen Reaktion
B: tHisF im Komplex mit tHisH: Messung der glutamin- oder der ammoniumabhängigen Reaktion

Tabelle 11: Bestimmung des $K_M^{5'\text{-PRFAR}}$ von tHisF unter Sättigung mit Ammoniak*.

tHisF-Var.	$K_M^{5'\text{-PRFAR}}$ (µM)	K_M, wt/ K_M, Var.	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}, wt/ k_{cat}, Var.	k_{cat}/K_M ($\mu M^{-1} S^{-1}$)	(k_{cat}/K_M wt)/ (k_{cat}/K_M Var.)
wt	1.7	1	2.2	1	1.3	1
C9A	6.4	0.3	1.8	1	0.3	4
D11N	ca. 2	1	ca. $4*10^{-5}$	ca. $6*10^{4}$	ca. $1*10^{-5}$	ca. $1*10^{5}$
K19S	9.6	0.2	2.1	1	0.2	7
D51N	2.9	0.6	1.0	2	0.3	4
N103A	2.7	0.6	2.1	1	0.8	2
D130E	30.3	0.1	$5*10^{-3}$	440	$2*10^{-4}$	$7*10^{3}$
D130N	> 1000	< $2*10^{-3}$	< $4*10^{-3}$	> 550	ca. $4*10^{-6}$	ca. $3*10^{5}$
D176N	36.5	0.05	0.064	48	$2*10^{-3}$	700
D183N	2.9	0.6	1.3	2	0.4	3

* 100 mM Ammoniumacetat, entspricht 17.4 mM Ammoniak bei pH 8.5

Tabelle 12: Bestimmung des K_M^{NH3} von tHisF unter Sättigung mit 5'-PRFAR*.

tHisF-Var.	K_M^{NH3} (mM)	K_M, wt/ K_M, Var.	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}, wt/ k_{cat}, Var.	k_{cat}/K_M ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	(k_{cat}/K_M wt)/ (k_{cat}/K_M Var.)
wt	2.2	1	2.0	1	0.9	1
C9A	6.4	0.3	1.8	1	0.3	3
D11N	n. g.					
K19S	5.9	0.4	1.5	1	0.3	3
D51N	14.9	0.1	1.8	1	0.1	9
N103A	6.5	0.3	2.6	0.8	0.4	2
D130E	3.8	0.6	$3*10^{-3}$	670	$8*10^{-4}$	$1*10^{3}$
D130N	n. g.					
D176N	4.7	0.5	0.04	50	$9*10^{-3}$	100
D183N	6.0	0.4	1.9	1	0.3	13

* Für die tHisF-Varianten C9A, K19S, D130E und D176N wurde keine Substratsättigung erreicht, da die Anfangskonzentration von 5'-PRFAR (50 µM) nicht mind. 10x $K_M^{5'-PRFAR}$ entsprach (s. Tab. 11). Der angegebene k_{cat}-Wert stellt damit nur den minimalen k_{cat}-Wert dar.

Tabelle 13: Bestimmung des $K_M^{5'-PRFAR}$ von tHisH:F unter Sättigung mit Glutamin*.

tHisF-Var.	$K_M^{5'-PRFAR}$ (µM)	K_M, wt/ K_M, Var.	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}, wt/ k_{cat}, Var.	k_{cat}/K_M ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	(k_{cat}/K_M wt)/ (k_{cat}/K_M Var.)
wt	1.5	1	0.81	1	0.6	1
C9A	4.2	0.4	0.94	1	0.2	3
D11N	n. g.					
K19S	29.8	0.05	0.06	14	$2*10^{-3}$	280
D51N	1.0	2	0.06	14	0.06	9
N103A	0.46	3	0.19	4	0.4	2
D130E	14.4	0.1	$3*10^{-3}$	270	$2*10^{-4}$	$1*10^{3}$
D130N	n. g.					
D176N	0.85	2	0.02	41	0.02	30
D183N	2.2	1	0.10	9	0.04	15

* Alle Messungen erfolgten mit 5 mM Glutamin.

Tabelle 14: Bestimmung des K_M^{Gln} von tHisH:F unter Sättigung mit 5'-PRFAR*.

tHisF-Var.	K_M^{Gln} (mM)	K_M, wt/ K_M, Var.	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}, wt/ k_{cat}, Var.	k_{cat}/K_M (μM^{-1} S^{-1})	(k_{cat}/K_M wt)/ (k_{cat}/K_M Var.)
wt	0.32	1	0.4	1	1.4	1
C9A	0.66	0.5	0.6	0.7	0.88	2
D11N	n. g.					
K19S	1.4	0.2	0.08	5	0.05	28
D51N	0.3	1	0.05	8	0.2	7
N103A	0.24	1	0.2	2	0.7	2
D130E	n. g.					
D130N	n. g.					
D176N	0.22	1	$9*10^{-3}$	40	0.04	35
D183N	0.22	1	0.08	5	0.4	4

* Für die tHisF-Variante K19S wurde keine Substratsättigung erreicht, da die Anfangskonzentration von 5'-PRFAR (50 µM) nicht mind. 10x $K_M^{5'\text{-PRFAR}}$ entsprach (s. Tab. 13). Der angegebene k_{cat}-Wert stellt damit nur den minimalen k_{cat}-Wert dar.

Tabelle 15: Bestimmung des $K_M^{5'\text{-PRFAR}}$ von tHisH:F unter Sättigung mit Ammoniak.*

tHisF-Var.	$K_M^{5'\text{-PRFAR}}$ (µM)	K_M, wt/ K_M, Var.	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}, wt/ k_{cat}, Var.	k_{cat}/K_M (μM^{-1} S^{-1})	(k_{cat}/K_M wt)/ (k_{cat}/K_M Var.)
wt	5.5	1	2.7	1	0.5	1
C9A	9.2	0.6	1.0	3	0.1	5
D11N	n. g.					
K19S	10.0	0.6	1.1	2	0.1	5
D51N	3.1	2	1.3	2	0.4	1
N103A	13.7	0.4	2.4	1	0.2	2
D130E	n. g.					
D130N	n. g.					
D176N	24.8	0.2	0.03	90	$2*10^{-3}$	170
D183N	10.9	0.5	1.5	2	0.1	5

* 100 mM Ammoniumacetat, entspricht 17.4 mM Ammoniak bei pH 8.5

Abkürzungen in Tab. 11-15: Var.: Variante, Gln: Glutamin, n. g.: nicht gemessen
Bedingungen:
50 mM Tris/Acetat, pH 8.0 (glutaminabhängige Reaktion) bzw. 50 mM Tris/Acetat, pH 8.5 (ammoniumabhängige Reaktion), 25° C.

4.4.3 Diskussion

4.4.3.1 tHisH-Kinetik

Glutaminase-Aktivität von tHisH

tHisH erwies sich als relativ labiles Enzym, dessen Aktivität (k_{cat}) in verschiedenen Präparationen und in Abhängigkeit der Lagerungsdauer um einen Faktor von 2-3 schwankte. In Tabelle 9 die maximal gemessenen Aktivitäten angegeben.

tHisH zeigt, ebenso wie eHisH (Klem & Davisson, 1993), keine meßbare Aktivität in Abwesenheit von HisF. Ferner muß, damit eine tHisH-Glutaminase-Aktivität unter den angegebenen Versuchsbedingungen meßbar ist, ein Ligand an das aktive Zentrum von tHisF gebunden sein. Dabei kann es sich um 5'-ProFAR oder ImGP handeln. Dahingegen konnten in den ImGP-S aus *E. coli* (eHisH:F, Klem & Davisson, 1993) und *Saccharomyces cerevisiae* (s*HIS*7; Chittur et al., 2000) Glutaminase-Aktivitäten in Abwesenheit eines Synthase-Liganden gemessen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß sich die Glutaminase-Bindungstasche in diesen Glutaminase-Untereinheiten schon vor der Bindung eines Liganden an die Synthase-Untereinheit ausbildet. Weiterhin deutet darauf hin, daß die Anwesenheit eines Liganden den k_{cat}-Wert drastisch erhöht, während der K_M^{Gln} nicht betroffen ist (Chittur et al., 2000). Ob isoliertes tHisH Glutamin bindet, jedoch nicht hydrolysieren kann, kann aus den vorliegenden Daten nicht geschlossen werden. In der Röntgenstruktur der nichtligandierten tImGP-S scheint das aktive Zentrum von tHisH lösungsmittelzugänglich zu sein, so daß dort eine Glutaminbindung denkbar erscheint (s. 5.2).

Die Ausbildung der Glutaminbindungstasche scheint in einigen GATasen der Klasse I unabhängig, in anderen dagegen abhängig von der Bindung eines Liganden an die Synthase-Untereinheit zu sein. In der eCP-S erfolgt die Glutaminbindung unabhängig von weiteren Liganden; in Abwesenheit von Synthase-Liganden ist die Glutaminhydrolyse der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion (Miles et al., 1998).

Gebundenes Glutamin (als γ-Glutamylthioester) wurde in einer CP-S-Röntgenstruktur nachgewiesen, in der das Histidin der katalytischen Triade gegen ein Asparagin ausgetauscht worden war (PDB entry 1A9X). Dagegen konnte in den ebenfalls zur Klasse I gehörenden GATasen GMP-S und Anthranilat-Synthase (AS) keine Glutaminbindung ohne gleichzeitige Bindung eines Synthase-Liganden nachgewiesen werden (Knöchel et al., 1999). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Regulation der Enzymaktivität in den Klasse-I-GATasen auf unterschiedliche Weise erfolgen kann.

Aktivierung von tHisH durch tHisF-Liganden

Für die Enzyme aus *E. coli* und *S. cerevisiae* betrugen die k_{cat}-Werte in Anwesenheit von 5'-ProFAR 160 min^{-1} (eHisH:F) bzw. 300 min^{-1} (s*HIS7*) und waren damit um den Faktor 40 bzw. 120 höher als in Abwesenheit des Liganden (Chittur et al., 2000). Der k_{cat} von tHisH:F unter Sättigung mit 5'-ProFAR bzw. ImGP betrug 6 min^{-1} bzw. 7 min^{-1}. Allerdings wurden die Enzymtests bei eHisH:F und s*HIS7* bei 30° C, also nahe dem physiologischen Wachstumsoptimum von *E. coli* und der Hefe, durchgeführt, während die Aktivitäten des *T. maritima*-Homologs bei 25° C und damit weit entfernt vom Wachstumsoptimum von 80° C gemessen wurden. Enzyme aus thermophilen Organismen zeigen im allgemeinen eine geringe Aktivität bei Temperaturen weit unter den physiologischen Wachstumstemperaturen (Badet-Denisot et al., 1997; Jaenicke & Böhm, 1998). Es ist daher zu vermuten, daß der k_{cat}-Wert von tHisH bei 80° C denen von *E. coli* und *S. cerevisiae* nahekommt. Der K_M^{Gln} von tHisH beträgt bei 25° C ca. 0.5 mM und ist damit etwas niedriger als in eHisH (2.4 mM) und s*HIS7*-Enzym (5.4 mM) bei 30° C. Allerdings ist der K_M eine temperaturabhängige Größe, der häufig mit zunehmender Temperatur steigt. Dies läßt vermuten, daß bei der physiologischen Temperatur von *T. maritima* der K_M-Wert in der Größenordnung der für die *E. coli*- und *S. cerevisiae*-Homologen ermittelten Werte liegt.

Als HisF-Ligand in dem *E. coli*- und im *T. maritima*-HisH:F-Komplex können das HisA-Substrat ProFAR oder das HisF-Produkt ImGP dienen, nicht aber das zweite HisF-Produkt AICAR. Dies und die fehlende Aktivierung durch AICAR bedeuten, daß der als „ImGP-Teil“ von 5’-PRFAR die Signalübertragung an tHisH induziert. 5’-ProFAR bindet mit einer ca. um den Faktor 100 höherer Affinität an tHisF als ImGP ($K_D^{ProFAR} \approx 20$ µM; $K_D^{ImGP} \approx 1500$ µM).

Für tHisH im Komplex mit tHisF-wt sind die k_{cat}-Werte mit sättigender Konzentration entweder an 5’-ProFAR oder an ImGP in etwa gleich (6 min^{-1} mit 5’-ProFAR, 5 min^{-1} mit ImGP). Bei hoher Enzymkonzentration (20 µM) wurde ein Umsatz von 5’-ProFAR durch tHisF beobachtet (Lang et al., 2000). Aus der Umsatzkurve wurden ein k_{cat} von 2.3 $*10^{-4}s^{-1}$ sowie ein K_M^{ProFAR} von 2 µM ermittelt. Der K_M^{ProFAR} von tHisF ist damit um einen Faktor 10 kleiner als der K_D^{ProFAR}. In der steady-state-Kinetik läßt der Grenzfall $K_M < K_D$ darauf schließen, daß sich der Enzym-Produkt-Komplex (tHisF-5’-PRFAR) anhäuft.

Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da 5’-PRFAR das natürliche HisF-Substrat ist und deshalb schnell umgesetzt werden sollte.
Eine andere Erklärung besteht darin, daß 5’-ProFAR möglicherweise eine geringere Signalübertragungseffizienz als 5’-PRFAR besitzt.

Die Aktivierung der Glutaminaseaktivität von tHisH über die ImGP-Bindung ist praktisch identisch für Wildtyp-tHisF und die katalytisch weitgehend inaktiven Varianten tHisF-D11N und tHisF-D130N. Dagegen ist die Aktivierung von tHisH über die ImGP-Bindung in tHisF-D11N und tHisF-D130N um einen Faktor von 7 bzw. 10 niedriger als bei Wildtyp-tHisF. Die Ursache könnte darin bestehen, daß ImGP an diesen Varianten schlechter bindet als an tHisF-Wildtyp und deshalb bei der eingesetzten Konzentration von 10 mM noch keine Sättigung erzielt wurde. Alternativ könnten der Austausch der Aminosäuren an Position 11 und 130 auch zu Konformationsänderungen in ihrer Umgebung führen, durch welche die ImGP-induzierte Signaltransduktion beeinträchtigt wird.

Die Inaktivität von tHisH in Abwesenheit von tHisF läßt vermuten, daß die Polypeptide *in vivo* als Bienzymkomplex vorliegen. Es wurde gezeigt, daß die Glutaminase-Aktivität streng kontrolliert und mit der Bindung eines Liganden an HisF gekoppelt ist. Nur wenn HisF an HisH gebunden und durch die Bindung eines geeigneten Liganden seine aktive Konformation erhält, wird die Glutaminase-Aktivität stimuliert. Unter *in vivo*-Bedingungen kommen als HisF-Liganden prinzipiell ImGP, 5'-ProFAR und 5'-PRFAR in Frage. Aufgrund der geringen Affinität von ImGP zu tHisF kommt ImGP als HisH-Aktivator *in vivo* jedoch tatsächlich nicht in Frage. 5'-ProFAR bindet zwar mit höherer Affinität als ImGP, spielt wahrscheinlich *in vivo* dennoch keine Rolle bei der tHisH-Aktivierung, da die Affinität von tHisA höher als die von tHisF ist ($K_M^{5'\text{-ProFAR}}$=0.4 µM für tHisA, Schmidt, 1999, $K_D^{5'\text{-ProFAR}}$ 20 µM für tHisF). Aufgrund dieser Konkurrenzsituation wird die HisH-Aktivierung *in vivo* hauptsächlich durch 5'-PRFAR erfolgen, so daß eine regulierte Histidin-Biosynthese möglich ist. Durch diese Kopplung von HisH- und HisF-Aktivität wird dafür gesorgt, daß es in der Zelle nicht zur überflüssigen Hydrolyse von Glutamin kommt, wodurch der Stickstoff-Metabolismus gestört werden würde.

Für die Variante tHisH-W123F wurde der gleiche K_{cat}-Wert wie für tHisH-wt ermittelt. Bei W123 handelt es sich daher um einen Rest, der weder an der Katalyse noch an der Aktivierung von tHisH durch ligandiertes tHisF beteiligt ist.

4.4.3.2 tHisF-Kinetik

Im gekoppelten tHisF-Assay wurde ein schneller, vollständiger Umsatz des eingesetzten HisA-Substrates zu den HisF-Produkten spektrophotometrisch nachgewiesen. 5'-PRFAR ist sehr labil. Man kann deshalb spekulieren, daß 5'-PRFAR nicht ins Lösungsmittel freigesetzt, sondern von tHisA direkt auf das aktive Zentrum von tHisF übertragen wird. Ein direkter Transfer des Substrates vom im Biosyntheseweg vorangehenden Enzym wird auch für die Klasse-II-GATase Glutamin-PRPP-Amidotransferase (GPAT) angenommen (Bera et al., 2000a).

Für das bei 95° C optimal wachsende Bacterium *Aquifex aeolicus* kann ausgeschlossen werden, daß das labile Phosphoribosylamin (PRA, Halbwertszeit bei pH 7.5 und 37° C= 5 s, Rudolph & Stubbe, 1995) von der Glycinamid-Ribonukleotid-Synthetase (GAR-S) ins Medium gegeben wird, bevor es zur Synthase-Untereinheit der GPAT gelangt. Dies führt zu dem Schluß, daß es eine transiente Wechselwirkung der Enzyme geben muß, während derer PRA auf GPAT übertragen wird. Kinetische Analysen und Inhibitorstudien der CP-S aus *Pyrococcus abyssi*, einem hyperthermohilen Archaeon (T_{opt} = 96° C), deuten ebenfalls auf transiente Wechselwirkungen mit sowohl der Ornithin- als auch der Aspartat-Transcarbamoylase (OTCase bzw. ATCase) hin, bei denen das labile Carbamolyphosphat (Halbwertzeit bei 96° C = 2-3 s, Purcarea et al., 1999) von der pCP-S direkt auf die OTCase bzw. ATCase übertragen wird (Purcarea et al., 1999). Ein analoger Fall könnte bei dem tHisA-tHisF-Enzympaar vorliegen, experimentelle Evidenzen liegen jedoch bislang nicht vor.

Vergleich von steady-state-Parametern des HisH:F-Komplexes aus T. maritima, E. coli und HIS7 aus S. cerevisiae

In Tabelle 16 sind die kinetischen Parameter der glutaminabhängigen Reaktion von tHisH:F, eHisH:F und des bifunktionellen Enzyms HIS7 aus *S. cerevisiae* gegenübergestellt.

Tabelle 16: Vergleich von steady-state-Parametern der HisH:F-Komplexe aus *T. maritima, E. coli* und des bifunktionellen Enzyms *HIS7* aus *S. cerevisiae*

Organismus	Glutaminase-Aktivität		Synthase-Aktivität	
	K_M^{Gln} (mM)	k_{cat} (s^{-1})	$K_M^{5'\text{-}PRFAR}$ (µM)	k_{cat} (s^{-1})
T. maritima[(1)]	0.32	0.8	1.5	0.4
E. coli[(2)]	0.24	8.5	1.5	9.1
S. cerevisiae[(3)]	3.9	3.9	4.0	5.2

[(1)]: gemessen bei 25° C in 50 mM Tris/Acetat, pH 8.0 (s. Tab. 17)
[(2)]: gemessen bei 30° C in 50 mM Tricin/KOH, pH 8.0 (Klem & Davisson, 1993)
[(1)]: gemessen bei 30° C in 50 mM Pipes/HCl, pH 7.0 (Chittur et al., 2000)

Während die K_M-Werte für Glutamin und 5'-PRFAR für die verglichenen Enzyme unter den gegebenen Bedingungen ähnlich sind, sind die k_{cat}-Werte von tHisH:F etwa um eine Größenordnung niedriger als die der Enzyme aus den mesophilen Organismen. Dies ist zu erwarten, da Enzyme aus hyperthermophilen Organismen bei niedrigen Temperaturen häufig nur eine geringe Aktivität aufweisen (Merz et al., 2000). Als Ursache wird eine für die Katalyse hinderliche Rigidität der thermostabilen Enzyme angenommen, die bei den hohen physiologischen Temperaturen aufgehoben ist (Zavodszky et al., 1998).

Effekt des gezielten Aminosäureaustausches auf die katalytischen Parameter und mögliche Rolle der ausgetauschten Reste in der tHisF-Katalyse

Acht tHisF-Varianten mit jeweils einem Aminosäureaustausch wurden entsprechend dem Wildtyp-tHisF auf ihre enzymatische Aktivität hin untersucht. Es zeigte sich, daß die einzelnen Aminosäureaustausche die tHisF-Aktivität in unterschiedlichem Maße beeinträchtigten. Im folgenden sind die beobachteten Effekte aufgeführt und interpretiert.

C9A: Dieser Aminosäureaustausch wirkt sich in einer geringfügigen (Faktor 2-4) Erhöhung der K_M-Werte für Glutamin, 5'-PRFAR und Ammoniak aus. Der k_{cat} entspricht im wesentlichen dem des Wildtyps, nur in der ammoniumabhängigen Reaktion des tHisH:F-Komplexes ist der k_{cat}-Wert um ca. ein Drittel niedriger als der des Wildtyp-Komplexes. Eine wichtige Rolle in der Katalyse der tHisF-Reaktion kann damit für die Aminosäure C9 ausgeschlossen werden.

D11N: Die Variante D11N wies eine sehr geringe Aktivität auf, die nur unter Einsatz einer sehr hohen Enzymkonzentration (20 µM) detektierbar war. Es wurde nur die ammoniumabhängige Aktivität dieser Variante untersucht. Die Messung der Anfangsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen 5'-PRFAR-Konzentrationen (20 µM, 50 µM, 100 µM) zeigte, daß die Anfangsgeschwindigkeit unabhängig von der Substratkonzentration war, d. h. daß das Enzym in jedem Fall mit 5'-PRFAR gesättigt war.

Hieraus kann geschlossen werden, daß der K_M^{PRFAR} für tHisF-D11N nicht signifikant über dem von tHisF-wt (1.7 µM) liegt und die drastische Reduktion der Aktivität von tHisF-D11N durch einen um den Faktor 10^4-10^5 reduzierten k_{cat}-Wert bedingt ist. Aspartat 11 scheint daher direkt an der Katalyse der tHisF-Reaktion beteiligt zu sein.

K19S: Für die Variante K19S wurde zum einen eine Erhöhung des K_M^{PRFAR} – besonders in der glutaminabhängigen Reaktion - beobachtet, zum anderen eine deutliche Verringerung des k_{cat}-Wertes in der glutaminabhängigen Reaktion.

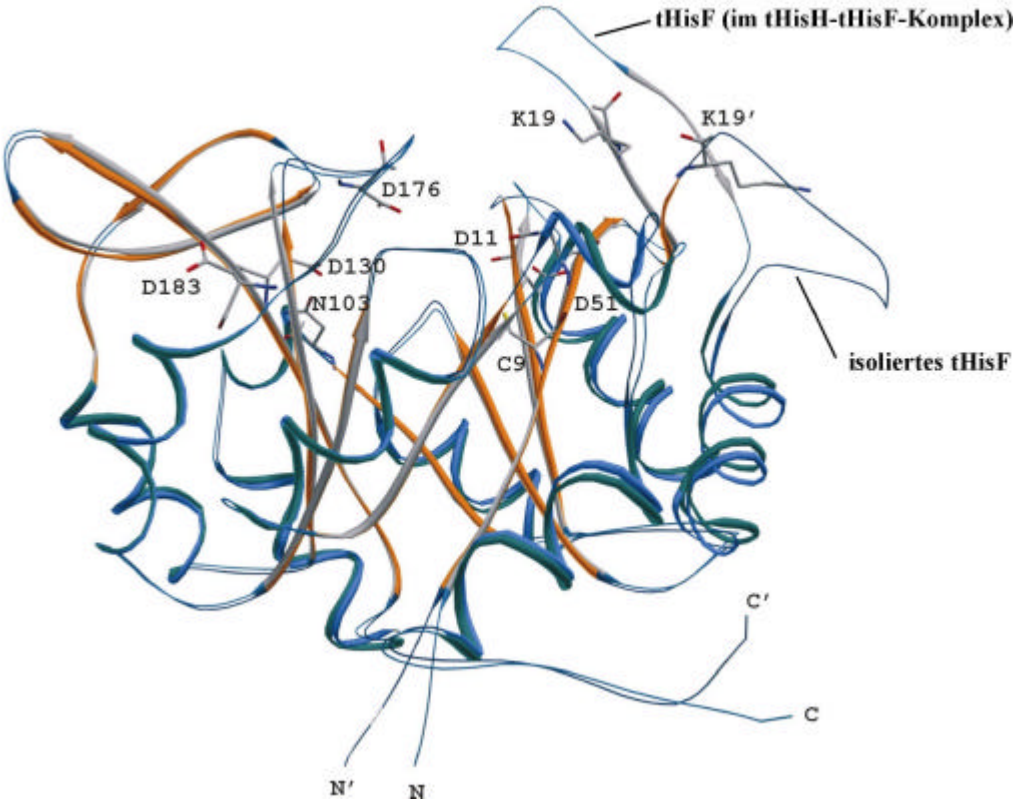


Abbildung 4.20: Die Superpositionierung von isoliertem mit komplexierten tHisF zeigt eine Konformationsänderungen in tHisF im Bereich zwischen b1 und b1''.

Die beiden tHisF-Strukturen lassen sich gut superpositionieren, der rmsd beträgt 0.68Å.
In die tHisF-Komplexstruktur sind alle ausgetauschten Aminosäuren eingezeichnet. In die isolierte tHisF-Struktur ist nur das Lysin-19 (K19') eingezeichent.
rmsd = 0.68 Å
N, N': N-Terminus von komplexiertem bzw. isoliertem tHisF
C, C': C-Terminus von komplexiertem bzw. isoliertem tHisF
Die markierten β-Stränge weisen auf die β-Stränge in dem mit tHisH komplexierten tHisF

Die Superpositionierung der Röntgenstrukturen von isoliertem und mit tHisH komplexiertem tHisF zeigt, daß die Aminosäure 19 die einzige der ausgetauschten Aminosäuren ist, deren Lage sich durch die Komplexbildung drastisch verändert (Abb. 4.20), da der Bereich nach β1 bis einschließlich β1'' eine drastische Konformationsänderung aufweist. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß es sich bei dieser Konformationsänderung um einen Kristallisationsartefakt handelt, deutet sie doch auf eine hohe Flexibilität dieses Bereiches in der Struktur hin. Diese Annahme wird auch durch das Ergebnis des Trypsinverdaus (s. 3.4.2) gestützt.

Im Komplex ist die Seitenkette des Lysin-19 zum aktiven Zentrum hin ausgerichtet. Sie könnte daher an der Bindung von 5'-PRFAR beteiligt sein, wofür die erhöhten $K_M^{5'\text{-PRFAR}}$-Werte in K19S sprechen. Die Tatsache, daß der k_{cat}-Wert von K19S nur in der glutaminabhängigen Reaktion, nicht jedoch in der ammoniumabhängigen Reaktion, signifikant erniedrigt ist, spricht für eine Beteiligung von K19 an der Kommunikation zwischen tHisH und tHisF. Eine Strukturdatenbank-Analyse ergab, daß Lysine besonders oft aufgrund von Ligandenbindungen Konformationsänderungen erfahren, die strukturelle Veränderungen in assoziierten Domänen oder Untereinheiten induzieren (Najmanovich et al., 2000). Diese Funktion könnte auch die Seitenkette von Lysin-19 ausüben.

D51N: Signifikante Abweichungen von den katalytischen Parametern von tHisF-wt bestehen zum einen in einem um den Faktor sieben höheren K_M^{NH3}, zum anderen in einem um den Faktor 10 verringerten k_{cat} in der glutaminabhängigen Reaktion.

Für CP-S, einer anderen Klasse-I-GATase, wurde durch Mutationsstudien nachgewiesen, daß externer Ammoniak auf einem anderen Weg zum aktiven Zentrum der Synthase-Untereinheit gelangt als der aus der Glutamin-Hydrolyse hervorgegangene Ammoniak (Huang & Raushel, 2000).

Die selektive Beeinträchtigung der Bindung von externem Ammoniak in der tHisF-Variante D51N gibt einen Hinweis darauf, daß dies auch bei der tImGP-S der Fall sein könnte, und daß durch den Austausch des Aspartates 51 gegen ein Asparagin der Zugang von externem Ammoniak beeinträchtigt worden ist.

In der vorliegenden tHisF-Struktur konnte ein möglicher Weg von externem Ammoniak zum aktiven Zentrum nicht gefunden werden.
Für den verringerten k_{cat}-Wert in der glutaminabhängigen Reaktion könnte wie auch bei der Variante K19S (s. o.) ein Defekt in der Signalübertragung zwischen tHisF und tHisH in Frage kommen. K19 und D51 liegen auf der Seite der C-terminalen Phosphatbindungsstelle (Abb. 4.21). Dies und der Befund, daß die Stimulierung der tHisH-Glutaminase-Aktivität über den „ImGP-Teil“ von 5’-PRFAR erfolgt (s. 4.4.3.1), deuten darauf hin, daß die Aktivierung von tHisH hauptsächlich über die tHisF-Seite mit der C-terminalen Phosphatbindungsstelle sowie den Aminosäuren K19 und D51 erfolgt.

N103A, D183N: Bei diesen Varianten ist nur der k_{cat}-Wert in der glutaminabhängigen Reaktion um einen Faktor von ca. 4-8 verringert, alle übrigen Parameter entsprechen weitgehend denen des Wildtyp-Enzyms. Eine mögliche Erklärung eine Beteiligung der Reste N103 und D183 an der Signalübertragung zwischen tHisF und tHisH. (vergl. K19S, D51N). N103 und D183 liegen, im Gegensatz zu K19 und D51, auf der Seite der N-terminalen Phosphatbindungsstelle (Abb. 4.21). An der Aktivierung von tHisH durch tHisF scheint daher auch die Seite von tHisF beteiligt zu sein, an der das N-terminale Phosphat und wahrscheinlich der „AICAR-Teil“ des 5’-ImGP gebunden sind.

In der Röntgenstruktur von tHisF mit gebundenen Phosphaten konnte gezeigt werden, daß N103 zusammen mit G82 und T104 direkt an der Bindung des N-terminalen Phosphates, und damit wahrscheinlich auch des zweifach phosphorylierten Substrates 5’-PRFAR, beteiligt ist (Lang et al., 2000).

Die Phosphatbindung erfolgt über das Stickstoffatom der Hauptkette (Abb. 4.21). Da sich der K_M^{PRFAR} durch den Austausch N103A praktisch nicht ändert, scheint sich die Lage der Hauptkette nicht verändert zu haben. N103 bildet zwei Wasserstoffbrücken zu D130 aus und könnte daher zur richtigen Orientierung von D130 für die Katalyse beitragen. Beide Wasserstoffbrücken werden in der Variante N103A nicht ausgebildet.

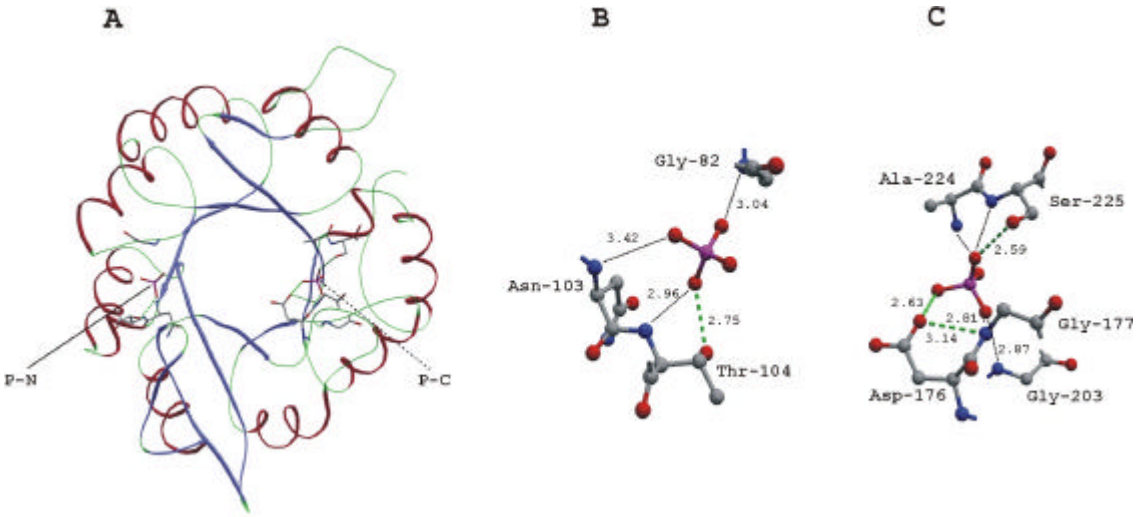


Abbildung 4.21: Phosphatbindungsstellen in tHisF.

A: Aufsicht auf das zentrale b-Barrel von tHisF. Die Positionen der beiden gebundenen Phosphate sind markiert: P-N, N-terminales Phosphat, P-C, C-terminales Phosphat.
B, C: Komplexierung des N-terminalen (B) und des C-terminalen (C) Phosphates.
Die Bindungslängen in Å sind eingezeichnet.

D130N: Die Variante D130N wies wie D11N eine sehr geringe Aktivität auf, die nur unter Einsatz einer sehr hohen Enzymkonzentration (20 µM) detektierbar war. Es wurde nur die ammoniumabhängige Aktivität dieser Variante untersucht. Die Messung der Anfangsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen 5'-PRFAR-Konzentrationen (50 µM, 100 µM, 200 µM) zeigte, daß die Anfangsgeschwindigkeit in linearer Abhängigkeit zur eingesetzten Substratkonzentration war. Die Steigung der entsprechenden Geraden erlaubt die Bestimmung von v_{max}/K_M bzw. der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M. Für die individuellen Konstanten k_{cat} und K_M können nur Maximal- bzw. Minimalwerte angegeben werden.

Die um ca. 10^6 verringerte katalytische Effizienz von D130N deutet auf eine entscheidende Rolle von D130 sowohl bei der Substratbindung als auch bei der Katalyse hin.

D130E: Der Austausch von D130 gegen Glutamat führt zu einem drastischen Rückgang der Aktivität (ca. 10^4fach). Es wurden eine signifikante Erhöhung des K_M^{PRFAR} sowie eine drastische Verringerung des k_{cat} beobachtet. Dieses Ergebnis stützt die oben (s. D130N) gemachte Annahme, daß D130 sowohl an der Substratbindung als auch an der Katalyse selbst beteiligt ist.

D176N: Die Variante D176N weist sowohl in der glutamin- als auch in der ammoniumabhängigen Reaktion einen deutlich verringerten k_{cat}-Wert auf. Ferner ist der K_M^{PRFAR} in der ammoniumabhängigen Reaktion gegenüber dem Wildtyp-Enzym erhöht.

Die Aminosäure D176 wurde als Teil der C-terminalen Phosphatbindungsstelle identifiziert (Lang et al., 2000). Die Bindung erfolgt über eine Wasserstoffbrücke zwischen Sauerstoffatomen des Phosphates und der Aminosäureseitenkette (Abb. 4.21). Durch den Austausch gegen Asparagin wird ein Sauerstoffatom der Seitenkette durch eine Aminogruppe ersetzt, wodurch die Wasserstoffbrücke entfernt oder geschwächt werden könnte. Dadurch könnte sich die Lage des 5'-PRFAR so verändern, daß der nukleophile Angriff des Ammoniaks erschwert wird, was die Ursache für den erniedrigte k_{cat}-Wert sein könnte.

Durch die kinetische Charakterisierung der tHisF-Varianten konnten zwei Aminosäuren, D11 und D130, identifiziert werden, die eine essentielle Rolle in der Katalyse spielen. Bei anderen Varianten wurden Effekte beobachtet, die auf eine Beteiligung an der Substratbindung oder –ausrichtung, oder dem Signaltransfer zwischen tHisF und tHisH hindeuten. Eine weitergehende Analyse der Rolle der einzelnen Reste könnte mit Kenntnis der Kristallstruktur des tHisF:H-Komplexes mit gebundenen Liganden erfolgen.

Entsprechende Kristallisationsversuche werden derzeit von Dr. Martina Walker (EMBL Außenstation Hamburg) durchgeführt.

4.4.4 Reaktionsmechanismen von tHisH und tHisF

An der ImGP-S sind die Reaktionsmechanismen der Teilreaktionen bislang nicht aufgeklärt worden. Ein Mechanismus einer Cycloligase-Lyase-Reaktion wie sie von tHisF katalysiert wird, ist noch völlig unbekannt. Hydrolyse-Reaktionen wie die von tHisH wurden zuerst an Serin-Proteasen, später an vielen weiteren Enzymen, unter anderem auch der CP-S (Thoden et al., 1998; Thoden et al., 1999), detailliert untersucht.

4.4.4.1 tHisH: Hydrolyse der Glutamin-Amidbindung

Während in GATasen der Klasse II einzig das N-terminale Cystein katalytisch essentiell ist, besitzen Klasse-I-GATase eine katalytische Triade Cys-His-Glu (Zalkin & Smith, 1998). Katalytische Triaden wurden zuerst in Serin-Proteasen (Bender et al., 1964) und seitdem in verschiedenen Enzymfamilien gefunden, z. B. in α/β-Hydrolasen (Ollis et al., 1992), Transglutaminasen (Yee et al., 1994) und Klasse-I- („Triaden“-) GATasen (Amuro et al., 1985). Aufgrund ihrer Polarität wird die katalytische Triade auch als „Charge Relay System“ (Robillard & Shulman, 1974; Markley & Porubcan, 1976) bezeichnet. Durch den Elektronenschub von der sauren Aminosäure (Glu oder Asp) über das streng konservierte His zum nukleophilen Rest (Cys, Ser oder Aps) wird dessen Nukleophilie verstärkt. In Abbildung 4.22 ist das potentielle Charge Relay System von tHisH, abgeleitet vom Charge Relay System von Chymotrypsin (Robillard & Shulman, 1974) gezeigt.

In Serin-Proteasen stellt der Sauerstoff der Serin-Seitenkette das Nucleophil dar. In Cystein-Proteasen und Klasse-I-GATasen wird diese Rolle durch den Schwefel der Cystein-Seitenkette übernommen.

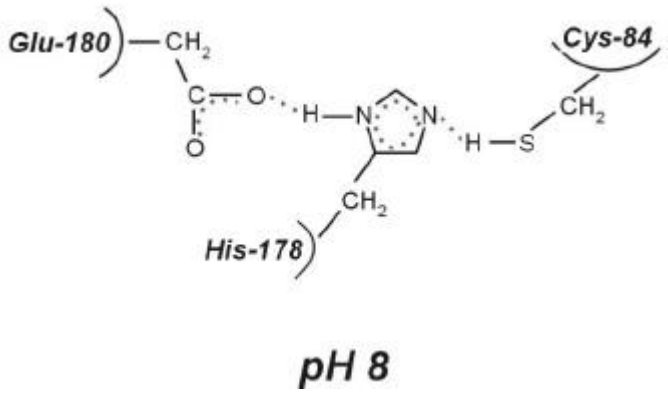


Abbildung 4.22: Katalytische Triaden stellen ein „Charge Relay System" dar, in dem durch Elektronenschub von einer sauren Aminosäure über ein Histidin die Nukleophilie der dritten Aminosäure erhöht wird.

Im Beispiel ist die vermutete katalytische Triade von tHisH dargestellt.

Serin- und Cystein-Proteasen sowie Klasse-I-GATasen besitzen ähnliche Faltungen. Sie besteht aus einem zentralen, gemischten β-Faltblatt, das von α-Helices umgeben ist (Garavito et al., 1977; Zalkin & Smith, 1998). Die Faltung des zentralen β-Faltblatts sorgt dafür, daß die Reste einer katalytische Triade zweierlei Ausrichtung haben können.

So ist das aktive Zentrum von Cystein-Proteasen quasi ein Spiegelbild des aktiven Zentrums in Serin-Proteasen (Garavito et al., 1977). Die katalytische Triade von Klasse-I-GATasen entspricht dem Cystein-Proteasen-Typ, wie an der guten Superpositionierung der katalytischen Reste von Papain und der GMP-S gezeigt werden konnte (Tesmer et al., 1996). Untersuchungen an der CP-S lassen vermuten, daß der Hydrolyse-Mechanismus in den „Triaden"-GATasen analog zu dem der Cystein-Proteasen ist (Thoden et al., 1998; Thoden et al., 1999a; Hewagama et al., 1999).

Thoden et al. (1999a) beschreiben den Reaktionsmechanismmus der CP-S-Glutaminase wie folgt: Durch Bindung des Glutamin an das Apoenzym wird zunächst der Michaelis-Komplex gebildet, der in der CP-S-Variante C269S direkt nachgewiesen wurde (Thoden et al., 1999a).

Der erste Katalyseschritt besteht im Angriff des Nukleophils auf den Carbonylkohlenstoff des Substrates, was zur Bildung eines tetraedrischen Intermediates führt. Dieses Intermediat wurde durch Zugabe des Inhibitors Glutamat-γ-Semialdehyd nachgewiesen (Thoden et al., 1998). In der Oxyaniontasche wird die negative Ladung des Intermediates durch Wasserstoffbrücken mit den Hauptketten-Stickstoffatomen von Gly-241 und Leu-270 stabilisiert. Durch Protonierung der Substrat-Amidgruppe, wahrscheinlich durch das Proton vom $N^{\varepsilon 2}$ des His-353, kommt es zur Abspaltung von Ammoniak und damit zur Bildung des Thioester-Intermediates. Dieses Intermediat wurde in der Variante H353N nachgewiesen. Der nukleophile Angriff eines Wassermoleküls auf den Carbonylkohlenstoff des Thioesters führt zur Bildung eines zweiten tetraedrischen Intermediates, durch dessen Kollabieren das Produkt Glutamat freigesetzt wird.

Der abgeleitete Reaktionsmechanismus ist – mit Numerierung entsprechend der Reste in tHisH – in Abbildung 4.23 dargestellt.

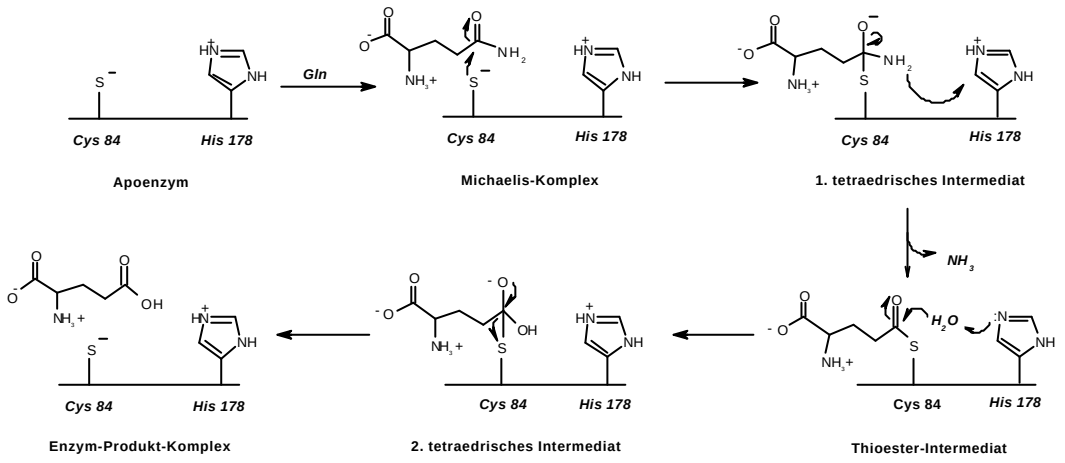


Abbildung 4.23: Reaktionsmechanismus der Glutaminase-Reaktion in Klasse-I-GATasen (nach Thoden et al., 1999a).

Die Numerierung erfolgte entsprechend der katalytischen Reste in tHisH. Die entsprechenden Aminosäuren in der eCP-S sind Cys-269 und His-353.

In der eCP-S wurde in Anwesenheit der Synthase-Liganden ATP und Bicarbonat die Bildung des Thioester-Intermediates als geschwindigkeitsbestimmender Schritt identifiziert, in Abwesenheit der Liganden hängt die Reaktionsgeschwindigkeit von der Geschwindigkeit der Thioester-Hydrolyse ab (Miles et al., 1998).

4.4.4.2 tHisF: Bildung des Imidazolrings und Spaltung einer C-N-Bindung

tHisF katalysiert eine komplizierte, mehrstufige Cycloligase-Lyase-Reaktion. Der chemisch plausible minimale Mechanismus besteht aus folgenden Schritten (Abb. 2.24):

1. nukleophiler Angriff von Ammoniak an die Carbonylfunktion des Ribulosylteils von 5'-PRFAR und Eliminierung von Wasser, ein Imin wird gebildet;

2. durch intramolekulare Umlagerung entsteht ein En-Diamin;

3. nukleophile Addition des vom Ammoniak stammenden Stickstoffs an den ungesättigten Kohlenstoff des Formimino-Teils des Substrats unter Ausbildung eines Imidazolringes; das Intermediat ist ein Amido-Imidazolin;

4. Spaltung der C-N-Bindung zwischen dem C4 des Imidazolrings und dem Amino-Stickstoff des Aminoimidazolteils des Substrats, wodurch die Produkte AICAR und ImGP entstehen

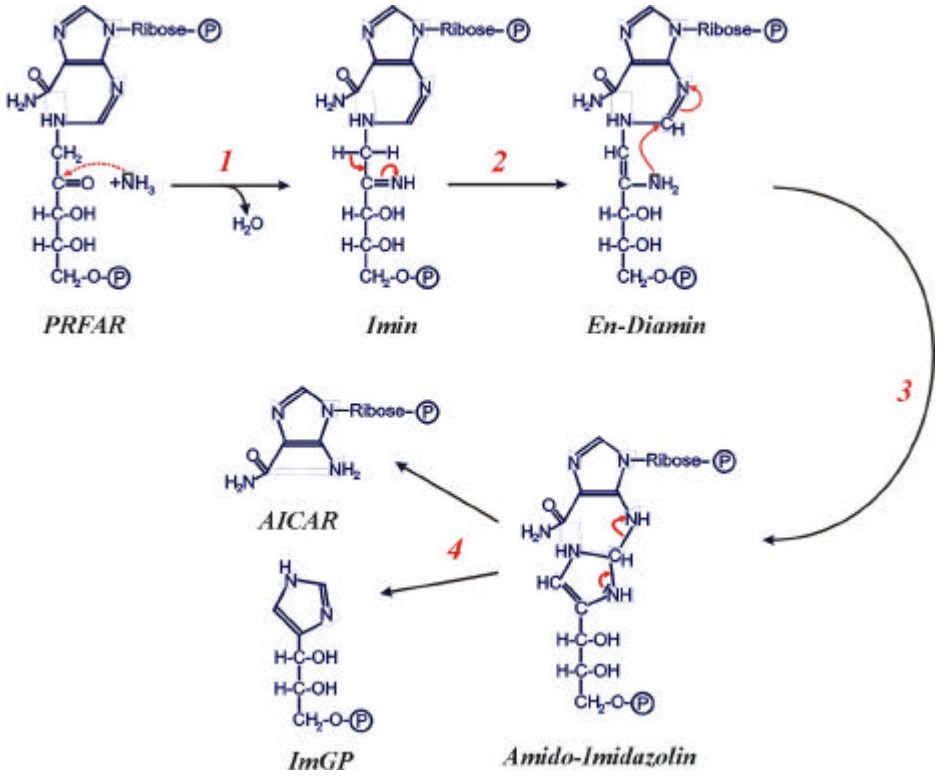


Abbildung 4.24: Minimaler Mechanismus der tHisF-Reaktion.

Die einzelnen Schritte sind im Text erläutert.

Diese Reaktionsabfolge läßt eine allgemeine Säure-Base-Katalyse vermuten. Die Identifizierung zweier katalytisch essentiellen Aspartate, D11 und D130, stützt diese Annahme. Die nukleophile Addition des Ammoniaks an die Carbonylfunktion, die anschließende Eliminierung von Wasser und darauf folgende intramolekulare Umlagerung zum En-Diamin (Schritte 1 und 2) können vermutlich unkatalysiert ablaufen. Bei den anderen Reaktionsschritten ist dagegen eine Katalyse wahrscheinlich. Abbildung 4.25 zeigt einen möglichen Säure-Base-katalysierten Reaktionsablauf. Durch Anlagerung eines Protons einer allgemeinen Säure **H-X**$_1$ an den Stickstoff der Formimino-C-N-Doppelbindung einsteht ein Carbokation, an dem ein nukleophiler Angriff des vom Ammoniak stammenden Stickstoffs erfolgt. Durch sukzessiven Entzug zweier Protonen von diesem Stickstoff durch allgemeine Basen $\mathbf{X}_2^-$ und $\mathbf{X}_1^-$ erhält der Stickstoff ein weiteres freies Elektronenpaar, welches zur Bildung einer Doppelbindung zum ursprünglichen Formimino-Kohlenstoff verwendet wird. Eine allgemeine Säure **H-X**$_2$ protoniert den ehemaligen Formimino-Stickstoff, wobei die C-N-Bindung gelöst wird und die beiden Produkte AICAR und ImGP freigesetzt werden.

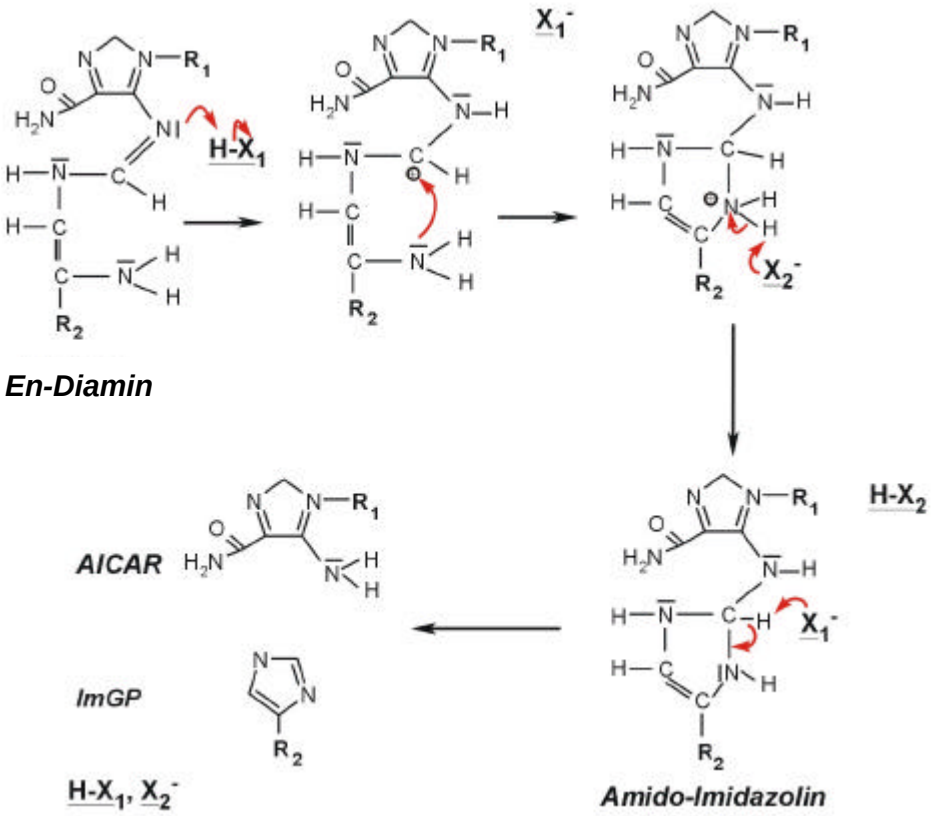


Abbildung 4.25: Potentiell Säure-Base-katalysierte Schritte der tHisF-Reaktion.

R$_1$: Ribosephosphat
R$_2$: 3-Phosphoglycerin
Die einzelnen Schritte sind im Text erläutert.

Die als katalytisch essentiell identifizierten Aminosäuren Asp-11 und Asp-130 könnten die Rollen der im vorgeschlagenen Mechanismus wirkenden Säure-Base-Paare haben. Eine dieser Aminosäuren müßte im Grundzustand des Enzyms protoniert vorliegen (**H-X**$_1$), was bedeutet, daß der pK_a-Wert stark pertubiert sein muß.

Nach Austausch des Asp-130 gegen Glu behält tHisF signifikante Restaktivität (s. Tab. 11, Tab. 13 und Tab. 14), während Asp-11 durch keine andere Aminosäure ersetzt werden kann. Daher kann vermutet werden, daß Asp-11 in einem Mikromilieu liegt, daß die Protonierung nur seiner Seitenkette ermöglicht, die eines Glutamates aber nicht.

Zur Aufklärung des Mechanismus der tHisF-Reaktion müssen weitere Untersuchungen, beispielweise mit Hilfe von pre-steady-state Kinetik, vorgenommen werden. Sehr hilfreich wäre auch eine Röntgenstruktur des tHisH:F-Komplexes in seiner aktiven Form, d. h. mit gebundenen Glutaminase- und Ligase-Liganden. Aufgrund der Labilität der Substrate –5'-PRFAR zerfällt schnell in AICAR und ein oder mehrere nicht charakterisierte Produkte (Klem & Davisson, 1993), Glutamin wird auch nichtenzymatisch zu Glutamat und Ammoniak hydrolysiert – müßte auf Substratanaloga ausgewichen werden. Als tHisH-Substratanaloga könnten Glutamat oder 6-Diazo-5-Oxo-Norleucin (DON) eingesetzt werden, als tHisF-Substratanalogon 5'-ProFAR (s. o.). Da tHisF-wt eine schwache HisA-Aktivität besitzt (Lang et al., 2000), sollte eine tHisF-Variante verwendet werden, deren Affinität zu 5'-ProFAR wenig beeinträchtigt ist, es aber praktisch nicht umsetzt. Die steady-state kinetischen Untersuchungen (s. 4.4.2) deuten darauf hin, daß tHisF-D11N ein geeigneter Kandidat für dieses Experiment ist.

4.5 *In vivo-Komplementationstest von thisF-Varianten in UTH860 („ΔhisF")*

Der gezielte Austausch von Asp-11 und Asp-130 gegen Asn führte zu einem drastischen Rückgang der Aktivität von tHisF (s. Tab. 15). Durch eine Randomisierung dieser Positionen und anschließender Selektion *in vivo* sollte ermittelt werden, ob Asp-11 oder Asp-130 durch eine der anderen 19 natürlich vorkommenden Aminosäuren funktionell ersetzt werden können. Dies würde sich dadurch zeigen, daß die entsprechende tHisF-Variante einen *E. coli*-Stamm mit defektem *his*F-Gen Wachstum auf histidinfreiem Medium ermöglicht („*in vivo*-Komplementation").

Der für diese Versuche verwendete *E. coli*-Stamm UTH860 („Δ*his*F“) wurde von Goldschmidt et al. (1970) als ein Stamm beschrieben, der aufgrund eines mutierten *his*F-Gens nicht zur Histidin-Biosynthese befähigt war. Das e*his*F-Gen aus dem Δ*his*F-Stamm wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenziert. Es wurde eine Deletion eines Nukleotids (G547) gefunden, welche zur Leserasterverschiebung führt. Das Glycin 183, das in allen bekannten HisF-Sequenzen streng konserviert ist, wird ersetzt durch Alanin. Ab diesem Rest wird die Wildtyp-eHisF-Sequenz wie folgt geändert:

wt: GVRNGYDLEQLK

Δ*his*F: ACVTVTTSRNN*

Es kommt in der Helix α6 zum Translationsstop. Dadurch fehlen mehrere Sekundärstrukturelemente, die zur Stabilität und enzymatischen Aktivität von HisF sowie auch für die Wechselwirkung mit HisH von Bedeutung sind.

Die Gene t*his*F-wt, t*his*F-D11N und t*his*F-D130N wurden umkloniert in das Plasmid pTNA. pTNA ist ein pDS-Derivat, in dem die Lac-Promotor-Operator-Region durch eine verkürzte Variante des Promotors des Tryptophanase- (tna-) Operons ersetzt wurde (Merz et al., 2000). Ausgehend vom tna-Promotor werden Gene in pTNA schwach konstitutiv exprimiert. pTNA hat sich in mehreren Fällen als geeignetes Plasmid für Komplementationsversuche erwiesen (Merz et al., 2000; Jürgens et al., 2000)

Mit den erhaltenen pTNA-Konstrukten wurden elektrokompetente *E. coli*-Δ*his*F-Zellen transformiert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden Aliquots der Transformationsansätze auf LB-Amp- und VB^-+Amp+His-Platten ausgestrichen (s. Tab. 17).

Um zu testen, ob t*his*F-wt, t*his*F-D11N und t*his*F-D130N zur Komplementation des defekten e*his*F *in vivo* befähigt waren, wurden transformierte -Δ*his*F-Zellen auf histidinfreies VB^-+Amp-Medium plattiert. Während t*his*F-wt wie erwartet *in vivo* komplementieren konnte, waren die Varianten t*his*F-D11N und t*his*F-D130N dazu nicht in der Lage (Tab. 17).

Δ*his*F-Zellen, die mit insertfreiem Vektor transformiert worden waren, komplementierten ebenfalls nicht.

Um zu untersuchen, ob eine andere Aminosäure das Aspartat an Position 11 oder 130 substituieren kann, wurden die Codone an diesen Positionen randomisiert. Die Plasmide pTNA-*his*F-D11N und pTNA-*his*F-D130N dienten als Matrize für eine „NNS-PCR“, bei der die Codone 11 bzw. 130 dadurch randomisiert wurden, daß an den ersten beiden Positionen jede der vier Basen zugelassen wurde (N) und an der dritten Position G oder C (S). Die beiden erhaltenen „NNS-Genpools“ wurden in pTNA ligiert. Δ*his*F-Zellen wurden mit diesen Ligationsansätzen transformiert und auf LB-Amp-Platten ausgestrichen. Die dicht gewachsenen Zellrasen (10 000 Kolonien) wurden abgeschwemmt und die beiden Genpools durch Anfertigen einer DNA-Präparation gesichert. Mit dieser DNA wurden erneut Δ*his*F-Zellen transformiert und auf auf LB-Amp- und VB^-+Amp+His, d. h. unter nicht-selektiven Bedingungen, ausgestrichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Effizienz der Transformation von Δ*his*F-Zellen mit pTNA-*his*F.

Platte	Transformationseffizienz (Kolonien pro µg transformierter DNA)				
	Wildtyp	D11N	D130N	D11NNS	D130NNS
LB-Amp	~ $3*10^8$	~ $3*10^8$	~ $3*10^8$	~ $2*10^8$	~ $3*10^8$
VB^-+Amp+His	~ $3*10^8$	~ $3*10^8$	~ $3*10^8$	~ $2*10^8$	~ $3*10^8$

Bei der Transformation wurde der Pool der Plasmid-DNA aller auf LB-Amp gewachsener Kolonien nach Transformation des Ligationsansatzes verwendet. Es wurden jeweils 10 ng DNA pro Transformationsansatz eingesetzt, die Transformationseffizienz wurde jedoch standardmäßig auf 1 µg DNA bezogen.

Die Daten zeigen, daß bei allen Varianten die beobachtete Transformationseffizienzen unabhängig davon sind, ob auf Voll- (LB-Amp-) oder Minimalmedium (VB^-+Amp+His) ausplattiert wurde.

Zur Kontrolle, ob die Basen in den Codonen 11 bzw. 130 zufällig verteilt sind, wurden von den auf LB-Amp gewachsenen Klonen 16 (t*his*F-D11NNS) bzw. 18 (t*his*F-D130NNS) t*his*F-Gene lesbar sequenziert. Die Verteilung der Nukleotide ist in Tab. 18 gezeigt.

Tabelle 18: Codone an Position 11 und 130 in tHisF.

Position 11	Klon	randomisiertes Codon		
	1	T	A	G
	2	T	C	G
	3	C	G	G
	4	G	G	G
	5	A	C	G
	6	T	A	G
	7*	A	A	T
	8	T	T	G
	9	G	A	G
	12	G	G	G
	13	T	G	C
	14	G	G	G
	15	C	T	G
	16	T	T	G
	19	C	G	G
	20	T	A	C
Position 130				
	1	G	T	G
	2	T	C	G
	3	G	A	G
	5	A	G	G
	6	A	G	G
	7	C	G	G
	8	T	C	G
	9	A	C	G
	10*	A	A	T
	11	C	G	G
	12	G	G	G
	13	T	G	G
	15	C	T	G
	16	C	C	G
	17	C	A	C
	18	C	G	G
	19	C	T	G
	20	G	G	C

*Das Codon AAT stellt das Matrizen-Codon dar.

Die Häufigkeit der Nukleotide ist nicht zufällig verteilt, doch wurde jede zugelassene Base in der Stichprobe an jeder Position mindestens zweimal gefunden (s. Tab. 19).

Tabelle 19:Verteilung der Nukleotide in den randomisierten Codonen.

	1. Position				2. Position				3. Position	
Nukleotid	G	A	T	C	G	A	T	C	G	C
D11NNS										
N	4	2	7	3	6	5	3	2	13	2*
%	25	13	44	19	38	31	19	13	81	6
D130NNS										
N	4	4	3	7	8	3	3	4	15	2*
%	22	22	17	39	44	17	17	22	83	11

* Durch das unvorhergesehene Auftreten von je einem T an dritter Position bei hisF-D11NNS und hisF-D130NNS ist die Summe hier nicht 16 bzw. 18, und es ergibt sich die um den T-Anteil verringerte Gesamtprozentzahl.

Unter der Vorraussetzung, daß alle 32 möglichen Codone mit gleicher Häufigkeit auftreten (f_i =1/32), wird eine Sättigungsmutagenese (P 0.99) mit einer Bibliothek von 145 Klonen erreicht (Formel (**4**.1), Darimont et al., 1998). Da nach der Transformation aller Varianten und Plattierung jeweils ein dichter Zellrasen mit mindestens 10 000 unabhängigen Klonen erhalten wurde, wurde mit Sicherheit trotz der nicht-zufälligen Codon-Verteilung jedes mögliche Codon erhalten.

$$P \leq 1 - \left(1 - \sum_{i=1}^{m} f_i \right)^n \qquad (\mathbf{4}.1)$$

P: Wahrscheinlichkeit dafür, daß bei *m* randomisierten Codonen mit einer relativen Häufigkeit f_i alle möglichen Kombinationen in der Bibliothek mit *n* unabhängigen Klonen vertreten sind aus: Darimont et al. (1998)

Selektion auf funktionale Aminosäuren an den Positionen D11 und D130 von tHisF

Frisch hergestellte elektrokompetente ΔhisF-Zellen wurden mit entweder 1 ng des „D11NNS“- oder des „D130-NNS“-Pools transformiert und Aliquots auf VB^-+Amp und VB^-+Amp+His ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht waren dichte Rasen auf den histidinhaltigen Kontrollplatten gewachsen. Auf den histidinfreien Platten erschienen über Nacht 23 „D11NNS“- und 1000 „D130NNS“-Klone. Nach 48 Stunden waren 500 weitere „D130NNS“-Klone erschienen, während die Zahl der „D11NNS“-Klone unverändert blieb.

Es wurden 4 „D11NNS“-Klone und 3 der nach 24 h und 5 der nach 48 h gewachsenen „D130NNS“-Klone sequenziert. Alle „D11NNS“-Klone und die nach Inkubation über Nacht gewachsenen „D130NNS“-Klone besaßen Codone für die Wildtyp-Aminosäure Aspartat. Dagegen besaßen alle „D130NNS“-Klone, die erst nach 48 h komplementieren konnten, Codone für Glutamat.

4.5.1 Diskussion

Durch den *in vivo*-Komplementationstest wurde gezeigt, daß die Aminosäure Aspartat 11 absolut essentiell für die Histidin-Biosynthese und damit für die Funktion von tHisF ist und durch keine andere Aminosäure in ihrer Funktion ersetzt werden kann. Das Aspartat 130 dagegen kann *in vivo* durch Glutamat ersetzt werden. An äquivalenter Position findet sich auch in HisF von *Legionella pneumophila* ein Glutamat, in allen weiteren 23 HisF-Sequenzen ist das Aspartat konserviert (s. 8.3). Die Substitution des Aspartat-130 in tHisF durch ein Glutamat führt zu einer gegenüber dem Wildtyp verlangsamten Komplementation, d. h. daß tHisF-D130E weniger aktiv ist als das Wildtyp-Enzym. Die Messung der Aktivität der gereinigten Variante tHisF-D130E *in vitro* zeigte, daß der $K_M{}^{5'\text{-PRFAR}}$ gegenüber dem Wildtyp-Enzym deutlich erhöht ist (30 µM vs. 1.7 µM) und der k_{cat}-Wert deutlich erniedrigt ($5*10^{-3}$ s^{-1} vs. 2.2 s^{-1}), so daß ein drastischer Abfall in der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M resultierte ($2*10^{-4}$ μM^{-1} s^{-1} vs. 0.6 μM^{-1} s^{-1}, s. Tab. 13). Analoge *in vivo*-Komplementationsexperimente mit Enzymen der Histidin- und Tryptophan-Biosynthese zeigten, daß k_{cat} und nicht K_M der selektierte Parameter war, da sich Substrat durch die Aktivität des vorangehenden Enzyms anhäufte (Merz et al., 2000; Jürgens et al., 2000). Da 5'-PRFAR extrem labil ist (Davisson et al., 1994), erscheint eine Akkumulation in ΔhisF-Zellen bei 37° C jedoch unwahrscheinlich. Dies würde bedeuten, daß eine gegenüber dem Wildtypenzym um den Faktor 10^3 erniedrigte katalytische Effizienz (Tab. 13) zur Komplementation des Δ*his*F–Stammes ausreicht.

5 Strukturelle Charakterisierung

5.1 Die Strukturen von tHisH und tHisF

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Bienzymkomplex tHisH:F gereinigt und Dr. Martina Walker (Arbeitsgruppe Dr. Matthias Wilmanns, EMBL Außenstation Hamburg) für Kristallisationsversuche zur Verfügung gestellt. Frau Dr. Walker gelang die die Kristallisation des Wildtypkomplexes und des katalytisch inaktiven Komplexes aus tHisH und tHisF-D11N. Vom Komplex tHisH:F-D11N konnte sie die Struktur in einer Auflösung von 2.4 Å durch molekularen Ersatz lösen, wobei isoliertes tHisF (Lang et al., 2000) als Suchstruktur diente (M. Walker, M. Wilmanns, unveröffentlichte Arbeiten). Im folgenden werden die Strukturen von tHisH und tHisF-D11N einzeln und im Komplex diskutiert, wobei Bezug auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen funktionellen Daten (4.4.2) genommen wird.

5.1.1 tHisH: „Triaden"-Glutamin-Amidotransferase-Faltung

Aufgrund der HisH-Glutaminase-Aktivität und der Sequenzähnlichkeit mit anderen GAT-Domänen wurde die ImGP-S der Klasse I der Glutamin-Amidotransferasen zugeordnet. Die Sequenzhomologie unter den Klasse-I-GAT-Domänen ist teilweise gering (18-45%, Zalkin, 1993), und auch die HisH-Sequenzen verschiedener Organismen ähneln einander zum Teil nur wenig. Neben tHisH sind derzeit weitere 22 HisH-Sequenzen bekannt, von denen das Homologe aus *Methanococcus jannaschii* (Archaeon; 40 % Identität, 59% Ähnlichkeit) die größte, das Homologe aus *Saccharomyces cerevisiae* (Eukaryot; 28 % Identität, 48 % Ähnlichkeit) die geringste Übereinstimmung mit tHisH aufweist.

Die Klasse-I-GAT-Domänen können anhand eines aus neun Aminosäure bestehenden „Fingerabdrucks" (s. 8.2) identifiziert werden. Sie weisen eine charakteristische Faltung auf, die gekennzeichnet ist durch ein gemischtes β-Faltblatt, das von α-Helices umgeben ist. Es können weitere β-Stränge außerhalb des Core-Faltblattes vorhanden sein. Charakteristisch ist eine katalytische Triade Cys-His-Glu, in der das Cystein in einem „nukleophilen Ellenbogen" (nucleophilic ellbow, Ollis et al., 1992), d. h. einem extrem engen Bogen (γ-like turn, Matthews, 1972) liegt.

Die kürzlich gelöste Struktur von tHisH (im Komplex mit tHisF, M. Walker, M. Wilmanns, unveröffentlichte Arbeit) beweist, daß die Zuordnung der tImGP-S zur „Triaden“-GATasen-Familie korrekt ist.

Die α/β-Hydrolase-Faltung (Ollis et al., 1992) ist der Faltung der GAT-Domänen der „Triaden“-GATasen sehr ähnlich. Auch dieser Faltungstyp ist gekennzeichnet durch ein zentrales, gemischtes β-Faltblatt, das von α-Helices umgeben wird, und durch eine katalytische Triade. Ein Unterschied zwischen diesen Familien besteht darin, daß in α/β-Hydrolase-Enzymen nur das Histidin der katalytischen Triade streng konserviert ist, während als Nukleophil Serin, Cystein oder Aspartat und als saurer Rest Aspartat oder Glutamat wirken können. In GATasen ist die Triade Cys-His-Glu streng konserviert (Zalkin & Smith, 1998). Auch die Reihenfolge der Reste in der katalytischen Triade (GATase: Cys-His-Glu, α/β-Hydrolase: (Cys/Ser/Asp)-(Asp/Glu)-His) sowie ihre topologische Position sind verschieden. Während der saure und der basische Rest in α/β-Hydrolasen in verschiedenen Loops liegen (Histidin: oft nach β7, saurer Rest: oft nach β8, Ollis et al., 1992), sind sie in den Glutaminasen der Klasse-I-GATasen auf dem selben Loop lokalisiert (Abbildung 5.1; Tesmer et al., 1996; Holden et al., 1998; Knöchel et al., 1999).

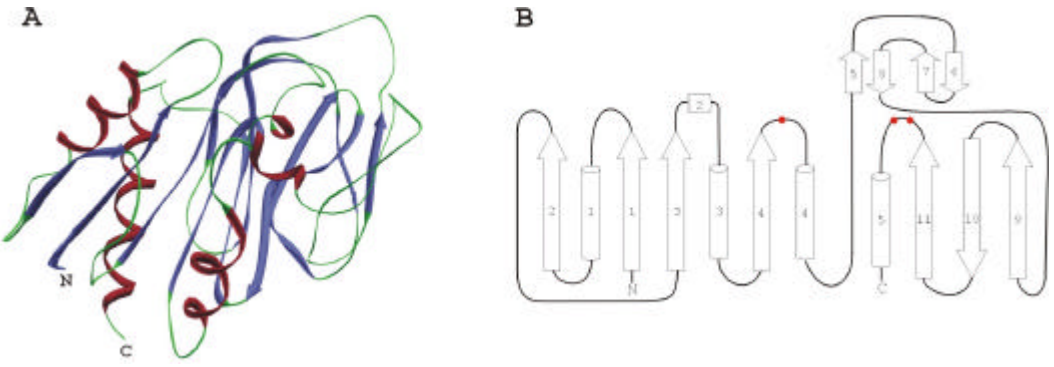


Abbildung 5.1: tHisH besitzt eine „Triaden“-GATasen-Faltung, in der das gemischte zentrale b-Faltblatt von a-Helices umgeben ist.

A: Röntgenstruktur von tHisH. Der N- und der C-Terminus sind gekennzeichnet (N, C)
B: Topologie von tHisH. β-Stränge sind durch Pfeile, α-Helices durch Zylinder dargestellt. Die Position der Reste der katalytischen Triade Cys-84, His-178 und Glu-180 sind durch rote Punkte markiert.

tHisH besitzt, ebenso wie die GMP-S aus *E. coli* (eGMP-S, Tesmer et al., 1996) und die AS aus *Sulfolobus solfataricus* (sAS, Knöchel et al., 1999) ein zentrales gemischtes β-Faltblatt aus sieben β-Strängen, bei der CP-S aus *E. coli* (eCP-S) besteht das zentrale β-Faltblatt dagegen aus 10 β-Strängen (Thoden et al., 1997). Zwei zweisträngige β-Faltblätter, bestehend aus β5+β8 bzw. β6+β7 liegen außerhalb des Core-Faltblattes von tHisH (Abbildung 5.1). Die Helices 1 und 5 liegen auf einer Seite des Faltblattes, die Helices 2-4 auf der anderen. Die Sequenzähnlichkeiten von tHisH zu den drei Klasse-I-GATasen, deren Struktur bekannt ist, sind in etwa gleich; die Identität beträgt jeweils 25-26%, die Ähnlichkeit 32-37%. Während sich jedoch die gesamte Glutaminase-Untereinheit von tHisH mit der von der sAS gut superpositionieren läßt (rmsd = 1.94 Å), gibt es zu den Glutaminase-Untereinheiten der eGMP-S und der eCP-S große Abweichungen, die in rmsd-Werten von 12.6 Å (tHisH-eGMP-S) bzw. 14.7 Å (tHisH-eCP-S) resultieren (Superpositionierung mit dem Programm SwissPdb Viewer, Glaxo Wellcome Research). Die zentralen β-Faltblätter liegen dabei gut übereinander, während die übrigen Strukturelemente nicht zur Deckung kommen.

Die räumliche Anordnung der katalytisch essentiellen Aminosäuren ist in den vier bekannten Strukturen von Klasse-I-GAT-Domänen gut konserviert, die Triaden Cys-His-Glu lassen sich mit geringem rmsd superpositionieren (Abb. 5.2). Das Cystein-84 in tHisH besitzt die „nicht erlaubte“ Hauptkettenkonformation (Φ = 54.4°, Ψ = -130.8°), die für den „nukleophilen“ Ellenbogen typisch ist.

Das aktive Zentrum der Glutaminase-Domäne liegt sowohl bei tHisH (s. Abb. 5.5, Abb. 5.8 A) als auch bei der eCP-S (Thoden et al., 1997), der sAS (Knöchel et al., 1999) und der eGMP-S (Tesmer et al., 1996) in der Nähe der Kontaktfläche mit der Synthase-Domäne.

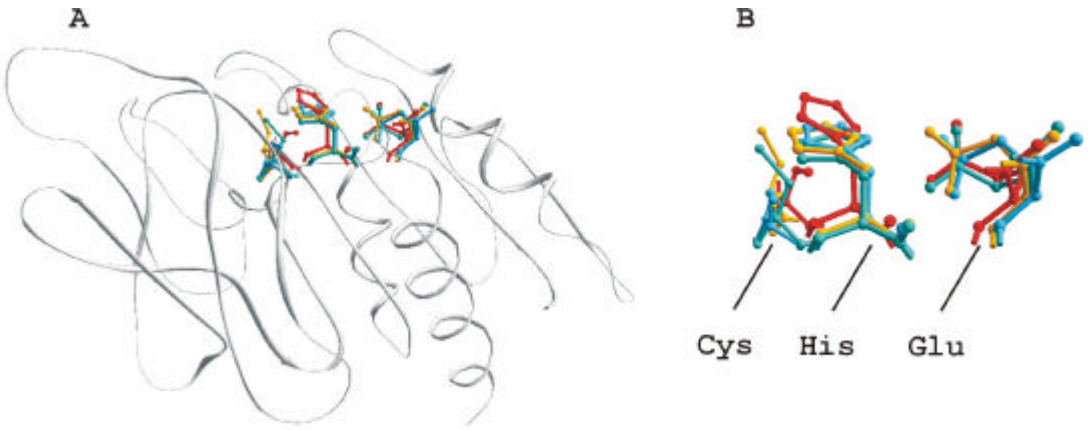


Abbildung 5.2: Die Reste der katalytischen Triade von vier „Triaden"-GATasen lassen sich gut superpositionieren.

A: Lage des aktiven Zentrums in tHisH
B: Detailansicht der superpositionierten Reste der katalytischen Triade (Cys-His-Glu)
Rot: tHisH
Grün: eCP-S (PDB entry 1A9X), rmsd = 0.31 Å
Orange: eGMP-S (PDB entry 1GPM), rmsd = 0.28 Å
Blau: sASII (PDB entry 1QDL), rmsd = 0.42 Å
Die rmsd-Werte wurden jeweils aus der Superpositionierung der genannten Struktur mit tHisH erhalten. Superpositionierungen angefertigt mit dem Programm SwissPdb Viewer, Glaxo Wellcome Research.

Das in der Hydrolyse gebildete transiente Oxyanion (s. 4.4.4.1) wird in „Triaden"-GATasen ebenso wie in α/β-Hydrolasen durch Wechselwirkungen mit den Hauptketten-Stickstoffatomen zweier bestimmter Aminosäuren stabilisiert. In Proteinen mit α/β-Hydrolase-Faltung stammen diese Stickstoffatome meist von der unmittelbar auf das Nukleophil folgenden Aminosäure sowie von einer Aminosäure im Loop zwischen β3 und α1 (Nardini and Dijkstra, 1999). In der eCP-S wird die Oxyanion-Tasche ebenfalls von der auf das katalytische Cystein folgenden Aminosäure (Leu-270) sowie von Gly-241 im Loop zwischen β3 und α3 gebildet (Thoden et al., 1998). Für tHisH liegt bislang keine Struktur mit gebundenem Substrat (-Analogon) vor, so daß die an der Stabilisierung des Oxyanions beteiligten Aminosäuren nicht bekannt sind.

5.1.2 tHisF: TIM-Barrel-Faltung

Die HisF-Sequenzen sind einander ähnlicher als die bekannten HisH-Sequenzen. Die größte Sequenzübereinstimmung zu tHisF besitzen die Homologen aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Bacterium) und *Archaeoglobus fulgidus* (Archaeon) mit jeweils 60 % Identität und 69 % Ähnlichkeit, die geringste Übereinstimmung besteht zum Homologen aus *Pseudomonas aeruginosa* (Bacterium, 37 % Identität, 46 % Ähnlichkeit).

Für tHisF wurde vor der Lösung der Röntgenstruktur eine „TIM"- oder „$(\beta/\alpha)_8$-Barrel"-Faltung vorhergesagt (Wilmanns & Eisenberg, 1993; Bork et al., 1995), die später bestätigt wurde (Lang et al., 2000). Neben dem Core aus acht parallelen β-Strängen und acht α-Helices besitzt tHisF zwei weitere zweisträngige, antiparallele β-Faltblätter (β1' und β1'', β5' und β5'') sowie die drei zusätzlichen Helices α4', α6' und α8', die den entsprechenden Core-Helices vorangehen (Abb. 5.3 A, B). Das zentrale β-Faß besitzt einen nahezu runden Querschnitt mit einem Durchmesser von 14 Å und eine Höhe von etwa 15 Å.

Die durch ortsspezifische Mutagenese identifizierten, katalytisch essentiellen Aminosäuren D11 und D130 sind am C-Terminus von β1 bzw. β5 lokalisiert. tHisF besitzt eine auffällige interne Symmetrie: auf Primär, Sekundär- und Tertiärstrukturebene lassen sich die N-terminale und die C-terminale Hälfte (β1-α4 und β5-α8) gut superpositionieren, wobei D11 und D130 direkt übereinander liegen (Höcker, 1999; Lang et al., 2000). In tHisA befinden sich an den äquivalenten Positionen die konservierten, katalytisch essentiellen Aminosäuren D8 (Schmidt, 1999) und D127 (M. Henn-Sax, persönliche Mitteilung). Aufgrund der Sequenzhomologie der HisF-Hälften, ebenso wie der entsprechenden HisA-Hälften, postulierten Fani et al. (1994) die Evolution der *his*A- und *his*F-Gene aus einem gemeinsamen Vorläufergen halber Länge durch Genduplikation und Diversifikation. Der durch Lösung der tHisA- und tHisF-Strukturen ermöglichte Vergleich auf Sekundär- und Tertiärstrukturebene sowie die Superpositionierung katalytisch essentieller Reste stützen dieses Evolutionsmodell (Lang et al., 2000; Höcker et al., 2001).

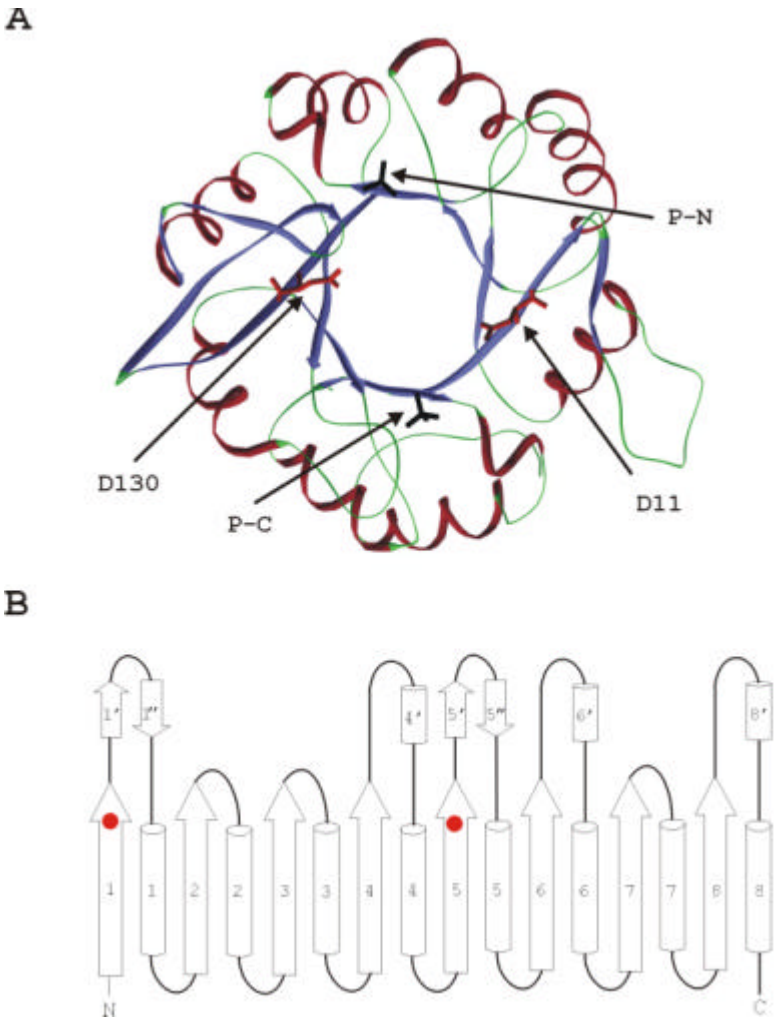


Abbildung 5.3: tHisF ist ein $(b/a)_8$-Barrel mit zusätzlichen Sekundärstrukturelemente außerhalb des Protein-Core.

A: Aufblick auf das tHisF-Faß. Die katalytisch essentiellen Aminosäuren D11 und D130 sowie die beiden gebundenen Phosphate sind in der N-terminalen (P-N) und in der C-terminalen (P-C) Hälfte eingezeichnet (Lang et al., 2000).

B: Topologische Darstellung. β-Stränge sind durch Pfeile, α-Helices durch Zylinder dargestellt.

Die Positionen der als katalytisch essentiell identifizierten Aminosäuren D11 in β-Strang 1 und D130 in β-Strang 5 sind durch rote Punkte gekennzeichnet.

tHisF-PDB entry: 1THF.

In das Faß hinein ragen die Seitenketten von 16 Aminosäuren, von denen zwei basisch, zwei sauer, drei polar und neun unpolar sind (Tab. 24, Abb. 5.7).

Tabelle 20: In das zentrale β-Faß von tHisF ragen 16 Aminosäure-Seitenketten, die in vier Schichten angeordnet sind.

Schicht	Aminosäure	Lage	Typ	Konservierung
1	Cys-9	β1	unpolar	*
1	Gly-80	β3	unpolar	-
1	Ala-128	β5	unpolar	-
1	Ser-201	β7	polar	+
2	Ile-48	β2	unpolar	-
2	Ser-101	β4	polar	+
2	Leu-169	β6	unpolar	-
2	Leu-222	β8	unpolar	+
3	Ile-7	β1	unpolar	+
3	Thr-78	β3	polar	-
3	Val-126	β5	unpolar	*
3	Ile-199	β7	unpolar	+
4	Arg-5	β1	basisch	*
4	Glu-46	β2	sauer	*
4	Lys-99	β4	basisch	*
4	Glu-167	β6	sauer	+

*: vollständig konserviert
+: in mind. 22 von 25 HisF-Sequenzen konserviert
- : nicht konserviert

Innerhalb eines β-Stranges sind die Aminosäuren alternierend angeordnet, so daß eine Seitenkette auf das Faßinnere ausgerichtet ist, während die folgende nach außen zeigt. Diese sterisch günstige Anordnung liegt generell bei $(\beta/\alpha)_8$-Barrel-Proteinen vor (Lesk et al., 1989).

Die in das Faß ragenden Reste sind in vier Schichten zu je vier Aminosäuren angeordnet (Tab. 20, Abb. 5.7 B). Die am N-Terminus des Fasses gelegene Schicht 4 besteht aus zwei sauren und zwei basischen Aminosäuren, die Schichten 1-3 aus überwiegend hydrophoben Resten.

Die raumfüllende Ansicht von tHisF mit modelliertem 5'-PRFAR (M. Hennig, Roche, Basel, unveröffentlichte Daten) deutet darauf hin, daß die Substratbindungsstelle im nichtligandierten tHisF lösungsmittelzugänglich ist (Abb. 5.4).

Möglicherweise verschließt nach der Substratbindung einer der am C-terminalen Ende des Fasses gelegenen Loops die 5'-PRFAR-Tasche, so daß ein Angriff von anderen Nukleophilen als Ammoniak, z. B. aus dem Cytoplasma, verhindert wird.

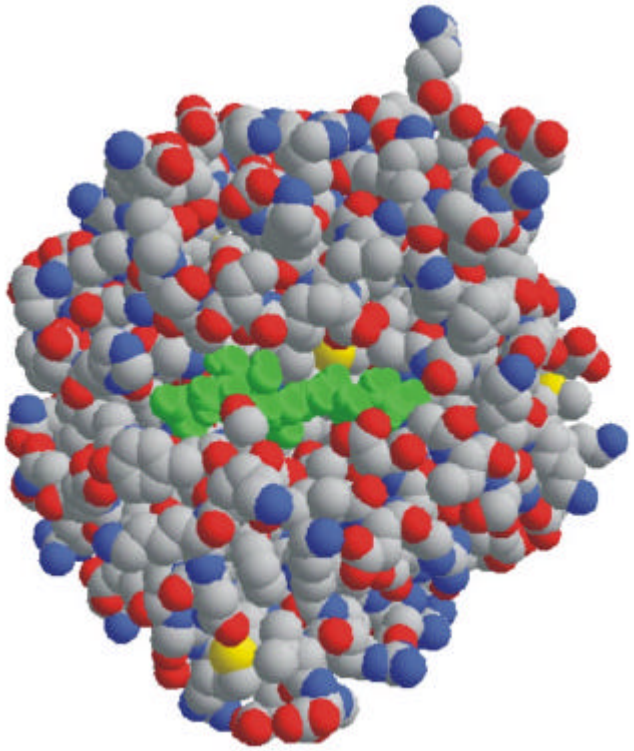


Abbildung 5.4: Die Substratbindungsstelle im nichtligandierten tHisF ist lösungsmittelzugänglich.

Aufblick auf nichtligandiertes tHisF, in das das Substrat 5'-PRFAR (grün) modelliert wurde (M. Hennig, unveröffentlichte Daten).

5.2 Die Kontaktfläche zwischen tHisH und tHisF

Allgemein wird angenommen, daß der hydrophobe Effekt die treibende Kraft der Proteinfaltung ist. Dennoch werden unpolare Aminosäuren bei der Faltung einer Polypeptidkette nicht immer optimal vom Lösungsmittel abgeschirmt. Hydrophobe Reste an der Oberfläche eines Proteins werden gehäuft an Stellen gefunden, an denen das Protein in Wechselwirkung mit einem anderen Protein treten kann, wodurch die „hydrophobe Wunde" verschlossen wird. Neben hydrophoben Resten treten an Protein-Protein-Kontaktflächen jedoch auch polare und geladene Aminosäuren auf. Diese häufig im Zentrum der Kontaktfläche liegenden Reste tragen deutlich mehr zur Bindungenergie bei (> 2 kcal/mol, Bogan & Thorn, 1998) als hydrophobe Aminosäuren und bilden daher sogenannte „hot spots" der Kontaktfläche.

Konservierte Reste in Proteinen haben meist eine wichtige Funktion. Diese kann zum Beispiel in der Katalyse, der Ligandenerkennung, der Enzymregulation oder aber der Bindung eines anderen Proteins liegen.

In HisF gibt es 26 total konservierte und weitere 33 stark konservierte Aminosäuren (s. 8.3). Untersuchungen an zahlreichen $(\beta\alpha)_8$-Barrel-Enzymen ergaben, daß das aktive Zentrum stets am C-Terminus des Fasses zu finden ist (Brändén & Tooze, 1991).

Die Loops am N-terminalen Ende des Fasses dagegen tragen zur Stabilität bei (Thoma et al., 2000). In tHisF wurden zwei konservierte Aminosäuren, D11 und D130, am C-Terminus des Fasses identifiziert, die katalytisch essentiell sind (s. 4.4.2). Viele konservierte Reste wurden jedoch auch am N-Terminus des Fasses gefunden, im Gegensatz zum evolutionär verwandten HisA. Die Vermutung lag daher nahe, daß der N-Terminus des tHisF-Fasses an der Komplexbildung mit tHisH beteiligt ist. Diese Vermutung wurde durch die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur des tHisH:F-Komplexes bestätigt (Abb. 5.5 A).

Im tHisH:F-Komplex befinden sich, wie erwartet, die N-terminalen Reste des tHisF-β-Fasses sowie die tHisH-Seite, die reich an konservierten Resten ist, an der intermolekularen Kontaktfläche.

Das aktive Zentrum von tHisH liegt in einer Spalte, die den Zugang des Glutamins erlaubt (Abb. 5.5 B). Hierin unterscheidet sich die tImGP-S von der Anthranilat-Synthase aus *S. solfataricus*, in der die Glutaminbindungsstelle im nichtligandierten Komplex geschlossen ist und wahrscheinlich erst nach Bindung des Synthase-Substrates Chorismat geöffnet wird (Knöchel et al., 1999).

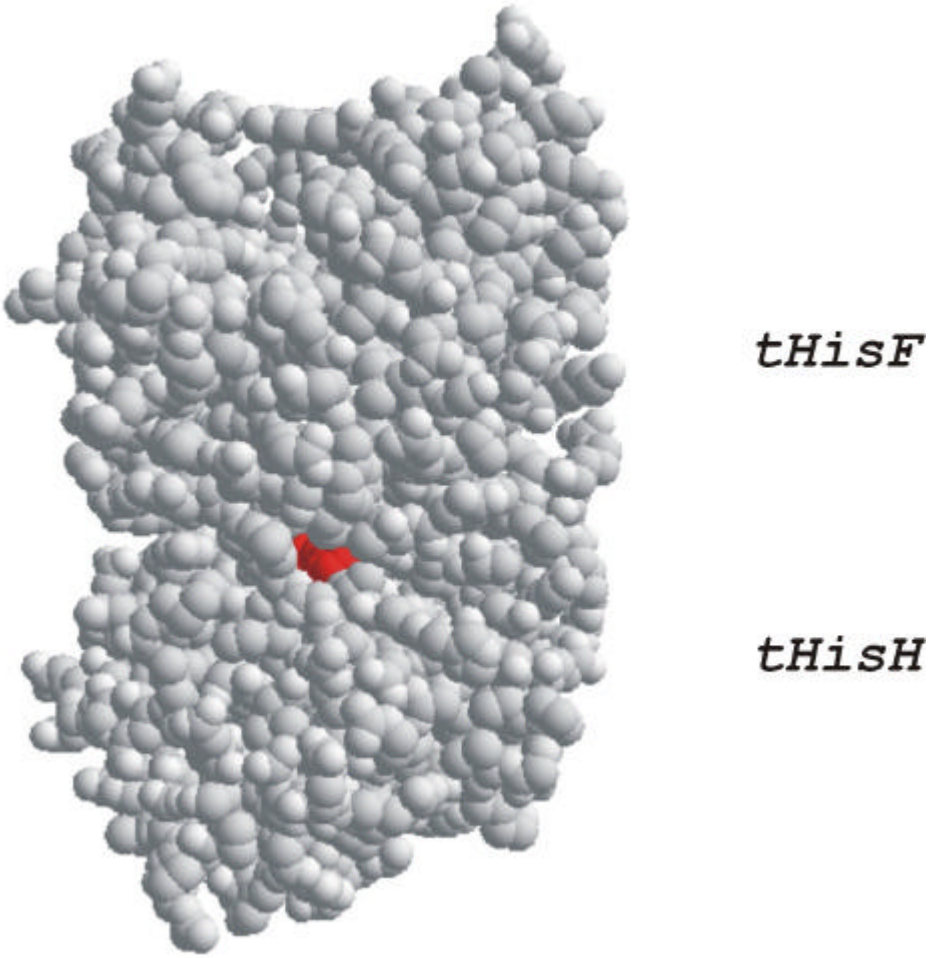


Abbildung 5.5: Das aktive Zentrum von tHisH ist im nichtligandierten tHisH:F-D11N lösungsmittelzugänglich.

Raumfüllendes Modell (SwissPdb Viewer), das aktive Zentrum von tHisH ist rot markiert .

Die an der Kontaktfläche lokalisierten Aminosäuren sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: An der Ausbildung der intermolekularen Kontaktfläche sind 22 Aminosäuren aus tHisF und 16 aus tHisH beteiligt.

tHisF			tHisH		
Aminosäure	Lage	Konservierung	Aminosäure	Lage	Konservierung
Met-1	vor β1	-	Arg-116	vor β6	-
Leu-2		-	Arg-117		-
Ala-3		-	His-120	β6	-
Lys-4		-	Met-121		+
Arg-5	β1	*	Gly-122		*
Asp-45	vor β2	*	Trp-123		*
Glu-46	β2	*	Asn-124		*
Ile-73	vor β3	-	Glu-125		-
Asp-74		-	Tyr-136	β7	-
Ile-75		-	Tyr-137		-
Pro-76	β3	*	Tyr-138		+
Asp-98	vor β4	+	Glu-157	β9	-
Lys-99	β4	*	Lys-181	vor α5	-
Gln-123	vor β5	*	Ser-182		-
Glu-167	β6	+	Ser-183		*
Pro-192	α6	-	Lys-184	α5	-
Thr-194	vor β7	-			
Asn-247	nach	-			
Arg-249	α8	+			
Leu-250		-			
Glu-251		-			
Gly-252		-			

* : vollständig konserviert

\+ : konserviert, max. 3 Abweichungen

-: nicht konserviert

Von den 22 an der intermolekularen Kontaktfläche lokalisierten tHisF-Aminosäuren sind sechs total konserviert und drei weitere streng konserviert. In tHisH sind vier der 17 Aminosäuren an der Kontaktfläche total konserviert, zwei weitere sind streng konserviert.

5.3 Substrat-Channeling in Glutamin-Amidotransferasen

In der Glutaminase-Reaktion der ImGP-S entsteht durch die Hydrolyse von Glutamin am aktiven Zentrum von HisH Ammoniak, der am aktiven Zentrum von HisF an 5'-PRFAR addiert wird. Aus der an der eImGP-S gemachten Beobachtung, daß die glutaminabhängige Aktivität ihr Optimum bei pH 7.5-8.0 aufweist, die ammoniumabhängige Reaktion dagegen bei pH 8.5, kann geschlossen werden, daß der in der glutaminabhängigen Reaktion produzierte Ammoniak nicht ins Lösungsmittel gelangt (Klem & Davisson, 1993).

Substrat-Channeling wurde für verschiedene Glutamin-Amidotransferasen als Mechanismus postuliert, um den der an der Glutaminase produzierte Ammoniak vor Protonierung durch das Lösungsmittel und damit den Verlust des Nukleophils zu schützen. Potentielle Ammoniak-Kanäle wurden in der Klasse-I-GATase CP-S (Thoden et al., 1997; Holden et al., 1998) sowie in den Klasse-II-GATasen GPAT (Krahn et al., 1997; Smith, 1998; Bera et al., 2000) und Asn-S (Larsen et al., 1999) nachgewiesen.

Die *E. coli*-CP-S wurde von allen GATasen diesbezüglich bislang am intensivsten untersucht. In diesem komplexen Enzym laufen vier Teilreaktionen an drei getrennten aktiven Zentren ab (Abb. 5.6).

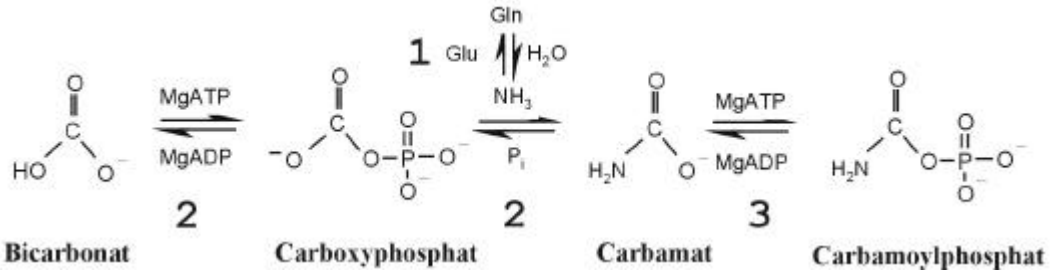


Abbildung 5.6: Die Carbamoylphosphat-Synthese erfolgt in der CP-S in vier Teilreaktionen an drei Reaktionszentren (1, 2, 3).

Das Zentrum 1 liegt in der α-Untereinheit, die Zentren 2 und 3 in der β-Untereinheit.

Die CP-S liegt als $(\alpha\beta)_4$-Tetramer vor (Thoden et al., 1997; Holden et al., 1998). Die kleinere α-Untereinheit besitzt eine N- und eine C-terminale Domäne, wobei die C-terminale Domäne eine Klasse-I-GAT-Domäne ist, während die N-terminale Domäne regulatorische Funktionen übernimmt.

Die Synthese von Carboxyphosphat aus Bicarbonat und ATP und die Synthese des Carbamats bzw. seine Phosphorylierung zum Carbamoylphosphat finden an den aktiven Zentren 2 und 3 in der β-Untereinheit statt (Abb. 5.6). In diesem Enzym wurde der längste bekannte Kanal nachgewiesen. Dieser zweiteilige Kanal besitzt eine Länge von 96 Å und verbindet die drei aktiven Zentren miteinander (Thoden et al., 1997; Thoden et al., 1998). Der Teil, der das aktive Zentrum der GAT-Domäne (1) mit dem aktiven Zentrum (2) verbindet, hat eine Länge von 45 Å. Dieser Ammoniak-Kanal ist überwiegend hydrophob, weist jedoch auch einige polare, eine saure und eine basische Aminosäure auf (Holden et al., 1998). Der Durchmesser des Kanals ist mit 3.2 Å für den Transport von Ammoniak ausreichend. Der zweite Teil des Kanals, durch den die beiden aktiven Zentren (2) und (3) der β-Untereinheit miteinander verbunden werden, dient wahrscheinlich dem Transport des labilen Carbamates. Dieser Kanal besitzt eine geringere Hydrophobizität, er enthält drei saure und zwei basische Aminosäuren.

Im Gegensatz zu dem Kanal der CP-S und der Asn-S ist der Kanal der GPAT eine transiente Struktur, die sich erst nach Bindung von PRPP an die Synthase-Domäne ausbildet. In der Röntgenstruktur der Klasse-I-GATasen GMP-S (Tesmer et al., 1996) und AS (Knöchel et al., 1999) sowie der Klasse-II-GATase Glm-S (Teplyakov et al., 1998) wurde kein Ammoniak-Kanal entdeckt. Für die Glm-S und die AS, die in Abwesenheit eines Synthase-Liganden kein Glutamin binden, wurde jedoch postuliert, daß sich - wie bei der GPAT - bei Substratbindung aufgrund von Konformationsänderungen ein Ammoniak-Kanal ausbilden könnte (Teplyakov et al., 1998; Knöchel et al., 1999).

Außer zum Transport von Ammoniak kann der Kanal auch an der Signaltransduktion zwischen den Domänen beteiligt sein. So wurde durch Mutationsanalyse in der GPAT festgestellt, daß konservierte Aminosäuren des Ammoniak-Kanals erheblichen Einfluß auf die Ausbildung der Glutamin-Bindungsstelle haben (Bera et al., 1999).

5.4 Gibt es einen Ammoniak-Kanal in der tImGP-S ?

Viele der das zentrale Faß von tHisF bildenden Reste sind konserviert, darunter alle der geladenen und zwei der drei polaren Aminosäuren (Tab. 21). Obwohl die hydrophoben Reste überwiegen, scheinen die hydrophilen somit eine wichtige Rolle zu spielen.

In einem anderen $(\beta/\alpha)_8$-Barrel-Enzym, der Spinat-Glycolat-Oxidase, wurde eine Kavität im Inneren des Fasses beschrieben, deren potentielle Funktion jedoch nicht diskutiert wurde (Lesk et al., 1989). Ein Blick auf das tHisF-β-Barrel zeigt dagegen zunächst keinen Kanal, durch den Ammoniak transportiert werden könnte (Abb. 5.7 C, D). Durch eine Bewegung der Seitenkette einer einzigen Aminosäure in Schicht 4, Lys-99, kann jedoch ein Kanal im Faßinneren mit einem minimalen Durchmesser von ca. 3.6 Å *in silicio* geschaffen werden (Abb. 5.7 E, F).

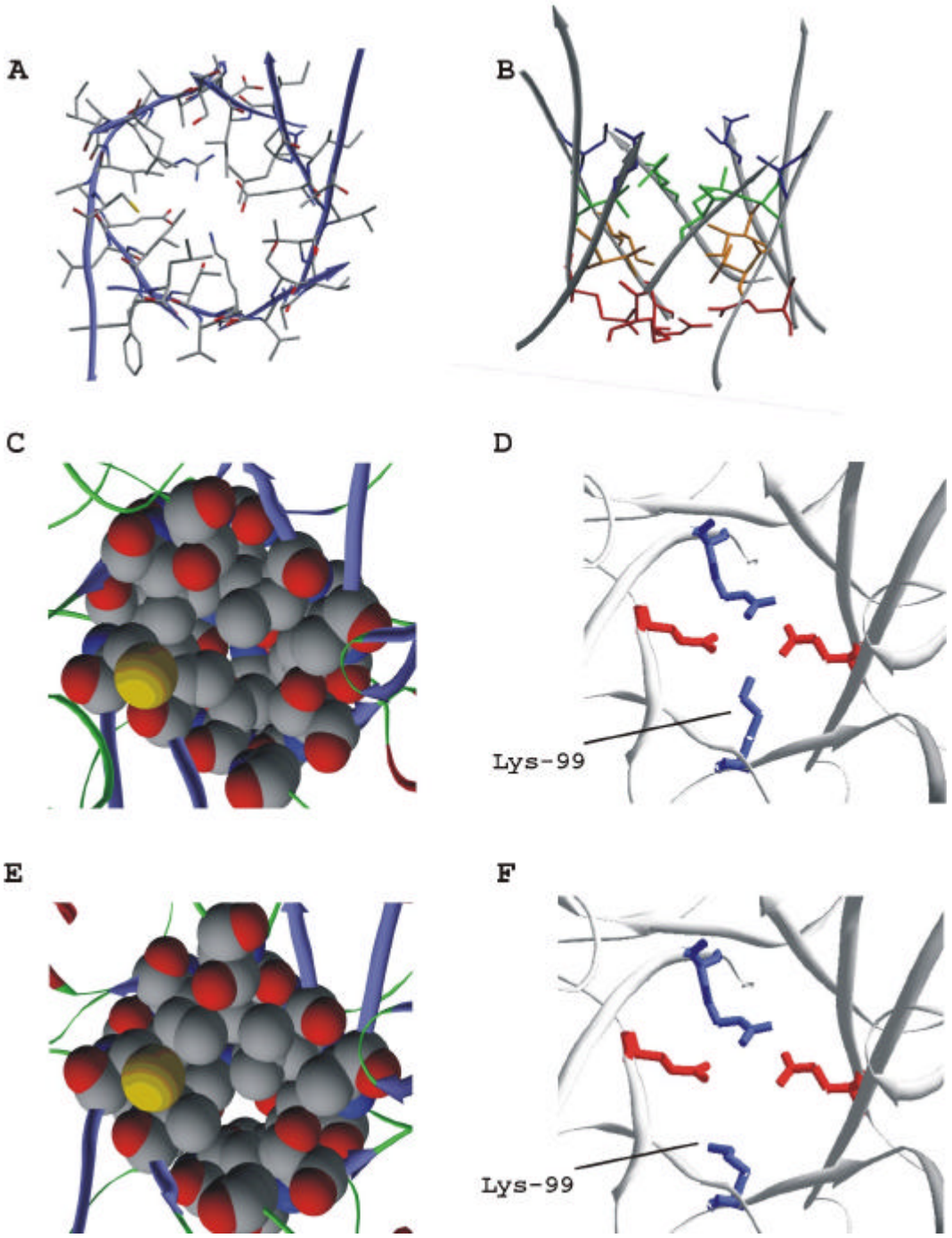


Abbildung 5.7: Durch Verdrehen der Seitenkette von Lys-99 *in silicio* entsteht in tHisF ein Kanal, durch den Ammoniak von tHisH zum aktiven Zentrum von tHisF transportiert werden könnte.

A: Fast alle Aminosäuren der zentralen β-Stränge sind an der Bildung des β-Fasses beteiligt.
B: Die Seitenketten der 16 in das Faß ragenden Aminosäuren sind in vier Lagen (s. farbige Markierung) angeordnet (vergl. Tab. 20).
C: Das β-Faß von tHisF ist geschlossen, ein Kanal ist nicht sichtbar.
D: Die Seitenketten von Arg-5, Glu-46, Lys-99 und Glu-167 (blau, basische Aminosäuren, rot, saure Aminosäure), die die Schicht 4 ausbilden (Tab. 20) verschließen das Faß. Wird die Seitenkette von Lys-99 *in silicio* gedreht (F), wird ein Kanal im Faß sichtbar (E).

Obwohl sich somit durch die Bewegung einer einzigen Seitenkette ein Kanal bilden könnte, stehen sich in tHisF an der Kontaktfläche zu tHisH je zwei positiv und zwei negativ geladene Aminosäuren gegen (Abbildung 5.8).

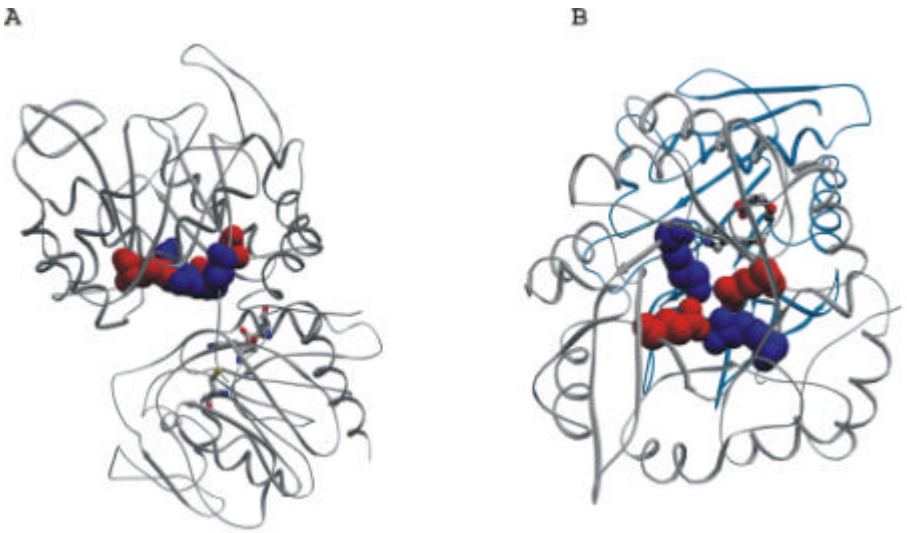


Abbildung 5.8: Der potentielle Ammoniak-Kanal wird am N-terminalen Ende des tHisF-Fasses von zwei sauren (Glu-46, Glu-167; rot) und zwei basischen (Arg-5, Lys-99; blau) Aminosäuren versperrt.

A: Seitenansicht des tHisH:F-Komplexes.
B: Aufsicht auf tHisF (grau) im tHisH:F-Komplex. tHisH ist blau dargestellt.
Die geladenen Aminosäuren am N-terminalen Ende des β-Fasses sind raumfüllend dargestellt.
Die katalytische Triade in tHisH ist in „ball-and-stick"-Form gezeigt.

Die basischen Aminosäuren Arg-5 und Lys-99 und die sauren Aminosäuren Glu-46 und Glu-167 stehen in naher Distanz zueinander, so daß sie ein Salzbrückennetzwerk bilden können (Tab. 26).

Tabelle 22: Potentielle intramolekulare Salzbrücken am N-terminalen Ende des tHisF-Fasses

Basische Aminosäure	Saure Aminosäure	N ···· O-Distanz (Å)
Arg-5	Glu-46	2.74
Arg-5	Glu-167	2.57, 2.89
Lys-99	Glu-46	3.19
Lys-99	Glu-167	2.68

In tHisH ist die Ausbildung eines Ammoniakkanals nicht notwendig, da das aktive Zentrum direkt an der Kontaktfläche zu tHisF liegt (Abbildung 5.8 A). Einem Channeling des Ammoniaks steht daher nur das Salzbrückennetzwerk am Eingang des postulierten Kanals entgegen. Möglicherweise wird durch Ligandenbindung eine Konformationsänderung induziert, die zur Auflösung des Netzwerkes führt und somit den Eingang des Kanals freigibt.

In Abbildung 5.9 sind die Koordination der Teilreaktionen und der postulierte Ammoniakkanal schematisch dargestellt.

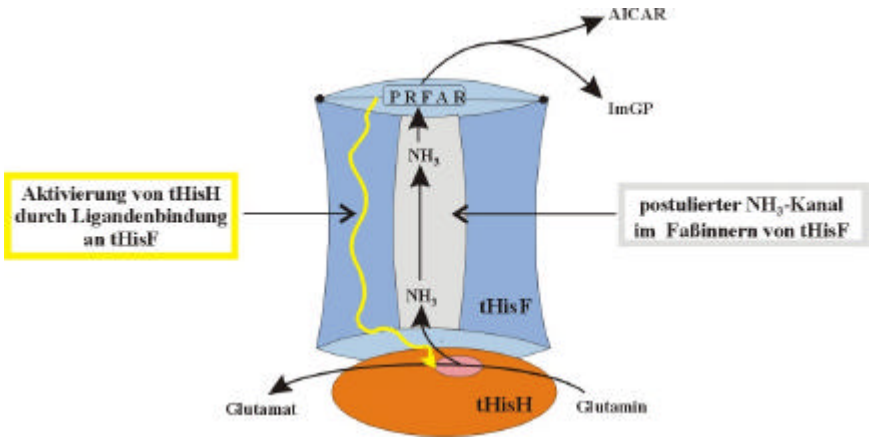


Abbildung 5.9: Modell der Koordination der tImGP-S-Teilreaktionen und des Ammoniaktransfers durch den postulierten Kanal im Faßinneren von tHisF.

Durch die Bindung eines Liganden (hier das Substrat 5'-PRFAR) an tHisF wird eine Konformationsänderung induziert, die zur Aktivierung von tHisH und zum Öffnen des Ammoniakkanals führt.

6 Ausblick

Zum Verständnis der Kommunikation zwischen tHisH und tHisF müssen kinetische Studien bei physiologischer Temperatur (ca. 80° C) durchgeführt werden. Die Messung der Glutaminase-Aktivität bei physiologischen Temperaturen kann zeigen, ob die Inaktivität von tHisH bei Raumtemperatur durch die Rigidität des Enzyms oder mechanistisch bedingt ist. Die erhaltenen Fließgleichgewichtskonstanten können mit den ebenfalls unter physiologischen Bedingungen ermittelten Parametern der mesophilen ImGP-S aus *E. coli* (Klem & Davisson, 1993) und *S. cerevisiae* (Chittur et al., 2000) verglichen und Hinweise auf die Erfordernisse der Katalyse bei hohen Temperaturen gewonnen werden.

In tHisA wurde die Aminosäure T164 durch Mutationsanalyse als ein katalytisch essentieller Rest identifiziert (Schmidt, 1999). Analog dazu soll die Rolle des entsprechenden Restes in tHisF, T171, untersucht werden.

Die Bindungskonstante von tHisF und tHisH bei der Bildung des Bienzymkomplexes kann mit Hilfe von isothermischer Kolorimetrie bestimmt werden. Ferner sollen weitere Untersuchungen zur Kommunikation zwischen tHisH und tHisF vorgenommen werden. Dazu könnten gezielt Aminosäuren an der tHisH:F-Kontaktfläche ausgetauscht werden, um den individuellen Beitrag einzelner Aminosäuren zu testen.

Es wird zu Zeit an Röntgenstrukturen der tImGP-S mit gebundenen tHisH- und tHisF-Liganden gearbeitet (M. Walker, M. Wilmanns, persönliche Mitteilung). Durch Vergleich mit der nichtligandierten Form können Rückschlüsse auf die durch die Ligandenbindung erfolgenden Konformationsänderungen und damit auf die Signaltransduktion zwischen tHisH und tHisF gezogen werden. Ferner können ligandierte tHisH:F-Komplexstrukturen zeigen, ob sich durch Ligandenbindung der Kanal in tHisF durch Aufbrechen des Salzbrücken-Clusters öffnet, wodurch die postulierte Funktion als Ammoniaktransportweg gestützt werden würde. Der gezielte Austausch einzelner Aminosäuren des Salzbrücken-Clusters kann ebenfalls zur Aufklärung der Rolle dieses Salzbrücken-Clusters beitragen.

Weiterhin muß die *in vivo*-Funktion des Kanals durch das tHisF-Faß untersucht werden und festgestellt werden, ob es sich um einen Ammoniakkanal, wie er für andere GATasen postuliert wird, handelt. Dazu können analog zu Versuchen an der Carbamolyphosphat-Synthetase aus *E. coli* (Huang & Raushel, 2000a;b) Aminosäuren des tHisF-Kanals durch voluminösere Aminosäuren ersetzt werden, so daß ein partieller oder vollständiger Verschluß des Kanals erzielt wird.

7 Literaturverzeichnis

Ames, B. N. & Garry, B. J. (1959). Coordinate repression of the synthesis of histidine biosynthetic enzymes by histidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **45**, 1453-1461.

Ames, B. N., Garry, B. J. and Herzenberg, L. A. (1960). The genetic control of the enzymes of histidine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol* **22**, 369-378.

Ames, B. N., Martin, R. G. and Garry, B. J. (1961). The first step of histidine biosynthesis. *The Journal of Biologcal Chemistry* **236**, 2019-2026.

Amuro, N., Paluh, J. L. and Zalkin, H. (1985). Replacement by site-directed mutagenesis indicates a role for histidine 170 in the glutamine amide transfer function of anthranilate synthase. *J Biol Chem* **260**, 14844-9.

Anderson, K. S. (1999). Fundamental mechanisms of substrate channeling. *Methods Enzymol* **308**, 111-45.

Badet-Denisot, M. A., Fernandez-Herrero, L. A., Berenguer, J., Ooi, T. and Badet, B. (1997). Characterization of L-glutamine:D-fructose-6-phosphate amidotransferase from an extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *Arch Biochem Biophys* **337**, 129-36.

Badet-Denisot, M. A., René, L. and Badet, B. (1993). Mechanistic investigations on glucosamine-6-phosphate synthase. *Bull. Soc. Chem. Fr.* **130**, 249-255.

Beckler, G. S. & Reeve, J. N. (1986). Conservation of primary structure in the hisI gene of the archaebacterium, *Methanococcus vannielii*, the eubacterium Escherichia coli, and the eucaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **204**, 133-40.

Bender, M. L., Kézdy, F. J. and Gunter, C. R. (1964). The Anatomy of an enzyme catalysis: α-Chymotrypsin. *J Am Chem Soc* **86**, 3714.

Bera, A. K., Chen, S., Smith, J. L. and Zalkin, H. (1999). Interdomain signaling in glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. *J Biol Chem* **274**, 36498-504.

Bera, A. K., Chen, S., Smith, J. L. and Zalkin, H. (2000a). Temperature-dependent function of the glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase ammonia channel and coupling with glycinamide ribonucleotide synthetase in a hyperthermophile. *J Bacteriol* **182**, 3734-9.

Bera, A. K., Smith, J. L. and Zalkin, H. (2000b). Dual role for the glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase ammonia channel. Interdomain signaling and intermediate channeling. *J Biol Chem* **275**, 7975-9.

Blasi, F., Aloj, S. M. and Goldberger, R. F. (1971). Effect of histidine on the enzyme which catalyzes the first step of histidine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* **10**, 1409-17.

Bogan, A. A.&Thorn, K. S. (1998). Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol* **280**, 1-9.

Bork, P., Gellerich, J., Groth, H., Hooft, R. and Martin, F. (1995). Divergent evolution of a beta/alpha-barrel subclass: detection of numerous phosphate-binding sites by motif search. *Protein Sci* **4**, 268-74.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.

Brändén, C.&Tooze, J. (1991). Introduction to protein structure. New York: Garland Publishing Inc.

Brannigan, J. A., Dodson, G., Duggleby, H. J., Moody, P. C., Smith, J. L., Tomchick, D. R. and Murzin, A. G. (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* **378**, 416-9.

Brenner, M. & Ames, B. N. (1971). The histidine operon and its regulation. In *Metabolic pathways*, vol. 5 (ed. H. J. Vogel). New York: Academic Press Inc.

Buchanan, J. M. (1973). The amidotransferases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **39**, 91-183.

Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I., Haeuptle, M. T. and Dobberstein, B. (1987). A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vitro* and *in vivo*. *Methods Enzymol* **155**, 416-33.

Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D. et al. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273, 1058-73.

Carlomagno, M. S., Chiariotti, L., Alifano, P., Nappo, A. G. and Bruni, C. B. (1988). Structure and function of the *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* K-12 histidine operons. *J Mol Biol* **203**, 585-606.

Chaparian, M. G.&Evans, D. R. (1991). The catalytic mechanism of the amidotransferase domain of the Syrian hamster multifunctional protein CAD. Evidence for a CAD-glutamyl covalent intermediate in the formation of carbamyl phosphate. *J Biol Chem* **266**, 3387-95.

Charlebois, R. L., Sensen, C. W., Doolittle, W. F. and Brown, J. R. (1997). Evolutionary analysis of the hisCGABdFDEHI gene cluster from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *J Bacteriol* **179**, 4429-32.

Chester, N. & Marshak, D. R. (1993). Dimethyl sulfoxide-mediated primer Tm reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **209**, 284-90.

Chittur, S. V., Chen, Y. and Davisson, V. J. (2000). Expression and purification of imidazole glycerol phosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* **18**, 366-77.

Cornish-Bowden, A.&Eisenthal, R. (1974). Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods. *Biochem J* **139**, 721-30.

Darimont, B., Stehlin, C., Szadkowski, H. and Kirschner, K. (1998). Mutational analysis of the active site of indoleglycerol phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Protein Sci* **7**, 1221-32.

Davisson, V. J., Deras, I. L., Hamilton, S. E. and Moore, L. L. (1994). A plasmid-based approach for the synthesis of a histidine biosynthetic intermediate. *J Org Chem* **59**, 137-143.

Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-45.

Durbecq, V., Legrain, C., Roovers, M., Pierard, A. and Glansdorff, N. (1997). The carbamate kinase-like carbamoyl phosphate synthetase of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*, a missing link in the evolution of carbamoyl phosphate biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12803-8.

Eberhard, M. (1990). A set of programs for analysis of kinetic and equilibrium data. *Comput Appl Biosci* **6**, 213-21.

Eisenthal, R. & Cornish-Bowden, A. (1974). The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem J* **139**, 715-20.

Englard, S. & Seifter, S. (1990). Precipitation techniques. *Methods Enzymol* **182**, 285-300.

Fani, R., Lio, P., Chiarelli, I. and Bazzicalupo, M. (1994). The evolution of the histidine biosynthetic genes in prokaryotes: a common ancestor for the hisA and hisF genes. *J Mol Evol* **38**, 489-95.

Fani, R., Lio, P. and Lazcano, A. (1995). Molecular evolution of the histidine biosynthetic pathway. *J Mol Evol* **41**, 760-74.

Fisher, H. F. (1985). L-Glutamate dehydrogenase from bovine liver. *Methods Enzymol* **113**, 16-27.

Garavito, R. M., Rossmann, M. G., Argos, P. and Eventoff, W. (1977). Convergence of active center geometries. *Biochemistry* **16**, 5065-71.

Geck, M. K.&Kirsch, J. F. (1999). A novel, definitive test for substrate channeling illustrated with the aspartate aminotransferase/malate dehydrogenase system. *Biochemistry* **38**, 8032-7.

Goldschmidt, E. P., Cater, M. S., Matney, T. S., Butler, M. A. and Greene, A. (1970). Genetic analysis of the histidine operon in *Escherichia coli* K12. *Genetics* **66**, 219-29.

Gorbunoff, M. J. (1985). Protein chromatography on hydroxyapatite columns. *Methods Enzymol* **117**, 370-80.

Guillou, F., Liao, M., Garcia-Espana, A. and Lusty, C. J. (1992). Mutational analysis of carbamyl phosphate synthetase. Substitution of Glu841 leads to loss of functional coupling between the two catalytic domains of the synthetase subunit. *Biochemistry* **31**, 1656-64.

Haas, F., Mitchell, M. B., Ames, B. N. and Mitchell, H. K. (1952). A series of histidineless mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* **37**, 217-226.

Hewagama, A., Guy, H. I., Vickrey, J. F. and Evans, D. R. (1999). Functional linkage between the glutaminase and synthetase domains of carbamoyl-phosphate synthetase. Role of serine 44 in carbamoyl- phosphate synthetase-aspartate carbamoyltransferase-dihydroorotase (cad). *J Biol Chem* **274**, 28240-5.

Höcker, B. (1999). Untersuchungen zur Evolution des (β/α)8-Barrel Enzyms HisF aus *Thermotoga maritima.* Diplomarbeit in der Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen.

Höcker, B., Beismann-Driemeyer, S., Hettwer, S., Lustig, A. and Sterner, R. (2001). Dissection of a $(\beta/\alpha)_8$-barrel enzyme into two folded halves. *Nat Struct Biol* **8**(1), 32-36.

Holden, H. M., Thoden, J. B. and Raushel, F. M. (1998). Carbamoyl phosphate synthetase: a tunnel runs through it. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 679-85.

Huang, X. & Raushel, F. M. (2000a). An engineered blockage within the ammonia tunnel of carbamoyl phosphate synthetase prevents the use of glutamine as a substrate but not ammonia. *Biochemistry* **39**, 3240-7.

Huang, X. & Raushel, F. M. (2000b). Restricted Passage of Reaction Intermediates through the Ammonia Tunnel of Carbamoyl Phosphate Synthetase. *J Biol Chem* **275**, 26233-26240.

Hubbard, S. J., Beynon, R. B. and Thornton, J. M. (1998). Assessment of conformational parameters as predictors of limited proteolytic sites in native protein structures. *Prot Engineering* **11**, 349-359.

Hubbard, S. J. (1998). The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim Biophys Acta* **1382**, 191-206.

Hyde, C. C., Ahmed, S. A., Padlan, E. A., Miles, E. W. and Davies, D. R. (1988). Three-dimensional structure of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 multienzyme complex from Salmonella typhimurium. *J Biol Chem* **263**, 17857-71.

Hyde, C. C. & Miles, E. W. (1990). The tryptophan synthase multienzyme complex: exploring structure- function relationships with X-ray crystallography and mutagenesis. *Biotechnology (N Y)* **8**, 27-32.

Igeno, M. I., Calberro, F. J. and Castillo, F. (1993). Molecular and kinetic characterization of glutamate synthase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2921-2929.

Isupov, M. N., Obmolova, G., Butterworth, S., Badet-Denisot, M. A., Badet, B., Polikarpov, I., Littlechild, J. A. and Teplyakov, A. (1996). Substrate binding is required for assembly of the active conformation of the catalytic site in Ntn amidotransferases: evidence from the 1.8 A crystal structure of the glutaminase domain of glucosamine 6-phosphate synthase. *Structure* 4, 801-10.

Jaenicke, R. & Böhm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Current opinion in structural biology* **8**, 738-748.

Jahn, D., Kim, Y. C., Ishino, Y., Chen, M. W. and Soll, D. (1990). Purification and functional characterization of the Glu-tRNA(Gln) amidotransferase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **265**, 8059-64.

Jürgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M. and Sterner, R. (2000). Directed evolution of a (beta alpha)8-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9925-30.

Kasai, T. (1974). Regulation of the expression of the histidine operon in *Salmonella typhimurium*. *Nature* **249**, 523-7.

Klem, T. J. & Davisson, V. J. (1993). Imidazole glycerol phosphate synthase: the glutamine amidotransferase in histidine biosynthesis. *Biochemistry* **32**, 5177-86.

Knighton, D. R., Kan, C. C., Howland, E., Janson, C. A., Hostomska, Z., Welsh, K. M. and Matthews, D. A. (1994). Structure of and kinetic channelling in bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. *Nat Struct Biol* **1**, 186-94.

Knöchel, T., Ivens, A., Hester, G., Gonzalez, A., Bauerle, R., Wilmanns, M., Kirschner, K. and Jansonius, J. N. (1999). The crystal structure of anthranilate synthase from *Sulfolobus solfataricus*: functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9479-84.

Kovach, J. S., Berberich, M. A., Venetianer, P. and Goldberger, R. F. (1969). Repression of the histidine operon: effect of the first enzyme on the kinetics of repression. *J Bacteriol* **97**, 1283-90.

Krahn, J. M., Kim, J. H., Burns, M. R., Parry, R. J., Zalkin, H. and Smith, J. L. (1997). Coupled formation of an amidotransferase interdomain ammonia channel and a phosphoribosyltransferase active site. *Biochemistry* **36**, 11061-8.

Kuenzler, M., Balmelli, T., Egli, C. M., Paravicini, G. and Braus, G. H. (1993). Cloning, primary structure, and regulation of the HIS7 gene encoding a bifunctional glutamine amidotransferase: cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **175**, 5548-58.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.

Lang, D., Thoma, R., Henn-Sax, M., Sterner, R. and Wilmanns, M. (2000). Structural evidence for evolution of the beta/alpha barrel scaffold by gene duplication and fusion. *Science* **289**, 1546-50.

Larsen, T. M., Boehlein, S. K., Schuster, S. M., Richards, N. G., Thoden, J. B., Holden, H. M. and Rayment, I. (1999). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* asparagine synthetase B: a short journey from substrate to product. *Biochemistry* **38**, 16146-57.

Lazcano, A., Fox, G. E. and Otó, J. (1992). Life before DNA: the origin and evolution of early archaeal cells. Booca Raton: CRC Press.

Le Gouill, C., Parent, J.-L., Rola-Pleszczynski, M. and Stankova, J. (1994). Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal Biochem* **219**, 164.

Lesk, A. M., Brändén, C. I. and Chothia, C. (1989). Structural principles of alpha/beta barrel proteins: the packing of the interior of the sheet. *Proteins* **5**, 139-48.

Liang, P. H. & Anderson, K. S. (1998). Substrate channeling and domain-domain interactions in bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase. *Biochemistry* **37**, 12195-205.

Lusty, C. J. & Liao, M. (1993). Substitution of Glu841 by lysine in the carbamate domain of carbamyl phosphate synthetase alters the catalytic properties of the glutaminase subunit. *Biochemistry* **32**, 1278-84.

Mantsala, P. & Zalkin, H. (1984). Glutamine amidotransferase function. Replacement of the active-site cysteine in glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **259**, 14230-6.

Mareya, S. M. & Raushel, F. M. (1994). A molecular wedge for triggering the amidotransferase activity of carbamoyl phosphate synthetase. *Biochemistry* **33**, 2945-50.

Markley, J. L. & Porubcan, M. A. (1976). The charge-relay system of serine proteinases: proton magnetic resonance titration studies of the four histidines of porcine trypsin. *J Mol Biol* **102**, 487-509.

Martin, R. G., Berberich, M. A., Ames, B. N., Davis, W. W., Goldberger, R. F. and Yourno, J. D. (1971). Enzymes and intermediates of histidine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *Methods in Enzymology* **17B**, 3-44.

Massière, F. & Badet-Denisot, M. A. (1998). The mechanism of glutamine-dependent amidotransferases. *Cell Mol Life Sci* **54**, 205-222.

Matthews, D. A. (1972). The γ turn: Evidence for a new folded conformation in proteins. *Macromolecules* **5**, 818-819.

Meister, A. (1989). Mechanism and regulation of the glutamine-dependent carbamyl phosphate synthetase of *Escherichia coli*. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **62**, 315-74.

Merz, A., Yee, M. C., Szadkowski, H., Pappenberger, G., Crameri, A., Stemmer, W. P., Yanofsky, C. and Kirschner, K. (2000). Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures. *Biochemistry* 39, 880-9.

Miles, B. W., Banzon, J. A. and Raushel, F. M. (1998). Regulatory control of the amidotransferase domain of carbamoyl phosphate synthetase. *Biochemistry* **37**, 16773-9.

Miles, B. W. & Raushel, F. M. (2000). Synchronization of the three reaction centers within carbamoyl phosphate synthetase. *Biochemistry* **39**, 5051-6.

Miles, E. W. (1991). Structural basis for catalysis by tryptophan synthase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **64**, 93-172.

Miles, E. W., Rhee, S. and Davies, D. R. (1999). The molecular basis of substrate channeling. *J Biol Chem* **274**, 12193-6.

Morgunov, I. & Srere, P. A. (1998). Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase. Substrate channeling of oxaloacetate. *J Biol Chem* **273**, 29540-4.

Muchmore, C. R., Krahn, J. M., Kim, J. H., Zalkin, H. and Smith, J. L. (1998). Crystal structure of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from *Escherichia coli*. *Protein Sci* **7**, 39-51.

Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.

Najmanovich, R., Kuttner, J., Sobolev, V. and Edelman, M. (2000). Side-chain flexibility in proteins upon ligand binding. *Proteins* **39**, 261-8.

Nardini, M. & Dijkstra, B. W. (1999). Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 732-7.

Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A. et al. (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399, 323-9.

Nyunoya, H. & Lusty, C. J. (1983). The carB gene of *Escherichia coli*: a duplicated gene coding for the large subunit of carbamoyl-phosphate synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4629-33.

Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J. et al. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* 5, 197-211.

Ovadi, J. (1991). Physiological significance of metabolic channelling. *J Theor Biol* **152**, 1-22.

Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**, 2411-23.

Purcarea, C., Evans, D. R. and Herve, G. (1999). Channeling of carbamoyl phosphate to the pyrimidine and arginine biosynthetic pathways in the deep sea hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *J Biol Chem* **274**, 6122-9.

Purcarea, C., Simon, V., Prieur, D. and Herve, G. (1996). Purification and characterization of carbamoyl-phosphate synthetase from the deep-sea hyperthermophilic archaebacterium *Pyrococcus abyssi*. *Eur J Biochem* **236**, 189-99.

Robillard, G. & Shulman, R. G. (1974). High resolution nuclear magnetic resonance studies of the active site of chymotrypsin. I. The hydrogen bonded protons of the "charge relay" system. *J Mol Biol* **86**, 519-40.

Rossomando, E. F. (1990). Ion-exchange chromatography. *Methods Enzymol* **182**, 309-17.

Rost, B. (1996). PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol* **266**, 525-39.

Rost, B. & Sander, C. (1993). Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7558-62.

Rubino, S. D., Nyunoya, H. and Lusty, C. J. (1986). Catalytic domains of carbamyl phosphate synthetase. Glutamine- hydrolyzing site of *Escherichia coli* carbamyl phosphate synthetase. *J Biol Chem* **261**, 11320-7.

Rubino, S. D., Nyunoya, H. and Lusty, C. J. (1987). In vivo synthesis of carbamyl phosphate from NH3 by the large subunit of *Escherichia coli* carbamyl phosphate synthetase. *J Biol Chem* **262**, 4382-6.

Rudolph, J. & Stubbe, J. (1995). Investigation of the mechanism of phosphoribosylamine transfer from glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase to glycinamide ribonucleotide synthetase. *Biochemistry* **34**, 2241-50.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.

Sambrook, J., Fritsch, E. E. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbour.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.

Sarkar, G. & Sommer, S. S. (1990). The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* **8**, 404-7.

Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79.

Schendel, F. J., Mueller, E., Stubbe, J., Shiau, A. and Smith, J. M. (1989). Formylglycinamide ribonucleotide synthetase from Escherichia coli: cloning, sequencing, overproduction, isolation, and characterization. *Biochemistry* **28**, 2459-71.

Schmid, F. X. (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Protein structure: A practical approach*., (ed. T. E. Creighton), pp. 259-295. Oxford: IRL Press.

Schmidt, S. (1999). Die Identifizierung von katalytisch essentiellen Aminosäuren der 5'-ProFAR-Isomerase aus *Thermotoga maritima.* Diplomarbeit in der Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen.

Schneider, W. P., Nichols, B. P. and Yanofsky, C. (1981). Procedure for production of hybrid genes and proteins and its use in assessing significance of amino acid differences in homologous tryptophan synthetase alpha polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 2169-73.

Sears, L. E., Moran, L. S., Kissinger, C., Creasey, T., Perry-O'Keefe, H., Roskey, M., Sutherland, E. and Slatko, B. E. (1992). CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques* **13**, 626-33.

Slatko, B. E. (1994). Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Methods Mol Biol* **31**, 35-45.

Smith, D. E. & Ames, B. N. (1964). Intermediates in the early steps of histidine biosynthesis. *J Biol Chem* **239**, 1848-1855.

Smith, J. L. (1995). Structures of glutamine amidotransferases from the purine biosynthetic pathway. *Biochem Soc Trans* **23**, 894-8.

Smith, J. L. (1998). Glutamine PRPP amidotransferase: snapshots of an enzyme in action. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 686-94.

Srere, P. A. (1987). Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu Rev Biochem* **56**, 89-124.

Stüber, D., Matile, H. and Garotta, G. (1990). System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. Orlando: Academic Press.

Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-30.

Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. and Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.

Teplyakov, A., Obmolova, G., Badet-Denisot, M. A., Badet, B. and Polikarpov, I. (1998). Involvement of the C terminus in intramolecular nitrogen channeling in glucosamine 6-phosphate synthase: evidence from a 1.6 A crystal structure of the isomerase domain. *Structure* **6**, 1047-55.

Tesmer, J. J., Klem, T. J., Deras, M. L., Davisson, V. J. and Smith, J. L. (1996). The crystal structure of GMP synthetase reveals a novel catalytic triad and is a structural paradigm for two enzyme families. *Nat Struct Biol* **3**, 74-86.

Thoden, J. B., Holden, H. M., Wesenberg, G., Raushel, F. M. and Rayment, I. (1997). Structure of carbamoyl phosphate synthetase: a journey of 96 A from substrate to product. *Biochemistry* **36**, 6305-16.

Thoden, J. B., Huang, X., Raushel, F. M. and Holden, H. M. (1999a). The small subunit of carbamoyl phosphate synthetase: snapshots along the reaction pathway. *Biochemistry* **38**, 16158-66.

Thoden, J. B., Miran, S. G., Phillips, J. C., Howard, A. J., Raushel, F. M. and Holden, H. M. (1998). Carbamoyl phosphate synthetase: caught in the act of glutamine hydrolysis. *Biochemistry* **37**, 8825-31.

Thoden, J. B., Wesenberg, G., Raushel, F. M. and Holden, H. M. (1999b). Carbamoyl phosphate synthetase: closure of the B-domain as a result of nucleotide binding. *Biochemistry* **38**, 2347-57.

Thoma, R. (1998). The isomerases of the histidine and the tryptophan biosynthetic pathway from the hyperthermophilic organism *Thermotoga maritima.* Inauguraldissertation in the department of Biophysical Chemistry, University of Basel.

Thoma, R., Hennig, M., Sterner, R. and Kirschner, K. (2000). Structure and function of mutationally generated monomers of dimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from *Thermotoga maritima*. *Structure Fold Des* **8**, 265-76.

Thoma, R., Schwander, M., Liebl, W., Kirschner, K. and Sterner, R. (1998). A histidine gene cluster of the hyperthermophile *Thermotoga maritima*: sequence analysis and evolutionary significance. *Extremophiles* **2**, 379-89.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.

Umbarger, H. E. (1956). Evidence for a negative-feedback mechanism in the biosynthesis of isoleucine. *Science* **123**, 848.

Viswanathan, V. K., Green, J. M. and Nichols, B. P. (1995). Kinetic characterization of 4-amino 4-deoxychorismate synthase from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**, 5918-23.

Vogel, H. J. & Bonner, D. M. (1956). Acetylornitinase of *E. coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem* **218**, 97-106.

Weber, A. L. & Miller, S. L. (1981). Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acids. *J Mol Evol* **17**, 273-84.

Wilmanns, M. & Eisenberg, D. (1993). Three-dimensional profiles from residue-pair preferences: identification of sequences with beta/alpha-barrel fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1379-83.

Winkler, M. E. (1986). Biosynthesis of histidine. Washington: American Society for Microbiology.

Winkler, M. E. (1987). Biosynthesis of histidine. Washington: American Society for Microbiology.

Yee, V. C., Pedersen, L. C., Le Trong, I., Bishop, P. D., Stenkamp, R. E. and Teller, D. C. (1994). Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7296-300.

Zalkin, H. (1985). Glutamine amidotransferases. *Methods Enzymol* **113**, 263-4.

Zalkin, H. (1993a). The amidotransferases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **66**, 203-309.

Zalkin, H. (1993b). Overview of multienzyme systems in biosynthetic pathways. *Biochem Soc Trans* **21**, 203-7.

Zalkin, H. & Murphy, T. (1975). Utilization of ammonia for tryptophan synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **67**, 1370-7.

Zalkin, H. & Smith, J. L. (1998). Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **72**, 87-144.

Zavodszky, P., Kardos, J., Svingor and Petsko, G. A. (1998). Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7406-11.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren wurden durch Verwendung des Einbuchstaben- oder des Dreibuchstabencodes abgekürzt.

µF	Mikrofaraday
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
2° Strk	Sekundärstruktur
5'-PRFAR	N'-[(5'-phosphoribulosyl)formimino]- 5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid
5'-ProFAR	N'-[(5'-phosphoribosyl)formimino]- 5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid
A	Absorption
Å	Ångström (1 Å= 10^{-10} m)
Aa-S	Acrylamin-Synthetase
ADC-S	Aminodeoxychorismat-Synthase
AICAR	5'-Phosphoribosyl-4-carboxamid-5-aminoimidazol
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Anthranilat-Synthase
Asn-S	Asparagin-Synthetase
A_x	Absorption Bei der Wellenlänge x
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	löslicher Rohextrakt; Cytosin
ca.	circa
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-Propansulfonsäure
CD-S	Cobyrinat-a, c-Diamin-Synthetase
cm	Zentimeter
CP-S	Carbamoylphosphat-Synthetase
CS	Cobyrinat-Synthase
CTP-S	Cytidintriphosphat-Synthetase
d	Schichtdicke
D	resuspendiertes $(NH_4)_2SO_4$-Pellet
d. h.	das heißt
D1	1 mM DTT (Pufferzusatz)
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol

dYT	LB-Medium mit doppelter Hefe- und Trypton-konzentration
E	Enzym
E1	1 mM EDTA (Pufferzusatz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und weitere (Autoren)
ex.	Anregungswellenlänge
f	Verdünnungsfaktor
FGAM-S	Formylglycinamid-Synthetase
FPLC	fast performance liquid chromatography
fw	Zellfrischgewicht
g	Erdbeschleunigung; Gramm
G	Guanin
GAR-S	Glycinamid-Ribonukleotid-Synthetase
GATase	Glutamin-Amidotransferase
GAT-Domäne	Glutaminase-Domäne
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GET	Glucose-EDTA-Tris-Lösung
Glm-S	Glucosamin-6-Phosphat-Synthetase
Glu-S	Glutamat-Synthase
Glu-tRNA^{gln}	Glutamat-tRNA^{gln}-Amidotransferase
GMP-S	Guanosinmonophosphat-Synthetase
GPAT	Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase
H	Hitzeschrittüberstand
h	Stunde
HQ	gepoolte Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie
Hyx	gepoolte Fraktionen nach Hydroxylapatitchromatographie
i. e.	das heißt
IMAP	Imidazolacetolphosphat
ImGP	Imidazolglycerinphosphat
ImGP-S	Imidazolglycerinphopsphat-Synthetase
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
K	einkonzentriertes Protein
KAc	Kaliumacetat
Kana	Kanamycin
K_{AV}	Verteilungskoeffizient
k_{cat}	Wechselzahl
k_{cat}/K_M	katalytische Effizienz
K_D	thermodynamische Dissoziationskonstante
K_M	Michaelis-Konstante
KP	Kaliumphosphatpuffer
L	Liter
LB	Luria-Bertani (-Medium)
ln	natürlicher Logarithmus
M	molar; Marker
mA	Milliampère
max.	maximal
mg	Milligramm

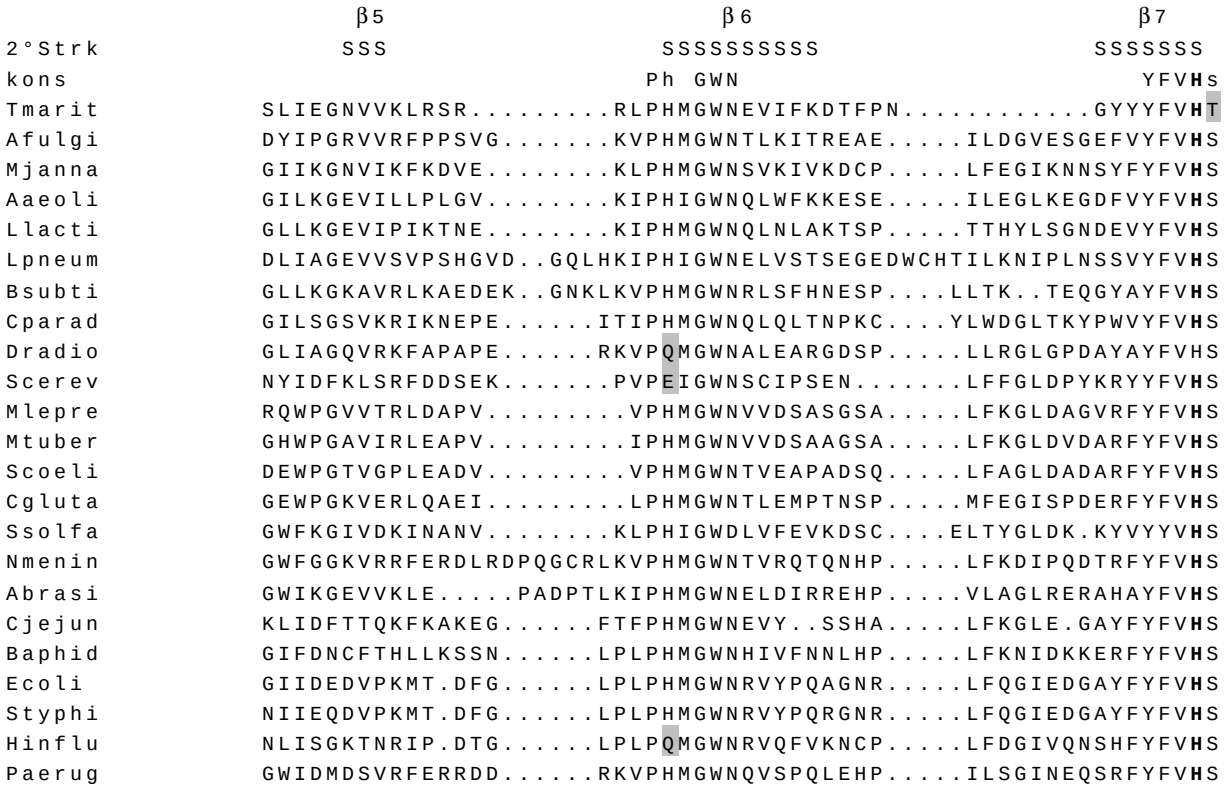
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	millimolar
MPa	Megapascal
M_R	Relatives Molekulargewicht
n	Zahl der Nukleotide eines Primers
NAD	Nicotinamiddinukleotid
NADH	reduziertes NAD
NAD-S	NAD-Synthase
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NP	resuspendiertes $(NH_4)_2SO_4$-Pellet
Ntn	N-terminales Nukleophil
OD_x	optische Dichte bei der Wellenlänge x
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Picogramm
pI	isoelektrischer Punkt
pmol	Picomol
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat
rel.	relativ
rmsd	mittlere relative Standardabweichung
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	siehe
S	Svedberg; Substrat
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SDS	Natriumlaurylsulfat
SV	Säulenvolumen
T	Temperatur
T_A	Annealing-Temperatur
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
T_M	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethy)aminomethan
u	Einheit
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
V_0	Totvolumen einer Säule
VB	Vogel-Bonner (-Medium)
V_e	Elutionsvolumen
vergl.	vergleiche
v_i	Anfangsgeschwindigkeit

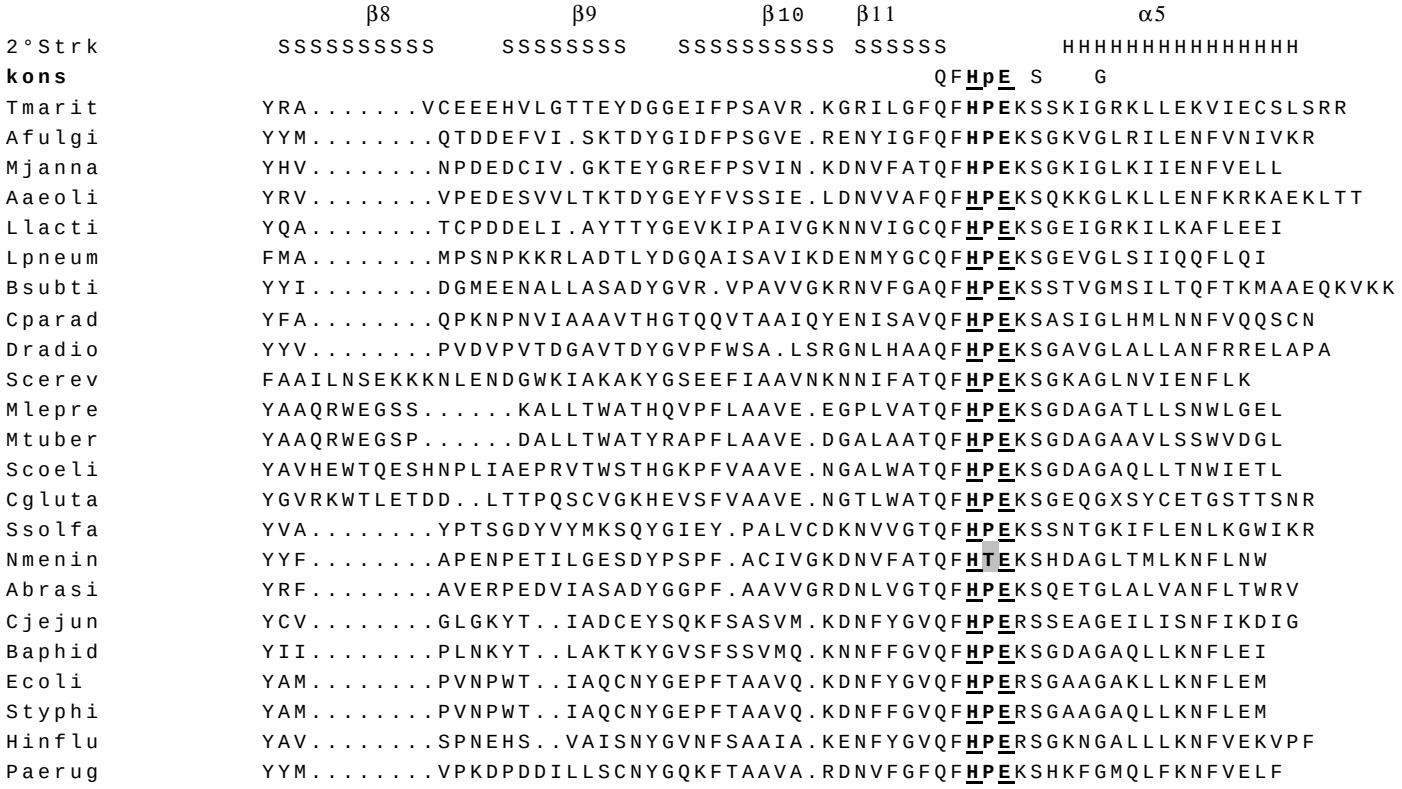
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V_t	Gesamtvolumen einer Säule
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
X	nicht identifizierte Aminosäure
z. B.	zum Beispiel
λ	Wellenlänge
Ω	Ohm
ε_{280}	molarer Absorptionskoeffizient bei 280 nm

8.2 HisH-Alignment

```
                                    β1                α1                β2        β3
2°Strk                         SSSSSSSSS      HHHHHHHHHH          SSSSSS      SSSS
kons                                     N   s
Tmarit          ............MLRIGIISVGPGNIMNLYRGVKRASEN..FEDVSIELVESPRNDLYDL
Afulgi          .............MIAIVNYGVGNLKSISKALETVG.....AKVSVTSDPE.KIKCASG
Mjanna          ............MKMIGIIDYNAGNLRSIQKAVELYD.....KV.IITNNSE.ELLACDK
Aaeoli          ............MRTVVIDYGMGNLRSVSKALEAVGF....PEVVVSNDYR.VASEADV
Llacti          ............MKKIVIIDYNIGNLQSVQAAFLRLG.....QETVISRDLE.EIRKADA
Lpneum          ............MSSVSIVDYGVGNLLSVARAFQYFD.....ASVNLVSTPE.EIMSADR
Bsubti          .............MIGVIDYGMGNLYSVSKALERVG.....VPYFVSEKPE.ELKEADA
Cparad          ....MINSKNNSPIEISIIDYQMGNLYSVCKGIERSG.....GIPKIINSAE.EIKKATA
Dradio          ....MSTTPVRAAPEVLLLDYGAGNVRSAARALERAG.....MTVRVTDNAA.DVPHAPA
Scerev          ............MPVVHVIDVESGNLQSLTNAIEHLGY....EVQLVKSPKDFNISGTSR
Mlepre          ..........MRSKSVVVLDYGSGNLWSVQRALQRVG.....AAVEVTADSAAG.AAADG
Mtuber          ..........MTAKSVVVLDYGSGNLRSAQRALQRVG.....AEVEVTADTDAA.MTADG
Scoeli          MTAAVPAGATGRAKKVVVFDYGFGNVRSAERALARAG.....ADVEITRDYDKA.MNADG
Cgluta          ............MTKTVALLDYGSGNLRSLRRTRALAG.....ASMFIVSSIQKLHPTHDG
Ssolfa          .............MKALVINYGVGNLYSISSALKRVG.....FEVTIDNKPR...NDYDL
Nmenin          ............MQT.AIIDYGMGNLHSVLKSVRTAGQLAGKNTEIFLSGDPDRVSRADK
Abrasi          ............METVALIDYGSGNLRSPAKALERAAAGCHASFQVLVTSDADAVRKADR
Cjejun          .............MKIIIIDTACANLASLKFCLDRLG......FNATISRDLKELESADK
Baphid          .............MDIAILNTGCANLTSIQVAIKKLG......YDSIVTSDPSIVLKSKK
Ecoli           .............MNVVILDTGCANLNSVKSAIARHG......YEPKVSRDPDVVLLADK
Styphi          .............MNVVILDT.CANLSSVKSAGAPR.......LHPGGQREAEIVLRADK
Hinflu          ............MINITIIDTGCANLSSVKFAFDRLG......YNTEITFDLNKIKSADK
Paerug          ................................MLKRVG......AKAKASDSREDIEQAEK
```

```
                          α2          α3          β4    α4
2°Strk          SSSSS     HH        HHHHHHHH    SSSSSSSHHHH
kons               PGvG     m                   p  G  C  G  q       E
Tmarit          LFIPGVGHFGEGMR.RLRENDLIDFVRKHVEDERYVVGVCLGMQLLFEESEEAP.GVKGL
Afulgi          VVFPGVGAFKSA...IEKLNLIRDVIDSL...EVPILGICLGMQLFATESTEGG.VYRGL
Mjanna          IILPGVGNFGSAMENLAPL...KETIYKIVDDRVPFLGICLGMQILFEESEEKR.GIKGL
Aaeoli          LVLPGVGAFGDAMKNLEELNLVS.VIRRHIEKGKPFLGICLGLQLLFEKSYEHG.EHRGL
Llacti          LILPGVGAFPTAMNNLKKFNLIE.LIQERAAAGIPILGICLGMQVLFEKGYEIE.ERQGL
Lpneum          LVLPGVGAFEDGMKGLTTLNFIE.PIKQFARSGKPFLGICLGMQMMLSRSTEFG.QHEGL
Bsubti          FILPGVGSFGDAMDNLGYTKLDQ.LIHDMVSEGRLLLGICLGMQLLFEESEENG.TASGL
Cparad          LILPGVGSFDPAMKQLKKQDLIN.PIKDAISEKKPFLGICLGLHLLFEESEE.G.IESGL
Dradio          LVVPGQGHFRQVMEAFEHGGFHG.PVLDAARAGVPLLGICVGMQLLFDGSEEAP.GVPGL
Scerev          LILPGVGNYGHFVDNLFNRGFEK.PIREYIESGKPIMGICVGLQALFAGSVESP.KSTGL
Mlepre          LLVPGVGAFEACMAGLRKIAGER.TIAERIVAGRPVLGVCVGMQILFARGVEFGVETTGC
Mtuber          LVVPGVGAFAACMAGLRKISGER.IIAERVAAGRPVLGVCVGMQILFACGVEFGVQTPGC
Scoeli          LLVPGVGAFAACMEGLKAARGDW.IVDRRLSGGRPVMGICVGMQILFSRGIEHDVEAEGL
Cgluta          LLVPGVGAFDACMKGLKNVF.DI.AYRQRLAGGRPVMGICVGMQILFDEGDEHGIKSAGC
Ssolfa          IVFPGVGAFSAVAEFILRY...RELFNDLRRSGTNFLGVCLGMQIMFEKGTE.GKESNGL
Nmenin          VIFPGQGAMPDCMAALKRDGLDE..AVKDALKNKPFFGICVGAQLLFDHSEE.G.NTDGL
Abrasi          VVLPAVGAFADC.....KRGLSE..VP..............GMQLMAEGGREYG.VTEGL
Cjejun          LFLPGVGTAKEAMKNLEQFNLIDFIQNTK....KPLLGICLGMQILGNFSEELN..QETL
Baphid          IFLPGVGTALAAMEQLHKKNLINTLKKLT....QPILGICLGMQIFSQFSEECK.GVKTI
Ecoli           LFLPGVGTAQAAMDQVRERELFDLIKACT....QPVLGICLGMQLLGRRSEESN.GVDLL
Styphi          LFLPGVGTAQAAMDQVRERELIDLIKACT....QPVLGICLGMQLLGRRSEETR.GVDLL
Hinflu          LILPGVGTANAAMYNLQERQLIETIQNLT....QPVLGICLGMQLMTEFSEEGN..VPTL
Paerug          LILPGVGAFDAGMQTLRKSGLVDVLTEQVMIKRKPVMGVCLGSQMLGLRSEEGA..EPGL
```


β5
β6
β7
2°Strk
SSS
SSSSSSSSSS
SSSSSSS
kons
Ph GWN
YFVHs
Tmarit SLIEGNVVKLRSR.....RLPHMGWNEVIFKDTFPN.....GYYYFVHT
Afulgi DYIPGRVVRFPPSVG.....KVPHMGWNTLKITREAE.....ILDGVESGEFVYFVHS
Mjanna GIIKGNVIKFKDVE.....KLPHMGWNSVKIVKDCP.....LFEGIKNNSYFYFVHS
Aaeoli GILKGEVILLPLGV.....KIPHIGWNQLWFKKESE.....ILEGLKEGDFVYFVHS
Llacti GLLKGEVIPIKTNE.....KIPHMGWNQLNLAKTSP.....TTHYLSGNDEVYFVHS
Lpneum DLIAGEVVSVPSHGVD..GQLHKIPHIGWNELVSTSEGEDWCHTILKNIPLNSSVYFVHS
Bsubti GLLKGKAVRLKAEDEK..GNKLKVPHMGWNRLSFHNESP....LLTK..TEQGYAYFVHS
Cparad GILSGSVKRIKNEPE.....ITIPHMGWNQLQLTNPKC....YLWDGLTKYPWVYFVHS
Dradio GLIAGQVRKFAPAPE.....RKVPQMGWNALEARGDSP.....LLRGLGPDAYAYFVHS
Scerev NYIDFKLSRFDDSEK.....PVPEIGWNSCIPSEN.....LFFGLDPYKRYYFVHS
Mlepre RQWPGVVTRLDAPV.....VPHMGWNVVDSASGSA.....LFKGLDAGVRFYFVHS
Mtuber GHWPGAVIRLEAPV.....IPHMGWNVVDSAAGSA.....LFKGLDVDARFYFVHS
Scoeli DEWPGTVGPLEADV.....VPHMGWNTVEAPADSQ.....LFAGLDADARFYFVHS
Cgluta GEWPGKVERLQAEI.....LPHMGWNTLEMPTNSP.....MFEGISPDERFYFVHS
Ssolfa GWFKGIVDKINANV.....KLPHIGWDLVFEVKDSC....ELTYGLDK.KYVYYVHS
Nmenin GWFGGKVRRFERDLRDPQGCRLKVPHMGWNTVRQTQNHP.....LFKDIPQDTRFYFVHS
Abrasi GWIKGEVVKLE.....PADPTLKIPHMGWNELDIRREHP.....VLAGLRERAHAYFVHS
Cjejun KLIDFTTQKFKAKEG.....FTFPHMGWNEVY..SSHA.....LFKGLE.GAYFYFVHS
Baphid GIFDNCFTHLLKSSN.....LPLPHMGWNHIVFNNLHP.....LFKNIDKKERFYFVHS
Ecoli GIIDEDVPKMT.DFG.....LPLPHMGWNRVYPQAGNR.....LFQGIEDGAYFYFVHS
Styphi NIIEQDVPKMT.DFG.....LPLPHMGWNRVYPQRGNR.....LFQGIEDGAYFYFVHS
Hinflu NLISGKTNRIP.DTG.....LPLPQMGWNRVQFVKNCP.....LFDGIVQNSHFYFVHS
Paerug GWIDMDSVRFERRDD.....RKVPHMGWNQVSPQLEHP.....ILSGINEQSRFYFVHS


β8 β9 β10 β11 α5
2°Strk SSSSSSSSSS SSSSSSSS SSSSSSSSSS SSSSSS HHHHHHHHHHHHHH
kons QFHpE S G
Tmarit YRA.....VCEEEHVLGTTEYDGGEIFPSAVR.KGRILGFQFHPEKSSKIGRKLLEKVIECSLSRR
Afulgi YYM.....QTDDEFVI.SKTDYGIDFPSGVE.RENYIGFQFHPEKSGKVGLRILENFVNIVKR
Mjanna YHV.....NPDEDCIV.GKTEYGREFPSVIN.KDNVFATQFHPEKSGKIGLKIIENFVELL
Aaeoli YRV.....VPEDESVVLTKTDYGEYFVSSIE.LDNVVAFQFHPEKSQKKGLKLLENFKRKAEKLTT
Llacti YQA.....TCPDDELI.AYTTYGEVKIPAIVGKNNVIGCQFHPEKSGEIGRKILKAFLEEI
Lpneum FMA.....MPSNPKKRLADTLYDGQAISAVIKDENMYGCQFHPEKSGEVGLSIIQQFLQI
Bsubti YYI.....DGMEENALLASADYGVR.VPAVVGKRNVFGAQFHPEKSSTVGMSILTQFTKMAAEQKVKK
Cparad YFA.....QPKNPNVIAAAVTHGTQQVTAAIQYENISAVQFHPEKSASIGLHMLNNFVQQSCN
Dradio YYV.....PVDVPVTDGAVTDYGVPFWSA.LSRGNLHAAQFHPEKSGAVGLALLANFRRELAPA
Scerev FAAILNSEKKKNLENDGWKIAKAKYGSEEFIAAVNKNNIFATQFHPEKSGKAGLNVIENFLK
Mlepre YAAQRWEGSS......KALLTWATHQVPFLAAVE.EGPLVATQFHPEKSGDAGATLLSNWLGEL
Mtuber YAAQRWEGSP......DALLTWATYRAPFLAAVE.DGALAATQFHPEKSGDAGAAVLSSWVDGL
Scoeli YAVHEWTQESHNPLIAEPRVTWSTHGKPFVAAVE.NGALWATQFHPEKSGDAGAQLLTNWIETL
Cgluta YGVRKWTLETDD..LTTPQSCVGKHEVSFVAAVE.NGTLWATQFHPEKSGEQGXSYCETGSTTSNR
Ssolfa YVA.....YPTSGDYVYMKSQYGIEY.PALVCDKNVVGTQFHPEKSSNTGKIFLENLKGWIKR
Nmenin YYF.....APENPETILGESDYPSPF.ACIVGKDNVFATQFHTEKSHDAGLTMLKNFLNW
Abrasi YRF.....AVERPEDVIASADYGGPF.AAVVGRDNLVGTQFHPEKSQETGLALVANFLTWRV
Cjejun YCV.....GLGKYT..IADCEYSQKFSASVM.KDNFYGVQFHPERSSEAGEILISNFIKDIG
Baphid YII.....PLNKYT..LAKTKYGVSFSSVMQ.KNNFFGVQFHPEKSGDAGAQLLKNFLEI
Ecoli YAM.....PVNPWT..IAQCNYGEPFTAAVQ.KDNFYGVQFHPERSGAAGAKLLKNFLEM
Styphi YAM.....PVNPWT..IAQCNYGEPFTAAVQ.KDNFFGVQFHPERSGAAGAQLLKNFLEM
Hinflu YAV.....SPNEHS..VAISNYGVNFSAAIA.KENFYGVQFHPERSGKNGALLLKNFVEKVPF
Paerug YYM.....VPKDPDDILLSCNYGQKFTAAVA.RDNVFGFQFHPEKSHKFGMQLFKNFVELF

Die HisH-Sequenzen entstammen der SwissProt-Datenbank.
Das Alignment wurde mit dem Programm Pile Up aus dem GCG-Package (Wisconsin University) erstellt.
Die angegebenen Sekundärstrukturen beziehen sich auf tHisH aus dem tHisH:F-D11N-Komplex (M. Walker, M.Wilmanns, unveröffentlichte Arbeiten)

Tmarit : Thermotoga maritima
Afulgi : Archaeoglobus fulgidus
Mjanna : Methanococcus jannaschii
Aaeoli : Aquifex aeolicus.
Llacti : Lactococcus lactis subsp. lactis
Lpneum : Legionella pneumophila
Bsubti : Bacillus subtilis
Cparad : Cyanophora paradoxa
Dradio : Deinococcus radiodurans.
Scerev : Saccharomyces cerevisiae
Mlepra : Mycobacterium leprae.
Mtuber : Mycobacterium tuberculosis

Scoeli : Steptomyces coelicolor
Cgluta : Corynebacterium glutamicum
Ssolfa : Sulfolobus solfataricus
Nmenin : Neisseria meningitidis
Abrasi : Azospirillum brasilense
Cjejun : Campylobacter jejuni
Baphid : Buchnera aphidicola
Ecoli : Escherichia coli.
Styphi : Salmonella typhimurium
Hinflu : Haemophilus influenzae Rd
Paerug : Pseudomonas aeruginosa

23 Sequenzen, Kons: streng konserviert, kons: in mind. 20 (max. 3 Abweichungen)
fett: GATase-Klasse-I-Fingerabdruck (Zalkin & Smith, 1998, fett und unterstrichen: katalytische Triade

Die größte Ähnlichkeit mit tHisH hat *Methanococcus jannaschii*-HisH (Archaeon, 40% Identität, 59% Ähnlichkeit), die geringste Ähnlichkeit mit tHisH hat das *Saccharomyces cerevisiae*-HisH-Homolog (Eukaryot, 28% Identität, 48% Ähnlichkeit).

8.3 HisF-Alignment

```
                                  β1        β1'            β1''      α1                  β2
2° strk                  SSSSSSSSSSSSS SSS             SSS    HHHHHHHHH            SSSSSS
kons                     R i cLd          VV K     f       Gd                    g DE  f d i
Tmarit             MLAKRIIACLDVK....DGRVV.KGTN.FENLRDSGDPVELGKFYSEI.......GIDELVFLDIT
Kpneum             MLAKRIIPCLDVR....DGQVV.KGVQ.FRNHEIIGDIVPLAKRYADE.......GADELVFYDIT
Ecoli              MLAKRIIPCLDVR....DGQVV.KGVQ.FRNHEIIGDIVPLAKRYAEE.......GADELVFYDIT
Styphi             MLAKRIIPCLDVR....DGQVV.KGVQ.FRNHEIIGDIVPLAKRYADE.......GADELVFYDIT
Hinflu             MLAKRIIPCLDVR....DGQVV.KGVQ.FRNHEIIGDIVPLAQRYAQE.......GADELVFYDIT
Baphid             MLAKRIIACLDVN....NGVVV.KGIQ.FKNHEIVGDIISLSKRYTKE.......GIDELVFYDIT
Cjejun             MLTKRIIACLDVK....DGRVV.KGTQ.FKNHKDMGDIIELARYYSQN.......GIDELVFYDIA
Rsphae             MLKTRIIPCLDVA....DARVV.KGVN.FVDLRDAGDPVEAARAYDAA.......GADELCFLDIH
Rcapsu             MLKTRIIPCLDVA....DGRVV.KGVN.FVNLIDAGDPVEAAKAYDAA.......GADELCFLDIH
Abrasi             MLKMRVIPCLDVK....DGRVV.KGVN.FVDLIDAGDPVEQARVYDRE.......GADELTFLDIT
Mtuber MYADRDLPGAGGLAVRVIPCLDVD    DGRVV.KGVN.FENLRDAGDPVELAAVYDAE.......GADELTFLDVT
Cgluta           MGVAIRVIPCLDVD...  NGRVV.KGVN.FENLAMLADPVELAKRYDEE.......GADELTFLDVT
Ssolfa             MTTKRIIACLDVK....DGNVV.KGVN.FLNLQLKGDPVSLASLYEEE.....  GADEIVFLDIT
Tethan             MVTKRIIPCLDVH....NGRVV.KGVN.FVNIRDAGDPVEIASYYDKA.......GADELTFLDIT
Aaeoli             MLAKRIIPCLDVD....KGRVV.KGVK.FLNLRDAGDPVEVAKRYEEE.......GADELVFLDIT
Afulgi             MLAKRIIPCLDVTLDESEARVV.KGVE.FVNLRDAGDPVELAKRYDEE.......GADELVFLDIT
Mjanna             MLTKRIIPCLDIK....DGRVV.KGTK.FLNLRDAGDPVELAQYYDDE.......GADELVFLDIT
Bsubti             MITKRIIPCLDVK....EGRVV.KGIQ.FLELKDAGDPVELAEVYDRE.......GADELVFLDIS
Synech           MTLAKRILPCLDVN....AGRVV.KGIN.FVDLQDAGDPVELARAYNEA.......GADELVFLDIT
Llacti             MLTKRIIPCLDIK....NGKVV.KGIN.FVGLREIGDPVELAKIYEEQ      .CADEIVFLDIT
Mtherm             MLAKRIIPCLDCDLQVPNGRVV.KGVE.FKQIRYAGDPVELATRYYED       GADEIVFLDIT
Dradio         MLRGVLAKRIVPCLDVQ....NGRVV.KNVRFFEDHRDAGDPLVLAQAYEAQ       QADELVFYDIT
Lpneum             MSNVRLIARLDIKGP..NLI...KGVH.LEGLRVVGNPNEYAMAYYA       QGADELIYMDTV
Paerug             MVRRRVIPCLLLK...DRGLV..KTV..FKEPKYVGDPINAIRIFNE       KEVDELILLDID
Scerev             GLTRRIIACLDVRTNDQGDLVVTKGDQYDVREKSDGKGVRNLGKPVQLAQKYYQQGADEVTFLNIT
```

```
                        α2          β3       α3              α3       β4  α4′                  α4         β5
2° strk              HHHHHHHHH      SSSS     HHHH            HHHHH    SSSS HHHH   HH-------------HHHHHH     SSS
kons     a                          P  V GG                       GadK s n  A   p                       Q  v
Tmarit   ASVE...KRKTMLELVEKVAEQIDIPFTVGGGIHDFETA..........SELILRGADKVSINTAAVENPSL.............ITQIAQTFGSQAVV
Kpneum   ASSD...GRVVDKSWVSRVAEVIDIPFCVAGGIKSLDDA..........AQILSFGADKISINSPALADPTL.............ITRLADRFGVQCIV
Ecoli    ASSD...GRVVDKSWVSRVAEVIDIPFCVAGGIKSLEDA..........AKILSFGADKISINSPALADPTL.............ITRLADRFGVQCIV
Styphi   ASSD...GRVVDKSWVARVAEVIDIPFCVAGGIRSIDDA..........AKILSFGADKISINSPALADPTL.............ITRLADRFGVQCIV
Hinflu   ASSD...GRTVDKSWVERIAQVIDIPFCVAGGIKTIEDA..........EKLFAFGADKISINSPALADPTL.............ISRLADRFGVQAIV
Baphid   ACTN...NKLVDRSWIKKVAEIINIPFCVAGGIKSVEDA..........QNILSFGADKISINSSALIDPDL.............ITKIANRFGVQCTV
Cjejun   ASAR...KERISREWVSEVAKNINISFCVAGGIKSEEDA..........AELLANGADKISINSPALNDPSL.............ITRLAKSFGVQCVV
Rsphae   ATHE...NRGTMYDLVTRTAEQCFMPLTVGGGVRTHQDV..........RALLLAGADKVSFNSAAVADPGV.............VP.SRRPLRSQCIV
Rcapsu   ATHE...NRGTMFDLVTRTAEQCFMPLTVGGGVRTQEDV..........RALLLAGADKVSFNSAAVANPDV.............VR.SRRSLRSQCIV
Abrasi   ASHE...NRDTIYDVVRRTAEQVFMPLTVGGGVRTVDDI..........RKLLLAGADKVSINTAAIHRPEF.............VQEAAEKFGAQCIV
Mtuber   ASSS...GRATMLEVVRRTAEQVFIPLTVGGGVRTVADV..........DSLLRAGADKVAVNTAAIACPDL.............LADMARQFGSQCIV
Cgluta   ASKH...GRGTMLDVVRRTADQVFIPLTVGGGVRSEEDV..........DQLLRAGADKVSVNTSAIARPEL.............LSELWKRFGAQCIV
Ssolfa   ATIE...ARKALYNVIKDTASVLSIPLTVGGGIRTPDDV..........SMALRSGADKVSINTAAVESSQI.............VKKSAEEFGSQAVV
Tethan   ASAE...LRNIMIDVVRRVAEQVFIPFTVGGGIRTVEDF..........REILKAGADKVSINSAAVKRPEL.............ISEAASRFGSQCVV
Aaeoli   ASAE...DREIMIDVVKKVAETVFMPFTVGGGIRSLEDM..........RRLLEAGADKISINTAAVKNPNL.............IYEGAKRFGSQCIV
Afulgi   ASPE...GRRTMIDVIERTAEQVFIPFTVGGGIKSIEDI..........NTILSAGADKVSINTAAVKNPEF.............VREAADIFGSQCIV
Mjanna   ASAE...KRDIIIDVVERTAEKVFIPLTVGGGIKSIEDF..........RRILRAGADKVSINTAAVKNPNL.............IKEASEIFGSQCVV
Bsubti   ASHE...GRKTMVDVVEQVAAKLAIPFTVGGGINQLSDM..........KTILRAGADKVSVNTAAVLRPEL.............ITEGAEFFGSQCIV
Synech   ATHE...QRDTIIDVVYRTAEEVFIPLTVGGGISTLEHI..........KNLLRAGADKVSVNSSAVRDPDF.............ISRASDRFGRQCIV
Llacti   ASFE...EREIIGELIGRAARELSIPLTVGGGIRSIDDF..........RRILARGADKVSVNSAAIENPEL.............IRQAANEFGVQCVV
Mtherm   ASHE...RRETMTHVIEATTENVFVPICVGGGIRKPEDY..........FKMLKAGADKCSTNTAAIKNPEL.............INEASDLVGSQACV
Dradio   ATHE...GRSLMLDVAARVAEQVMMPLTVGGGVGALSDF..........RQLLLAGADKISVNSGAVKRPEL.............IREASDHYGAQCVM
Lpneum   ASLY...GRNNLSEIVKTTAENVFIPITVGGGIRSVDDA..........EQLLRCGADKVAINTAATKNPTL.............ISDIARRFGSQCVV
Paerug   ASRL...NQEPNYELIAEVAGECFMPICYGGGIKTLEHA..........EKIFSLGVEKVSINTAALMDLSL.............IRRIADKFGSQSVV
Scerev   SFRDCPLKDTPMLEVLKQAAKTVFVPLTVGGGIKDIVDVDGTKIPALEVASLYFRSGADKVSIGTDAVYAAEKYYELGNRGDGTSPIETISKAYGAQAVV
```

```
                β5                                  β5′       β5′′      α5          β6   α6′          α6           β7
2° strk SSSSSSSS                                 SSSSSS    SSSSSS HHHHHHHHH    SSSSSSHHHH       HHHHHHHHHH    SSSSS
kons       d                                                    w       GaGEi l     dG   G d              P iAs
Tmarit  VAIDAKRVDG.....................EFMVFTYSGKKNTGILLRDWVVEVEKRGAGEILLTSIDRDGTKSGYDTEMIRFVRPLTT.LPIIAS
Kpneum  VGIDT......WFDAASGKYHVNQYTGDESR............TRVTQWETLDWVQEVQKRGAGEIVLNMMNQDGVRNGYDLEQLSKVRA.VCRVPLIAS
Ecoli   VGIDT......WYDAETGKYHVNQYTGDESR............TRVTQWETLDWVQEVQKRGAGEIVLNMMNQDGVRNGYDLEQLKKVRE.VCHVPLIAS
Styphi  VGIDT......WFDDATGKYHVNQYTGDENR............TRVTQWETLDWVQEVQQRGAGEIVLNMMNQDGVRNGYDLTQLKKVRD.VCRVPLIAS
Hinflu  VGIDS......WFEQETGKYWVNQYTGDETR............TRQTHWQLLDWVKEVQQCGAGEIVLNMMNQDGLRNGYDLAQLKLVRG.VCRVPLIAS
Baphid  VGIDS......WFDSDKKKYMVQQYTGDANR............TYQTDWETIDWVEKVQKKGAGEIVLNMMNQDGLQNGYDLSQLNEIRK.KCKVPLIAS
Cjejun  VGIDS.......FKDENGNLKVFQYTGDEKT............SKHSGKSTLEWVKKVQDLGAGEIVLNMMNQDGVKNGYDLEQLEAVYK.ICKVPLIAS
Rsphae  VAIDTKTVAPGR.....................WEIFTHGGRRATGIDAVAFACEMASRGAGEILLTSMDRDGTRAGFNLPLTRAISDAVP.IPVIAS
Rcapsu  VAIDAKTVEPGR.....................WEIFTHGGRKSTGIDAVEFARHVEAKGAGEILLTSMDRDGTKAGFNLPLTRAIADAVK.IPVIAS
Abrasi  VAIDAKQVEPGR.....................WEIFTHGGRKATGIDAIEWAKRMESYGAGEILLTSMDRDGTKSGFDLALTRKVADGLR.IPVIAS
Mtuber  LSVDARTVPVGSAPTPSG...............WEVTTHGGRRGTGMDAVQWAARGADLGVGEILLNSMDADGTKAGFDLALLRAVRAAVT.VPVIAS
Cgluta  LSVDARRVPEGGTPQPSG...............FEVTTHGGSKSAELDAIEWAKRGEELGVGEILLNSMDGDGTKNGFDLELLEKVRAAVS.IPVI.S
Ssolfa  VAIDVKKVSGN.....................WIVFTKSGTYNTRLDAIKWAKKVEELGAGEILLTSIDRDGTRLGYDLELTRKIVDSVN.IPVIAS
Tethan  VAIDAKRRDDNSG.....................WDVYINGGRINTGKDAVEWAVEVEKLGAGEILLTSMDCDGTKKGYDIELTRKVSESVRMIPVIAS
Aaeoli  VAIDAKRKGNS.....................WEVYIHGGRTPTGLDAVEWAKKVESLGAGEILLTSMDRDGTKDGYDIELNRAISEAVN.IPVIAS
Afulgi  VAIDCRRNFDLSKGEYIVELEDGTKA.........WYEVVIYGGRKPVGIDAVWWAKRVEELGAGEILLTSMNRDGTKDGFDIPITRKISEEVN.IPVIAS
Mjanna  VAIDAKRHYVNEDEIDKINKNVVKVEDGYC....WFEVYIYGGRKETGIDAINWAKKVEELGAGEILLTSIDKDGTKSGYDLILTKEISKSVK.LPVIAS
Bsubti  LAIDAKYDKESD.....................TYKVYTHGGRKKTDWEVTAWAKEGVKRGAGEILLTSMDSDGEKKGFDHTLTKLVSEAV.PVPVIAS
Synech  VAIDARRRLDADNP...................GWDVYVRGGRENTGLDAIAWAEEVAKRGAGELLVTSMDGDGTQAGYDLALTAAIAERVE.IPVIAS
Llacti  VAIDAKKRADHRG.....................YDVYIKGGRENAGLDLVDWAKKCERLGAGEILLTSMDKDGTKTGYDLEMLNDVCTAVN.IPVVAS
Mtherm  VAIDAKRRYI.ENPRESDERFIIEVDDGYC....WYECSIYGGREFTGIDAVKWAMECQDRGAGEILLTSMDRDGTKMGYDIPLTRTMSENLD.IPVIAS
Dradio  LSIDAKRRPGGQG.....................WTVHIGGGRVDTGLDLLAWARRGQELGAGELCLNVMDADGTRAGFDLEATRAVAREVD.LPVIAS
Lpneum  LSIEAKRTVNGR.....................WEVMTDNGREHTGMDVVDWARNGEKFGAGEILLTSIDQEGTRKGFDLELVKQVSSMVS.IPVIAS
Paerug  GSIDCRK..................GFWG....GHSVFSENGTRDMKRSPLEWAQALEEAGVGEIFLNSIDRDGVQKGFDNALVENIASNV.HVPVIAC
Scerev  ISVDPKRVYVNSQADTKNKVFETEYPGPNGEKYCWYQCTIKGGRESRDLGVWELTRACEALGAGEILLNCIDKDGSNSGYDLELIEHVKDAV.KIPVIAS
```

```
                      α7         β8   α8′          α8
2° strk       HHHHHHHHHH    SSSS HHHH     HHHHHHHHHH
kons     gG G                  laA  fh         k      g   r
Tmarit   GGAGKMEHFLEAF.LAGADAALAASVFHFREIDVRELKEYLKKHGVNVRLEGL......
Kpneum   GGAGTMEHFLEAFRDASVDGALAASVFHKQIINIGELKTYLAAQGVEIRVC........
Ecoli    GGAGTMEHFLEAFRDADVDGALAASVFHKQIINIGELKAYLATQGVEIRIC........
Styphi   GGAGTMEHFLEAFRDADVDGALAASVFHKQIINIGELKAYLAGQGVEIRIC........
Hinflu   GGAGKMVHFRDAFIEAKVDGALAASVFHKQIIEIGELKSYLVQSAIEIRSE........
Baphid   GGAGCADHFYQAFDHANVDGVLAASVFHKKIVNIKDLKYFLIQKGLEIRIC........
Cjejun   GGAGKMEHFLEAFK.LGIDGALAASVFHQKLIDIKELKIYLKNQGLSIRI.........
Rsphae   GGVGTLDHLVEGVTEGGASAVLAASIFHFGEFTIGEAKAHMAAAGIPVRLA........
Rcapsu   GGVGTLDHLVEGVTEGHASAVLAASIFHFGTYTIGEAKAHMAPAGIPMRLA........
Abrasi   GGVGTLDHLVEGIREGHATAVLAASIFHFGTYTIGQAKAALAEAGIPVRPARMAEAAHG
Mtuber   GGAGAVEHFAPAVAAG.ADAVLAASVFHFRELTIGQVKAALAAEGITVR.........
Cgluta   GGAGKAEHFPPAVARG.ANAVLAATIFHFREVTIAEVKGAIKDAGFEVRK.........
Ssolfa   GGAGKMEHFYEVFSLAKADAALAAGIFHDGIIKIKDLKSYLSQKGIEVRM.........
Tetahn   GGAGTMEHFREALVEGKADAVLAASLFHYREIEIMELKKYLKENGIEIRM.........
Aaeoli   GGAGKKEHFYEVFSKTKVEAALAASVFHFREISIPELKEYLLERGINVRPLD.......
Afulgi   GGAGTKEHFYEGFVEGKADACLAASIFHYREIGIREIKEYLAERGVQVRL.........
Mjanna   GGCGKPEHVYEAFVYGKADAALMAGILHYREYTIEEIKKYCADRGIPMRLTAVCG....
Bsubti   GGAGNAQHMLEAFTKGEADAALAASIFHYKETSIKEVKSYLKEYGVNVR.........
Synech   GGAGNCQHVYEAFTEGKAEAALLASLLHYGQLTIGELKTFLEARQIPVRH.........
Llacti   GGCGKISDIVEVFQNTRSDAALFASLFHYGEEQLMKLKTNL...... ............
Mtherm   GGVGEPEHIYEAFTDGKADAALAASIFHFNEYPVPAVKEYLRSRGVPIRL.........
Dradio   GGAGKVQDFYDVLTAGEADAALAASVFHFGELTVPQVKTSLAAQGVPVRPEWRGATE..
Lpneum   GGMGKLEEFN..................................................
Paerug   GGAGSIADLIDLFERTCVS AVAAGSLFVFHGKHRAVLISYPDVNKLDVG.........
Scerev   SGAGVPEHFEEAFLKTRADACLGAGMFHRGEFTVNDVKEYLLEHGLKVRMDEE......
```

Die HisF-Sequenzen entstammen der SwissProt-Datenbank.
Das Alignment wurde mit dem Programm Pile Up aus dem GCG-Package (Wisconsin University) erstellt.
Die angegebenen Sekundärstrukturen beziehen sich auf tHisF aus dem tHisH:F-D11N-Komplex (M. Walker, M. Wilmanns, unveröffentlichte Arbeiten)

Tmarit: Thermotoga maritima
Kpneum: Klebsiella pneumoniae
Ecoli : Escherichia coli
Styphi: Salmonella typhimurium
Hinflu: Haemophilus influezae
Baphid: Buchnera aphidicola
Cjejun: Campylobacter jejuni
Rsphae: Rhodobacter sphaeroides
Rcapsu: Rhodobacter capsulatus
Abrasi: Azospirillum brasilense
Mtuber: Mycobacterium tuberculosis
Cgluta: Corynebacterium glutamicum
Ssolfa: Sulfolobus solfataricus

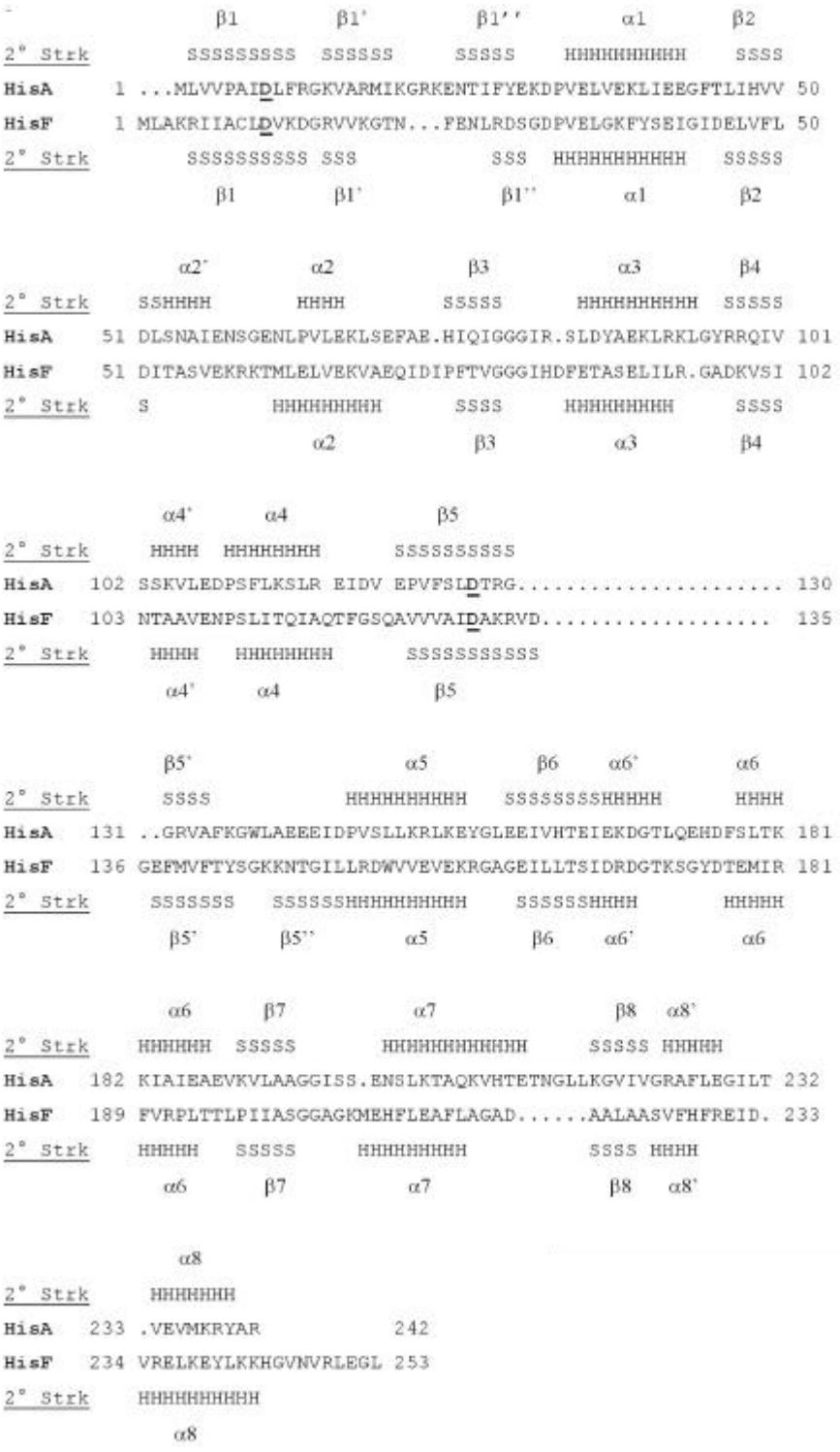
Tethan: Thermoanaerobacter ethanolicus
Aaeoli: Aquifex aeolicus
Afulgi: Archeoglobus fulgidus
Mjanna: Methanococcus jannaschii
Bsubti: Bacillus subtilis
Synech: Synechocysis sp. (strain PCC 6803)
Llacti: Lactococcus lactis
Mtherm: Methanobacteriun thermoautotrophicum
Dradio: Deinococcus radiodurans
Lpneum: Legionella pneumophila
Paerug: Pseudomonas aeruginosa
Scerev: Saccharomyces cerevisiae

25 Sequenzen, Kons: streng konserviert, kons: in min 22 (max. 3 Abweichungen)
essentielle Aspartate (Tmarit): fett und unterstrichen, andere ausgetauschte AS: fett

Die größte Ähnlichkeit mit tHisF haben *Thermoanaerobacter ethanolicus*-HisF (Bacterium, 60% Identität, 69% Ähnlichkeit) und *Archaeoglobus fulgidus*-HisF (Archeon, 60% Identität, 69% Ähnlichkeit).

Die geringste Ähnlichkeit mit tHisF hat *Pseudomonas aeruginosa*-HisF (Eubacterium, 37% Identität, 46% Ähnlichkeit).

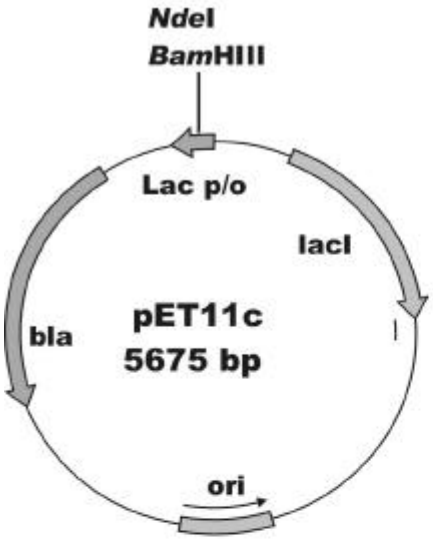
8.4 Alignment tHisA-tHisF



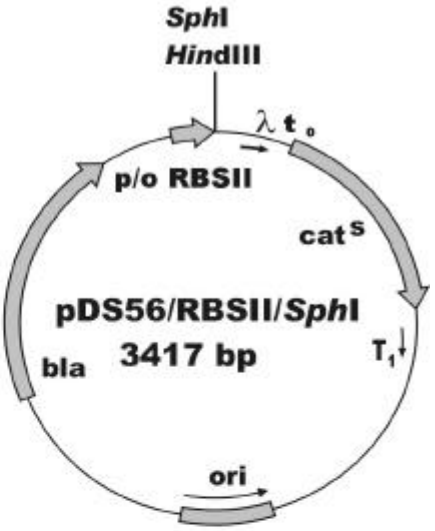
Die katalytisch essentiellen Aminosäuren D8 und D127 (tHisA) und D11 und D130 (tHisF) sind fett und unterstrichen.
Die Sekundärstruktur von tHisF wurde aus der tHisH:F-D11N-Komplexstruktur erhalten. Die Sekundärstruktur von tHisA wurde (Lang et al., 2000) entnommen. Das Alignment wurde mit dem Programm Pretty aus dem GCG-Package (Wisconsin University) erstellt.

8.5 Plasmide

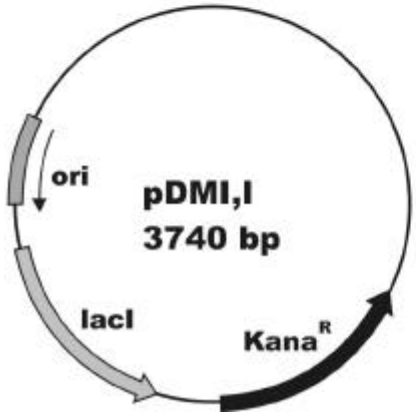
A



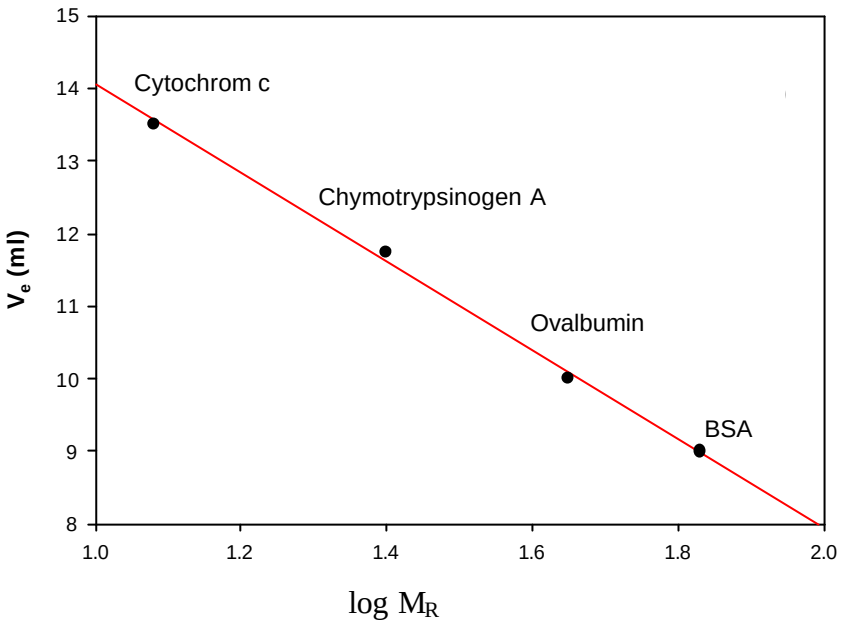
B



C



8.6 Kalibrierung der Superdex-75-Gelfiltrationssäule



Protein	M_R *10^{-3}	log (M_R*10^{-3})	V_e (ml)
BSA	68	1.83	18
Ovalbumin	45	1.65	20.26
Chymotrypsinogen A	25	1.40	23.4
Cytochrom c	12	1.08	27

V_t (Blue Dextran): 7.75 ml

V_0 (Aceton): 19.30 ml

$K_{AV} = V_e\text{-}V_0/V_t\text{-}V_0$

K_{AV}: Verteilungskoeffizient
V_e: Elutionsvolumen
V_0: Totvolumen
Vt: Gesamtvolumen

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Imidazolglycerinphosphat-Synthetase aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* (tImGP-S) funktionell und strukturell charakterisiert.

Die tImGP-S ist ein Bienzymkomplex aus der Klasse der Glutamin-Amidotransferasen, in der der an der Glutaminase-Untereinheit (tHisH) gebildete Ammoniak an der Synthase-Untereinheit (tHisF) mit N'-[(5'-phospho-ribulosyl)formimino]- 5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid (5'-PRFAR) zu 5'-Phosphoribosyl-4-carboxamid-5-aminoimidazol (AICAR) und Imidazol-glycerinphosphat (ImGP) reagiert. Es wurde gezeigt, daß tHisH und tHisF mit hoher Affinität zu einem 1:1-Komplex assoziieren. Durch enzymkinetische Messungen wurden die Fließgleichgewichtskonstanten von tHisH, tHisF und tHisH:F bestimmt. Mittels gezieltem Einzelaustausch von acht Aminosäuren am aktiven Zentrum von tHisF sowie durch Totalrandomisierung einzelner Codone wurden zwei für die Katalyse essentielle Aspartate identifiziert. Andere Aminosäuren könnten an der Synchronisation der an den beiden aktiven Zentren ablaufenden Teilreaktionen beteiligt sein. Von diesen Ergebnissen und der kürzlich gelösten Röntgenstruktur des tHisH:F-Komplexes wurden Rückschlüsse auf den Mechanismus der tHisF-Reaktion, der Translokation des in der tHisH-Reaktion gebildeten Ammoniaks sowie der allosterischen Kommunikation zwischen tHisH und tHisF gezogen.

Abstract

The present work gives a functional and structural characterization of the imidazoleglycerol phosphate synthetase from *Thermotoga maritima* (tImGP-S).

The tImGP-S is a bienzyme complex that belongs to the glutamine amidotransferase class of enzymes. The ammonia produced at the glutaminase subunit (tHisH) reacts at the synthase subunit (tHisF) with N'-[(5'-phosphoribulosyl)formimino]- 5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonucleotide (5'-PRFAR) to 5'-Phosphoribosyl-4-carboxamid-5-aminoimidazol (AICAR) and Imidazoleglycerol phosphate (ImGP). It was shown that tHisH and tHisF associate with high affinity to give a 1:1 complex. The steady-state parameters of tHisH, tHisF, and tHisH:F were determined. Two catalytically essential aspartates were identified using site-directed mutagenesis of eight amino acids at the active site of tHisF and randomization of single codons. Other amino acids could play a role in synchronizing the two partial reactions which take place at separate active sites. From these results together with the recently determined X-ray structure of the tImGP-S holoenzyme conclusions were drawn concerning the reaction mechanism, the translocation of the tHisH product ammonia to the active site of tHisF, and the allosteric interactions between tHisH and tHisF.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner für die Überlassung des interessanten Themas und für die finanzielle Unterstützung, die mir neben der Laborarbeit auch die Teilnahmen an interessanten Tagungen ermöglichte. Ich möchte ihm dafür danken, daß er sich stets die Zeit für wissenschaftliche Diskussionen genommen hat, für das in mich gesetzte Vertrauen und für seine Ermutigung und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. H. W. Klein danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Fritz bedanke ich mich dafür, daß unsere Arbeitgruppe zwei Jahre lang in seiner Abteilung wirken durfte. Herrn Prof. Dr. K. Kirschner danke ich, daß ich sechs Wochen lang in seiner Arbeitsgruppe in Basel die Grundlagen des molekularbiologischen Arbeitens lernen durfte.

Ich danke den Mitarbeitern des Göttingen Genome Laboratory und des Zentrum für Molekulare Medizin der Universität Köln für zahlreiche DNA-Sequenzierungen. Für die Peptidsequenzierungen bedanke ich mich bei Paul Jenö vom Biozentrum der Universität Basel und Dr. Markus Macht vom Zentrum für Molekulare Medizin der Universität Köln.

Dr. Michael Hennig gilt mein Dank für die Anfertigung und Bereitstellung des Modells von mit 5'-PRFAR ligandiertem tHisF.

Herrn Ariel Lustig danke ich für die Ultrazentrifugationsläufe „meiner" Proteine.

Mein Dank gilt Dr. Matthias Wilmanns, Dr. Dietmar Lang und Dr. Martina Walker von der EMBL Außenstation in Hamburg. Sie haben die Röntgenkristallstrukturen von tHisF und tHisH:F gelöst, ohne die meiner Arbeit ein wichtiger Bestandteil fehlen würde.

Ich danke meinen Kolleginnen und Kollegen Vera Boege, Simona Cerrone, Martina Henn-Sax, Stefan Hettwer, Birte Höcker, Andreas Ivens, Catharina Jürgens und Steffen Schmidt für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und für die gute Arbeitsatmosphäre.

Last but not least danke ich meinem Mann Nikolas dafür, daß er in allen Lebenslagen zu mir gehalten hat, für sein Verständnis und seine Liebe.

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

Teilpublikation:

Höcker, B., Beismann-Driemeyer, S., Hettwer, S., Lustig, A. und Sterner, R. (2001). „Dissection of a $(\beta/\alpha)_8$-barrel enzyme into two folded halves". *Nature Structural Biology*, **8**(1), 32-36.

Lebenslauf

Silke Beismann-Driemeyer,geboren am 23.12.1970 in Preetz/Holstein

Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Schulausbildung

1977-1981	Hermann-Ehlers-Grundschule in Preetz
1981-1991	Friedrich-Schiller-Gymnasium in Preetz
Juni 1991	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1991-1997	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität zu Göttingen
1994-1995	Teilnahme am ERASMUS-Programm. Studium der Biologie am Trinity College/ Dublin
Sept. 1996	Diplomprüfungen in Botanik (Hauptfach), Mikrobiologie und organischer Chemie
Dez. 1996- Aug. 1997	Diplomarbeit bei Prof. Dr. D. G. Robinson am Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften der Universität Göttingen, Abteilung Strukturelle Zellphysiologie. Thema der Arbeit: Versuche zur Charakterisierung von Tonoplastenproteinen aus Erbsenkotyledonen
Sept. 1997	Diplom in Biologie
Jan. 1998-Okt. 2000	experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation bei Prof. Dr. Reinhard Sterner am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie der Universität Göttingen, seit Februar 2000 am Institut für Biochemie der Albertus-Magnus-Universität zu Köln