

**Evolution und Regulation von Protein-Protein Interaktionen
in zwei Glutamin-Amidotransferasen aus der
Biosynthese von Histidin und Tryptophan**

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



vorgelegt von
Michaela C. Häger aus Mainz

Juni 2005

Promotionsgesuch eingereicht am: 22.Juni 2005
Kolloquium am: 09.August 2005

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. R. Baumann
Prof. Dr. R. Sterner
Prof. Dr. H. Tschochner
Prof. Dr. R. Wirth

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2002 bis Juni 2004 am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln und von Juni 2004 bis Juni 2005 am Lehrstuhl Biochemie II des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät II der Universität zu Regensburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VII
FORMELVERZEICHNIS	IX
ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	4
1A. FUNKTIONELLE BEDEUTUNG UND NACHWEIS VON PROTEIN-PROTEIN INTERAKTIONEN.....	4
1B. STRUKTURELLE GRUNDLAGE VON PROTEIN-PROTEIN INTERAKTIONEN.....	6
2A. DIE FAMILIE DER GLUTAMIN-AMIDOTRANSFERASEN (GATASEN).....	8
2B. EVOLUTION VON GLUTAMIN-AMIDOTRANSFERASEN.....	9
3A. DIE IMIDAZOLGLYCERINPHOSPHAT -SYNTHASE, EINE GATASE AUS DER HISTIDIN-BIOSYNTHESE	11
3B. DIE ANTHRANILAT -SYNTHASE, EINE GATASE AUS DER TRYPTOPHAN-BIOSYNTHESE	13
3C. VERGLEICH DER IMIDAZOLGLYCERINPHOSPHAT -SYNTHASE AUS <i>THERMOTOGA MARITIMA</i> UND DER ANTHRANILAT -SYNTHASE AUS <i>SULFOLOBUS SOLFATARICUS</i>	14
2 ZIELSETZUNG	17
3 MATERIAL	19
3.1 GERÄTE.....	19
3.2 CHEMIKALIEN	21
3.3 KITS.....	22
3.4 ENZYME.....	22
3.5 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	23
3.6 BAKTERIEN- UND HEFESTÄMME	24
3.7 VEKTOREN	25
3.7.1 <i>pET 11c</i>	25
3.7.2 <i>pDS56/RBSII/SphI</i>	26
3.7.3 <i>pQE70</i>	26
3.7.4 <i>pTNA</i>	27
3.7.5 <i>pGAD424</i>	28
3.7.6 <i>pAS2-1</i>	28
3.8 OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE	29
3.9 DNA -LÄNGENSTANDARD.....	33
3.10 PROTEIN-STANDARD.....	33
3.11 PUFFER UND LÖSUNGEN	34
3.11.1 Für Arbeiten mit DNA :	34
3.11.2 Für Arbeiten mit <i>E. coli</i> :.....	34
3.11.3 Für Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i> :	35
3.11.4 Für Agarose-Gelelektrophorese :	36
3.11.5 Für Polyacrylamid-Gelelektrophorese (denaturierend und nativ):.....	36
3.11.6 Für Arbeiten mit Proteinen:.....	38
3.12 NÄHRMEDIEN FÜR <i>E. COLI</i>	39
3.13 NÄHRMEDIEN FÜR <i>S. CEREVISIAE</i>	39
3.14 SOFTWARE.....	40
4 METHODEN	42
4.1 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....	42
.....	42

4.1.1	<i>Sterilisation von Lösungen, Nährmedien und Geräten</i>	42
4.1.2	<i>Vermehrung von E. coli Kulturen</i>	42
4.1.3	<i>Lagerung von Mikroorganismen (Glycerinkulturen)</i>	42
4.1.4	<i>Abtöten von Mikroorganismen</i>	42
4.1.5	<i>Transformation von E. coli</i>	42
4.1.6	<i>Isolierung genomischer DNA</i>	44
4.1.7	<i>Präparation kompetenter S. cerevisiae Zellen</i>	44
4.1.8	<i>LiAc-Transfektion von S. cerevisiae Zellen und Überprüfung mittels Auxotrophie-Marker</i>	45
4.1.9	<i>Qualitativer Interaktions-Assay mittels Interaktions-Marker (yeast-2-hybrid)</i>	45
4.1.10	<i>Quantitativer Interaktions-Assay mittels Chlor-Phenol-Red-b-D-Galactopyranosid (CPRG)</i>	47
4.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	48
4.2.1	<i>Bestimmung von DNA-Konzentrationen</i>	48
4.2.2	<i>Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Standard- und touchdown-PCR</i>	48
4.2.3	<i>Gerichtete Mutagenese mittels SOE (overlap-extension) PCR</i>	50
4.2.4	<i>Kolonie-PCR</i>	51
4.2.5	<i>Isolierung von Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken</i>	52
4.2.6	<i>Isolierung von Plasmid-DNA zu präparativen Zwecken</i>	52
4.2.7	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	52
4.2.8	<i>Hydroxyethylcellulose (HEC) -Agarose-Gelelektrophorese</i>	53
4.2.9	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	53
4.2.10	<i>Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen</i>	53
4.2.11	<i>Ligation</i>	54
4.2.12	<i>DNA-Sequenzierung</i>	54
4.3	PRÄPARATIVE PROTEINCHEMISCHE METHODEN	55
4.3.1	<i>Genexpression und Proteinreinigung</i>	55
4.3.2	<i>Analytische Expression</i>	55
4.3.3	<i>Präparative Expression</i>	56
4.3.4	<i>Anionenaustausch-Chromatographie</i>	57
4.3.5	<i>Adsorptions-Chromatographie (Hydroxylapatit)</i>	57
4.3.6	<i>Präparative Gelfiltration</i>	58
4.3.7	<i>Ammoniumsulfat-Präzipitation</i>	58
4.3.8	<i>Rückfaltung von Proteinen</i>	59
4.3.9	<i>Dialyse von Proteinlösungen</i>	60
4.3.10	<i>Einkonzentrieren von Proteinlösungen</i>	60
4.3.11	<i>Lagerung</i>	60
4.3.12	<i>Synthese von ProFAR</i>	60
4.4	BIOPHYSIKALISCHE METHODEN ZUR PROTEINCHARAKTERISIERUNG	62
4.4.1	<i>Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen</i>	62
4.4.2	<i>Biorad-Assay zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen</i>	63
4.4.3	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	64
4.4.4	<i>Tris-Tricin-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	65
4.4.5	<i>Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	65
4.4.6	<i>Limitierte Proteolyse mit Trypsin</i>	66
4.4.7	<i>Analytische Gelfiltration</i>	67
4.4.8	<i>Fluoreszenzspektroskopie</i>	67
4.4.9	<i>Fluorimetrische Titration von HisH und HisF</i>	68
4.4.10	<i>Circular-Dichroismus</i>	69
4.4.11	<i>Steady-state Enzymkinetiken</i>	71
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	75
KAPITEL 1: DIE ENZYME HISH, HISF UND TRPG AUS THERMOTOGA MARITIMA		75
5.1.1	<i>DALI-Suche zur Identifizierung von Proteinen mit signifikanter Strukturähnlichkeit zu HisH</i>	75
5.1.2	<i>Analyse der Proteine HisH, HisF und TrpG aus T. maritima und ihrer Kontaktflächen</i>	77
5.1.3	<i>Zusammenfassung</i>	82
5.2	KAPITEL 2: DIE REGULATION DER PROTEIN-PROTEIN WECHSELWIRKUNGEN IM BI-ENZYMKOMPLEX HISH:HISF	83
5.2.1	<i>Der Bi-Enzymkomplex aus HisH und HisF</i>	83
5.2.2	<i>Vergleich von Kristallstrukturen des HisH:HisF Komplexes mit Liganden</i>	83
5.2.3	<i>Mutationsanalyse der HisH:HisF Kontaktfläche</i>	89
5.2.4	<i>Auswahl der auszutauschenden Aminosäuren in HisH an der Kontaktfläche zu HisF</i>	90
5.2.5	<i>Auswahl der auszutauschenden Aminosäuren in HisF an der Kontaktfläche zu HisH</i>	96
5.2.6	<i>Gerichtete Mutagenese zur Herstellung der hisH- und hisF- Genkonstrukte</i>	97

5.2.7	Herstellung der HisF und HisH Varianten durch heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> und Proteinreinigung.....	98
5.2.8	Expression der hisF Konstrukte.....	98
5.2.9	Expression der hisH Konstrukte.....	100
5.2.10	Strukturelle Charakterisierung der HisF Varianten.....	102
5.2.11	Strukturelle Charakterisierung der HisH Varianten.....	104
5.2.12	Funktionelle Charakterisierung der HisH und HisF Varianten durch steady-state Enzymkinetiken 111	
5.2.13	Zusammenfassung.....	120
5.3	KAPITEL 3: DIE CHARAKTERISIERUNG DER GLUTAMINASE TRPG AUS <i>THERMOTOGA MARITIMA</i>	123
5.3.1	TrpG, die Glutaminase der Anthranilat-Synthase, aus <i>Thermotoga maritima</i>	123
5.3.2	Klonierung von trpG aus <i>Thermotoga maritima</i>	124
5.3.3	Expression von trpG und Reinigung des Proteinproduktes.....	126
5.3.4	Biophysikalische Charakterisierung von TrpG.....	126
5.3.5	Vorhersage der Tertiärstruktur von TrpG aus <i>T. maritima</i> mit SWISS Model.....	128
5.3.6	Zusammenfassung.....	131
5.4	KAPITEL 4: DIE EVOLUTION DER GLUTAMIN-AMIDOTRANSFERASEN (GATASEN).....	132
5.4.1	Vergleich der GATasen HisH und TrpG.....	132
5.4.2	Wahl der zu untersuchenden Aminosäure-stretches.....	133
5.4.3	Herstellung der Genkonstrukte.....	133
5.4.4	Das yeast-2-hybrid System zur Untersuchung der Komplexbildung in vivo.....	135
5.4.5	Heterologe Genexpression der trpG-Varianten und Reinigung der Proteinprodukte.....	137
5.4.6	Strukturelle Charakterisierung der TrpG stretch Varianten.....	140
5.4.7	Untersuchung auf stabile Interaktion mit HisF.....	142
5.4.8	Untersuchung auf funktionelle Interaktion mit HisF.....	145
5.4.9	Übersicht über die Ergebnisse der TrpG stretch Varianten.....	147
5.4.10	Zusammenfassung.....	150
6	ABSCHLIEßENDE DISKUSSION.....	151
6.1	STRUKTUR UND FUNKTION DER IMIDAZOLGLYCERINPHOSPHAT -SYNTHASE.....	151
6.2	DIE EVOLUTION DER GATASEN.....	155
7	LITERATUR.....	158
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	182
9	ANHANG.....	188
9.1	NUKLEOTIDSEQUENZEN DER VERWENDETEN GENE AUS <i>THERMOTOGA MARITIMA</i>	188
9.2	AMINOSÄURESEQUENZEN VON HISH, HISF UND TRPG AUS <i>THERMOTOGA MARITIMA</i> MIT SEKUNDÄRSTRUKTURELEMENTEN.....	189
9.3	ALIGNMENT VON <i>tmTRPG</i> MIT <i>tmHISH</i>	190
9.4	CHARAKTERISTISCHE GRÖßEN DER UNTERSUCHTEN WILDTYPISCHEN GENE / ENZYME VON <i>THERMOTOGA MARITIMA</i>	191
9.5	DATEN ZUR BESTIMMUNG DER PROFAR-KONZENTRATION / -REINHEIT.....	192
9.6	PROGRAMME DER SÄULEN-CHROMATOGRAPHIE.....	193
9.7	KALIBRIERUNG DER ANALYTISCHEN GELFILTRATIONSSÄULE SUPERDEX 75.....	195
10	KURZZUSAMMENFASSUNG.....	196
11	ABSTRACT.....	197
12	DANKSAGUNG.....	198
13	LEBENS LAUF.....	200

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1: MODULARE STRUKTUR UND ALLGEMEINES REAKTIONSSCHEMA DER GLUTAMIN-AMIDOTRANSFERASEN (GATASEN)	8
ABBILDUNG 1.2: DIE HISTIDIN-BIOSYNTHESE.....	11
ABBILDUNG 1.3: KATALYSIERTE REAKTION DER ANTHRANILAT-SYNTHESE (TRPG:TRPE KOMPLEX).....	13
ABBILDUNG 1.4: SCHEMATISCHER VERGLEICH BEKANNTER QUARTÄRSTRUKTUREN DER ANTHRANILAT-SYNTHESE	14
ABBILDUNG 1.5: VERGLEICH DER STRUKTUREN VON IMIDAZOLGLYCERINPHOSPHAT-SYNTHESE UND ANTHRANILAT-SYNTHESE.....	15
ABBILDUNG 1.6: TRPG UND HISH WEISEN ÄHNLICHE RAUMSTRUKTUREN UND IDENTISCHE AKTIVE ZENTREN AUF..	16
ABBILDUNG 3.3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PDS-PDM- (A) UND DES PET- EXPRESSIONSSYSTEMS (B)	27
ABBILDUNG 4.1: DAS <i>YEAST-2-HYBRID</i> SYSTEM DETEKTIERT KOMPLEXBILDUNG ZWISCHEN ZWEI PROTEINEN <i>IN VIVO</i>	46
ABBILDUNG 4.2: PRINZIP DER SOE-PCR	51
ABBILDUNG 4.3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VORGEHENSWEISE BEI ANALYTISCHER GENEXPRESSION.....	56
ABBILDUNG 4.4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER GLUTAMINABHÄNGIGEN KOMPLEXREAKTION (A), DER AMMONIUMABHÄNGIGEN HISF-TEILREAKTION (B), SOWIE DER GLUTAMINASE-HISH-TEILREAKTION (C).....	71
ABBILDUNG 5.1: DIE AMINOSÄURE-ZUSAMMENSETZUNG VON HISH UND HISF ALS GANZES UND IHRER OBERFLÄCHEN	79
ABBILDUNG 5.2: DIE AMINOSÄURE-ZUSAMMENSETZUNG VON HISH UND HISF AN DER KONTAKTFLÄCHE.....	79
ABBILDUNG 5.3: DIE AMINOSÄURE-ZUSAMMENSETZUNGEN VON <i>TM</i> HISH, <i>TM</i> HISF UND <i>TM/ss</i> TRPG SIND ÄHNLICH	80
ABBILDUNG 5.4: DER CHEMISCHE CHARAKTER DER AMINOSÄUREN AN DER KONTAKTFLÄCHE VON HISH UND TRPG UND DAS MUSTER IHRER KONSERVIERUNG SIND IDENTISCH.....	80
ABBILDUNG 5.5: RÖNTGENSTRUKTUREN VON HISH:HISF AUS <i>T. MARITIMA</i> MIT VERSCHIEDENEN LIGANDEN.....	84
ABBILDUNG 5.6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VIER <i>LAYER</i>	85
ABBILDUNG 5.7: DIE BINDUNG VON GLUTAMIN AN HISH ÖFFNET DEN AMMONIAK-KANAL IM INNEREN DES FASSES VON HISF.	86
ABBILDUNG 5.8: POSITION DER IN HISH GEGEN ALANIN AUSGETAUSCHTEN RESTE AN DER KONTAKTFLÄCHE ZU HISF	90
ABBILDUNG 5.9: DIE INTERMOLEKULAREN WASSERSTOFFBRÜCKEN VON HISH_R117 ÄNDERN SICH BEI GLUTAMIN-BINDUNG.....	91
ABBILDUNG 5.10: DIE INTERMOLEKULAREN WASSERSTOFFBRÜCKEN VON HISH_N124 ÄNDERN SICH BEI GLUTAMIN-BINDUNG.....	92
ABBILDUNG 5.11: DIE INTERMOLEKULAREN WASSERSTOFFBRÜCKEN VON HISH_Y138 ÄNDERN SICH BEI GLUTAMIN-BINDUNG.....	93
ABBILDUNG 5.12: DIE INTERMOLEKULAREN WASSERSTOFFBRÜCKEN VON HISH_S183 ÄNDERN SICH BEI GLUTAMIN-BINDUNG.....	94
ABBILDUNG 5.13: AMINOSÄURESEQUENZ VON HISH.....	95

ABBILDUNG 5.14: POSITION DER <i>STRETCHES</i> IN <i>HISH</i> , DIE GEGEN ENTSPRECHENDE SEQUENZABSCHNITTE AUS <i>TRPG</i> AUSGETAUSCHT WURDEN	95
ABBILDUNG 5.15: DURCH DEN AUSTAUSCH VON THR78 GEGEN DIE VOLUMINÖSERE AMINOSÄURE METHIONIN IN EBENE 3 SOLL DER AMMONIAK-KANAL VERENGT WERDEN.....	97
ABBILDUNG 5.16: NACH DER REINIGUNG LAGEN <i>HISF_WT</i> UND DIE VARIANTEN T78M UND Q123A ALS LÖSLICHE UND HOCHKONZENTRIERTE PROTEINE VOR.....	99
ABBILDUNG 5.17: HERSTELLUNG VON <i>HISH_R117A_B7</i> MITTELS HETEROLOGER GENEXPRESSION IN <i>E. COLI</i> UND ERSTE REINIGUNG ÜBER HITZESCHRITT.....	100
ABBILDUNG 5.18: NACH DER REINIGUNG LAGEN <i>HISH_WT</i> UND SÄMTLICHEN ALANIN-, SOWIE <i>STRETCH</i> VARIANTEN ALS LÖSLICHE UND HOCHKONZENTRIERTE PROTEINE VOR.....	101
ABBILDUNG 5.19: <i>HISF</i> UND <i>HISF_T78M</i> WEISEN KEINE MESSBAREN ÄNDERUNGEN IN DEN SEKUNDÄR- UND TERTIÄRSTRUKTUREN AUF.....	103
ABBILDUNG 5.20: <i>HISH_WT</i> UND DIE <i>HISH</i> ALANIN- UND <i>STRETCH</i> VARIANTEN SIND RESISTENT GEGEN PROTEOLYTISCHEM VERDAU DURCH TRYPSIN.....	105
ABBILDUNG 5.21: NATIVE PAGE BELEGT DIE KOMPLEXBILDUNG ZWISCHEN <i>HISH_WT</i> , SOWIE DEN ALANIN- UND <i>STRETCH</i> VARIANTEN MIT <i>HISF</i>	107
ABBILDUNG 5.22: FLUORESCENZSPEKTROSKOPIE BELEGT DIE KOMPLEXBILDUNG VON <i>HISH_B7</i> UND <i>HISH_B9</i> MIT <i>HISF</i>	109
ABBILDUNG 5.23: FLUORESCENZ-TITRATION BELEGT DIE AUSBILDUNG VON 1:1 KOMPLEXEN ZWISCHEN <i>HISH_Y138A</i> UND <i>HISF</i>	109
ABBILDUNG 5.24: RIBBONDIAGRAMM DES <i>HISH:HISF</i> KOMPLEXES MIT DEN VON IHM KATALYSIERTEN REAKTIONEN.	111
ABBILDUNG 5.25: DURCH DEN AUSTAUSCH VON <i>STRETCH 7</i> WIRD AUS EINER KONDITIONALE EINE KONSTITUTIVE GLUTAMINASE.....	120
ABBILDUNG 5.26: IN VERSCHIEDENEN ORGANISMEN LIEGT <i>TRPG</i> FUSIONIERT MIT <i>TRPE</i> , <i>TRPD</i> , UND <i>TRPC</i> VOR..	124
ABBILDUNG 5.27: DAS FUSIONSPROTEIN AUS <i>TRPG</i> UND <i>TRPD</i> AUS <i>THERMOTOGA MARITIMA</i> LÄSST SICH DURCH TRYPSINVERDAU IN ZWEI STABILE UND KATALYTISCH AKTIVE DOMÄNEN TRENNEN.....	125
ABBILDUNG 5.28: TRYPSIN SCHNEIDET EXAKT AN DER POSTULIERT EN DOMÄNENGRENZE VON <i>TRPG</i> UND <i>TRPD</i> ..	125
ABBILDUNG 5.29: HERSTELLUNG VON <i>TMTRPG</i> MITTELS HETEROLOGER GENEXPRESSION IN <i>E. COLI</i> UND ANREICHERUNG MITTELS HITZEFALLUNG MESOPHILER WIRTSPROTEINE.....	126
ABBILDUNG 5.30: DIE FERN- (A) UND NAH- (B) UV-CD-SPEKTREN BELEGEN FÜR <i>TRPG</i> EINE WOHLDEFINIERT E SEKUNDÄR- UND TERTIÄRSTRUKTUR.....	127
ABBILDUNG 5.31: ANALYTISCHE GELFILTRATION (SUPERDEX 75) WEIST <i>TRPG</i> ALS SAUBERES DIMERES PROTEIN AUS (A), WELCHES NICHT MIT <i>HISF</i> INTERAGIERT (B).....	128
ABBILDUNG 5.32: DIE NATIVE PAGE LIEFERT KEINEN HINWEIS AUF KOMPLEXBILDUNG ZWISCHEN <i>TRPG</i> UND <i>HISF</i>	128
ABBILDUNG 5.33: AUS DER TERTIÄRSTUKTURVORHERSAGE MIT SWISS MODEL ABGELEITETE SEKUNDÄRSTRUKTURVORHERSAGE FÜR <i>TRPG</i>	129
ABBILDUNG 5.34: ERGEBNIS DER TERTIÄRSTRUKTURVORHERSAGE FÜR <i>TMTRPG</i> MIT SWISS MODEL IN RIBBONDARSTELLUNG.....	130
ABBILDUNG 5.35: DIE MODELLIERTE STRUKTUR VON <i>TMTRPG</i> IST DER STRUKTUR VON <i>TMHISH</i> SEHR ÄHNLICH..	130
ABBILDUNG 5.36: <i>TRPG</i> ZEIGT IM CPRG-A SSAY KEINE INTERAKTION MIT <i>HISF</i>	136

ABBILDUNG 5.37: DIE VARIANTEN TRPG_B5, TRPG_B6, SOWIE DIE HISH_TRPG-CHIMÄRE INTERAGIEREN <i>IN VIVO</i> NICHT MIT HISF.....	137
ABBILDUNG 5.38: HERSTELLUNG VON TRPG_B7 MITTELS HETEROLOGER GENEXPRESSION IN <i>E. COLI</i> UND ANREICHERUNG MITTELS HITZEFALLUNG MESOPHILER WIRTSPROTEINE.....	138
ABBILDUNG 5.39: DIE TRPG_HISH CHIMÄRE KONNTE NICHT LÖSLICH EXPRIMIERT WERDEN.....	139
ABBILDUNG 5.40: NACH DER REINIGUNG LAGEN TRPG_WT UND VARIANTE ALS LÖSLICHE, REINE UND HOCHKONZENTRIERTE PROTEINE VOR.....	140
ABBILDUNG 5.41: DER AUSTAUSCH VON β -STRANG 6 AUS TRPG GEGEN β -STRANG 6 AUS HISH FÜHRT ZU KEINER MESSBAREN ÄNDERUNGEN DER SEKUNDÄR- UND TERTIÄRSTRUKTUR.....	141
ABBILDUNG 5.42: NATIVE PAGE LIEFERT KEINEN HINWEIS AUF EINE KOMPLEXBILDUNG ZWISCHEN TRPG <i>STRETCH</i> VARIANTEN UND HISF.....	144
ABBILDUNG 5.43: FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE LIEFERT KEINEN HINWEIS AUF EINE KOMPLEXBILDUNG ZWISCHEN TRPG_B6 UND HISF.....	145
ABBILDUNG 5.44: TRPG_B7 IST IM GEGENSATZ ZU WILD-TYPISCHEM TRPG EINE KONSTITUTIVE GLUTAMINASE	146

Tabellenverzeichnis

TABELLE 4.1: ÜBERSICHT ÜBER MENGE AN AMMONIUMSULFAT , DIE FÜR VERSCHIEDENE SÄTTIGUNGSGRADEN BENÖTIGT WIRD.....	59
TABELLE 4.2: HALBWERTSZEITEN ($T_{1/2}$) VON PROFAR BEI PH 7,5 UND UNTERSCHIEDLICHEN TEMPERATUREN.....	61
TABELLE 4.3: ZUSAMMENSETZUNG VON SAMMEL- UND TRENNGEL DER SDS-GELE.....	64
TABELLE 4.4: ZUSAMMENSETZUNG VON SAMMEL- UND TRENNGEL DER TRIS-TRICIN-GELE.....	65
TABELLE 4.5: ZUSAMMENSETZUNG VON SAMMEL- UND TRENNGEL DER NATIVEN GELE.....	66
TABELLE 5.1: DIE DALI-SUCHE MIT HISH AUS <i>THERMOTOGA MARITIMA</i> (1K9V) IDENTIFIZIERT SIGNIFIKANTE STRUKTURÄHNLICHKEITEN ZUM HISH:HISF HOMOLOGEN HIS7 AUS HEFE UND ZU ANDEREN GLUTAMINASEN.....	76
TABELLE 5.2: GEGENÜBERSTELLUNG DER AMINOSÄURE-ZUSAMMENSETZUNG VON <i>TM</i> HISF, <i>TM</i> HISH UND <i>TM</i> /SSTRPG IM GANZEN, SOWIE AN IHREN OBER- UND KONTAKTFLÄCHEN.....	78
TABELLE 5.3: INTERMOLEKULARE WASSERSTOFFBRÜCKEN ZWISCHEN HISH UND HISF IN DER HISH:HISF APO-STRUKTUR IM VERGLEICH ZUR GLUTAMIN- GEBUNDENEN STRUKTUR.....	86
TABELLE 5.4: SALZBRÜCKEN AM CLUSTER IN EBENE 4 VON HISF IN DER HISH:HISF APO-STRUKTUR IM VERGLEICH ZUR GLUTAMIN- GEBUNDENEN STRUKTUR.....	87
TABELLE 5.5: WASSERSTOFFBRÜCKEN ZWISCHEN HISH_R117 UND AMINOSÄUREN AUS HISF.....	91
TABELLE 5.6: WASSERSTOFFBRÜCKEN ZWISCHEN HISH_N124 UND AMINOSÄUREN AUS HISF.....	92
TABELLE 5.7: WASSERSTOFFBRÜCKEN ZWISCHEN HISH_Y138 UND AMINOSÄUREN AUS HISH UND HISF.....	93
TABELLE 5.8: WASSERSTOFFBRÜCKEN ZWISCHEN HISH_S183 UND AMINOSÄUREN AUS HISF ANGEGEBEN SIND JEWEILS DIE ABSTÄNDE ZWISCHEN H-DONOR UND H-AKZEPTOR. DIE IN KLAMMERN AUFGEFÜHRTEN ABSTÄNDE SIND ZU GROß FÜR DIE AUSBILDUNG EINER WASSERSTOFFBRÜCKE.....	94
TABELLE 5.9: ÜBERSICHT ÜBER DIE WICHTIGSTEN PARAMETER BEI DER HERSTELLUNG DER HISF VARIANTEN.....	99
TABELLE 5.10: ÜBERSICHT ÜBER DIE WICHTIGSTEN PARAMETER BEI DER HERSTELLUNG DER HISH VARIANTEN..	101
TABELLE 5.11: FLUORESZENZEMISSIONS-SPEKTREN DER HISF VARIANTEN.....	102
TABELLE 5.12: CHARAKTERISTISCHE EIGENSCHAFTEN DER FERN-UV CD-SPEKTREN VON HISF UND DER VARIANTEN HISH_Q123A UND _T78M.....	103
TABELLE 5.13: FLUORESZENZEMISSIONS-SPEKTREN DER HISH VARIANTEN.....	104
TABELLE 5.14: OLIGOMERISIERUNGSZUSTAND DER HISH VARIANTEN.....	106
TABELLE 5.15: ANALYTISCHE GELFILTRATION BELEGT DIE KOMPLEXBILDUNG ZWISCHEN DEN HISH VARIANTEN UND HISF.....	107
TABELLE 5.16: DIE KOMPLEXBILDUNG ZWISCHEN DEN HISH VARIANTEN UND HISF KANN ÜBER EINE ERNIEDRIGUNG DES FLUORESZENZEMISSIONSMAXIMUMS VON TRP 123 AUS HISH NACHGEWIESEN WERDEN.....	108
TABELLE 5.17: <i>STEADY-STATE</i> ENZYMKINETISCHE KONSTANTEN DER GLUTAMINABHÄNGIGEN GESAMTREAKTION DES WILDTPISCHEN HISH:HISF KOMPLEXES UND DER VARIANTEN.....	113
TABELLE 5.18: <i>STEADY-STATE</i> ENZYMKINETISCHE KONSTANTEN DER AMMONIUMABHÄNGIGEN HISF-TEILREAKTION DES WILDTPISCHEN HISH:HISF KOMPLEXES UND DER VARIANTEN.....	114

TABELLE 5.19: <i>STEADY-STATE</i> ENZYMKINETISCHE KONSTANTEN DER GLUTAMINASE-HISH-TEILREAKTION DES WILDTYPISCHEN HISH:HISF KOMPLEXES UND DER VARIANTEN.....	115
TABELLE 5.20: GEMEINSAMKEITEN UND UNTERSCHIEDE DER BEIDEN GLUTAMINASEN HISH UND TRPG.....	132
TABELLE 5.21: EXPRESSIONSTEMPERATUR, HITZESCHRITT UND AUSBEUTE BEI DER REINIGUNG DER TRPG <i>STRETCH</i> VARIANTEN.....	139
TABELLE 5.22: OLIGOMERISIERUNGSZUSTAND DER TRPG <i>STRETCH</i> VARIANTEN.....	141
TABELLE 5.23: ANALYTISCHE GELFILTRATION LIEFERT KEINEN HINWEIS AUF EINE KOMPLEXBILDUNG ZWISCHEN DEN TRPG <i>STRETCH</i> VARIANTEN UND HISF.	144
TABELLE 5.24: DER „MOLEKULARE SCHALTER“ ZUR REGULATION DER GLUTAMINASE-AKTIVITÄTEN VON TRPG UND HISH LIEGT JEWEILS IN β -STRANG 7.....	147
TABELLE 5.25: GEGENÜBERSTELLUNG DER EIGENSCHAFTEN VON HISH, WILDTYPISCHEM TRPG UND DEN TRPG <i>STRETCH</i> VARIANTEN.....	148

Formelverzeichnis

FORMEL 1: BERECHNUNG DER TRANSFORMATIONS-EFFIZIENZ.....	44
FORMEL 2: BESTIMMUNG DER DNA-KONZENTRATION AUS DER OD_{260}	48
FORMEL 3: BERECHNUNG DER SCHMELZTEMPERATUR EINES OLIGONUKLEOTIDES.....	49
FORMEL 4: BERECHNUNG DER OPTIMALEN <i>ANNEALING</i> -TEMPERATUR EINER PCR-REAKTION	49
FORMEL 5: DAS LAMBERT -BEERSCHE GESETZ.....	62
FORMEL 6: BERECHNUNG DES MOLAREN EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN ϵ_{280} AUS DER AMINOSÄURE-SEQUENZ EINES PROTEINS.....	62
FORMEL 7: BERECHNUNG DES SPEZIFISCHEN EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN $^{0,1\%} A_{280}$	63
FORMEL 8: BERECHNUNG DER PROTEINMENGE AUS DER ABSORPTION BEI 595NM IM BRADFORD-ASSAY.....	63
FORMEL 9: BERECHNUNG DER DURCHSCHNITTLICHEN ELLIPTIZITÄT PRO AMINOSÄURE AUS DER ÜBER CIRCULAR- DICHROISMUS GEMESSENE ELLIPTIZITÄT	70

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Evolution und Regulation von Protein-Protein Wechselwirkungen am Beispiel der Glutamin-Amidotransferasen (GATasen) untersucht. Die Bi-Enzymkomplexe aus der Familie der GATasen bestehen jeweils aus einer Synthase und einer Glutaminase und sind für den Einbau von Stickstoff in den Biosynthesen von Nukleotiden, Aminosäuren, Coenzymen und Antibiotika verantwortlich.

Es wurde mit der Imidazolglycerinphosphat-Synthase (ImGP-S; 1:1 Komplex aus der Glutaminase HisH und der Synthase HisF) aus der Biosynthese des Histidin und der Anthranilat-Synthase (AS; 2:2 Komplex aus der Glutaminase TrpG und der Synthase TrpE) aus der Biosynthese des Tryptophan gearbeitet. Beide Enzyme stammen aus dem hyperthermophilen Organismus *Thermotoga maritima*.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Regulation und der wechselseitigen Aktivierung der Aktivitäten im HisH:HisF Komplex. HisH gehört zur Klasse I der Glutaminasen mit einer $\alpha\beta$ -Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade (Cys-His-Glu). HisF ist ein $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzym, welches mit der N-terminalen Seite des Fasses mit HisH interagiert. Es war bekannt, dass die Bindung des HisF Substrates PRFAR (N'-[(5'-phosphoribulosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid) zur Hydrolyse von Glutamin am 25 Å entfernten aktiven Zentrum von HisH führt und der dabei erzeugte Ammoniak durch einen hydrophoben Kanal, der das Innere des β -Fasses von HisF mit einschließt, zu dessen aktivem Zentrum wandert. Dort reagiert er mit PRFAR zu den Produkten ImGP und AICAR (5'-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid).

Es sollten Aminosäuren an der Kontaktfläche der beiden Untereinheiten identifiziert werden, die an deren wechselseitiger Aktivierung bzw. Kommunikation zwischen HisH und HisF beteiligt sind. Dazu wurden zunächst in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Matthias Wilmanns am EMBL Hamburg mehrere Kristallstrukturen von ligandiertem HisH:HisF Komplex mit einer Auflösung von 2,4-2,84 Å aufgeklärt. Dabei handelt es sich um Strukturen mit (1) dem HisH-Substrat Glutamin, (2) dem HisH-Substrat Glutamin zusammen mit dem HisF-Produkt ImGP, (3) dem HisH-Produkt Glutamat und (4) dem HisF-Produkt AICAR. Aus dem Vergleich der apo- mit der Glutamin-gebundenen Struktur wurden vier Aminosäuren in HisH identifiziert (R117, N124, Y138 und S183), die ligandenabhängige Unterschiede in ihrer Konformation oder der Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrücken zeigen, und gegen Alanin ausgetauscht. Ebenso wurde das streng konservierte HisF_Q123 an der Kontaktfläche zu

HisH durch Alanin ersetzt. Darüber hinaus wurde HisF_T78 im Ammoniak-Kanal gegen die voluminösere Aminosäure Methionin ausgetauscht. Parallel dazu wurden in HisH ganze Sekundärstrukturelemente (β -Strang 5, 6, 7, 9, α -Helix 5) mit konservierten Aminosäuren an der Kontaktfläche zu HisF durch die entsprechenden Abschnitte aus TrpG ersetzt (*stretch* Varianten HisH_b5, _b6, _b7, _b9, _a5). So sollte die wildtypische Faltung erhalten werden, da im Rahmen dieser Arbeit durch Sequenz- und Strukturvergleiche festgestellt wurde, dass HisH der Glutaminase TrpG sehr ähnlich ist.

Sämtliche HisH und HisF Varianten wurden durch heterologe Genexpression in *Escherichia coli* hergestellt, gereinigt und biochemisch charakterisiert. Inkubation mit Trypsin und spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Varianten sehr stabil sind und native Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbilden. Durch native Polyacrylamidelektrophorese und analytische Gelfiltration wurde nachgewiesen, dass sie stabile 1:1 HisH:HisF Komplexe mit dem wildtypischen Partnerprotein bilden. Die funktionelle Bedeutung der ausgetauschten Aminosäuren wurde mittels *steady-state* Enzymkinetik analysiert. Die Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von HisF_Q123 an der Bindung, nicht jedoch an der Hydrolyse von Glutamin an HisH hin. Dagegen spielen HisH_R117A und HisH_N124A bei der Gesamtreaktion und der Kommunikation zwischen den aktiven Zentren eine wichtige Rolle. Vermutlich geht dies auf die Induktion weit reichender Konformationsänderungen von der Kontaktfläche über das N terminale Ende des zentralen β -Fasses von HisF zu dessen aktiven Zentrum zurück, welche die Stärke und die Produktivität der Bindung von PRFAR beeinträchtigen.

Der Austausch von β -Strang 7 gegen den entsprechenden Abschnitt von TrpG führte dazu, dass aus der konditionalen Glutaminase HisH die konstitutive Glutaminase HisH_b7 wurde, deren Aktivität nicht länger von der Bindung eines Liganden an das aktive Zentrum von HisF abhängt. Der dafür hauptsächlich verantwortliche Rest ist HisH_Y138, dem somit eine entscheidende Rolle in der Regulation der Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Glutaminase und Synthase zukommt. Dies hat vermutlich mit seiner zentralen Position als Brückenrest zwischen der katalytischen Triade von HisH und dem β -Fass von HisF zu tun.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde wildtypisches TrpG biochemisch charakterisiert und seine evolutive Verwandtschaft zu HisH näher untersucht.

In *T.maritima* ist TrpG mit TrpD fusioniert. Die TrpG Domäne wurde durch heterologe Genexpression in *E. coli* hergestellt, gereinigt und charakterisiert. TrpG ist ein stabiles, dimeres Protein mit definierter Sekundär- und Tertiärstruktur. Bislang ist die Röntgenstruktur von TrpG

aus *T.maritima* nicht bekannt. Mittels des online verfügbaren Programm SWISS Model konnten jedoch zuverlässige Vorhersagen zur Sekundär- und Tertiärstruktur gemacht werden. Die für TrpG modellierte Struktur lässt sich sehr gut mit HisH zur Deckung bringen, wobei ein rmsd Wert von nur 1,16 Å für die überlagerten C α Atome ermittelt wurde.

Analog zu den oben beschriebenen HisH *stretch* Varianten wurden an der Kontaktfläche von TrpG größere Sequenzabschnitte einzeln und in Kombination durch die entsprechende Sequenzabschnitte aus HisH ersetzt. Dadurch sollten TrpG:HisF Mischkomplexe hergestellt werden. Die TrpG *stretch* Varianten konnten trotz der Vielzahl von bis zu 20 Aminosäure-Austauschen in großen Mengen und in löslicher Form durch heterologe Genexpression in *E. coli* gewonnen, gereinigt und charakterisiert werden. Inkubation mit Trypsin und spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Varianten sehr stabil sind und native Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbilden. Analytische Gelfiltration ergab für die meisten Varianten eine signifikante Reduzierung der Dimerisierungstendenz, die im wildtypischen TrpG sehr ausgeprägt ist. TrpG_b7, TrpG_a5, TrpG_b5_a5, TrpG_b6_a5 und TrpG_b5_b9_a5 liegen sogar überwiegend in monomerer Form vor. Dies lässt die Vermutung zu, dass vor allem das Einfügen der HisH-Aminosäuren aus β -Strang 7 und α -Helix 5 zur Bildung der für wildtypisches HisH typischen Monomere führt. Umgekehrt zeigten die HisH *stretch* Varianten eine Tendenz zur Dimerbildung. In den TrpG *stretch* Varianten wurden bis zu 63% der Aminosäuren, die in HisH die Kontaktfläche mit HisF bilden, an äquivalenter Position eingebaut. Dabei wurden konservierte Aminosäuren besonders berücksichtigt. Dennoch konnten für keine der elf charakterisierten TrpG *stretch* Varianten *in vivo* (*yeast-two-hybrid* System) oder *in vitro* (native PAGE, analytische Gelfiltration, Fluoreszenzemissionsspektroskopie, *steady-state* Enzymkinetik) Hinweise auf eine stabile Interaktion mit HisF erhalten werden.

Der Austausch von β -Strang 7 gegen den entsprechenden Abschnitt von HisH führte dazu, dass aus der konditionalen Glutaminase TrpG die konstitutive Glutaminase TrpG_b7 wurde, deren Aktivität unabhängig von der Anwesenheit einer Synthase ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Austausch größerer Sequenzbereiche zwischen HisH und TrpG zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der Struktur führt und in beiden Enzymen der „molekularer Schalter“ zur Regulation der Glutaminase-Aktivität in β -Strang 7 liegt. Dies spricht für einen gemeinsamen evolutionären Ursprung von HisH und TrpG.

1 Einleitung

1a. Funktionelle Bedeutung und Nachweis von Protein-Protein Interaktionen

Proteine spielen in praktisch allen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle und sind bei der strukturellen und funktionellen Organisation von Zellen von zentraler Bedeutung (Camacho & Vajda, 2002). Viele Funktionen werden jedoch nicht von einzelnen Proteinen ausgeführt, sondern von miteinander interagierenden Proteinen bis hin zu großen Multiproteinkomplexen, wie dem Muskel, dem Proteasom oder dem Transkriptionsapparat (Piehler, 2005; Dutta *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 1996; Alvarez *et al.*, 2003; Gavin & Superti-Furga, 2003). Die Komplexbildung bietet Proteinen den Vorteil der Koordination von Aktivitäten über allosterische Signale. Darüber hinaus können instabile oder flüchtige Intermediate ohne Kontakt zum Lösungsmittel von einem aktiven Zentrum zum nächsten transferiert werden, was als Substrat-Channeling bezeichnet wird (Huang *et al.*, 2001; Miles *et al.*, 1999). Bei hyperthermophilen Bakterien wurde nachgewiesen, dass durch Komplexierung die Stabilität von Proteinen erhöht werden kann (Sternier & Liebl, 2001).

Nach der Sequenzierung und Annotierung zahlreicher Genome ist die Identifikation und Charakterisierung von Protein-Protein Interaktionen ein zentrales Ziel der aktuellen biochemischen Forschung (Piehler, 2005; Deng *et al.*, 2002; Pandey & Mann, 2000). Auf theoretischer Seite können durch die systematische bioinformatische Analyse von Genomsequenzen Hinweise auf Protein-Protein Interaktionen erhalten werden (Valencia & Pazos, 2002; Huynen *et al.*, 2003). So ist eine identische Anordnung mehrerer Gene in den Genomen unterschiedlicher Organismen oder das gleichzeitige Vorhandensein bzw. das gleichzeitige Fehlen von Genen ein Hinweis auf Komplexbildung der kodierten Proteine (Dandekar *et al.*, 1998; Pellegrini *et al.*, 1999; Pazos & Valencia, 2001). Aber auch auf funktioneller Ebene sind Hinweise auf Interaktion zu finden, wie etwa die Beteiligung von Enzymen an gleichen Stoffwechselwegen. Ein sehr deutliches Indiz auf Interaktion zweier Proteine ist das Vorhandensein dieser Proteine in anderen Organismen als bifunktionelle Fusionsproteine (Enright *et al.*, 1999; Marcotte *et al.*, 1999). Es ist zu berücksichtigen, dass diese Analysen lediglich mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit auf eine Interaktion zwischen Proteinen hindeuten. Die Summe dieser Indizien auf Interaktionen können biochemische Experimente jedoch stark motivieren.

Auf experimenteller Seite wurden in den letzten Jahren über neue Screening-Verfahren, wie dem *large-scale yeast-2-hybrid* System, zahlreiche neue Protein-Protein Wechselwirkungen detektiert (Clarke *et al.*, 2005; Uetz *et al.*, 2002; Uetz, 2000; Ito *et al.*, 2001; Vidalain *et al.*, 2003; Toby & Golemis, 2001; Fields & Song, 1989), so dass heute etwa 46.000 Wechselwirkungen zwischen Proteinen aus mehr als 100 Organismen bekannt sind (Database of Interacting Proteins, DIP, Xenarios *et al.*, 2002). In zahlreichen Datenbanken wie STRING (Search Tool for Retrieval instances of Interacting Genes & proteins, <http://string.embl.de>, von Mering *et al.*, 2005), MIPS (Munich Information center for Protein Sequences, <http://mips.gsf.de/proj/ppi>, Pagel *et al.*, 2005), DIP (Database of Interacting Proteins, <http://dip.doe-mbi.ucla.edu>, Salwinski *et al.*, 2004), BIND (Biomolecular Interacion Network Database, <http://bind.ca>, Alfarano *et al.*, 2005) und MINT (a Molecular INTeraction database, <http://mint.bio.uniroma2.it/mint>, Zanzoni *et al.*, 2002) können Informationen über bekannte und postulierte Protein-Protein Interaktionen abgerufen werden.

Zusammengenommen ermöglichen diese theoretischen und experimentellen Arbeiten die Erstellung von Protein-Interaktions-Netzwerken (*protein-protein interaction maps*). Inzwischen sind solche Protein-Interaktions-Netzwerken für Bakterien und Viren (*Helicobacter pylori*, Rain *et al.*, 2001; T7 Bakteriophagen, Bartel *et al.*, 1996), sowie die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2002; Gavin *et al.*, 2002, Schwikowski *et al.*, 2000), den Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Li *et al.*, 2004) und die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Giot *et al.*, 2003; Formstecher *et al.*, 2005) verfügbar.

Zur effizienten Ausführung spezifischer Funktionen in der Zelle ist die Regulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen für Organismen unverzichtbar. Die Bedeutung der Regulation von Protein-Protein Interaktionen wird deutlich, betrachtet man die Auswirkungen fehlregulierter Wechselwirkungen an einem Beispiel näher.

Die miteinander interagierenden Proteine Ras und GAP sind Teil der Signaltransduktionskaskade, die durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, wie z.B. dem EGF (*epidermal growth factor*), an entsprechende Rezeptoren ausgelöst wird. Letztendlich führt diese Kaskade zur Aktivierung eines Transkriptionsfaktors, welcher die Mitose auslöst und dadurch zur Teilung der Zelle führt (Weaver, 1997). Ras ist ein kleines G-Protein (GTPase) und nur aktiv, wenn es die energiereiche Verbindung GTP gebunden hat. In diesem Zustand kann Ras die Stimulierung durch Wachstumsfaktoren innerhalb der Zelle weiterleiten (Pruitt & Der, 2001; Shields *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 1998; Voet & Voet, 1995). Das Protein GAP (GTPase Aktivierendes Protein) ist ein negativer Ras-Effektor. Durch die Bindung von GAP

wird in Ras eine GTPase-Aktivität stimuliert, die Ras befähigt, GTP in GDP zu hydrolysieren und damit in den inaktiven Zustand überzugehen. Die Signalweiterleitung wird dadurch gestoppt (Bischof *et al.*, 2000; Peck *et al.*, 2002; Weaver, 1997). Eine Punktmutation in Ras kann zur Verschlechterung der Bindung von GAP führen und dadurch die Stimulierung der GTPase-Aktivität vermindern (Al-Mulla *et al.*, 1999). Dies führt dazu, dass Ras dauerhaft in der aktivierten GTP-gebundenen Form vorliegt und die Teilung der Zelle ununterbrochen stimuliert. Diese Fehlregulation der Wechselwirkungen zwischen den Proteinen Ras und GAP führt somit zu unreguliertem Zellwachstum und kann die Bildung von Tumoren begünstigen (Shields *et al.*, 2000; Pruitt & Der, 2001; Burbelo *et al.*, 2004).

Dies zeigt sehr anschaulich, dass neben dem Wissen über das Vorhandensein von Protein-Protein Wechselwirkungen ein Verständnis der Regulation und der mechanistischen Prinzipien funktioneller Protein-Protein Wechselwirkungen notwendig ist. Bislang sind darüber wenige Informationen verfügbar. Solche Regulationsprinzipien können am besten durch die genaue Analyse von Modellsystemen verstanden werden. Ein vergleichsweise einfaches Modellsystem bilden die im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersuchten Bienenzymkomplexe aus der Familie der Glutamin-Amidotransferasen.

1b. Strukturelle Grundlage von Protein-Protein Interaktionen

Die Komplexbildung von Proteinen erfolgt im Allgemeinen über nicht-kovalente Bindungen (Piehler, 2005). Dazu zählen (1) elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Seitenketten (Salzbrücken), (2) Wasserstoffbrücken zwischen Sauerstoff- und Stickstoff-Atomen, (3) hydrophobe Wechselwirkungen zwischen unpolaren Seitenketten und (4) unspezifische van-der-Waals-Bindungen zwischen Elektronenhüllen benachbarter Atome. Die Reichweite dieser nicht-kovalenten Wechselwirkungen liegt zwischen 2,6 und 4Å, der Energiegehalt bei bis zu 30 kJ/mol. Im Vergleich dazu weisen kovalente Bindungen einen Energiegehalt von 200-500 kJ/mol auf (Winter & Noll, 1998).

Proteinkomplexe lassen sich aufgrund verschiedener struktureller Charakteristika ihrer Kontaktflächen in Gruppen einteilen. Neben dem chemischen Charakter der beteiligten Aminosäuren sind vor allem die Größe der Kontaktfläche (Jones & Thornton, 1996; LoConte *et al.*, 1999), Komplementarität (Shoichet *et al.*, 1992; Kuntz *et al.*, 1982), Hydrophobizität (Young *et al.*, 1993), elektrostatische Eigenschaften (Goodford, 1985), Konservierung (Valdar & Thornton, 2001; Hu *et al.*, 2000), sowie die Wasserstoffbrückendichte (Danziger & Dean, 1989a, 1989b) untersucht worden. Daneben wird zwischen Homo-Oligomeren, d.h. Komplexen, die aus identischen Proteinen bestehen, und Hetero-Oligomeren, die sich aus

verschiedenen Proteinen zusammensetzen, unterschieden. Weiterhin wird zwischen transienten Komplexen, d.h. die komplexbildenden Proteine liegen *in vivo* auch in isolierter monomerer Form vor, und permanenten Komplexen unterschieden (Ofraan & Rost, 2003; Nooren & Thornton, 2003).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Proteine, die in transienten Proteinkomplexen vorkommen, weisen im Allgemeinen relativ polare Kontaktflächen auf, da sie auch in isolierter Form vorliegen und dabei stabil gefaltet und löslich sein müssen (Nooren *et al.*, 2003; Jones & Thornton, 1996; LoConte *et al.*, 1999).

- Dagegen weisen Proteine, die obligat in Proteinkomplexen vorkommen, im Allgemeinen größere und hydrophobere Kontaktflächen auf (Nooren *et al.*, 2003; Jones & Thornton, 1996; LoConte *et al.*, 1999).

- Die Größe von Protein-Protein Kontaktflächen beträgt in einem idealtypischen Komplex $1600 \pm 400 \text{Å}^2$ („*standard size*“) und kann bis hin zu $>2000 \text{Å}^2$ („*large*“) reichen (Jones & Thornton, 1996; LoConte *et al.*, 1999). Kontaktflächen zwischen Domänen eines Proteins weisen dagegen im Allgemeinen eine Größe von rund $600\text{-}1000 \text{Å}^2$ auf (Wells, 1991).

- Proteine, welche in Komplexe mit Kontaktflächen $>1000 \text{Å}^2$ eingebunden sind, führen bei der Assoziation häufig Konformationsänderungen durch (LoConte *et al.*, 1999; Nooren *et al.*, 2003).

- An Kontaktflächen gibt es keine Bevorzugung für bestimmte Sekundärstrukturelemente (Tsai *et al.*, 1997).

Diese abgeleiteten Prinzipien können bei der Vorhersage von Kontaktflächen hilfreich sein.

2a. Die Familie der Glutamin-Amidotransferasen (GATasen)

Die Enzyme der Familie der **Glutamin-Amidotransferasen (GATasen)** sind für den Einbau von Stickstoff (in Form von Ammoniak) in den Biosynthesen von Nukleotiden, Aminosäuren, Coenzymen und Antibiotika verantwortlich (Raushel *et al.*, 1999). Da freier Ammoniak unter physiologischen pH-Bedingungen in der Zelle hauptsächlich als nicht-reaktives Ammoniumion vorliegt, wird Glutamin als Stickstoffquelle verwendet. GATasen sind Bienenzymkomplexe mit zwei aktiven Zentren (Buchanan, 1973; Abbildung 1.1).

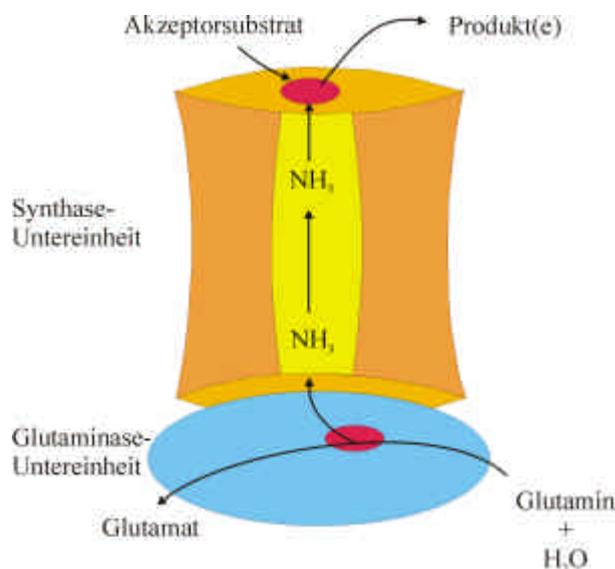


Abbildung 1.1: Modulare Struktur und allgemeines Reaktionsschema der Glutamin-Amidotransferasen (GATasen). Die Synthese ist in orange dargestellt mit dem hydrophoben Kanal in gelb; die Glutaminase in blau. Die aktiven Zentren sind in rot angedeutet. Die Stöchiometrie und die Quartärstruktur des dargestellten Komplexes entspricht der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus der Synthese-Untereinheit HisF und der Glutaminase-Untereinheit HisH (vgl. Abbildung 1.5).

An der Glutaminase-Untereinheit entsteht bei der Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat naszierender Ammoniak, der an das aktive Zentrum der Synthese-Untereinheit transferiert wird und dort mit dem Substrat der Synthese zu den für die jeweilige GATase spezifischen Produkten reagiert. Die beiden Untereinheiten sind entweder auf einer Polypeptidkette lokalisiert oder als zwei getrennte Proteine in einem Bienenzymkomplex organisiert. Die Reaktionen an den beiden aktiven Zentren der GATasen laufen koordiniert ab (Guillou *et al.*, 1992; Mareya & Raushel, 1994; Bera *et al.*, 1999). So wird in der Regel die Glutaminase-Aktivität erst durch die Bindung des Substrates der Synthese-Untereinheit induziert, um die unnötige Hydrolyse von Glutamin zu verhindern (Massière & Badet-Denisot, 1998). Dies wird als konditionale Glutaminase-Aktivität bezeichnet. Außerdem wird in allen bisher untersuchten GATasen neu gebildeter Ammoniak vom aktiven Zentrum der Glutaminase zum aktiven Zentrum der Synthese durch einen hydrophoben Kanal transferiert, was die Protonierung zum

nicht-reaktivem Ammonium durch umgebendes Wasser verhindert (Huang *et al.*, 2001). *In vitro* können die meisten GATasen auch externen Ammoniak in Form von Ammoniumsalzen als Amidonor verwenden.

Die 16 bisher bekannten GATasen werden nach ihren Glutaminase-Domänen in zwei evolutionär nicht verwandte Klassen unterteilt (Massière & Badet-Denisot, 1998; Zalkin, 1993; Zalkin & Smith, 1998). GATasen der Klasse I enthalten Glutaminasen mit einer α/β Hydrolase-ähnlichen Faltung, deren Kern ein offenes, siebensträngiges gemischtes β -Faltblatt bildet (Ollis *et al.*, 1992). Ihr aktives Zentrum besteht aus einer konservierten Cystein-Histidin-Glutamat Triade, welche die Hydrolyse des Glutamins über zwei tetraedrische und ein Glutamyl-Thioesterintermediat katalysiert (Thoden *et al.*, 1999). Zu dieser Klasse zählen neben der Imidazolglycerinphosphat-Synthase (ImGP-S) und der Anthranilat-Synthase (AS), auch Carbamoylphosphat-Synthase (CPS) und GMP-Synthase. GATasen der Klasse II enthalten dagegen Glutaminasen mit der einzigen katalytisch essentiellen Aminosäure Cystein am N-Terminus der Polypeptidkette (N-terminales Nukleophil, Ntn) und weisen eine so genannte Ntn-Hydrolase Faltung auf. Zu dieser Klasse zählen unter anderem die Asparagin-Synthase (Asn-S) und die Glutamat-Synthase (Glu-S).

Im Unterschied zu den Glutaminasen zeigen die verschiedenen Synthase-Domänen, welche die für die jeweilige GATase spezifischen Reaktionen katalysieren, weder Gemeinsamkeiten in der Faltung noch im katalytischen Mechanismus (Massière & Badet-Denisot, 1998; Zalkin & Smith, 1998) (Abbildung 1.5).

2b. Evolution von Glutamin-Amidotransferasen

Interessanterweise sind in einigen Organismen, wie z.B. *Salmonella typhimurium*, Glutaminasen der Klasse I gefunden worden, die aktive Komplexe mit mehreren unterschiedlichen Synthasen aus verschiedenen Stoffwechselwegen bilden können (Sawula & Crawford, 1972; Kane, 1977; Buvinger *et al.*, 1981). Die Identifizierung dieser „amphibolaren“ Glutaminasen führte zu zwei Modellen des evolutiven Ursprungs der GATasen.

Crawford (1975) postulierte, dass die Deletion einer spezifischen Glutaminase, die nur mit einer wohl definierten Synthase aus einem Stoffwechselweg wechselwirken konnte, dazu führte, dass eine andere Glutaminase die Funktion der deletierten Glutaminase nach Ansammlung von Mutationen mit übernommen hat. Diese neue, weniger spezifische Glutaminase war nun in der Lage an zwei verschiedene Synthasen aus zwei verschiedenen Stoffwechselwegen zu binden

und mit ihnen jeweils funktionelle GATasen zu bilden. Diese Theorie wird die Beobachtung unterstützt, dass die bekannten amphibolaren Glutaminasen in unterschiedlichen Organismen Sequenzähnlichkeiten zu unterschiedlichen Glutaminasen aufweisen. So ist die amphibolare GATase aus *Acinetobacter calcoaceticus* der monofunktionalen Glutaminase TrpG aus der Tryptophan-Biosynthese anderer Organismen sehr ähnlich, während die aus *Bacillus subtilis* eine höhere Sequenzidentität zu der monofunktionalen Glutaminase pABA der Paraaminobenzoat-Synthese (pABA) aufweist.

Einige Jahre später stellte Yanofsky (1984) eine alternative Evolutionstheorie für GATasen auf. Danach soll eine ursprüngliche prokaryotische Glutaminase der Klasse I in der Lage gewesen sein, an verschiedene Synthasen zu binden und mit ihnen jeweils funktionelle GATasen zu bilden. Im Verlauf der Evolution sollen sich aus dieser Ur-Glutaminase durch Genduplikationen und Mutationen die heutigen, hoch spezialisierten Glutaminasen der Klasse I entwickelt haben, die jeweils nur noch mit einer Synthase einen aktiven Komplex bilden können.

Haben sich die heutigen GATasen wie in diesem Modell postuliert tatsächlich ortholog, d.h. aus einem gemeinsamen Vorläufer mit gleicher Funktion, entwickelt, dann sollten sich zwischen ihnen Ähnlichkeiten in Struktur, Funktion und Regulation finden lassen. Darüber hinaus sollte es in diesem Falle möglich sein, durch eine begrenzte Anzahl von Aminosäureaustauschen eine spezialisierte Glutaminase in eine weniger spezialisierte umzuwandeln, die auch mit anderen als „ihrer“ Synthase wechselwirkt und damit ähnliche Eigenschaften wie die postulierte Ur-Glutaminase aufweist.

3a. Die Imidazolglycerinphosphat-Synthase, eine GATase aus der Histidin-Biosynthese

Die Imidazolglycerinphosphat-Synthase (ImGP-S) ist eine GATase, die sich in Bakterien aus je einer Untereinheit der Klasse I Glutaminase HisH und der Synthase HisF zusammensetzt. In der Hefe liegen beide Aktivitäten fusioniert auf einer bifunktionellen Polypeptidkette (His7) vor (Klem & Davisson, 1993; Chittur *et al.*, 2000). Das Enzym katalysiert eine Schlüsselreaktion in der Biosynthese der Aminosäure Histidin und erzeugt dabei gleichzeitig ein Intermediat für die Nukleotidbiosynthese (Abbildung 1.2).

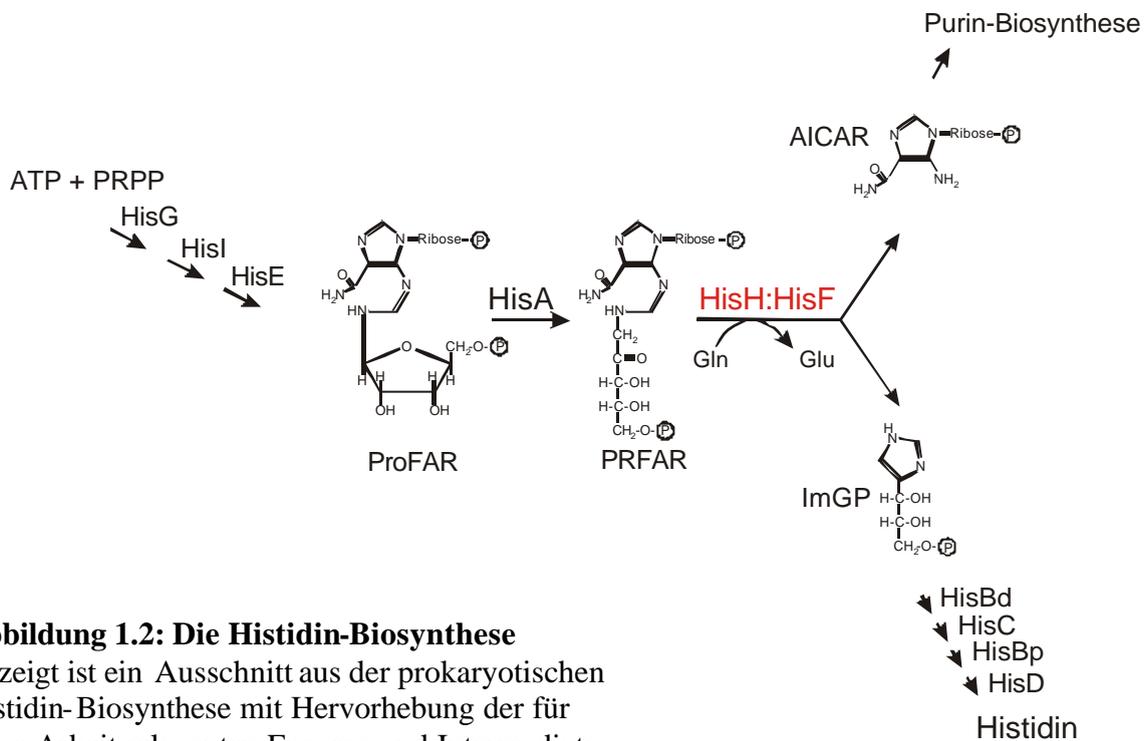


Abbildung 1.2: Die Histidin-Biosynthese
Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der prokaryotischen Histidin-Biosynthese mit Hervorhebung der für diese Arbeit relevanten Enzyme und Intermediate.

Relevante Enzyme:

- HisA : Phosphoribosyl-formimino-5-aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid-Isomerase
- His H : His F : Imidazolglycerinphosphat -Synthase

Relevante Intermediate:

- ProFAR : N-[5'-phosphoribosylformimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid
- PRFAR : N-[5'-phosphoribulosylformimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid
- AICAR : 5'-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid
- ImGP : Imidazolglycerinphosphat

HisH (Klem & Davidson, 1993; Beismann-Driemeyer, 2001) katalysiert die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat unter Freisetzung von Ammoniak. Dieser lagert sich am aktiven Zentrum von HisF an N-[5'-phosphoribulosylformimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid (PRFAR) an, wonach es zu dessen Spaltung in ImGP, aus dem Histidin gebildet wird, und 5'-Aminoimidazol-4-carboxamid-5-aminoimidazol (AICAR) kommt, welches in die

de novo Purinsynthese eingeschleust wird (Winkler, 1987). Die ImGP-S aus Hefe und dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* wurden durch *steady-state* Enzymkinetik und Mutationsanalysen eingehend charakterisiert (Klem *et al.*, 1993, 2001; Chittur *et al.*, 2000; Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der Glutaminasedomäne von der Bindung des Substrates PRFAR bzw. des Substratanalogons ProFAR oder des Produktes ImGP am aktiven Zentrum der Synthase-Domäne abhängt.

Die Röntgenstrukturen mehrerer ImGP-S sind bekannt. Für das Enzym aus *Thermotoga maritima* wurden sowohl die Strukturen der isolierten HisF- (mit gebundenen Phosphationen, 1thf) und HisH- (1k9v / 1jvn) Untereinheiten, als auch die des HisH:HisF Komplexes (mit gebundenen Phosphationen, 1gpw; sowie bislang unveröffentlichte Strukturen mit gebundenem Glutamin, ImGP + Glutamin, Glutamat, AICAR) aufgeklärt (Lang *et al.*, 2000; Douangamath *et al.*, 2002; Korolev *et al.*, 2002; Vega, Häger, Sterner, Wilmanns, unveröffentlichte Daten). Des Weiteren wurden die Strukturen von HisF aus dem hyperthermophilen Archaeon *Pyrobaculum aerophilum* (mit gebundenen Phosphationen + Glycerinmolekülen; 1h5y), von HisH:HisF aus *Thermus thermophilus* (Apo-Enzym, 1ka9) und von His7 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Apo-Enzym, 1ox6; mit kovalent gebundenem Glutamin-Analogon Acvicin, 1jvn; Acvicin + PRFAR, 1ox5; Glutamin-Analogon DON, 1ox4;) veröffentlicht (Banfield *et al.*, 2001; Chaudhuri *et al.*, 2001, 2003; Omi *et al.*, 2002). Sämtliche Strukturen lassen sich jeweils gut superpositionieren und weisen hohe Sequenzidentitäten auf (Banfield *et al.*, 2001; Chaudhuri *et al.*, 2001).

HisH aus *Thermotoga maritima* gehört zur Familie I der Glutaminasen (Zalkin & Smith, 1998) mit der charakteristischen katalytischen Triade (Cys84, His178, Glu180) und einer α/β -Hydrolase Faltung (Ollis *et al.*, 1992). Die HisF Proteine weisen eine $(\beta\alpha)_8$ -barrel Faltung auf, die erstmals für die Triosephosphat-Isomerase (TIM) aus *Gallus gallus* beschrieben wurde und daher auch als TIM-Barrel bekannt ist (Banner *et al.*, 1975), $(\beta\alpha)_8$ -Barrel Enzyme bilden ein zentrales, achtsträngiges paralleles β -Faltblatt, das Barrel (Fass), welches von den acht α -Helices umgeben ist (Gerlt & Raushel, 2003; Vega *et al.*, 2003). Zwei für die Katalyse essentielle Aspartatreste (Asp11 und Asp130 in der ImGP-S aus *T. maritima*) liegen an den C-terminalen Enden von β -Strang 1 und 5 (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). In allen bekannten ImGP-S Strukturen liegt die Kontaktfläche zwischen den beiden Untereinheiten bzw. Domänen am N-terminalen Ende des β -Fasses von HisF und in der Nähe des aktiven Zentrums von HisH. Daraus wurde abgeleitet, dass der an HisH erzeugte Ammoniak in einem hydrophoben Kanal, der die Kontaktfläche und das Innere des Fasses von HisF umfasst, zum aktiven Zentrum von HisF gelangt (vgl. Abbildung 1.5).

3b. Die Anthranilat-Synthase, eine GATase aus der Tryptophan-Biosynthese

Die Anthranilat-Synthase (AS; TrpG:TrpE Komplex) ist eine GATase, die den ersten Schritt in der Biosynthese der Aminosäure Tryptophan katalysiert. Dabei stellt die Glutaminase TrpG Ammoniak für die Synthase TrpE bereit, welche unter Freisetzung von Pyruvat Anthranilat aus Chorismat erzeugt. Die TrpE-Reaktion erfolgt in zwei Schritten. Zunächst reagiert Chorismat reversibel mit Ammoniak zu 2-Deoxychorismat (ADIC), gefolgt von der irreversiblen Eliminierung von Pyruvat (Abbildung 1.3). Beide Reaktionen sind Mg^{2+} -abhängig und ADIC wird nicht ins Lösungsmittel freigesetzt (Morollo & Bauerle, 1993). Die AS steht unter negativer Feedback-Regulation von Tryptophan, dem Endprodukt des Biosyntheseweges.

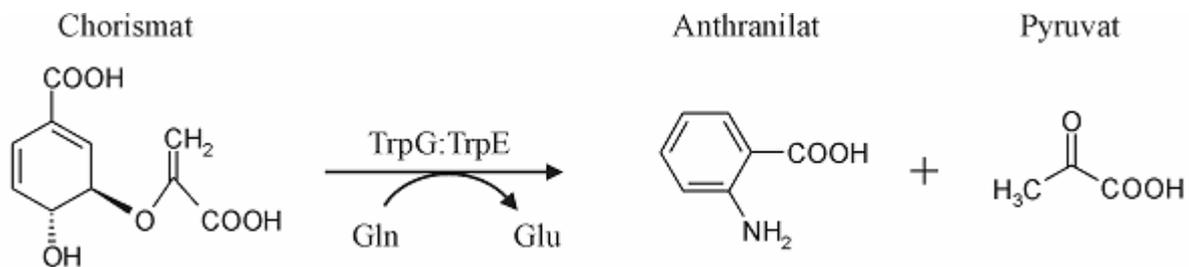


Abbildung 1.3: Katalysierte Reaktion der Anthranilat-Synthase (TrpG:TrpE Komplex)

Bisher wurden die Röntgenstrukturen der Anthranilat-Synthasen aus dem hyperthermophilen Archaeon *Sulfolobus solfataricus* (Apo-Enzym; 1qdl), sowie den mesophilen Bakterien *Salmonella typhimurium* (mit gebundenem Inhibitor Tryptophan; 1ilq) und *Serratia marcescens* (mit gebundenen Substraten Chorismat + Glutamin + Produkt Glutamat; 1i7q; Inhibitor Tryptophan; 1i7s) gelöst (Knöchel *et al.*, 1999; Morollo & Eck, 2001; Spraggon *et al.*, 2001).

TrpG gehört zur Familie I der Glutaminasen (Zalkin & Smith, 1998) mit der charakteristischen katalytischen Triade (Cys84, His175, Glu177 in der AS aus *S. solfataricus*) und einer α/β -Hydrolase Faltung (Knöchel *et al.*, 1999). TrpE weist eine neuartige und komplizierte α/β -Topologie auf, wobei zwei Domänen durch einen Spalt getrennt sind. Biochemisch am besten untersucht ist die AS aus *Salmonella typhimurium* (Zalkin, 1993). An ihr wurde gezeigt, dass die Bindung von Chorismat an TrpE essentiell für die Glutamin-Hydrolyse an TrpG ist, Tryptophan alle Teilreaktionen des TrpG:TrpE Komplexes inhibiert (Caligiuri & Bauerle, 1991a), sowie die katalytisch essentiellen Reste in TrpE identifiziert (Ile243, Asp266, His306, Thr333, Gly393, Glu403; Morollo & Bauerle, 1993).

Die Quartärstruktur ist in allen drei Fällen ein Heterotetramer $(\text{TrpG:TrpE})_2$ aus zwei funktionellen TrpG:TrpE Einheiten. Während die Kontaktflächen innerhalb der funktionellen

TrpG:TrpE Einheiten in allen Strukturen hohe Ähnlichkeit zeigen, ist die Verknüpfung der beiden funktionellen Einheiten sehr unterschiedlich (Abbildung 1.4). Während bei der AS aus *Sulfolobus solfataricus* der Kontakt zwischen den funktionellen TrpG:TrpE Einheiten ausschließlich über die beiden TrpG-Untereinheiten erfolgt, werden in der Struktur der AS von *Serratia marcescens* die funktionellen TrpG:TrpE Einheiten über die TrpE-Untereinheiten verknüpft. In *S. typhimurium* sind sowohl TrpG als auch TrpE an der Verknüpfung beteiligt.

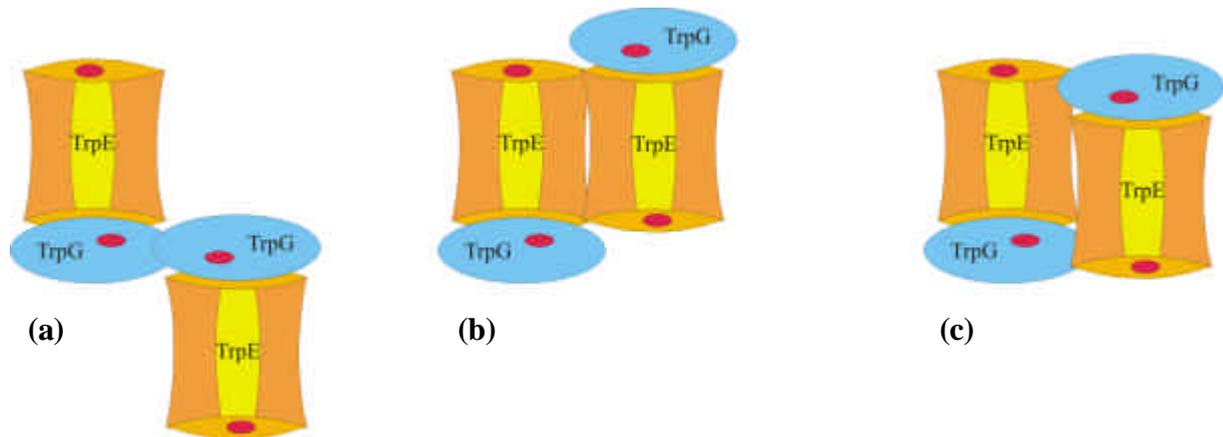


Abbildung 1.4: Schematischer Vergleich bekannter Quartärstrukturen der Anthranilat-Synthase

Gezeigt ist die schematische Anordnung der funktionellen TrpG:TrpE Einheiten der Anthranilat-Synthase in (a) *Sulfolobus solfataricus*, (b) *Serratia marcescens* und (c) *Salmonella typhimurium*

In keine der Strukturen finden sich offensichtliche Hinweise darauf, wie der an TrpG erzeugte Ammoniak ohne Kontakt mit dem Lösungsmittel zum aktiven Zentrum von TrpE gelangt. Dies deutet darauf hin, dass im Vergleich zu den bekannten Strukturen eine größere Konformationsänderung zur Ausbildung des postulierten Ammoniakkanals notwendig ist.

3c. Vergleich der Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus *Thermotoga maritima* und der Anthranilat-Synthase aus *Sulfolobus solfataricus*

In Abbildung 1.5 ist die Röntgenstruktur des HisH:HisF Komplexes aus *Thermotoga maritima* (*tm*) zusammen mit der Struktur einer funktionellen TrpG:TrpE Einheit des (TrpG:TrpE)₂ Komplexes aus *Sulfolobus solfataricus* (*ss*) dargestellt. Sowohl TrpG als auch HisH zeigen die charakteristische Faltung der Glutaminasen der Klasse I, während die Strukturen von TrpE und HisF keine Gemeinsamkeiten aufweisen. Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Enzymkomplexe in der Größe der intermolekularen Kontaktflächen: 2700 Å² zwischen TrpG

und TrpE (Knöchel *et al.*, 1999) und 1100 \AA^2 zwischen HisH und HisF (Douangamath *et al.*, 2002).

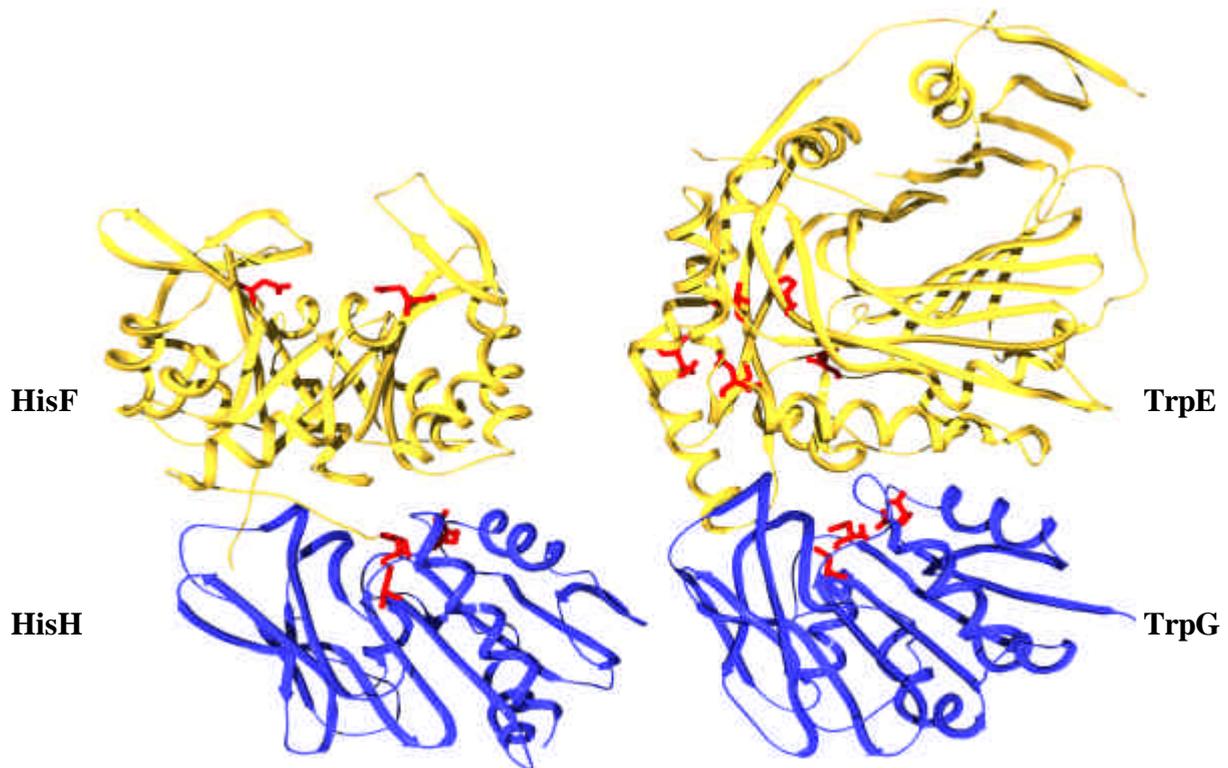


Abbildung 1.5: Vergleich der Strukturen von Imidazolglycerinphosphat-Synthase und Anthranilat-Synthase

Gezeigt sind die Ribbonstrukturen der ImGP-S (HisH:HisF Komplex) aus *Thermotoga maritima* (Douangamath *et al.*, 2002) und der AS ([TrpG:TrpE]₂ Komplex) aus *Sulfolobus solfataricus* (Knöchel *et al.*, 1999). Die Synthasen HisF und TrpE sind in gelb dargestellt, die Glutaminasen HisH und TrpG in blau. Die katalytisch essentiellen Reste an den aktiven Zentren sind rot markiert. Der Einfachheit halber ist nur eine funktionale TrpG:TrpE Einheit gezeigt.

Die Überlagerung der Strukturen der von TrpG aus *Sulfolobus solfataricus* und HisH aus *T. maritima* ergeben eine große Ähnlichkeit ($\text{rmsd} = 2,6 \text{ \AA}$) und identische Positionen der katalytischen Triade Cys-His-Glu auf (Abbildung 1.6). Diese Ähnlichkeit unterstützt das oben skizzierte Modell eines gemeinsamen evolutionären Ursprungs von Klasse I Glutaminasen (Yanofsky, 1984).

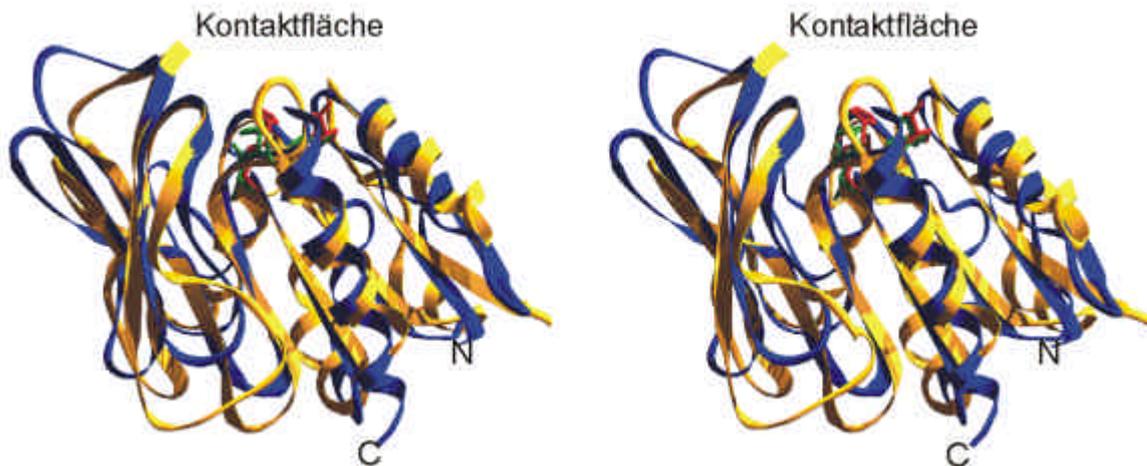


Abbildung 1.6: TrpG und HisH weisen ähnliche Raumstrukturen und identische aktive Zentren auf.

Gezeigt ist eine Superpositionierung des Proteinrückgrates von TrpG aus *S. solfataricus* (in orange) mit dem von HisH aus *T. maritima* (in blau) (Stereodarstellung; Swiss PDB Viewer / PovRay). Die rms Abweichung der übereinander gelagerten C_{α} -Atome beträgt 2.6 Å. Die katalytischen Triaden aus Cys-His-Glu von TrpG (in grün) und HisH (in rot) superpositionieren sehr gut. „Kontaktfläche“: Der mit TrpE bzw. HisF in Kontakt tretende Bereich von TrpG bzw. HisH.

2 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die strukturelle Grundlagen und die Evolution von Protein-Protein Wechselwirkungen in GATasen am Beispiel der ImGP-S und der AS untersucht werden. Die Arbeit umfasste zwei mit einander verknüpfte Teilbereiche.

1. Es war bekannt, dass erst durch die Bindung des Substrates PRFAR (bzw. seines Analogons ProFAR oder des Produktes ImGP) an HisF die Hydrolyse von Glutamin an HisH induziert wird (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Umgekehrt war bekannt, dass die Bindung von Glutamin an HisH zu Änderungen in der Konformation einer flexiblen Schleife in der Nähe des aktiven Zentrums von HisF führt (Häger, 2001). Dies bedeutet, dass es im HisH:HisF Komplex zu ligandeninduzierten Konformationsänderungen kommen muss, die über die Kontaktfläche hinweg in beide Richtungen weitergeleitet werden.

Es sollte nun untersucht werden, welche Aminosäuren im Kontaktbereich von HisH und HisF an der Weiterleitung der Konformationsänderungen beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden ausgewählte Reste in beiden Enzymen gegen Alanin ausgetauscht. Darüber hinaus wurden bis zu 10 Aminosäuren lange Sequenzabschnitte aus HisH gegen die entsprechenden Abschnitte der verwandten Glutaminase TrpG ersetzt. Die mittels gerichteter Mutagenese erzeugten Varianten wurden durch heterologe Genexpression in *E. coli* hergestellt, gereinigt und biochemisch, biophysikalisch und enzymologisch charakterisiert.

Dieses Projekt soll der Beantwortung folgender Fragen dienen:

Welche Wechselwirkungen sind essentiell für die Stabilität der HisH:HisF Interaktion? Welche Reste sind essentiell für die katalytische Effizienz der isolierten Synthase- und Glutaminasereaktionen bzw. der Gesamtreaktion der ImGP-S? Lässt sich durch die Austausch ein molekularer Schalter identifizieren, der für die Koordination der Aktivitäten an den aktiven Zentren essentiell ist?

2. Die Glutaminasen TrpG und HisH weisen sehr ähnliche Strukturen auf und katalysieren die Hydrolyse von Glutamin über einen identischen Mechanismus. Nach dem Modell der Evolution der GATasen von Yanofsky (1984) haben sich HisH und TrpG aus einer ursprünglichen GATase der Klasse I durch Genduplikation, gefolgt von der Ausbildung spezifischer funktioneller Interaktionen mit den Synthasen HisF bzw. TrpE, entwickelt.

Um diese Verwandtschaft näher zu untersuchen, wurden - analog zur oben beschriebenen Mutationsanalyse in HisH - bis zu 10 Aminosäuren lange Sequenzabschnitte im TrpE-Kontaktbereich von TrpG durch die entsprechenden Reste von HisH ersetzt. Die so erzeugten Varianten wurden wie oben beschrieben hergestellt, charakterisiert, sowie die Ähnlichkeiten zu HisH und die Komplexbildung mit HisF *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Dieses Projekt soll der Beantwortung folgender Fragen dienen:

Gibt es neben der Faltung und der katalysierten Reaktion weitere Gemeinsamkeiten zwischen den Glutaminasen HisH und TrpG? Sind die hergestellten chimären Proteine aus TrpG und HisH gefaltet? Ist es durch gerichtete Mutagenese möglich, gezielt HisH Eigenschaften auf TrpG zu etablieren? Bilden die TrpG Varianten einen stabilen Komplex mit HisF aus? Stützen die Ergebnisse die Existenz einer Ur-Glutaminase?

Es wurde mit den HisH, HisF und TrpG Enzymen aus dem Organismus *Thermotoga maritima* gearbeitet, da Proteine aus hyperthermophilen Organismen im Allgemeinen durch ihre erhöhte Stabilität eine größere Toleranz gegenüber Mutationen aufweisen, was eine Grundvoraussetzung für beide Projekte darstellt. Zudem ist die ImGP-S aus *T. maritima* biochemisch gut charakterisiert (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001) und ihre Kristallstruktur aufgeklärt (Lang *et al.*, 2000; Douangamath *et al.*, 2002).

3 Material

3.1 Geräte

Chromatographie-Anlagen:

BioCAD-Sprint Perfusion Systems	PERSEPTIVE BIOSYSTEMS, Weiterstadt
FPLC LCC-501 plus	AMERSHAM Pharmacia Biotech, Freiburg
ÄKTA basic 10	AMERSHAM Biosciences, Cambridge, UK
mit folgenden Säulen :	AMERSHAM Pharmacia Biotech, Freiburg
Superdex 75 HR 10/30	
Superdex 75 pg HiLoad 26/60	
Mono Q HR 16/10	
Affinitätssäule POROS MC/20	
Hydroxlyapatit (selbstgepackt) in XK 26/40 tube	

Brutschränke:

Binder	BINDER GmbH, Tuttlingen
Heraeus B6060	KENDRO, Hanau
Circular Dichroismus System J-715	JASCO, Cremella, Italien
Cell density meter Ultrospec 10	AMERSHAM Biosciences, Cambridge, UK
Concentrator 5301	EPPENDORF, Hamburg
Electroporator 2510	EPPENDORF, Hamburg
Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse	VARIAN, Darmstadt
Gefrierschränke -80°C:	
Heraeus Hera freeze	KENDRO, Hanau
MDF-U72V	SNAYO, Tokyo, Japan
Gefrierschränke -20°C	LIEBHERR, Nussbaumen
Gelelektrophorese-Kammern:	
Agarose-Elektrophorese-Apparatur	hauseigene Werkstatt Universität Köln
SDS-Elektrophoresekammer Mighty Small II	

und Multi Gel Caster Gelgießstand	AMERSHAM Pharmacia Biotech, Freiburg
Polyacrylamid-Elektrophorese-Apparatur	HOEFER Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA
Glaspipetten und Glaswaren	SCHOTT, Mainz; FISCHER SCIENTIFIC, Schwerte; NOVOGLAS, Bern, Schweiz
Hamilton Mikroliterspritze	HAMILTON, Banský, Schweiz
Heizblock-Thermostat HBT-2131	HCL, Bovenden
Imager:	
GelDoc 1000	BioRAD, Hercules, USA
mit GelDoc1000 White Light Source und Single Wavelength Mini- Transilluminator	
Multi-Doc-It Digital Imaging System	UVP Inc., Upland, USA
Inkubationsschüttler:	
Innova 4000, 4400, 4430 Incubator Shaker	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, Nürtingen
Certomat SII	B. BRAUN Biotech, Melsungen
Küvettenschleuder Roto-Vette 310	HELLMA, Mülheim
Magnetrührer (beheizbar):	
IKAMAG RCT <i>basic</i>	IKA-LABORTECHNIK, Staufen
MR3001	HEIDOPH, Kehlheim
Mikroliterpipetten:	
Pipetman P20, P200, P1000	GILSON Medical Electronics, Frankreich
Research 2,5, 10, 100, 1000	EPPENDORF, Hamburg
Mikrowellen:	
Micromat 15, 600W	AEG, Nürnberg
HMT 842C	BOSCH, Nürnberg
PCR-Geräte:	
Mastercycler personal	EPPENDORF, Hamburg
Mastercycler gradients	EPPENDORF, Hamburg
T3 Thermocycler	BIOMETRA, Göttingen
pH-Meter	INOLAB, Weilheim
Pipettus-accu	HIRSCHMANN Laborgeräte, Eberstadt
Power Supply EPS 301	AMERSHAM Pharmacia Biotech, Freiburg

Quarzküvetten (2 ml, 1 cm Schichtdicke)	STARNA, Pfungstadt; GLASKELLER, Basel, Schweiz; VARIAN, Darmstadt
Schütteltische:	
Rocking Platform	BIOMETRA, Göttingen
GFL 3013	GFL, Burgwedel
Ultraschallgerät Branson Sonifier 250D	HEINEMANN, Schwäb. Gmünd
UV-Leuchttische:	
N90 MW 310nm	Konrad Benda, Wiesloch
Reprostar	CAMAG Chemie Erzeugnisse, Berlin
Vakuum Speed, LyoVac GT2	LEYBOLD Vacuum, Köln
Vakuumpumpe ME 2C	VACUUBRAND, Wertheim
Varioklav Dampfsterilisator Typ 500	H&P LABORTECHNIK, München
Vortex ReaxTop	HEIDOLPH, Kehlheim
Waagen:	
SBA 33 und 52	SCALTECH, Heiligenstadt
H54AR und H20T	METTLER, Giessen
PI 1200	METTLER, Giessen
Wasserbad 1012	GFL, Burgwedel
Wasserfiltrationsanlagen:	
SG Reinstwasser-System UF 60	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation, Hamburg
Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage	MILLIPORE, Eschborn
Zentrifugen:	
Varifuge 20 RS	SCHÜTT LABORTECHNIK, Göttingen
Centrifuge 5415D, 5415R, 5810 R	EPPENDORF, Hamburg
HERAEUS Biofuge <i>pico, fresco</i>	SCHÜTT LABORTECHNIK, Göttingen
Sorvall RC 2B, 5C plus	Du Pont Instruments, Bad Homburg
Zweistrahlspektrophotometer Cary 100 Bio	VARIAN, Darmstadt

3.2 Chemikalien

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

AMERSHAM PHARMACIA Biotech

(Freiburg)

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

3.3 Kits

QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR-Purification Kit	QIAGEN, Hilden
NucleoBond [®] AX DNA-Extraction Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
NucleoSpin [®] Gel-Extraction Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
NucleoSpin [®] PCR-Purification Kit I+II	MACHEREY-NAGEL, Düren
GENE ELUTE Plasmid Miniprep Kit	SIGMA-ALDRICH, Steinheim
LMW Gel Filtration Calibration Kit	AMERSHAM Biosciences, Cambridge, UK

3.4 Enzyme

DNA-Polymerasen

Pfu: STRATAGENE, Heidelberg

Pwo : ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim

Vent : NEW ENGLAND BIOLABS, Bad Schwalbach

Taq : PROMEGA, Madison, USA

ReadyMixRED *Taq* PCR Reaction Mix: SIGMA- ALDRICH, Deisenhofen

Benzonase: MERCK Eurolabs, Lohmar

Glutamat-Dehydrogenase aus Rinderleber: SIGMA- ALDRICH, Deisenhofen

Restriktionsendonukleasen :

MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot; NEW ENGLAND BIOLABS, Bad Schwalbach

T4-DNA-Ligase : ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim

Trypsin: ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim

3.5 Verbrauchsmaterialien

Centricon amicon Miniconcentratoren	MILLIPORE, Bedford, MA, USA
Dialyseschläuche Visking Typ 36/32	ROTH, Karlsruhe
Einmalkanülen fine ject 100	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Einweg-Küvetten (½ Mikroküvetten)	RATIOLAB, Dreieich SARSTEDT, Nümbrecht
Elektroporationsküvetten 2 mm Gap	FISCHER SCIENTIFIC, Schwerte
Faltenfilter	MACHEREY-NAGEL, Düren
Latex-Handschuhe Safeskin	KIMBERLY-CLARK, Roswell, USA
Membranfilter ME 24, Porengröße 0,2µm	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
Nitril-Handschuhe Safeskin	KIMBERLY-CLARK, Roswell, USA
Parafilm „M“ Laboratory Film	American National Can, Chicago, USA
Pasteurpipetten	HIRSCHMANN, Eberstadt
PCR <i>Softstrips</i> 0,2 ml	BIOZYM Diagnostik, Hess. Oldendorf
PCR Gefäße 0,2ml	PEQLAB, Erlangen
Petrischalen	GREINER, Nürtingen
Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl	ROTH, Karlsruhe; SARSTEDT, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	ROTH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel 2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Röhrchen 15 ml, 50 ml	ROTH, Karlsruhe
Spritzen Omnifix 5ml	B. BRAUN, Melsungen
Spritzenfilter 0,22µM Porengröße	RENNER, Daunstadt
Umpuffersäulchen, NAP Columns	AMERSHAM Pharmacia Biotech, Freiburg

3.6 Bakterien- und Hefestämme

E. coli DH5a (Hanahan, 1983)

BF⁻, *endA1*, *hsdR17* (*r_k⁻m_k⁻*), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA* (Nal^r), *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*)U169, Φ 80*lacZ* Δ M15]

E. coli BL21 (DE3) (Studier & Moffat, 1986)

hsdS, *gal*, [λ cI, *ts857*, *cmd1*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *relA1*]

E. coli BL21 CodonPlus (DE3) RIPL (Stratagene)

BF⁻ *ompT* *hsdS*(*r_B⁻ m_B⁻*) *dcm*⁺ Tet^r *gal* ?(DE3) *endA* Hte [*argU proL Cam*^r] [*argU ileY leuW* Strep/Spec^r]

Bei BL21 CodonPlus (DE3) RIPL Zellen werden Gene von einem zusätzlichen Plasmid coexprimiert, welche für in *E. coli* seltenen Codon-tRNAs kodieren (*argU* (AGA, AGG); *proL* (CCC); *ileY* (AUA); *leuW* (CUA)). Das Plasmid enthält zusätzlich die Antibiotikaresistenz für Chloramphenicol.

E. coli KK8 = W3110*trpEA2* (Schneider *et al.*, 1981)

trpR, *tna2*, Δ *trpEA2*

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

lonA⁻(Tn5), F, Δ *lacU169*, *araD139*, *rpsL*, *relA*, *thiA*, *flbB*

E. coli UTH860 (Δ *hisF*, Goldschmidt *et al.*, 1970)

ara-14, *glnV44* (AS), *galk2*, λ ⁻, *hisF860* (stable), *rpsL145* (*strR*), *malt1* (λ ^R), *xylA5*, *mtl-1*

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

MAT α , *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , LYS2::*GAL1-HIS3*, GAL2-ADE2, *met2*::GAL7-*lacZ*

S. cerevisiae HF7c (Feilotter *et al.*, 1994)

MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4-542*, *gal80-538*, LYS2::*GAL1*_{UAS}-*GAL1*_{TATA}-*HIS3*, URA3::*GAL4*_{17mers(x3)}-*CYC1*_{TATA}-*lacZ*

S. cerevisiae SFY526 (Bartel *et al.*, 1993)

MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *can^r*, *gal4-542*, *gal80-538*, *URA3::GAL1-lacZ*

Tabelle 3.1: Übersicht über die Eigenschaften der Promotoren der verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme
(nach Clontech)

Stamm	Reporter-gen	Herkunft der UAS	Regulation der UAS durch	Herkunft der TATA	Expressions-level bei positiver Interaktion	Expressions-strengte
AH109	HIS3	Gal1	Gal4	Gal1	hoch	hoch
	ADE2	Gal2	Gal4	Gal2	hoch	hoch
	<i>lacZ</i>	Mel1	Gal4	Gal2	niedrig	
HF7c	HIS3	Gal1	Gal4	Gal1	hoch	hoch
	<i>lacZ</i>	UAS _{G 17-mer} (x3)	Gal4	CYC1	niedrig	
SFY526	<i>lacZ</i>	Gal1	Gal4	Gal1	hoch	

3.7 Vektoren

3.7.1 pET 11c

Die Expression von Genen in pET-Vektoren (NOVAGEN, plasmid for expression by T7 RNA polymerase) erfolgt über die RNA-Polymerase des Phagen T7 (Studier *et al.*, 1990). Daher können pET-Vektoren nur in Stämmen verwendet werden, in denen eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerasegens vorhanden ist (z.B. in *E. coli* BL21 (DE3)). Die Expression des Polymerasegens erfolgt unter Kontrolle eines *lacUV5*-Promotor-Operators und

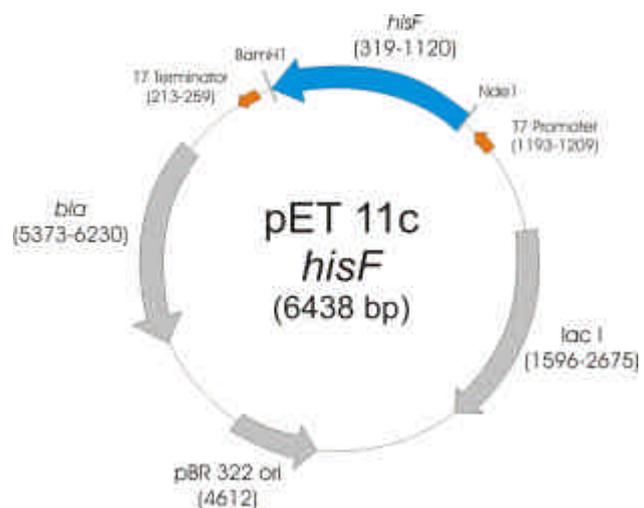


Abbildung 3.1: Vektorkarte von pET11c_{hisF}

wird durch Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert (Abbildung 3.3).

Die Abbildung 3.1 zeigt die Vektorkarte des zur Expression von *hisF* verwendeten pET11cVektors. Die Expression ist ebenfalls über einen *lac*-Operator reguliert. Das dazu erforderliche *lac*-Repressor-Gen (*lacI*) ist plasmidkodiert und wird konstitutiv exprimiert. Das Plasmid kodiert das β -Lactamase-Gen (*bla*), so dass plasmidtragende Zellen gegenüber Ampicillin resistent sind.

3.7.2 pDS56/RBSII/SphI

Der Vektor pDS56/RBSII/SphI (Bujard *et al.*, 1987; Stüber *et al.*, 1990) entspricht dem kommerziellen pQE40 Vektor (QIAGEN). Er besitzt zwei Kopien des *lac*-Operators, die den starken T5 Promotor regulieren. Zur Selektion ist ein β -Lactamase-Gen (Ampicillin-Resistenz) vorhanden. Das Gen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (*cat*) besitzt keinen funktionellen Promoter und kann daher nicht als Selektionsmarker verwendet werden (Abbildung 3.2). Die regulierte und durch IPTG induzierte Expression von einklonierten Genen erfordert die Anwesenheit des Repressorplasmids pDMI,1 (Certa *et al.*, 1986) (Abbildung 3.3). Dieses Repressorplasmid entspricht dem kommerziell erhältlichen pREP4 Plasmid (QIAGEN) und enthält das konstitutiv exprimierte *lacI*-Gen. Als Selektionsmarker besitzt der Vektor pDMI,1 ein Kanamycin-Resistenzgen.

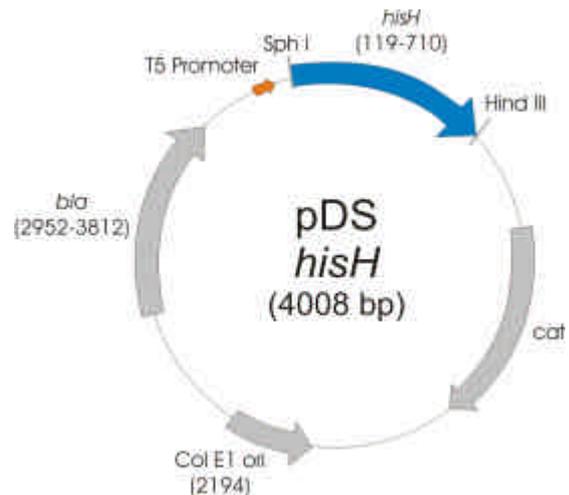


Abbildung 3.2: Vektorkarte von pDS_{hisH}

3.7.3 pQE70

Der pQE70 Vektor (QIAGEN) besitzt *downstream* der *multicloning site* einen His-tag (6x His), welcher jedoch bei Klonierung über die Restriktionsendonuklease-Schnittstellen *SphI* und *BamHI* entfernt wird. Zur Selektion ist ein β -Lactamase-Gen (*bla*) vorhanden. Die Expression des einklonierten Gens erfordert ebenfalls die Anwesenheit des Repressorplasmids pDMI,1.

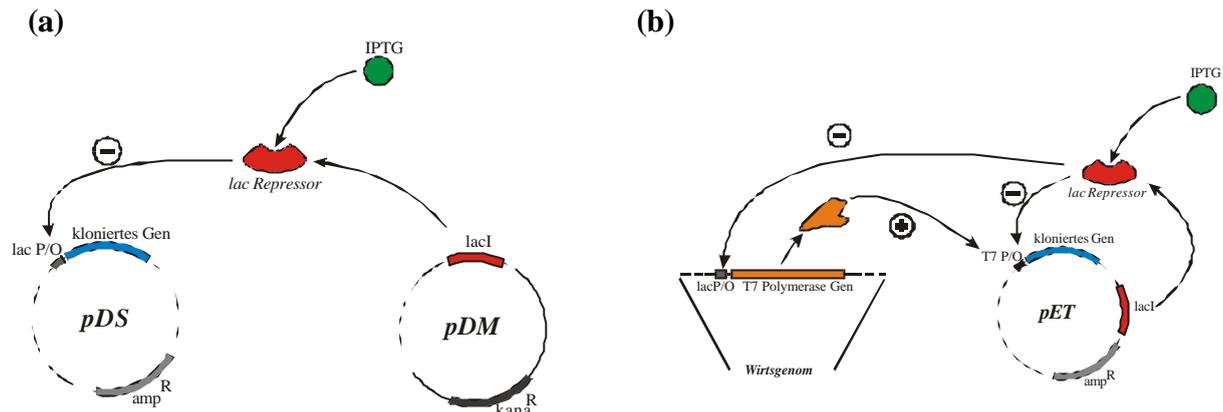


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des pDS-pDM- (a) und des pET-Expressionssystems (b)

Der Induktor IPTG (grün) verhindert die Bindung des vektorkodierten *lac*-Repressors (rot) an die *lac* Promotor / Operator Region, so dass das nachfolgende Gen abgelesen werden kann. Im pET-System erfolgt die Transkription durch die im Wirtsgenom kodierte T7 RNA Polymerase (orange), deren Expression ebenfalls unter Kontrolle eines *lac*-Promotor/Operator-Bereiches steht.

3.7.4 pTNA

Der Vektor pTNA (C. Yanofsky, Stanford; Jürgens *et al.*, 2000) entspricht mit Ausnahme des Promotorbereichs dem pDS56/RBSII/*Sph*I-Vektor (Bujard *et al.*, 1987; Stüber *et al.*, 1990). Statt der *lac*-Promotor-Operator-Region ist eine verkürzte Variante des Tryptophanase-Promotors von *E. coli* vorhanden, welcher zu schwach konstitutiver Expression einklonierter Gene führt (Abbildung 3.4).

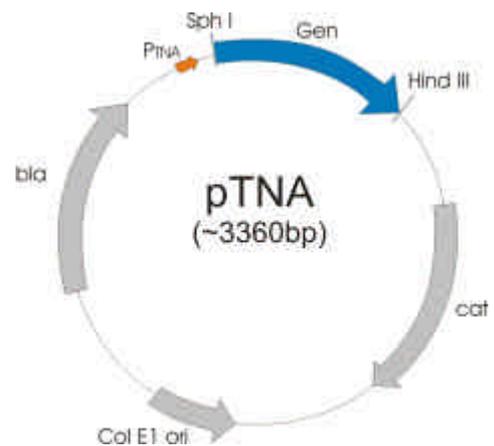


Abbildung 3.4: Vektorkarte von pTNA

3.7.5 pGAD424

Der *E. coli*-Hefe-Shuttle-Vektor pGAD424 (Bartel *et al.*, 1993a) ist ein Beute (*prey*) Vektor aus dem CLONTECH Matchmaker *yeast-2-hybrid* System. Für Klonierungen in *E. coli* ist eine *multicloning site* (mcs) mit Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen, ein ColE1 ori und ein Ampicillin-Resistenz-Gen (*bla*) vorhanden. Das *in frame* einklonierte Gen wird in *S. cerevisiae* als Fusionsprotein mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) hergestellt und über das Nukleus-Translokationssignal der Alkohol-Dehydrogenase (T_{ADH}) in den Zellkern transportiert. Zur Selektion in *S. cerevisiae* ist ein 2μ ori vorhanden und das Gen für die 3-Isopropylmalat Dehydrogenase (*leu2*) vorhanden, welches *leu*-defiziente Hefen komplementieren kann (Abbildung 3.5).

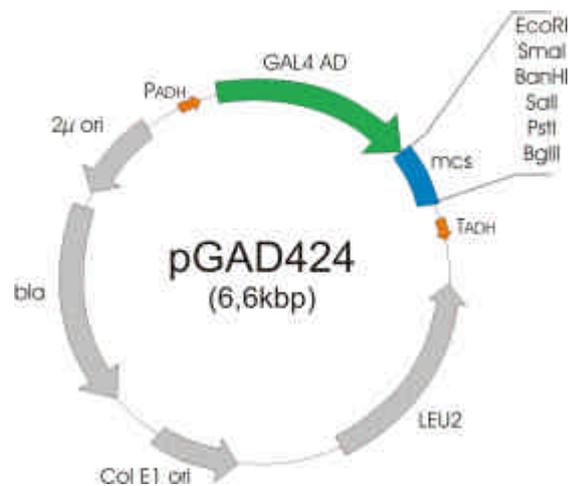


Abbildung 3.5: Vektorkarte von pGAD424

3.7.6 pAS2-1

Der *E. coli*-Hefe-Shuttle-Vektor pAS2-1 (Harper *et al.*, 1993) ist ein Köder (*bait*) Vektor aus dem CLONTECH Matchmaker *yeast-2-hybrid* System. Für Klonierungen in *E. coli* ist eine *multicloning site* (mcs) mit Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen, ein ColE1 ori und ein Ampicillin-Resistenz-Gen (*bla*) vorhanden. Das *in frame* einklonierte Gen wird in *S. cerevisiae* als Fusionsprotein mit der Gal4-DNA-Bindedomäne (DBD) hergestellt und über das Nukleus-Translokationssignal der Alkohol-Dehydrogenase (T_{ADH}) in den Zellkern transportiert. Zur Selektion in *S. cerevisiae* ist ein 2μ ori vorhanden und das Gen für die Phosphoribosylantranilat-Isomerase (*trp1*) vorhanden, welches *trp*-defiziente Hefen komplementieren kann (Abbildung 3.6).

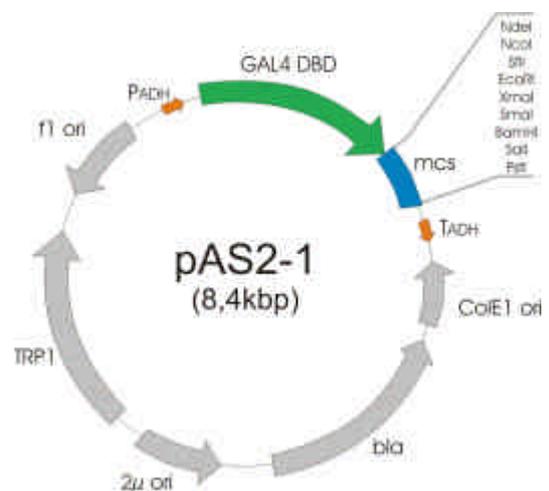


Abbildung 3.6: Vektorkarte von pAS2-1

in *S. cerevisiae* ist ein 2μ ori vorhanden und das Gen für die Phosphoribosylantranilat-Isomerase (*trp1*) vorhanden, welches *trp*-defiziente Hefen komplementieren kann (Abbildung 3.6).

3.8 Oligodesoxyribonukleotide

Vektorspezifische Amplifikations- und Sequenzierungsprimer

T7 Promotor	für pET-Konstrukte, 88-69 bp <i>upstream</i> des Startcodons 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
T7 Terminator	für pET-Konstrukte, 59-77 bp <i>downstream</i> des Stopcodons 5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'
CyRI	für pDS- und pTNA-Konstrukte, 137-117 bp <i>upstream</i> des Startcodons 5'- TCA CGA GGC CCT TTC GTC TT -3'
CyPstI	für pDS- und pTNA-Konstrukte, 132-110 bp <i>downstream</i> des Stopcodons 5'- TCG CCA AGC TAG CTT GGA TTC T -3'
pGAD_5`_AD	für pGAD-Konstrukte, 78-62bp <i>downstream</i> des Genbeginns 5'- TACCACTACAATGGATG -3'
pGAD_3`_AD	für pGAD- Konstrukte, 43-57bp <i>downstream</i> des Stopcodons 5'- TTGAAGTGAACCTTGCAGGGG -3'
pAS_5`_BD	für pAS-Konstrukte, 76-60bp <i>downstream</i> des Genbeginns 5'- TCG GAA GAG AGT AGT AA -3'
pAS_3`_BD	für pAS-Konstrukte, 122-99bp <i>downstream</i> des Stopcodons 5'- TCG TTT TAA AAC CTA AGA GTC A -3'

His-Operon-Primer

HisB_HisH_oben	in <i>E. coli hisB</i> 89-106bp <i>upstream</i> des Startcodons für <i>E. coli hisH</i> 5'- ACGATCATCACCGTG TAG -3'
HisH_HisA_unten	in <i>E. coli hisA</i> 87-104bp <i>downstream</i> des Stopcodons für <i>E. coli hisH</i> 5'- CAATCGCGGCAGCGGGTC -3'
K12_eHisA_NdeI_forw (von Ralf Thoma)	5'- AAC CTG GAC ATA TGA TGA TTA TTC CGG C -3'
K12_eHisA_BamHI_rev (von Ralf Thoma)	5'- CAC GAG GAT CCA GAC ATG GGA TTA TG -3'

Insertspezifische Primer zum Einfügen verschiedener Restriktionsendonuklease-Schnittstellen

HisH_Eco_ATG	für Klonierung in pGAD 5'- GCGCGAATTCATGAGGATCGGAATA A -3'
--------------	---

HisH_Bam_STOP	für Klonierung in pGAD	5'- GAATGGATCCGCTATCGCCGGGACAA -3'
TrpG_Eco_Nde_ATG	für Klonierung in pGAD	5'- GCGCGAATTCCATATGAAACGTGTGAT -3'
TrpG_Bam_STOP	für Klonierung in pGAD	5'- CGCGGGATCCGTCACCTTTACCTGAAT -3'
HisH_PstI_STOP	für Klonierung in pGAD	5'- GCGCCTGCAGCTATCGCCGGGACAA -3'
HisH_Bam_ATG	für Klonierung in pGAD	5'- GCGCGGATCCAAATGAGGATCGGAATAATC -3'
TrpG_Sph_ATG	für Klonierung in pTNA	5'- GCGCGCATGCATGAAACGTGTGATCGTT -3'
TrpG_Hind_STOP	für Klonierung in pTNA	5'- CGCGAAGCTTTTACTTTACCTGAATATCCTGG -3'
TrpG_BamH1_ATG	für Klonierung in pTNA	5'- GCGCGGATCCATGAAACGTGTGAT -3'
HisH_Sph1_KH_LA_oben	zur Generierung der TrpG-HisH-Chimere	5'- GGA AAC GTC GTG CAT GCG AGG AGC AGA AGA-3'
HisH_Sph1_KH_LA_unten	zur Generierung der TrpG-HisH-Chimere	5'- TCT TCT GCT CCT CGC ATG CAC GAC GTT TCC -3'

Mutagenisierungsprimer für HisF (Einzelaustausche neu eingefügter Nukleotide unterstrichen)

HisF_T78M_5	5'- GAC ATT CCG TTC <u>ATG</u> GTT GGA GGA GGT -3'
HisF_T78M_3	5'- ACC TCC TCC AAC <u>CAT</u> GAA CGG AAT GTC -3'
HisF_Q123A_hin	5'- ACT TTT GGG AGT <u>GCG</u> GCC GTT GTC GTG -3'
HisF_Q123A_rück	5'- CAC GAC AAC GGC <u>CGC</u> ACT CCC AAA AGT -3'

Mutagenisierungsprimer für HisH (Einzelaustausche neu eingefügter Nukleotide unterstrichen)

HisH_R117A_hin	5'- CTG AGG AGC AGA <u>GCA</u> CTT CCC CAC ATG -3'
HisH_R117A_rück	5'- CAT GTG GGG AAG <u>TGC</u> TCT GCT CCT CAG -3'
HisH_N124A_hin	5'- CAC ATG GGC TGG <u>GCC</u> GAG GTG ATC TTC -3'
HisH_N124A_rück	5'- GAA GAT CAC CTC <u>GGC</u> CCA GCC CAT GTG -3'
HisH_Y138A_hin	5'- AAC GGG TAT TAC <u>GCC</u> TTC GTC CAC ACC -3'

HisH_Y138A_rück 5'- GGT GTG GAC GAA GGC GTA ATA CCC GTT -3'
 HisH_S183A_hin 5'- CCC GAA AAG AGT GCA AAA ATC GGA AGA -3'
 HisH_S183A_rück 5'- TCT TCC GAT TTT TGC ACT CTT TTC GGG -3'

Mutagenisierungsprimer für HisH (Austausch mehrerer Aminosäuren neu eingefügter Nukleotide unterstrichen)

HisH_b6_118-124_hin 5'- CTG AGG AGC AGA AGA CGT ATT CTG CAC
GGC AAG ACC GAG GTG ATC TTC AAA GAC -3'
 HisH_b6_118-124_rück 5'- GTC TTT GAA GAT CAC CTC GGT CTT GCC
GTG CAG AAT ACG TCT TCT GCT CCT CAG -3'
 HisH_b7_135-140_hin 5'- ACG TTT CCG AAC TTG GTT TAC ACC TTC
TAC CAC ACC TAC AGA GCT -3'
 HisH_b7_135-140_rück 5'- AGC TCT GTA GGT GTG GTA GAA GGT GTA
AAC CAA GTT CGG AAA CGT -3'
 HisH_b9_157-158_hin 5'- CAC GTT CTG GGA ACA ACT TCA GAC GAC
 GGT GAG ATC TTT CCA -3'
 HisH_b9_157-158_rück 5'- TGG AAA GAT CTC ACC GTC GTC TGA AGT
 TGT TCC CAG AAC GTG -3'
 HisH_a5_181-185_hin 5'- CCA TCC CGA AAG CGT GTT AAC CGA GGA
AGG AAG AAA ACT GCT TGA G -3'
 HisH_a5_181-185_rück 5'- CTC AAG CAG TTT TCT TCC TTC CTC GGT
TAA CAC GCT TTC GGG ATG G -3'

Mutagenisierungsprimer für TrpG (Austausch mehrerer Aminosäuren neu eingefügter Nukleotide unterstrichen)

TrpG_sheet6_H_oben 5'- ATC GTG CAC GCA AAG AGG CTT CCC CAC
ATG GGC TGG AAC AAG ATC GTA CAC AAC
GGA -3'
 TrpG_sheet6_H_unten 5'- TCC GTT GTG TAC GAT CTT GTT CCA GCC
CAT GTG GGG AAG CCT CTT TGC GTG CAC GAT
 -3'
 TrpG_HisH_b6b7_oben 5'- GGA AAG ATC GTG CAT GCA AAG CTT CCC

	<u>CAC ATG GGC TGG AAC</u> -3'
TrpG_HisH_b6b7_unten	5'- AAC TTC AGG AAG GGA TGC CTC <u>CAC AGC</u> <u>TCT GTA GGT GTG CAC</u> -3'
TrpG_b6b7_lang_oben	5'- TGG TGG AAA GAT CGT GCA TGC AAA <u>GCT</u> <u>TCC CCA CAT GGG CTG GAA CGA GGT GAT CTT</u> <u>CAA AGA CAC GTT TCC GAA CGG GTA T</u> -3'
TrpG_b6b7_lang_unten	5'- CCA GAA CTT CAG GAA GGG ATG CCT <u>CCA</u> <u>CAG CTC TGT AGG TGT GGA CGA AGT AGT AAT</u> <u>ACC CGT TCG GAA ACG TGT CTT TGA A</u> -3'
TrpG_b5_HisH_oben	5'- ATC GGC TAC GCT TTT GGT GGA <u>AAC GTC</u> <u>GTG AAA CTG AGG AGC AGA AGA AGG ATT</u> CTT CAT GGA AAG ACA GAC -3'
TrpG_b5_HisH_unten	5'- GTC TTT CCA TGA AGA ATC CTT CTT <u>CTG</u> <u>CTC CTC AGT TTC ACG ACG</u> TTT CCA CCA AAA GCG TAG CCG AT -3'
TrpG_b7_135-140_hin	5'- GTG AAA AAT CCA <u>GGC TAT</u> GCT <u>TAT</u> CGG <u>GTC</u> CAT TCA CTC GTT GTT -3'
TrpG_b7_135-140_rück	5'- AAC AAC GAG TGA ATG <u>GAC</u> CCG <u>ATA</u> AGC <u>ATA GCC</u> TGG ATT TTT CAC -3'
TrpG_b9_157-158_hin	5'- GAA ATC ACC GCC AAA <u>GAA TAC</u> GAT GGA GAG ATC ATG -3'
TrpG_b9_157-158_rück	5'- CAT GAT CTC TCC ATC <u>GTA TTC</u> TT GGC GGT GAT TTC -3'
TrpG_a5_181-185_hin	5'- TTC ATC CAG <u>AAA AGT CGT CGA AAA</u> <u>TAG</u> GAA AGA GAA TCA TAA AG -3'
TrpG_a5_181-185_rück	5'- CTT TAT GAT TCT CTT TCC <u>TAT TTT CGA</u> <u>CGA CTT TTC</u> TGG ATG AA -3'

Primer zur Erstellung eines $\Delta hisH$ Stammes

N-outer_HisH	5'- GCG CGG ATC CTC AGA TCG CT A CCC ACG GCG -3'
N-inner_HisH	5'- CTC ACG ACA T TA CTT GCA CCC ACG CAA TAA CCT TCA CAC TCC AAA TTT ATA AC -3'
C-outer_HisH	5'- CGA CCG TTC TCT TGA GCC CGC CTA GGG

C-inner_HisH CGC -3'
 5'- GTT ATA AAT TTG GAG TGT GAA GGT TAT
 TGC GTG TGA GAT GTG ATG ATT ATT C -3'

3.9 DNA-Längenstandard

SMART LADDER (Eurogentec)

Polynukleotidgrößen [bp]	ng DNA / Bande bei 5µl Auftrag
10.000	100
8.000	80
6.000	60
5.000	50
4.000	40
3.000	30
2.500	25
2.000	20
1.500	15
1.000	100
800	80
600	60
400	40
200	20



3.10 Protein-Standard

Low Molecular Weight-Marker (AMERSHAM PHARMACIA)

Protein	Molmasse [kDa]
Phosphorylase B	97,0
BSA	66,2
Ovalbumin	45,0
Carboanhydrase	30,0
Trypsininhibitor (Sojabohne)	20,1
α-Lactalbumin	14,4



MidRange (PROMEGA)

Molmassen [kDa]: 97,4 (Phosphorylase A), 66,2 (BSA), 55 (Glutamat Dehydrogenase), 42,7 (Ovalbumin), 40 (Aldolase), 31 (Carboanhydrase), 21,5 (Trypsin Inhibitor (Sojabohne)), 14,4 (Lysozym)

3.11 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Puffer sterilfiltriert und bei Raumtemperatur gelagert.

3.11.1 Für Arbeiten mit DNA :

PCR-dNTP-Lösung (2mM)

je 2 mM dNTP (N = A, C, G oder T) in H₂O gelöst, bei -20°C gelagert

LiCl-Stammlösung (5M)

5M LiCl in Wasser gelöst, sterilfiltriert, bei RT gelagert

3.11.2 Für Arbeiten mit *E. coli*:

Ampicillin-Stammlösung (1000x)

150 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser gelöst, sterilfiltriert, bei 4°C gelagert

Kanamycin-Stammlösung (1000x)

75 mg/ml Kanamycin in Wasser gelöst, sterilfiltriert, bei 4°C gelagert

Streptomycin-Stammlösung (1000x)

100 mg/ml Streptomycin in Wasser gelöst, sterilfiltriert, bei 4°C gelagert

Chloramphenicol-Stammlösung (1000x)

30 mg/ml Streptomycin in 100% EtOH gelöst, sterilfiltriert, bei 4°C gelagert

IPTG-Stammlösung (1M)

1 M IPTG in Wasser, sterilfiltriert, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert

Glycerin (87%)

TFB I

100mM KCl, 50mM MnCl_2 , 30mM KOAc, 10mM CaCl, 15% Glycerol;

die Einzelkomponenten wurden bei 4°C gelagert und der Puffer direkt vor der Verwendung frisch angesetzt

TFB II

100mM Tris HCl 7,0, 10mM KCl, 75mM CaCl_2 ;

die Einzelkomponenten wurden bei 4°C gelagert und der Puffer direkt vor der Verwendung frisch angesetzt

3.11.3 Für Arbeiten mit *S. cerevisiae* :

Lysepuffer

60mM K_2HPO_4 , 40mM NaH_2PO_4 , 10mM KCl, 1mM MgSO_4 , 50mM β -Mercaptoethanol

LiAc/PEG-Puffer

10mM Tris HCl, 1mM EDTA, 100mM LiAc, 40% PEG, pH 7,5

[8ml 50% PEG (in H_2O gelöst, gegebenenfalls zum Lösen auf 50°C erwärmen)

1ml 1M LiAc (pH 7,5 mit Salzsäure einstellen, autoklavieren)

1ml 10x TE (100mM Tris HCl, 10mM EDTA, pH 7,5, autoklaviert)]

LiAc -Puffer

10mM Tris HCl, 1mM EDTA, 100mM LiAc, pH 7,5

[1ml 10x TE (100mM Tris HCl, 10mM EDTA, pH 7,5, autoklaviert)

1ml 1M LiAc (pH 7,5 mit Salzsäure einstellen, autoklavieren)

8ml H_2O]

TE-Puffer (1x)

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

***fish sperm carrier* DNA (10mg/ml), Roche**

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

3.11.4 Für Agarose-Gelelektrophorese :**Agarose (1 und 2,5%)**

Eine entsprechende Menge an Agarose in 0,5x TBE gelöst, aufgeköcht und kurzzeitig bei 60°C aufbewahrt

Hydroxyethylcellulose (HEC)-Agarose

0,5% der HEC-Lösung mit 1% Agarose in 0,5x TBE-Puffer

Sukrose-Farbmarker

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

TBE (5x)

445 mM Borsäure, 12,5 mM EDTA, 445 mM Tris (der pH-Wert stellt sich automatisch auf 8,15 ein)

Ethidiumbromid-Stammlösung (10mg/ml)**3.11.5 Für Polyacrylamid-Gelelektrophorese (denaturierend und nativ):****ProtogelTM**

30% (v/v) Acrylamid, 0,8% (v/v) Bisacrylamid, bei 4°C gelagert

Ammoniumperoxodisulfid (APS)-Stammlösung (25% und 40%)

25% bzw. 40% (w/v) APS in Wasser gelöst, sterilfiltriert, bei -20°C gelagert

SDS-PAGE Trenngelpuffer

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

SDS-PAGE Sammelgelpuffer

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

SDS-PAGE Laufpuffer

0,025 M Tris, 0,1% (w/v) SDS, 0,2 M Glycin (der pH-Wert stellt sich automatisch auf 8,5 ein)

SDS-PAGE Probenpuffer (2x)

10% (w/v) Glycerin, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol, 2% (v/v) SDS; 0,01% (w/v) Bromphenolblau, 1,25 M Tris HCl, pH 6,8

Färbelösung

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

nativer Trenngelpuffer

3M Tris HCl pH 8.8

nativer Sammelgelpuffer

0.5M Tris HCl pH 6.8

nativer Laufpuffer (1x)

50mM Tris, 284mM Glycin (kein Einstellen des pH-Wertes notwendig)

nativer Probenpuffer (3,3x)

100 μ l 60% Saccharose, 200 μ l 0,5M EDTA, 200 μ l H₂O, ein Krümelchen Bromphenolblau

Tris Tricin Gelpuffer

3M Tris HCl, pH 8,45, 0,3% SDS

oberer Tris Tricin Laufpuffer

0,1M Tris HCl, pH 8,45, 0,1 M Tricin, 0,1% SDS

unterer Tris Tricin Laufpuffer

0,2M Tris HCl, pH 8,9

3.11.6 Für Arbeiten mit Proteinen:

Kaliumphosphatpuffer (KP)

1M K_2HPO_4 und 1M KH_2PO_4 wurden durch Mischen der beiden Komponenten auf die pH-Werte 6,5 / 7,0 / 7,5 und 7,8 eingestellt.

Tris HCl

1M Tris HCl mit den pH-Werten pH 7,5 / 7,8 / 8,0 und 8,5

Tris Acetat

1M Tris Acetat mit den pH-Werten pH 8,0 und 8,5

Aufschlußpuffer

100mM KP, pH 7,5, 2mM EDTA

Dialyse- und Lagerungspuffer

10mM KP, pH 7,5, 1mM EDTA

FPLC-Puffer (für präparative Gelfiltration)

10mM KP, 300mM KCl, pH 7,5

Glutamin-Stammlösung (125mM und 250mM)

entsprechende Menge Glutamin in entsprechendem Puffer direkt vor der Verwendung frisch angesetzt

DTT-Stammlösung (500mM)

500mM DTT in Wasser gelöst, sterilfiltriert, bei -20°C gelagert

EDTA-Stammlösung (250mM, pH 8,8)

entsprechende Menge EDTA unter Zugabe von NaOH in H₂O gelöst und pH-Wert auf 8,8 eingestellt, bei RT gelagert

Ammoniumacetat-Stammlösungen (8,3M und 83mM)

entsprechende Menge Ammoniumacetat in Wasser gelöst, sterilfiltriert, bei RT gelagert

Kaliumchlorid-Stammlösung (3M)

3M KCl in Wasser gelöst, sterilfiltriert, bei RT gelagert

Natriumchlorid-Stammlösung (3M)

3M NaCl in Wasser gelöst, sterilfiltriert, bei RT gelagert

3.12 Nährmedien für *E. coli***LB-Vollmedium (Sambrook *et al.*, 1989)**

0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) Trypton, 1% (w/v) NaCl
zu Selektivmedien wurden

LB-Agar

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

Selektiv-Agar

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

nach dem Autoklavieren wurden die entsprechenden Antibiotika als 1000x konzentrierte sterilfiltrierte Stammlösungen zugegeben

3.13 Nährmedien für *S. cerevisiae*

YPD-Vollmedium

20g Trypton, 10g Hefe-Extrakt, mit Wasser auf 950ml auffüllen, nach dem Autoklavieren 50ml 40% sterilfiltrierte Glukose-Stammlösung zugeben

YPDA-Vollmedium

YPD-Vollmedium zuzüglich 30mg Adenin nach dem Autoklavieren

YPD-Agar

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

SD (*synthetic dropout*) -Minimalmedien

6,7g YNB (*yeast nitrogen base*, mit Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren, ohne Dextrose), 0,61g CSM-Ade-His-Leu-Trp (*complete supplement mixture*, enthält alle Nukleotide und Aminosäuren außer Adenin, Histidin, Leucin und Tryptophan), ergibt SD-TLHA-Minimalmedium, bei Bedarf wurden je 20mg Adenin, Histidin, Leucin und/oder Tryptophan zugegeben (z.B. zur Herstellung von SD-TL), mit Wasser auf 950ml aufgefüllt, nach dem Autoklavieren 50ml 40% sterilfiltrierte Glukose-Stammlösung zugegeben

SD (*synthetic dropout*) -Selektiv-Agar

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

bei Bedarf wurden je 20mg Adenin, Histidin, Leucin und/oder Tryptophan zugegeben

3.14 Software

Adobe Photoshop	Version 7.0	© 2002 Adobe Systems Inc.
ÄKTA Unicorn	Version 5.01 (318)	© 2004 Amersham Biosciences
BioCAD Perfusion Chromatography Workstation	Version 3.01	© 1999 Perseptive Biosystems
Cary Eclipse	Version 1.0 (75)	© Varian Australia Pty Ltd. 1999/2000
	Version 1.1 (175)	© Varian Australia Pty Ltd. 2002
Cary Win UV	Version 2.0 (25)	© Varian Australia Pty Ltd. 1999
	Version 3.0 (182)	© Varian Australia Pty Ltd. 2002
Chromas	Version 1.45	© 1998 Conor McCarthy

	http://www.technelysium.com.au/chromas.html
Corel draw	Version 9,11,12 © 1999/2002/2003 Corel Corporation
COSY	Version 5.5 © 1994, Eberhard (1990)
Dali	http://www.ebi.ac.uk/dali
Deep View Swiss PDB Viewer	Version 3.6.b3 / 3.7 © 1999/2001 N. Guex http://www.expasy.org/spdbv
DocIt	Version 2.3.0 © 2003, UVP Inc.
EndNote	Version 7.0.0 © 2000 Wintertree Software Inc http://www.endnote.com
ISIS Draw	Version 2.3 © 2000 MDL Information Systems www.mdli.com
NNPredict	http://www.cmpharm.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html
pI wrapper	http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl
Pov Ray	Version 3.1g © 1999 POV-team
PredictProtein	http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/predictprotein.html
Primer Generator	http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi
PyMOL	Version 0.98 © 2002 DeLano Scientific http://www.pymol.org
Wisconsin Package	Version 10.2-UNIX © 2001 Genetics Computer group (GCG), Madison, Wisconsin, USA
Sigma Plot	Version 5.0/8.0 © 1999/2002 SPSS, Inc.
SmartFTP	Version 1.0 © 2001 Mike Walter
SWISS Modell	http://swissmodel.expasy.org
WinGene	Version 2.31 © 2002 Lars Hennig http://www.ipw.agrl.ethz.ch/~lhennig/wingene.html
WinPep	Version 3.0 © 2002 Lars Hennig http://www.ipw.agrl.ethz.ch/~lhennig/winpep.html

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Sterilisation von Lösungen, Nährmedien und Geräten

Zur Sterilisation wurden hitzestabile Lösungen und Nährmedien, sowie Glasgeräte für 20min bei 121°C autoklaviert. Hitzelabile Bestandteile wurden in konzentrierten Stammlösungen hergestellt und durch Membranfilter der Porengröße 0,2µm von Partikeln und Mikroorganismen befreit. Verdünnungen wurden grundsätzlich mit Millipore-Wasser angesetzt.

4.1.2 Vermehrung von *E. coli* Kulturen

E. coli Stämme wurden im Schüttelinkubator bei 37°C und 150rpm (bzw. 250rpm bei 50ml Kolben) in LB-Medium, welches bei plasmidtragenden Stämmen mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin 150^{µg}/ml, Chloramphenicol 20^{µg}/ml, Kanamycin 75^{µg}/ml, Streptomycin 100^{µg}/ml) versetzt wurde, kultiviert.

Bei Bedarf wurde das Wachstum der Zellen durch Messungen der optischen Dichte bei 600nm gegen Medium verfolgt.

4.1.3 Lagerung von Mikroorganismen (Glycerinkulturen)

Zur längerfristigen Lagerung von *E. coli* und *S. cerevisiae* Stämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden Aliquots von frisch angezogenen Übernachtskulturen im Verhältnis 1:1 mit 87% Glycerin versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

4.1.4 Abtöten von Mikroorganismen

Nicht mehr benötigte *E. coli* und *S. cerevisiae* Kulturen, sowie mit Bakterien oder Hefen in Kontakt gekommene Lösungen wurden vor der Entsorgung autoklaviert.

4.1.5 Transformation von *E. coli*

4.1.5.1 Präparation chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter DH5α Zellen nach Inoue *et al.* (1990) wurden 50ml LB Medium angeimpft und O/N unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Aus dieser Vorkultur

wurde eine Literkultur LB-Medium angeimpft. Bei einer OD_{600} von 0,4-0,6 wurden die Zellen für 15min auf Eis gestellt, geerntet (30min, 2900g, 4°C) und mit 100ml eiskaltem TBF I Puffer gewaschen (15min, 3200g, 4°C). Das Zellpellet wurde in 10ml eiskaltem TBF II Puffer resuspendiert und in Aliquots von 100µl bei -80°C eingefroren und gelagert.

4.1.5.2 Chemische Transformation

Zur Transformation chemisch kompetenter DH5α Zellen nach Inoue *et al.* (1990) wurde ein Aliquot der Zellen auf Eis aufgetaut und mit etwa 50ng (in einem Volumen von 1-4µl) Plasmid-DNA versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für 42s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach weiteren 5min auf Eis wurden 800µl LB Medium zugegeben. Zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenz wurden die Zellen unter Schütteln für 1h bei 37°C inkubiert („kuren“). In einem Volumen von 100µl wurden Aliquots auf Selektiv-Agar ausplattiert und O/N bei 37°C inkubiert.

4.1.5.3 Präparation elektrokompenter Zellen

Zur Präparation elektrokompenter Zellen nach Dower *et al.* (1988) wurden 50ml LB-Medium mit den entsprechenden Zellen angeimpft und O/N unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 500ml LB-Medium angeimpft. Bei einer OD_{600} von 0,4-0,6 wurden die Zellen geerntet (10min, 2900g, 4°C) und mit 2x 250ml und 1x 80ml eiskaltem Wasser gewaschen (15min, 3200g, 4°C). Das Zellpellet wurde in 1,5ml eiskaltem 10% Glycerin aufgenommen und in 50µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

4.1.5.4 Elektrotransformation

Zur Transformation durch Elektroporation nach Dower *et al.* (1988) wurde ein Aliquot der Zellen auf Eis aufgetaut und mit etwa 50ng (in einem Volumen von 1-4µl) salzfreier Plasmid-DNA vermischt. Der Transformationsansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und mit einem elektrischen Puls (2500V, 25µF, 200 Ω, die Zeitkonstante sollte über 4,5 liegen) ausgesetzt. Zum Kuren wurden die Zellen in 1ml LB-Medium aufgenommen und unter Schütteln für 1h bei 37°C inkubiert. In einem Volumen von 100µl wurden Aliquots auf Selektiv-Agar ausplattiert und O/N bei 37°C inkubiert.

4.1.5.5 Bestimmung der Transformations-Effizienz

Zur Bestimmung der Transformations-Effizienz (T_E) wurde ein Aliquot der Zellen wie unter 4.1.5.2 und 4.1.5.4 beschrieben mit 1ng Plasmid-DNA transformiert. Nach dem Kuren wurden jeweils 100µl einer Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) auf Selektiv-Agar ausgestrichen. Aus der Anzahl gewachsener Kolonien wurde nach Formel 1 die Transformations-Effizienz ermittelt:

$$T_E = \frac{\text{Anzahl der Kolonien} \cdot \text{Verdünnung sfaktor}}{\text{eingesetzt e DNA - Menge } [\mu\text{g}]} = \text{Anzahl Kolonien pro } \mu\text{g DNA}$$

Formel 1: Berechnung der Transformations-Effizienz

4.1.6 Isolierung genomischer DNA

Die Zellen einer zugewachsenen 50ml Kultur wurden durch Zentrifugation (2900g, 10min, 4°C) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 50ml Wasser resuspendiert und erneut wie zuvor zentrifugiert, um das Medium vollständig zu entfernen. Zum Aufschluss wurden die Zellen in 10ml S1-Lösung des Nukleobond AX100 Kits (Macherey Nagel) resuspendiert und mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt. Nach 20minütiger Inkubation bei RT wurde 1ml 10%iger SDS Lösung (w/v) sowie eine Spatelspitze Proteinase K zugesetzt und bei 65 °C für 30min inkubiert. Zur Trennung der DNA von den Proteinbestandteilen der Zelle folgte eine Phenolextraktion durch Zusatz von 1 Volumen Phenol und 200µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) und kurzem Schütteln. Die Phasen der Emulsion wurden durch Zentrifugation für 10min bei 2900g und 4°C getrennt. Die wässrige Oberphase wurde in ein neues 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und die Prozedur einmal mit Phenol ohne Ethidiumbromid und zweimal mit Chloroform wiederholt. Anschließend folgte eine Ethanol-fällung. Hierdurch können u.a. Kontaminationen wie Salze und freie Nukleotide entfernt werden. Die DNA-Lösung wurde mit $\frac{1}{10}$ Vol 7M Ammoniumacetat Lösung und 3 Volumen 96%igem Ethanol versetzt und danach bei 30min bei 2900g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und 5min bei 2900g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vollständig abgenommen und die Reaktionsgefäße zum Trocknen des Pellets bei 65°C offen stehen gelassen, bis sich das Ethanol vollständig verflüchtigt hatte. Zum Schluss wurde die DNA in 3ml Wasser aufgenommen, unter Schütteln bei RT O/N gelöst und bei 4 °C gelagert. Der Erfolg der Präparation wurde durch ein Absorptionsspektrum und Auftrag eines Aliquots auf ein 1 %iges Agarosegel überprüft. Im Falle von sauber präparierter genomischer DNA lag eine Bande weit oberhalb von 10kbp vor.

4.1.7 Präparation kompetenter *S. cerevisiae* Zellen

Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurden 5ml YPD Medium mit einer frischen gewachsenen Einzelkolonie angeimpft, diese durch kräftiges Vortexen im Medium resuspendiert und unter Schütteln mit 250rpm bei 30°C O/N inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde eine 50ml Kultur YPD auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und etwa 5h bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert. Zur Zellernte wurde die Suspension bei RT für 3 min bei 4500g

abzentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 25ml H₂O (3min, 4500g, RT) wurde das Zellpellet in 800µl LiAc-Puffer resuspendiert und bei 4°C zur Verwendung innerhalb von einer Woche gelagert.

4.1.8 LiAc-Transfektion von *S. cerevisiae* Zellen und Überprüfung mittels Auxotrophie-Marker

Die Transfektion des auxotrophen Hefestamms AH109 erfolgte nach der LiAc-Methode (Ito *et al.*, (1983); Guthrie & Fink, (1991)). Dazu wurde ein 20µl Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis mit einem Gemisch aus 1µg Plasmid-DNA und 60µg denaturierter *fish sperm carrier* DNA versetzt und gründlich gevortext. Bei Kotransfektion mit zwei Plasmiden wurden jeweils 0,5µg DNA eingesetzt. Es wurden 80µl LiAc/PEG-Puffer zugegeben und erneut kräftig gevortext. Es folgte eine 1-2-stündige Schüttelinkubation der Zellen bei 30°C mit 250rpm. Nach Zugabe von 15µl DMSO wurde der Transformationsansatz für 15min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach 2min auf Eis wurde der Ansatz 10s bei 16.000g pelletiert, in 30µl YPDA resuspendiert und 1h mit 250rpm bei 30°C inkubiert. In einem Volumen von 15µl wurden Aliquots auf SD-Selektiv-Agar ausplattiert, bei 30°C inkubiert und mehrfach täglich auf Zellwachstum kontrolliert. Gewöhnlich waren nach 3-5 Tagen deutlich sichtbare Kolonien herangewachsen.

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

4.1.9 Qualitativer Interaktions-Assay mittels Interaktions-Marker (*yeast-2-hybrid*)

Das *yeast-2-hybrid*-System ist ein *in vivo* Assay zur qualitativen Analyse von Protein-Protein Interaktionen und wurde erstmals von Fields und Song (1989) beschrieben. Basierend auf dem ursprünglichen System sind zahlreiche Variationen entwickelt worden.

Das Prinzip des *yeast-2-hybrid*-System beruht auf der Beobachtung, dass der eukaryotische Transkriptionsfaktor GAL4 aus zwei funktionelle unabhängigen Domänen, der DNA-bindenden Domäne (DBD) und die Aktivierungsdomäne (AD), besteht und die räumliche Nähe der AD zum Transkriptionsstart eines Genes ausreicht, um dessen Transkription durch die RNA-Polymerase zu initialisieren (Brent & Ptashne, 1985, Hope & Struhl, 1986, Trienzenberg *et al.*, 1988). Zum Test auf Interaktion werden die beiden zu analysierenden

Proteine als Fusionsproteine mit der DBD bzw. der AD kloniert. Dabei wird das mit der DBD fusionierte Protein als Köder (*bait*) bezeichnet, das an AD fusionierte Protein als Beute (*prey*).

Findet keine Interaktion zwischen Köder und Beute statt, bindet das Fusionsprotein DBD-Köder zwar an die UAS (*upstream activation sequence / upstream activating site of transcription*), ohne jedoch das Fusionsprotein AD-Beute rekrutieren zu können.

Bei Interaktion von Köder und Beute kommt die AD in räumliche Nähe der an die UAS bindenden DBD und kann somit die RNA-Polymerase II aktivieren, was zur Transkription eines Reportergens führt (Abbildung 4.1).

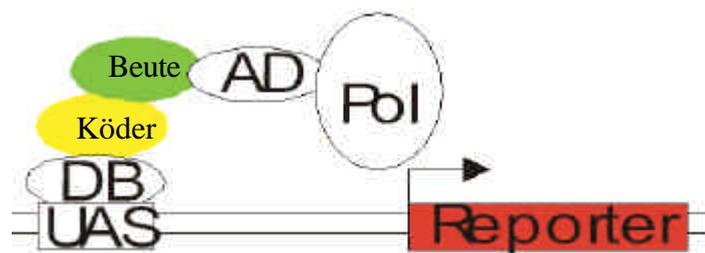


Abbildung 4.1: Das yeast-2-hybrid System detektiert Komplexbildung zwischen zwei Proteinen *in vivo*.

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

Die Reportergene, auch Interaktions-Marker genannt, kodieren meist für Enzyme aus Aminosäure-Stoffwechselwegen, die es den Zellen ermöglichen auf entsprechenden Minimalmedien zu wachsen oder Enzyme, die bei Zugabe entsprechender Substrate ins Medium Farbreaktionen katalysieren. Häufig verwendete Interaktions-Marker sind *his3* (Imidazolglycerolphosphate-Dehydratase, ermöglicht Wachstum auf Medium ohne Histidin), *ade2* (Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase, ermöglicht Wachstum auf Medium ohne Adenin), *mell* (extrazelluläre α -Galactosidase, Farbreaktion) und *lacZ* (intrazelluläre β -Galactosidase, Farbreaktion).

Nach frischer Transfektion wurden die Zellen auf entsprechendem SD-Selektiv-Agar (z.B. SD-TLH) ausplattiert, bei 30°C inkubiert und täglich mehrfach auf Kolonienbildung kontrolliert. Gewöhnlich waren nach 3-5 Tagen deutlich sichtbare Kolonien herangewachsen.

4.1.10 Quantitativer Interaktions-Assay mittels Chlor-Phenol-Red-b-D-Galactopyranosid (CPRG)

Neben der qualitativen Analyse von Protein-Protein-Interaktionen kann das *yeast-2-hybrid* System auch zur Quantifizierung von Wechselwirkungen verwendet werden. Hierzu wird meist die intrazelluläre β -Galactosidase (*lacZ*) verwendet, deren Transkription offensichtlich proportional zur Affinität von Köder und Beute ist.

Quantitative β -Galactosidase-Assays können *in vivo* auf Agarplatten über Zugabe von Substrat zum Medium durchgeführt werden (*agar plate assays*). Eine höhere Sensitivität besitzen Assays, in denen das Substrat zu aufgeschlossenen Zellen zugegeben wird (*liquid culture assays*). Als Substrate können ONPG (Ortho-Nitrophenol- β -D-Galacto-Piranoside) und CPRG (Chlor-Phenol-Red- β -D-Galactopyranosid), welches die höhere Sensitivität besitzt, verwendet werden. Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte CPRG-Assay ist an Imhof *et al.* (2000) angelehnt.

Je 5ml SD-TL Medium wurde mit frisch gewachsenen Kolonien angeimpft, durch 1-minütiges kräftiges Vortexen gemischt und O/N mit 250rpm bei 30°C geschüttelt. Die Kulturen sollten danach eine OD₆₀₀ von mindestens 1,5 besitzen. Nach erneutem 1-minütigem kräftigem Vortexen wurden je 1ml der Kulturen in 4ml YPD überimpft und 5,5h mit 250rpm bei 30°C geschüttelt. Zur Bestimmung der in den nächsten Schritten verwendeten Zellmenge wurde die OD₆₀₀ ermittelt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen für 5min bei 2900g wurde das Pellet mit 5ml H₂O gewaschen und in 150 μ l frisch angesetztem Lysepuffer resuspendiert. Zur Analyse der Protein-Protein-Interaktionen zwischen Köder und Beute müssen die Zellen aufgeschlossen werden. Dazu wurde ein Schockgefrieren bei -80°C in flüssigem Stickstoff, sowie 4 darauf folgende Zyklen von je 1-minütigem Inkubieren bei 37°C und in flüssigem Stickstoff bei -80°C durchgeführt. Zelltrümmer und unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 3min bei 2900g abgetrennt. Der Überstand wurde mit 20 μ l frisch angesetzter gelblicher CPRG-Lösung mit einer Endkonzentration von 4mg/ml versetzt und bei 37°C so lange inkubiert, bis ein Farbumschlag nach rot sichtbar wurde. Die entsprechenden Zeiten wurden notiert. Die Farbreaktion wurde mit 100 μ l 3mM ZnCl₂ abgestoppt und der Grad der Verfärbung über eine Absorptionsmessung bei 575nm bestimmt. Als Referenz diente eine entsprechend verdünnte CPRG-Lösung. Im Absorptionsbereich von 0,25-1,8 konnte ein linearer Zusammenhang zur eingesetzten Menge an β -Galactosidase nachgewiesen werden.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen proportional zur Absorption bei 260nm. Bei einer Schichtdicke von 1cm zeigt eine Lösung mit 50µg/ml dsDNA eine OD₂₆₀ von etwa 1,0 (ebenso 31µg/ml RNA, 33µg/ml ssDNA).

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurden Absorptionsspektren im Bereich von 220 bis 350nm aufgenommen. Aus der OD₂₆₀ wurde nach Formel 2 die DNA-Konzentration berechnet.

$$c_{\text{dsDNA}} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = \text{OD}_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Formel 2: Bestimmung der DNA-Konzentration aus der OD₂₆₀

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

Daneben erfolgte eine grobe Abschätzung der DNA-Konzentration über den Vergleich der Bandenintensität der Probe mit denen des SmartLadders im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.

4.2.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Standard- und *touchdown*-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die enzymatische Vervielfältigung von DNA-Fragmenten *in vitro* (Mullis *et al.*, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Dies geschieht über zyklisches Wiederholen von Aufschmelzung doppelsträngiger DNA (Denaturierung), sowie Anlagerung (*annealing*) und Verlängerung (*extension*) zweier Primer (synthetische Oligonukleotide), die auf gegenüberliegenden Seiten in entgegengesetzter Richtung das zu amplifizierende DNA-Fragment einrahmen. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgt exponentiell.

Für Klonierungen wurde im Allgemeinen die *Pfu*- oder *Pwo*-DNA-Polymerase verwendet, die eine 3'-5' Exonukleaseaktivität (*proof-reading*-Aktivität) besitzt. Alternativ wurde der *Taq*-Polymerase-Premix benutzt und zusätzlich 1µl *Pwo*-DNA-Polymerase zugegeben. Die Reaktion wurde standardmäßig in 50µl Volumen in einem Thermocycler (Deckeltemperatur 110°C) durchgeführt. Die Primermenge betrug je 50pmol. Die Reaktion wurde mit 50-100ng

zu amplifizierender DNA-Matrize, 1U thermostabiler Polymerase und 200µM dNTPs in entsprechendem Polymerase-Puffer standardmäßig wie folgt durchgeführt:

	<u>Temperatur [°C]</u>	<u>Zeit [min]</u>	
Denaturierung :	95	1	
	95	0,5	} 35x
<i>annealing</i> :	T _A	0,5	
<i>extension</i> :	72	1	
	72	5	

Die Schmelztemperatur T_M und die optimale *annealing*-Temperatur T_A der Primer wurden nach den Formeln 3 und 4 (Chester & Marshak, 1993) ermittelt.

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

wobei:

T_M = Schmelz-Temperatur des Primers [°C]

GC [%] = GC-Gehalt des Primers [%]

N_p = Anzahl der Nukleotide des Primers

Formel 3: Berechnung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotides

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

wobei :

T_M = Schmelz-Temperatur des Primers [°C]

T_A = optimale *annealing*-Temperatur für eine PCR mit Primern 1 und 2 [°C]

Formel 4: Berechnung der optimalen *annealing*-Temperatur einer PCR-Reaktion

T_A lag in der Regel zwischen 50 und 65°C. Für Insertscreensings mittels Kolonie-PCR (4.2.4) wurden Ansätze mit einem Volumen von 25µl verwendet. Standardmäßig wurde dazu der *Taq*-Polymerase-Premix verwendet und mit sämtlichen Vektorprimern (T7, Cy, pAS, pGAD) bei einer *annealing*-Temperatur von 50°C gute Ergebnisse erzielt.

Führte eine PCR mit der berechneten *annealing*-Temperatur nicht zu zufrieden stellenden Ergebnissen wurde eine *touchdown*-PCR durchgeführt. Hierbei wurde die *annealing*-Temperatur während der PCR systematisch von 60°C bis zu 45°C erniedrigt:

	<u>Temperatur [°C]</u>	<u>Zeit [min]</u>	
Denaturierung :	95	5	
	95	1	} je 7x mit $T_A = 60, 55, 50, 47, 45^\circ\text{C}$
<i>annealing</i> :	T_A	1	
<i>extension</i> :	72	1	
	72	10	

Dies kann u.a. hilfreich sein, wenn die beiden verwendeten Primer sehr unterschiedliche T_M -Werte besitzen. Darüber hinaus wird durch die anfängliche hohe *annealing*-Temperatur die Spezifität der PCR-Amplifikation erhöht und weniger Nebenprodukte gebildet.

4.2.3 Gerichtete Mutagenese mittels SOE (*overlap-extension*) PCR

Durch gerichtete Mutagenese können einzelne Basen eines Gens gezielt ausgetauscht werden. Dazu werden Mutagenisierungsprimer verwendet, die die Sequenz der zu erstellenden Punktmutante aufweisen und etwa 27 bp lang sind.

In der SOE-PCR (Ho *et al.*, 1989; Horton *et al.*, 1989), deren Prinzip in Abbildung 4.2 gezeigt ist, wurden zunächst in zwei getrennten 100µl PCR-Ansätzen (PCR 1 und PCR 2) mit je einem Mutagenisierungsprimer, einem vektorspezifischen Primer und etwa 100ng DNA-Matrize zwei Megaprimer synthetisiert. Diese weisen entgegengesetzte Orientierung auf und überlappen im Bereich der eingefügten Mutation.

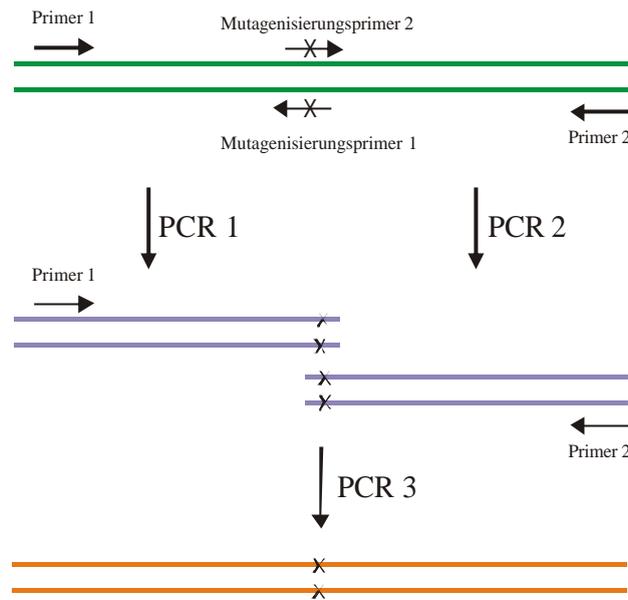


Abbildung 4.2: Prinzip der SOE-PCR

Farbkodierung: *template* (grün), Megaprimer (lila), Volllängenprodukt mit eingefügter Mutation (orange), Einzelheiten finden sich im Text.

Nach einer Aufreinigung der Megaprimer über das Gel Extraction Kit (QIAGEN) wurde die PCR mit vektorspezifischen Primern und 0,1-5µl der beiden Megaprimer als *template* durchgeführt. Das entstandene Volllängen-Produkt wurde nach Reinigung über das PCR Purification Kit und Gel Extraction Kit (QIAGEN) mit Restriktionsenzymen geschnitten und in den gewünschten Vektor kloniert. Die drei PCR-Ansätze wurden wie folgt durchgeführt:

	<u>Temperatur [°C]</u>	<u>Zeit [min]</u>	
Denaturierung :	95	3	
	95	1	} 24x
<i>annealing</i> :	50	0,5	
<i>extension</i> :	72	1	
	72	10	

4.2.4 Kolonie-PCR

Um erste Aussagen über den Erfolg einer Klonierung machen zu können, wurde ein Insert-Screening mittels Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden auf Selektiv-Agar gewachsene Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze in einen 50µl PCR-Ansatz mit *Taq*-Polymerase gegeben und eine PCR wie unter 4.2.2 beschriebenen mit einer *annealing*-Temperatur T_A von

50°C durchgeführt. Meist wurden vektorspezifische Primer (z.B. T7T / T7P für pET 11c) verwendet. Das PCR-Produkt wurde über seine im Agarosegel abgeschätzte Größe identifiziert.

4.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken

Die analytische Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte über eine Mini-Präparation. Dazu wurden aus einer frischen O/N-Kultur 1,5ml für 1min bei 12.500g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100µl S1 Puffer aus dem NucleoBond®AX DNA-Extraction Kit von Macherey-Nagel resuspendiert. Zum Lysieren der Zellen wurden 100µl S2-NucleoBond-Puffer zugegeben und das Reaktionsgefäß invertiert. Das Präzipitieren der chromosomalen DNA erfolgte über die Zugabe von 100µl S3-NucleoBond-Puffer und erneutem Invertieren. Nach Zugabe von 450µl 5M Lithium-Chlorid wurde 5min auf Eis inkubiert. Nach 5minütigem Abzentrifugieren bei 16.000g wurde der Überstand mit 650µl Isopropanol vermischt und 30min bei 16.000g und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20µl Wasser resuspendiert.

4.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA zu präparativen Zwecken

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem NucleoBond®AX DNA-Extraction Kit von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers. Für 50ml O/N-Kulturen wurden NucleoBond AX 100 Säulen verwendet. Das Fällen der chromosomalen DNA erfolgte für 5min bei -20°C. Zum Klären des Zelllysates wurden die mitgelieferten Faltenfilter verwendet. Das DNA-Pellet wurde in 20-50µl Wasser aufgenommen und durch Erwärmen (1min, 50°C) gelöst.

4.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA-Fragmenten nach Mutagenese, Restriktionsverdau, sowie zu präparativen Zwecken verwendet.

Zur Herstellung der Gele wurde 1% Agarose in 0,5% TBE-Puffer durch aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf etwa 50°C wurden 0,2µl/ml der Stammlösung (10mg/ml) des Fluoreszenz-Farbstoffes Ethidiumbromid zugesetzt und die Agarose-Lösung in die Gelkammern gegossen. Durch weitere Abkühlung entsteht ein ausgehärtetes Gel mit netzartiger Struktur, in der durch Anlegung einer Spannung DNA nach ihrer Größe aufgetrennt wird.

Die DNA-Proben wurden mit $1/2$ Volumen Sukrose-Farbmarker versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurden 5 μ l des SMART LADDERS von Eurogentec verwendet. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 15-30min bei etwa 200V und 200mA. Durch Bestrahlung mit UV-Licht (Sharp *et al.*, 1973) werden die DNA-Fragmente sichtbar. Die Dokumentation erfolgte über den UV-Transilluminator der BioRAD GelDoc Anlage bzw. des Multi-DocIT Digital Imaging Systems.

4.2.8 Hydroxyethylcellulose (HEC) -Agarose-Gelelektrophorese

Ähnlich der Agarose-Gelelektrophorese dient auch die Hydroxyethylcellulose (HEC)-Agarose-Gelelektrophorese der Auftrennung von DNA-Fragmenten. HEC-Gele besitzen jedoch eine sehr viel höhere Auflösung bei der Auftrennung kleiner DNA-Fragmente (100-1000bp).

Zur Herstellung der HEC-Gele wird eine 2%-ige Stammlösung von HEC in 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0 benötigt. Diese wird bei 60°C im Brutschrank am besten O/N quellen gelassen. Zur Herstellung der HEC-Gele wurde 0,5% der HEC-Stammlösung mit 1% Agarose in 0,5% TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und wie bei der unter 1.2.3.7 beschriebenen Agarose-Gelelektrophorese verfahren.

4.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das Ausschneiden der DNA-Banden aus präparativen Gelen erfolgte mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht (310nm). Isolierte Gelfragmente wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Angabe des Herstellers aufgereinigt.

4.2.10 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Für das spezifische Schneiden von dsDNA wurden solche Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, die palindromische DNA-Erkennungssequenzen besitzen und einzelsträngige DNA-Überhänge (*sticky ends*) erzeugen.

Für analytische DNA-Spaltungen zur Identifizierung von Inserts bekannter Sequenz wurden etwa 2 μ g DNA mit 20 U Restriktionsenzym für 2-3h in einem Volumen von 10-40 μ l in entsprechendem Puffer bei 37°C inkubiert. Bei präparativen Spaltungen zur Ligation von Fragmenten wurden jeweils etwa 5 μ g DNA von Vektor und Insert eingesetzt und 20-80 U Restriktionsenzym verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Da Restriktionsenzyme in glycerinhaltigen Lösungen gelagert werden, sollte ihr Anteil im Reaktionsansatz nicht mehr als 10% betragen.

4.2.11 Ligation

Die bei Restriktionsspaltungen entstehenden „sticky ends“ enthalten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden, welche bei komplementärer Sequenz über die enzymatische Aktivität der Ligase wieder miteinander verbunden werden können. Pro Ligationsansatz wurde 1U T4-Ligase (Roche) verwendet. Für die Klonierung eines Gens in den gewünschten linearisierten Vektor wurden beide DNA-Fragmente nach dem Verdau mit Restriktionsenzymen über das QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) gereinigt. Es wurden etwa 250ng Vektor und ein 3-facher molarer Überschuss an Fragment in einen ~ 20µl Ansatz gegeben. Die Ligation erfolgte O/N bei 4°C.

4.2.12 DNA-Sequenzierung

Die Verifizierung von Nukeotidsequenzen mutagenisierter und klonierter Gene erfolgte über Auftragssequenzierung im Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin an der Universität Köln (<http://www.uni-koeln.de/~akc46/dna-seq.htm>), bei der Firma GENTERprise an der Johannes Gutenberg Universität Mainz (<http://www.genterprise.de>) und bei der Firma GENEArt im BioPark Regensburg (www.geneart.com).

Dazu wurden jeweils 0,3-1µg Plasmid-DNA mit 10pmol eines Sequenzierungsprimers in einem Volumen von 6µl bzw. 8µl abgegeben. Die Sequenzanalyse erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger *et al.* (1977) mit BigDye Farbstoffen. Die Analyse der im ABI-Format erhaltenen Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software Chromas und GCG.

4.3 Präparative proteinchemische Methoden

4.3.1 Genexpression und Proteinreinigung

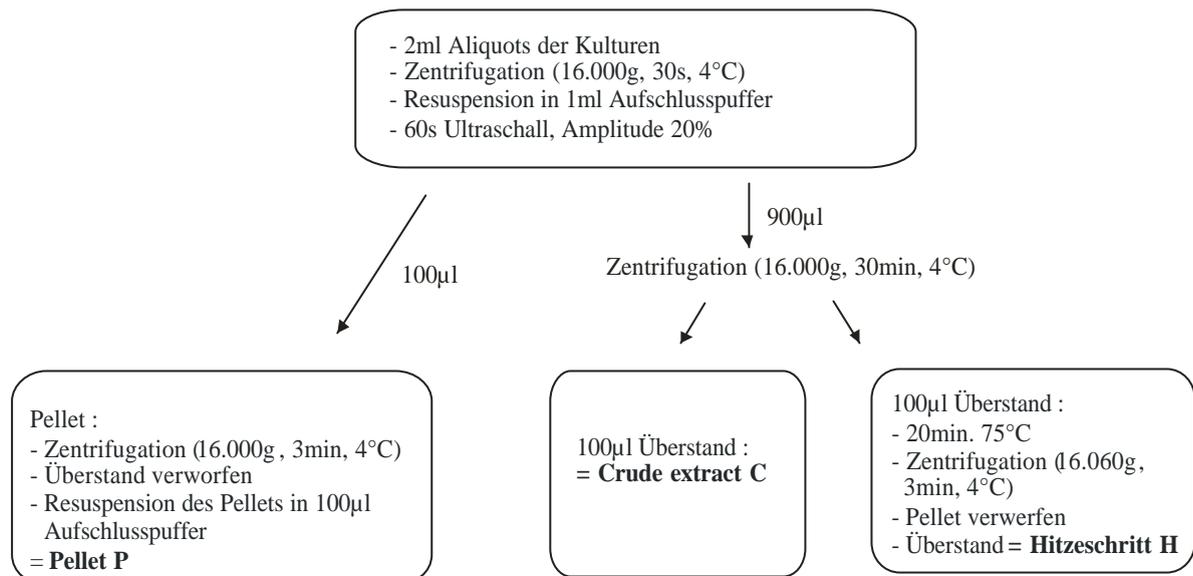
Die Expression der gewünschten Gene aus *T. maritima* erfolgte in mesophilen *E. coli* Zellen. Zur Expression wurden entsprechend den verwendeten Plasmiden pET11c und pDS das pET-Expressionssystem mit BL21 (DE3) oder BL21 (DE3) C+ RIPL Zellen bzw. das pDS-pDM-Expressionssystem mit KK8 oder SG200+50 Zellen verwendet (Abbildung 3.3).

Im ersten Reinigungsschritt wurden die thermolabilen Wirtsproteine durch Hitzebehandlung des Zellextraktes zum großen Teil denaturiert und mittels Zentrifugation entfernt. Die weitere Reinigung der Proteine erfolgte über Perfusions-Chromatographie an einer BioCAD Sprint bzw. einer ÄKTA Purifier Anlage unter Verwendung verschiedener Säulen. Die Standard-Programme zur chromatographischen Reinigung sind im Anhang aufgelistet. Der Verlauf der Reinigung wurde über die Absorption bei 260nm und 280nm verfolgt. Darüber hinaus wurden Leitfähigkeit, pH-Wert und Druck während des gesamten Laufes aufgezeichnet und Fraktionen von 3-5ml gesammelt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Absorptionsspektroskopie analysiert. Zur Abtrennung größerer Mengen an Nukleotiden bzw. Nukleinsäuren wurden Proteine mittels Ammoniumsulfat ausgefällt.

4.3.2 Analytische Expression

Für jedes zu exprimierende Gen wurde eine analytische Probeexpression durchgeführt. Dazu wurde eine 3ml Vorkultur frisch transformierter Einzelkolonien O/N bei 37°C geschüttelt. Falls nur wenig oder kein lösliches Protein hergestellt wurde, wurde zusätzlich eine Expression bei niedrigerer Temperatur (18°C-25°C) durchgeführt. Weiterhin wurde über die Zugabe von 10mM Glucose als Energielieferant für ATP-abhängige Chaperone, 0,57% Glycerin (87%) zur Stabilisierung der Faltung, 10-50mM KP-Puffer pH 7,0 zur pH-Konstanthaltung des Mediums und Stabilisierung von HisF durch Bindung an die Phosphatbindestelle, sowie bis zu 500mM Glutamin bei den Glutaminasen HisH und TrpG versucht, den Anteil löslichen Proteins zu erhöhen.

Aus der Vorkultur wurden 2x10ml Medium mit Antibiotika angeimpft, wovon eine Kultur bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 mit 1mM IPTG induziert wurde. Aus beiden Kulturen wurden nach 4h und O/N 2ml Aliquots abgenommen und die unlösliche (P), lösliche (C) und hitzestabile (H) Fraktionen nach abgebildetem Schema (Abbildung 4.3) aufgetrennt. Die Analyse der Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE.



Zugabe von je 1/10 Vol. 10x SDS-Probenpuffer, 5min bei 99°C, kurze Zentrifugation, Analyse von 10µl mittels SDS-PAGE

Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei analytischer Genexpression

4.3.3 Präparative Expression

Basierend auf den Ergebnissen der analytischen Expression wurden chemisch kompetente Zellen frisch transformiert, Einzelkolonien O/N in 10ml Vorkulturen angezogen und daraus 11 Kulturen inokuliert. Bei Expression mit dem pDS-System wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 1mM IPTG induziert. Für das pET-System wurden keine Unterschiede durch IPTG-Induktion beobachtet und daher wurde meist auf eine Zugabe von IPTG verzichtet. Nach Expression O/N zwischen 22°C und 37°C wurden die Zellen geerntet (20min, 2900g, 4°C), in 20ml Aufschlusspuffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert (20min, 2900g, 4°C). Das gewaschene Zellpellet kann in diesem Zustand bei -20°C gelagert werden. Nach der Bestimmung des Nassgewichts wurden die Zellen in 20ml Aufschlusspuffer aufgenommen.

Nach dem Zellaufschluss über Ultraschall (2x2min 50%, auf Eis) folgte der Abbau von Nukleinsäuren durch die Zugabe von 100U Benzoyl-DNAse, gefolgt von 1-stündiger Inkubation unter Schütteln bei 37°C. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15min, 27.000g, 4°C) erfolgte die Hitzefällung. Je nach Stabilität des zu reinigenden Proteins wurde der Überstand für 10-20min bei 50-75°C inkubiert. Die dabei ausgefallenen *E. coli* Proteine wurden abzentrifugiert (30min, 27.000g, 4°C) und das Protein über Chromatographie und / oder Ammoniumsulfat-Präzipitation weiter aufgereinigt.

Während der Präparation wurden Proben der unlöslichen (P), löslichen (C) und hitzestabilen (H) Fraktionen zur Analyse im SDS-Gel entnommen.

4.3.4 Anionenaustausch-Chromatographie

Bei der Anionenaustausch-Chromatographie werden Proteine aufgrund ihrer Ladungen getrennt (Rossomando, 1990). Die Proteine binden unterschiedlich stark an die fixierten positiven Ladungen der Säulenmatrix und werden je nach Bindungsstärke bei verschiedenen Salzkonzentrationen eluiert. Die hauptsächlich verwendete Mono Q Säule besteht aus einem hydrophilen Polyether-Harz mit einer Partikelgröße von durchschnittlich 10µm. Das Säulenvolumen (CV) beträgt etwa 20ml. Als Laufpuffer wurde 10mM Tris HCl-Puffer pH 8,0 oder 50mM KP-Puffer pH 7,5 verwendet, die Laufgeschwindigkeit betrug 2ml/min. Zusätzlich wurden die Anionenaustauscher-Säulen Poros HQ20, Resource Q und Source 30Q verwendet. Bei allen Materialien handelt es sich um starke Anionenaustauscher.

Die Anionenaustauscher-Säulen wurden zur Reinigung von HisH, HisF, HisA und TrpG verwendet. Der Überstand des Hitzeschrittes wurde auf die gespülte und mit Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen (s. Anhang). Das Auftragsvolumen betrug rund 1,5CV. Nach einem Waschschrift mit 2CV Laufpuffer wurde über 10CV mit einem Salzgradienten von 0-1,5M eluiert. Bei Verwendung von Tris Puffer wurde NaCl verwendet, bei KP-Puffer entsprechend KCl. Nach dem Lauf erfolgte eine Regeneration der Säule mit Laufpuffer, sowie die Analyse und Dialyse der proteinhaltigen Fraktionen.

4.3.5 Adsorptions-Chromatographie (Hydroxylapatit)

Durch die Reinigung über Anionenaustausch-Chromatographie konnte HisH nicht von Nukleinsäuren getrennt werden. Daher wurden die vereinigten proteinhaltigen Fraktionen der Anionenaustauscher-Säule zur weiteren Reinigung auf die gespülte und mit Puffer äquilibrierte Hydroxylapatit-Säule gegeben (s. Anhang).

Die Hydroxylapatit-Säule besteht aus $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, einem kristallinen Calciumphosphat, an das Amino- und Carboxygruppen binden. Die positiv geladenen Aminogruppen interagieren über unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Matrix. Negativ geladene Carboxygruppen komplexieren mit den positiv geladenen Calciumionen. Die Säule hat ein Volumen von etwa 37ml und kann mit einer Laufgeschwindigkeit von bis zu 4ml/min verwendet werden. Um eine optimale Bindung des Proteins an die Säulenmatrix zu ermöglichen, wurde eine Auftragsgeschwindigkeit von 0,5 ml/min gewählt. Als Laufpuffer wurde 10mM KP mit 100mM KCl, pH 7,5 verwendet. Das Auftragsvolumen betrug rund 1 CV. Nach einem Waschschrift mit 1 CV Laufpuffer wurde über 5 CV mit einem Phosphatgradienten von 10-500mM eluiert. Nach dem Lauf

erfolgte eine Regeneration der Säule mit Laufpuffer, sowie die Analyse und Dialyse der proteinhaltigen Fraktionen.

4.3.6 Präparative Gelfiltration

Wie beschrieben, wurden HisH und HisF einzeln hergestellt und gereinigt. Die Komplexbildung fand innerhalb weniger Sekunden durch Zusammenpipettieren auf Eis statt. Um eine versehentlich im Überschuss zugegebene Komponente vom HisH:HisF Komplex zu trennen, wurde eine präparative Gelfiltration durchgeführt. Die verwendete Gelfiltrationssäule Superdex75 mit einem Säulenvolumen von 320ml besteht aus quervernetzter Agarose und Dextran mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 34 μ m. Die Trennung der Proteine erfolgt nach dem Prinzip eines umgekehrten Molekularsiebes aufgrund der Größe (Ausschluss-Chromatographie). Als Laufpuffer wurde 10mM KP pH 7,5 mit 300mM KCl verwendet (s. Anhang). Die Laufgeschwindigkeit betrug 0,5m/min. Die präparative Gelfiltrationssäule ist an der FPLC Anlage bei 4°C angeschlossen. Der Lauf wurde über die Anzeige der Leitfähigkeit und das Aufzeichnen der Absorption bei 280nm verfolgt.

Der Komplex wurde mit YM-10 Centripreps nach Herstellerangaben auf ein Volumen von etwa 4ml eingengt und über einen Auftragsloop auf die gespülte und mit Puffer äquilibrierte Gelfiltrations-Säule gegeben. Die Elution erfolgte durch Spülen der Säule mit 1,5 CV Laufpuffer. Der Fraktionssammler wurde 10min nach Beginn des Laufes gestartet und auf eine Fraktionsgröße von 5ml eingestellt. Die Analyse der Fraktionen erfolgte über analytischen Bradford-Assay und SDS-PAGE. Der HisH:HisF Komplexes eluierte deutlich früher als das im Überschuss zugegebene HisF bzw. HisH Protein.

4.3.7 Ammoniumsulfat-Präzipitation

Zur Abtrennung von Proteinen und vor allem Nukleinsäuren wurden die Glutaminasen HisH und TrpG einer Ammoniumsulfat-Präzipitation unterzogen. Dazu wurde zunächst zu einem Aliquot der Proteinlösung in Schritten 10%iger $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung nach Tabelle 4.1 (nach England & Seifter, 1990) die entsprechende Menge an Ammoniumsulfat spatelspitzenweise auf Eis und unter langsamem Rühren zugegeben und jeweils ein Aliquot abgenommen. Dieses wurde zentrifugiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Dabei ergab sich für HisH WT eine optimale Reinigung bei 80%iger $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung, für TrpG WT bei 50%iger Sättigung.

Daraufhin wurde das Volumen der verbliebenen Proteinlösung bestimmt und die entsprechende Menge an Ammoniumsulfat spatelspitzenweise auf Eis und unter langsamem

Rühren zugegeben. Nach vollständiger Zugabe des Ammoniumsulfat wurde 20min auf Eis weitergerührt und das Protein anschließend durch 30min bei 15.000g abzentrifugiert. Das Proteinpellet wurde in gewünschtem Puffervolumen resuspendiert und der Erfolg der Fällung über SDS-PAGE und Absorptionsspektroskopie überprüft. Das Ammoniumsulfat wurde mittels Dialyse entfernt.

Tabelle 4.1: Übersicht über Menge an Ammoniumsulfat, die für verschiedene Sättigungsgrade benötigt wird

% Sättigung an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / 10ml Proteinlösung	Δ g / 10ml
10	0,55	+ 0,55
20	1,13	+ 0,58
30	1,76	+ 0,63
40	2,42	+ 0,66
50	3,13	+ 0,71
60	3,90	+ 0,77
70	4,72	+ 0,82
80	5,61	+ 0,89

4.3.8 Rückfaltung von Proteinen

Befand sich das hergestellte Protein in *inclusion bodies* in der unlöslichen Fraktion (P) des Zellextraktes, so wurde es durch Solubilisierung in chaotroper Lösung schrittweise rückgefaltet (Höcker, 2002; Kleemann, 1995). Dazu wurde das Pellet nach dem Zellaufschluss zweimal mit 10mM KP, pH 7,5 gewaschen und anschließend in 20ml 6M Guanidinium-Chlorid (GdmCl), 10mM KP, pH 7,5 aufgenommen. Nach 30min Inkubation bei RT wurden 20ml 1M GdmCl, 10mM KP, pH 7,5 zugegeben, die Lösung durch Schwenken gemischt und für weitere 30min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation (27.000g 30min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 70ml 2M GdmCl, 10mM KP, pH 7,5 gemischt. Daraufhin wurde die Lösung drei Mal gegen 5l 50mM KP, pH 7,5 dialysiert, wodurch das GdmCl praktisch vollständig entfernt und damit die Rückfaltung des Proteins induziert wurde. Das auf diese Weise in Lösung gebrachte Protein wurde durch Zentrifugation von dem unlöslichen Anteil getrennt.

Darüber hinaus wurden nach Protokollen von Lilie *et al.* (1998) und Rudolph *et al.* (1992, 1996) bei der Dialyse verschiedenste Zusätze einzeln und in Kombination verwendet: 1mM

EDTA, 1mM DTT, 2mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 250mM NaCl, 440mM Sucrose, 550mM Arginin, 0,5M Guanidium-Chlorid, 300μM Lauryl Maltosid, 20% Glycerol, 10mM Glutamin, 10mM Glutamat.

4.3.9 Dialyse von Proteinlösungen

Nach dem Vereinigen der proteinhaltigen Säulenfraktionen wurden diese über Dialyse von kleinen Partikeln und DNA befreit und in stabilisierenden Puffer überführt. Dazu wurde die Proteinlösung in Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgröße von 14kDa gefüllt. Unter Rühren wurde 2-3mal mindestens 6h gegen 100-250-fachen Volumenüberschuss Dialysepuffer bei 4°C inkubiert.

4.3.10 Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Direkt im Anschluss an die Dialyse wurden die Proteinlösungen über Centriprep YM-10 Zentrifugalkonzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 10kDa nach Angaben des Herstellers bis zum gewünschten Volumen einkonzentriert (3.000g, 4°C).

4.3.11 Lagerung

Zur Lagerung wurden die dialysierten und einkonzentrierten Proteinlösungen in kleinen Volumina (10-20μl) in flüssigen Stickstoff eingetropf und bei -80°C gelagert.

4.3.12 Synthese von ProFAR

Das Substrat von HisF, PRFAR (N'-[5'-phosphoribulosylformimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonukleotid), ist sehr labil und kann daher nicht gelagert werden. Deshalb wurde PRFAR stets mittels HisA *in situ* aus ProFAR (N'-[(5'-phosphoribosyl)formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid) synthetisiert (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Darüber hinaus wurde ProFAR als Substratanalogon verwendet.

Auch ProFAR ist nur bedingt stabil (Tabelle 4.2, Henn-Sax *et al.*, 2002), lässt sich jedoch synthetisieren und für eine begrenzte Zeit bei -80°C lagern. Seine Konzentration wird über die Messung der Absorption bei 300nm bestimmt ($\epsilon_{300} = 6069 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Klem & Davisson, 1993; siehe Anhang).

Tabelle 4.2: Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) von ProFAR bei pH 7,5 und unterschiedlichen Temperaturen

	37°C	60°C	80°C
$T_{1/2,5}^{\text{PROFAR}}$	953 min	75 min	13 min

ProFAR wurde in Anlehnung an Davisson *et al.* (1994) enzymatisch aus ATP und PRPP, den Ausgangsprodukten der Histidin-Biosynthese, synthetisiert. Dazu wurden zunächst die Proteine ATP-Phosphoribosyl-Transferase (HisG) und Phosphoribosyl-ATP-Pyrophosphohydrolase/Phosphoribosyl-AMP-Cyclohydrolase (HisIE) aus *E. coli* gereinigt und nach Mischung in einem molaren Verhältnis von 1:1 in einer Konzentration von 4,2mg/ml bei -80°C gelagert.

Der abgedunkelte Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10ml enthielt 50mM KP, 2mM EDTA, 1mM DTT, pH 7,7, 2mM PRPP, 0,66mM ATP und 16mM MgCl_2 . Unter ständigem Rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von etwa 2mg HisG-IE gestartet. Die Synthese konnte spektroskopisch verfolgt werden, da das Absorptionsspektrum von ATP sich von ProFAR unterscheidet. ATP hat ein Absorptionsmaximum bei 260nm. ProFAR hingegen absorbiert bei höheren Wellenlängen, wobei der maximale Unterschied zu ATP bei 290nm liegt. Sobald keine Veränderung des Spektrums mehr beobachtet werden konnte, wurde das ProFAR aus dem Reaktionsansatz über eine Anionenaustausch-Chromatographie mit der Poros HQ-20-Säule mit einem CV von 7,9ml gereinigt. Als Laufpuffer diente 50mM Tris-Acetat pH 8,0, die Elution erfolgte über einen Acetat-Gradienten (0-1M, 15CV). Konzentration ($\epsilon_{300} = 6069 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und Reinheit ($A_{290}/A_{260} = 1,1$) wurden spektroskopisch bestimmt (Smith & Ames, 1964), Fraktionen mit sauberem und hochkonzentriertem (bis 540 μM) ProFAR vereinigt und in Aliquots bei -80°C gelagert. Die Ausbeute der ProFAR-Synthese lag bei 70-80%, was einer Menge von 4,6-5,3 μmol ProFAR entsprach.

4.4 Biophysikalische Methoden zur Proteincharakterisierung

4.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Absorption elektromagnetischer Strahlung im UV/Vis-Bereich erfolgt, wenn delokalisierte π -Elektronen aus dem Grundzustand in einen angeregten, energiereicheren Zustand überführt werden. Die Peptidbindung absorbiert im Wellenlängenbereich von 180-240nm. Der Bereich von 250-300nm ist gekennzeichnet durch die Absorption der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin, sowie von Disulfidbrücken (Cystinen). Tryptophan und Tyrosin liefern dabei den größten Beitrag zur Absorption, da ihre Extinktionskoeffizienten um fast eine Größenordnung höher liegen als die des Phenylalanins und der Disulfidbrücken (Schmid, 1989). Oberhalb von 310nm sollte eine Proteinlösung keine Absorption zeigen.

Zur Bestimmung der Konzentration an gereinigtem Protein wurden Absorptionsspektren von 230nm bis 330nm aufgenommen. Mit dem Absorptionswert bei 280nm wurde die Proteinkonzentration c nach dem Lambert-Beer'schen Gesetzes (Formel 5) berechnet:

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

wobei :

A_{280} = Absorption bei 280nm

c = Konzentration [mg/ml]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

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

Formel 5: Das Lambert-Beersche Gesetz

Aus der Aminosäuresequenz eines Proteins kann sein molarer Extinktionskoeffizient bei 280nm (ϵ_{280}) berechnet werden (Pace *et al.*, 1995, Formel 6):

$$\epsilon_{280} = \sum \text{Trp} \cdot 5500 + \sum \text{Tyr} \cdot 1490 + \sum \text{Cys} \cdot 125$$

Formel 6: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} aus der Aminosäure-Sequenz eines Proteins

Zusammen mit der molaren Masse M_r ergibt sich der spezifische Extinktionskoeffizient (${}^{0,1\%} A_{280}$) bei 280nm (Formel 7):

$${}^{0,1\%}e_{280} = \frac{e_{280}}{M_r}$$

wobei :

ϵ_{280} = molarer Extinktionskoeffizient [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

${}^{0,1\%}A_{280}$ = spezifischer Extinktionskoeffizient [$\text{cm}^2\text{mg}^{-1}$]

M_r = molare Masse [g/mol]

Formel 7: Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten ${}^{0,1\%}A_{280}$

Die molaren und spezifischen Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine sind im Anhang zusammengestellt.

Das Absorptionsmaximum eines Proteins sollte sich bei etwa 280nm befinden. Außerdem sollte der Quotient A_{280}/A_{250} mindestens 1,8 betragen. Absorptionsmaxima bei kleineren Wellenlängen und mit geringerem Quotienten deuten auf Verunreinigungen mit Nukleotiden bzw. Nukleinsäuren hin. Eine signifikante Absorption bei Wellenlängen größer als 300nm geht in der Regel auf Lichtstreuung, oft verursacht durch Proteinaggregation, zurück.

4.4.2 Biorad-Assay zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur quantitativen Proteinbestimmung nach einzelnen Reinigungsschritten wurde der Biorad-Assay nach Bradford (1976) verwendet. Er beruht auf der Rotverschiebung der Absorption des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 von 465nm zu 595nm nach Bindung an Proteine. Die Intensität der Färbung ist im Bereich von etwa 0,2 - 1,4mg/ml Protein linear.

In einer 1ml Einwegküvette wurden 800 μ l Proteinlösung mit 200 μ l Biorad Protein Assay Färbelösung versetzt und durch Invertieren vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 5min wurde die Absorption bei 595nm bestimmt. Als Basislinie diente die gleiche Menge Färbelösung in Puffer. Durch Eichung mit bekannten Konzentrationen an BSA wurde nach der Geradengleichung die Proteinmenge bestimmt:

$$\text{Proteinmenge } [\mu\text{g}] = \frac{\text{OD}_{595} - b}{m}$$

wobei:

b = y-Achsenabschnitt

m = Steigung

Formel 8: Berechnung der Proteinmenge aus der Absorption bei 595nm im Bradford-Assay

Zur schnellen qualitativen Proteinbestimmung wurden 8µl Proteinlösung in einer Mikrotiterplatte mit 2µl Färbelösung versetzt. Nach 5min wurden die blau gefärbten Fraktionen zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE ausgewählt. Die Dokumentation erfolgte über den Durchlicht-Tisch des GelDoc Systems.

4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese** (SDS-PAGE, denaturierende PAGE) nach Laemmli (1970) dient der analytischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Native Proteine wandern im elektrischen Feld zu dem ihrer Ladung entgegengesetzten Pol. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Nettoladung der Proteine, sowie ihrer Größe und Form. Setzt man der Proteinlösung Natriumdodecylsulfat (SDS) zu, werden die Proteine denaturiert und binden das negativ geladene Detergens in einem theoretischen Verhältnis von 1,4g SDS pro 1g Protein, was einem SDS-Molekül pro zwei AS entspricht. Diese starke negative Ladung an den aufgefalteten Proteinen maskiert die Eigenladung der Proteine, so dass die SDS-beladenen Proteine nahezu identische Ladungs-Masse-Verhältnisse und ähnliche Form aufweisen. Die Elektrophorese von Proteinen in einem SDS-haltigen Gel erfolgt daher nach dem Prinzip eines molekularen Siebes, wobei die relative Mobilität invers mit dem Logarithmus der molaren Masse korreliert ist. Die Größe der Proteine kann durch Vergleich mit einem Proteinstandard (Marker) abgeschätzt werden.

Zur Analyse und Abschätzung des Reinheitsgrades der Proteinpräparation wurden 12,5%ige SDS-Polyacrylamidgele mit Trenn- und Sammelgelen eingesetzt (Fling & Gregerson, 1986), deren Zusammensetzung Tabelle 4.3 zu entnehmen ist. Bei einer Spannung von 250V und 35mA betrug die Dauer der Elektrophorese etwa 45min.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel der SDS-Gele

	Trenngel	Sammelgel
SDS-Trenngelpuffer	16,5 ml	-
SDS-Sammelgelpuffer	-	6,25 ml
Acrylamid-Lösung	27,4 ml	5 ml
H ₂ O	20,8 ml	13,25 ml
TEMED	75 µl	25 µl
APS-Stammlösung (25%)	165 µl	75 µl

4.4.3.1 Probenvorbereitung

Die Proteinlösungen wurden mit 1 Volumen 2x SDS-Probenpuffer versetzt und 5min auf 99°C erhitzt. Nach dem Abzentrifugieren (3min, 16.000g) wurden 10-15µl des Überstandes mit einer Hamiltonspritze in die Probenaschen des Gels aufgetragen.

4.4.3.2 Färbung der SDS-Gele

Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurde der Farbstoff Coomassie verwendet. Das Anfärben erfolgte innerhalb weniger Minuten unter leichtem Wippen der Polyacrylamid-Gele in Coomassie-Färbelösung. Unspezifische Färbung wurde durch anschließendes Aufkochen in Wasser (Mikrowelle, 2x 5min) entfernt. Die Dokumentation erfolgte über den Durchlicht-Tisch des GelDoc Systems.

4.4.4 Tris-Tricin-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei kleinen Proteinen kann durch die Verwendung von Tris-Tricin-Polyacrylamid-Gelen (Schägger & von Jagow, 1987) eine bessere Auflösung als bei herkömmlichen Polyacrylamid-Gelen erreicht werden. Dies ist besonders von Interesse, wenn Proteine mit geringen Größenunterschieden analysiert werden sollen. Im Unterschied zur herkömmlichen SDS-PAGE werden die Polyacrylamid-Gele mit einem Tris-Tricin-Puffer hergestellt (Tabelle 4.4) und spezielle Anoden- und Kathodenpuffer verwendet. Die Laufzeit der Tris-Tricin-Gele beträgt bei 250V und 20mA etwa 2h. Die Vorbereitung der Proben, sowie das Färben der Gele erfolgt analog zur herkömmlichen SDS-PAGE.

Tabelle 4.4: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel der Tris-Tricin-Gele

	Sammelgel	Trenngel
Tris-Tricin-Puffer	6,2 ml	22,5 ml
Acrylamid-Lösung	3,2 ml	45 ml
H ₂ O	15,2 ml	-
TEMED	20 µl	22,5 µl
APS-Stammlösung	200 µl	225 µl

4.4.5 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE) wird dem Gel und dem Probenpuffer kein Detergens zugesetzt, so dass die native Konformation und der

Assoziationszustand der Proteine erhalten bleiben. Die Trennung der Proteine erfolgt anders als bei der SDS-PAGE, nicht ausschließlich nach der Größe, sondern ist daneben abhängig von der Nettoladung (isoelektrischer Punkt pI) und der Form der Proteine. Im Rahmen dieser Arbeit wurde native PAGE hauptsächlich zur Analyse der Bildung eines Komplexes zwischen HisF und HisH- bzw. HisF und TrpG-Varianten herangezogen.

Dazu wurden 8,5%ige native Polyacrylamidgelen mit Trenn- und Sammelgelen eingesetzt, deren Zusammensetzung Tabelle 4.5 zu entnehmen ist.

Je 10µl der Proteinlösungen wurden mit 3µl nativem Probenpuffer versetzt und mit einer Hamiltonspritze in die Probenaschen des Gels aufgetragen. Um die Proteine in nativem Zustand zu halten, wurde die Elektrophorese bei 4°C durchgeführt. Bei einer Spannung von 150V und 40mA betrug die Dauer der Elektrophorese etwa 3-4h. Das Färben der Gele erfolgt analog zur SDS-PAGE (4.4.3.2).

Tabelle 4.5: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel der nativen Gele

	Trenngel (8,5%)	Sammelgel (5%)
Nativer Trenngelpuffer	9,25 ml	-
Nativer Sammelgelpuffer	-	12,5 ml
Acrylamid-Lösung	15 ml	8,3 ml
Sacchrose (60%)	5,75 ml	
H ₂ O	20,0ml	29,2 ml
TEMED	22,00l	50 µl
APS-Stammlösung (40%)	55,33µl	62,5 µl

4.4.6 Limitierte Proteolyse mit Trypsin

Die Resistenz von Proteinen gegenüber Proteasen hängt vor allem von der Zugänglichkeit potentieller Schnittstellen ab (Hubbard, 1998). Die Serinprotease Trypsin spaltet Peptidbindungen C-terminal von Argininen und Lysin.

Für die Trypsin-Spaltungen in der vorliegenden Arbeit wurden 10µM zu verdauendes Enzym mit 1,6µg/ml Trypsin (64nM) bei 25°C in 10mM KP Puffer, pH 7,5 inkubiert. Einige Ansätze enthielten darüber hinaus Liganden in sättigender Konzentration (32mM Gln; 250µM ProFAR), sowie Aminosäuren oder Salze. Die Ansätze besaßen ein Volumen von 1ml. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 100µl Aliquots entnommen und die Reaktion durch

Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer und sofortiges Erhitzen (5 min, 99°C) abgestoppt. Die Analyse der Trypsinverdauung erfolgte über SDS-PAGE.

4.4.7 Analytische Gelfiltration

Durch analytische Gelfiltration kann die apparente Molmasse eines Proteins und damit auch sein Oligomerisierungszustand bestimmt werden. Dazu wird eine mit Eichprotein erstellte Kalibrierungsgerade verwendet (s. Anhang). Darüber hinaus zeigt ein symmetrischer *peak* eine hohe Reinheit des Proteins an.

Analog zur präparativen Gelfiltration (4.3.6) erfolgte die Auftrennung auf einer Superdex75-Säule (CV =24ml) bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,5ml/min. Als Laufpuffer wurde 50mM KP, pH 7,5 mit 300mM KCl bei 25°C verwendet. Standardmäßig wurden 100µl Proteinlösung mit einer Konzentration von etwa 50µM auf die gespülte und mit Laufpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte durch Spülen mit 1,5CV Laufpuffer.

Mit Hilfe der Unicorn Software wurden die erhaltenen *peaks* integriert, um die prozentualen Anteile zu bestimmen. Zusätzlich wurden die eluierten Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert.

4.4.8 Fluoreszenzspektroskopie

Unter Fluoreszenzspektroskopie versteht man die Messung der Emission von Photonen nach Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge. Die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen beruht auf der Anregung der delokalisierten Elektronenpaare der aromatischen Aminosäurereste in den S_1 Zustand und ihr Zurückfallen in den Grundzustand S_0 . Sowohl Tyrosin, als auch Tryptophan zeigen bei der Anregung mit Licht der Wellenlänge 280nm ein Fluoreszenz-Signal, wobei die Fluoreszenz-Intensität von Tryptophan dominiert. Dies ist mit der stärkeren Absorption und der höheren Quantenausbeute, sowie mit dem strahlungslosen Energie-Transfer von Tyrosin zu Tryptophan zu erklären (Förster-Transfer). Nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 295nm, bei der Tyrosin nicht absorbiert, beruht die Fluoreszenz ausschließlich auf Tryptophan. Aufgrund der relativ langen Verweildauer im angeregten Zustand ($10^{-9} - 10^{-7}$ s) sind, im Unterschied zur Absorption, Wechselwirkungen mit der Umgebung für die Lage und Intensität des Fluoreszenzsignals relevant. So gibt die Lage des Tryptophan-Fluoreszenz-Maximums Auskunft über die Polarität der Umgebung. Ist Tryptophan in Wasser gelöst, ist ein Fluoreszenz-Emissionsmaximum bei etwa 350nm zu beobachten. Je hydrophober die Umgebung ist, desto weiter ist das Emissionsmaximum zu kürzeren Wellenlängen verschoben (hypsochromer Effekt, „Blauverschiebung“). So zeigen

Tryptophane in organischen Lösungsmitteln oder im Inneren von Zellmembranen ein Fluoreszenz-Maximum bei etwa 320nm (Galla *et al.*, 1985). Da Proteine in wässrigen Lösungen vorliegen und Tryptophane in der Regel im nativen Zustand vom Lösungsmittel abgeschirmt sind, kann die Lage des Fluoreszenz-Maximums dazu genutzt werden, Konformationsänderungen oder Denaturierung eines Proteins zu verfolgen.

Es wurden jeweils Einzelenzyme bzw. Proteinkomplexe mit einer Konzentration von etwa 10 μ M bzw. 20 μ M in 1ml 10mM KP-Puffer pH 7,5 bei 25°C vermessen. Darüber hinaus wurden Messungen mit sättigenden Konzentrationen von Glutamin (32mM) und ProFAR (100 μ M) durchgeführt. Alle Messungen erfolgten am Cary Eclipse mit folgenden Einstellungen:

	Einstellungen
<i>excitation</i> [nm]	280 / 295
<i>excitation slit</i> [nm]	5
<i>emission</i> [nm]	300-400
<i>emission slit</i> [nm]	2,5-5
<i>scan rate</i> [nm/min]	120
<i>average time</i> [s]	0,5
<i>data intervall</i> [nm]	1
<i>No of scans</i>	10
<i>pMT detector</i>	high

Aus je 10 Messungen wurde der Mittelwert bestimmt und eine Basislinien-Korrektur um die geringe Eigenfluoreszenz des Puffers (Maximum bei 328nm) vorgenommen.

4.4.9 Fluorimetrische Titration von HisH und HisF

Mit Hilfe der fluorimetrischen Titration kann die Komplexbildung von HisH und HisF analysiert werden, da HisH einen einzigen Tryptophanrest (W123) besitzt, der bei der Assoziation mit HisF vom Lösungsmittel abgeschirmt wird (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Um die Auswertung zu erleichtern, wurde eine Tryptophan-freie HisF Variante (HisF_W156F) verwendet. HisH wurde in einer Konzentration von 10 μ M (bzw. 1 μ M) vorgelegt und Tryptophan-freies HisF in Titrationsschritten von 1-2 μ M (bzw. 0,1 μ M) bis zu einer Endkonzentration von 20 μ M (bzw. 2 μ M) zugegeben. Nach jedem Titrationsschritt

wurde ein Fluoreszenz-Emission-Spektrum von 300-400nm nach Anregung mit 295nm aufgenommen.

Die Messungen erfolgten am Cary Eclipse standardmäßig mit folgenden Einstellungen:

	Einstellungen
<i>excitation</i> [nm]	295
<i>excitation slit</i> [nm]	5
<i>emission</i> [nm]	300-400
<i>emission slit</i> [nm]	5
<i>scan rate</i> [nm/min]	30
<i>average time</i> [s]	0,5
<i>data intervall</i> [nm]	0,25
<i>No of scans</i>	3
<i>pMT detector</i>	medium

4.4.10 Circular-Dichroismus

Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) ist eine spezielle Form der UV/vis-Spektroskopie, die auf Wechselwirkungen von zirkular polarisiertem Licht mit optisch aktiven Substanzen, wie Proteinen, beruht. Optisch aktive Substanzen besitzen unterschiedliche Brechungsindizes für rechts- und links-polarisiertes Licht, was zu unterschiedlichen Verzögerungen beim Durchgang der Lösung und somit zu einer Phasenverschiebung ϕ führt, die bei der Optischen Rotationsdispersion gemessen wird. Weiterhin unterscheiden sich optisch aktive Substanzen in den Extinktionskoeffizienten für rechts- und links-polarisiertes Licht, was beim Durchgang der Lösung zu elliptisch polarisiertem Licht führt. Die Elliptizität (θ_{obs}) wird bei CD-Messungen als Signal verwendet. Es findet eine Normierung auf die durchschnittliche molare Elliptizität pro Aminosäure θ_{MRW} nach folgender Formel statt (Schmid, 1997):

$$\theta_{\text{MRW}} = \frac{\theta_{\text{obs}} \cdot \text{MRW}}{c \cdot d} = \frac{\theta_{\text{obs}} \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A}$$

wobei :

θ_{MRW} = durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure [$\text{degcm}^2\text{dmo}l^{-1}$]

θ_{obs} = gemessene Elliptizität [mGrad]

MRW = mittlere Molmasse der Aminosäurenreste (*mean residue weight*) [Da]

c = Konzentration der Proteinlösung [mg/ml]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

M_r = molare Masse [g/mol]

N_A = Anzahl der Aminosäuren

Formel 9: Berechnung der durchschnittlichen Elliptizität pro Aminosäure aus der über Circular-Dichroismus gemessene Elliptizität

Fern-UV-CD-Spektren (170-250nm) beruhen vor allem auf der Absorption der Peptidbindung und lassen somit Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur des Proteins zu. Nach Johnson *et al.* (1990) besitzen α -Helix, β -Stränge und *random coil* typische Fern-UV-CD-Spektren, aus denen sich die Proteinspektren zusammensetzen. Als charakteristische Merkmale eines fern-UV-CD-Spektrums gelten Maximum, Nulldurchgang und Minima. Nah-UV-CD-Spektren (250-310nm) sind auf die Absorption der aromatischen Aminosäuren zurückzuführen und reagieren sehr empfindlich auf Änderungen in der Tertiärstruktur eines Proteins.

Alle CD-Messungen wurden bei 25°C in Küvetten mit einer Schichtdicke von 0,1cm und einem Volumen von 200 μ l durchgeführt. Für Fern-UV-CD-Spektren wurden etwa 0,2mg/ml (etwa 8 μ M) Protein eingesetzt, für Nah-UV-CD-Spektren etwa 10mg/ml (etwa 400 μ M). Nach den CD-Messungen wurden die genauen Proteinkonzentrationen über Absorptionsspektroskopie bestimmt. Als Puffer wurde bevorzugt 10mM KP-Puffer pH 7,5 verwendet. Bei Messungen mit 100mM KP-Puffer waren die Spektren durch die geringe Lichtintensität unterhalb 195nm nicht mehr auszuwerten. Die Einstellungen waren wie folgt:

	Einstellungen
<i>scan rate</i> [nm/min]	50
<i>wavelength</i> [nm]	185-250 (fern-UV) 250-310 (nah-UV)
<i>stop resolution</i> [nm]	0,1
<i>band width</i> [nm]	2
<i>accumulation</i>	10 (fern-UV) 5 (nah-UV)
<i>response</i> [s]	1

Aus je 5 (fern-UV) bzw. 10 (nah-UV) Messungen wurde der Mittelwert bestimmt, eine Basislinien-Korrektur vorgenommen und nach Formel 9 normiert.

4.4.11 *Steady-state* Enzymkinetiken

Zur funktionellen Charakterisierung von HisH und HisF wurden enzymkinetische Messungen unter *steady-state* Bedingungen bei RT durchgeführt und die katalytischen Parameter K_M und k_{cat} bestimmt. Es wurde die Komplexreaktion (glutamin-abhängige Reaktion, Abbildung A) zur Bestimmung des K_M für PRFAR unter Sättigung mit Glutamin, die HisF-Teilreaktion (ammoniumabhängige Reaktion, Abbildung B) zur Bestimmung des K_M^{PRFAR} unter Sättigung mit Ammoniumsalzen und die HisH-Teilreaktion (Glutaminase-Reaktion, Abbildung C) zur Bestimmung des K_M für Gln unter Sättigung mit PRFAR gemessen. Alle Messungen wurden mit komplexierten Proteinen durchgeführt.

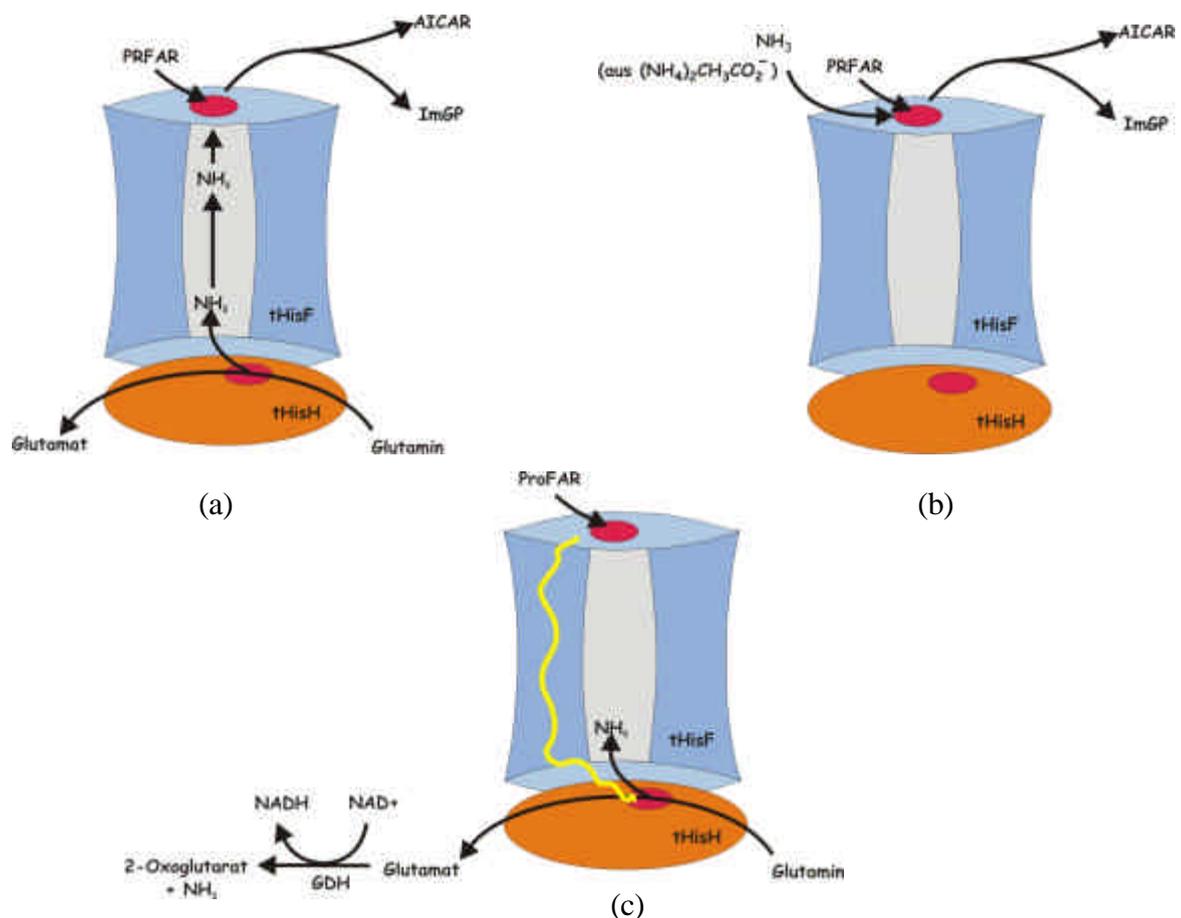


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der glutaminabhängigen Komplexreaktion (a), der ammoniumabhängigen HisF-Teilreaktion (b), sowie der Glutaminase-HisH-Teilreaktion (c).

Farbkodierung: HisF (blau), HisH (orange), aktive Zentren (rot).

4.4.11.1 Messung der glutaminabhängigen Gesamtreaktion

Die glutaminabhängige Reaktion ist die physiologische Gesamtreaktion. Glutamin wird von HisH zu Glutamat und NH_3 hydrolysiert. NH_3 wird durch den hydrophoben Kanal zu HisF transferiert und dort mit dem Substrat PRFAR in ImGP und AICAR umgesetzt.

Da PRFAR sehr labil ist, wurde es *in situ* aus dem stabileren ProFAR mittels HisA hergestellt (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). HisA wurde im Überschuss zugesetzt (600nM) und die Reaktion nach einigen Minuten durch Zugabe des HisH:HisF Komplexes bzw. der Varianten gestartet. Die Reaktion wurde über den Abfall der Absorption bei 300nm verfolgt und quantifiziert ($\Delta\epsilon_{300} (\text{ProFAR} - \text{AICAR}) = 5,64 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Klem & Davisson, 1993).

Damit die Hydrolyse von Glutamin durch HisH die einzige Ammoniak-Quelle in der Reaktion ist, wurde Ammonium-freier Tris Acetat Puffer pH 8,0 und Ammonium-freies ProFAR verwendet. Es wurden unter Sättigung mit Glutamin und PRFAR gesamte Umsatzkurven aufgenommen und durch Fit mit der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung (COSY, Eberhard, 1990) die katalytischen Parameter K_M^{PRFAR} und V_{max} bzw. k_{cat} bestimmt. Zusätzlich wurden unter Sättigung mit Glutamin und unterschiedlichen PRFAR-Konzentrationen Anfangssteigungen und daraus Sättigungskurven erstellt. Daraus wurde wiederum K_M^{PRFAR} und V_{max} bzw. k_{cat} ermittelt. Die wichtigsten Versuchsbedingungen für wildtypisches HisH:HisF im Überblick:

5mM Glutamin (sättigend)
0-100 μ M ProFAR
600nM His A
in 50mM Tris Acetat, pH 8.0

Die Reaktion wurde bei RT durchgeführt und durch Zugabe von 0,1 μ M HisH:HisF gestartet und über die Abnahme der Absorption bei 300nm verfolgt.

4.4.11.2 Messung der ammoniumabhängigen HisF-Teilreaktion

Die ammoniumabhängige Reaktion ist die von HisF katalysierte Teilreaktion, wobei Ammoniumsalze als Quelle für NH_3 dienen. Analog zur glutaminabhängigen Reaktion wird das Substrat PRFAR *in situ* aus dem stabileren ProFAR mittels HisA hergestellt (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). HisA wurde im Überschuss zugesetzt (600nM) und die Reaktion

nach einigen Minuten durch Zugabe des HisH:HisF Komplexes bzw. der Varianten gestartet. Für die ammoniumabhängige Reaktion ist die Anwesenheit von HisH im Prinzip nicht erforderlich, dennoch wurden wegen der Vergleichbarkeit mit der glutaminabhängigen Gesamtreaktion und der HisH-Teilreaktion alle Messungen mit dem HisH:HisF Komplex durchgeführt. Die Reaktion wurde über den Abfall der Absorption bei 300nm verfolgt und quantifiziert ($\Delta\epsilon_{300} (5^{\text{ProFAR}} - \text{AICAR}) = 5,64 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, Klem & Davidson, 1993). Als Ammoniak-Quelle diente NH_4^+ Acetat (100mM), welches in 50mM Tris Acetat bei pH 8,5 rund 17mM Ammoniak entspricht (Henderson-Hasselbalch-Gleichung).

Es wurden unter Sättigung mit Ammoniak und PRFAR gesamte Umsatzkurven aufgenommen und durch Fit mit der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung (COSY, Eberhard, 1990) die katalytischen Parameter K_M^{PRFAR} und V_{max} bzw. k_{cat} bestimmt. Zusätzlich wurden unter Sättigung mit Ammoniak und unterschiedlichen PRFAR-Konzentrationen Anfangssteigungen bestimmt und daraus Sättigungskurven erstellt. Daraus wurden wiederum K_M^{PRFAR} und V_{max} bzw. k_{cat} ermittelt. Die wichtigsten Versuchsbedingungen für wildtypisches HisH:HisF im Überblick:

100mM NH_4^+ Acetat (sättigend)

0-100 μM ProFAR

600nM His A

in 50mM Tris Acetat, pH 8.5

Die Reaktion wurde bei RT durchgeführt und durch Zugabe von 0,1 μM HisH:HisF gestartet und über die Abnahme der Absorption bei 300nm verfolgt.

4.4.11.3 Messung der Glutaminase-HisH-Teilreaktion

Die Glutaminase-Reaktion ist die von HisH katalysierte Teilreaktion, d.h. die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und NH_3 . Die Glutaminase-Aktivität sowohl von isoliertem HisH als auch des HisH:HisF Komplexes aus *T. maritima* ist so gering, dass sie mit der verwendeten Methode nicht nachweisbar ist (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Erst durch die Bindung eines Liganden an HisF findet eine Stimulierung der Glutaminase-Aktivität statt. Neben dem HisA-Substrat ProFAR hat sich auch das HisF-Produkt ImGP als wirksamer Ligand erwiesen (Klem & Davisson, 1993; Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001).

Da die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und Ammoniak mit keiner Absorptionsänderung verbunden ist, wurde der Reaktion die Glutamat-Dehydrogenase (GDH)-Reaktion nachgeschaltet. Durch die GDH wird Glutamat zu 2-Oxoglutarat oxidiert. Die damit einhergehende NAD^+ -Reduktion zu NADH^+ ist durch eine Zunahme der Absorption bei 340nm nachweisbar. Es wurden die Anfangssteigungen der Reaktion in Abhängigkeit von der Glutaminkonzentration gemessen und daraus Sättigungskurven erstellt. Daraus wurden K_M^{Gln} und V_{max} bzw. k_{cat} ermittelt. Die wichtigsten Versuchsbedingungen für wildtypisches HisH:HisF im Überblick:

0-150 mM Glutamin
5mM NAD^+
0,75mg/ml GDH
50 μM ProFAR (sättigend)
in 50mM Tricin/KOH, pH 8.0

Die Reaktion wurde bei RT durchgeführt und durch Zugabe von 1 μM HisH:HisF gestartet und über die Zunahme der Absorption bei 340nm verfolgt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Die durchgeführten Experimente und deren Auswertung und Diskussion gliedern sich in vier Kapitel. Nach einer kurzen Vorstellung der drei Enzyme HisH, HisF und TrpG aus *T. maritima* und ihrer Beziehung zueinander in Kapitel (1) werden in Kapitel (2) der Proteinkomplex HisH:HisF, sowie die strukturellen und funktionellen Eigenschaften hergestellter HisH und HisF Varianten beschrieben. Kapitel (3) enthält die Charakterisierung von wildtypischem TrpG und Kapitel (4) beschäftigt sich mit der Untersuchung der Evolution der Glutaminasen anhand hergestellter TrpG Varianten im Vergleich zu HisH.

Kapitel 1: Die Enzyme HisH, HisF und TrpG aus *Thermotoga maritima*

5.1.1 DALI-Suche zur Identifizierung von Proteinen mit signifikanter Strukturähnlichkeit zu HisH

Neben der Charakterisierung der Protein-Protein Wechselwirkungen im Bi-Enzymkomplex Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus der Glutaminase HisH und der Synthase HisF soll im Rahmen dieser Arbeit die Evolution der Glutaminasen untersucht werden. Zur Identifizierung eines möglicherweise nah verwandten Proteins zu HisH wurde die Proteindatenbank (PDB, *protein data bank*, Berman *et al.*, 2000) mit Hilfe von DALI (*distance matrix alignment*, Holm & Sander, 1995, <http://www.ebi.ac.uk/dali>) nach Proteinen mit signifikanter Strukturähnlichkeit durchsucht. Die größte Strukturhomologie wurde zu His7, dem HisH:HisF Fusionsprotein aus Hefe gefunden (Tabelle 5.1). An zweiter Stelle rangierte TrpG aus *S. solfataricus*, die Glutaminase der Anthranilat-Synthase aus der Tryptophanbiosynthese. Ein Z-Wert von 16,1 ist ein deutlicher Hinweis auf eine evolutive Verwandtschaft der beiden Enzyme (Hadley & Jones, 1999; Lichtarge, 2001). Darüber hinaus wurden als signifikante Treffer weitere Glutaminasen, gefolgt von Hydrolasen, gefunden.

Tabelle 5.1: Die DALI-Suche mit HisH aus *Thermotoga maritima* (1k9v) identifiziert signifikante Strukturähnlichkeiten zum HisH:HisF Homologen His7 aus Hefe und zu anderen Glutaminasen

Z-Score: relatives Maß für die Signifikanz eines Treffers, SeqID (%): prozentualer Anteil der Aminosäure-Sequenzidentität an äquivalenten Positionen, rmsd: Wurzel der mittlere quadratische Abweichung der überlagerten C_α Atome in Å (*positional root mean square deviation*), pdb: Kürzel der entsprechenden Proteine in der Protein-Datenbank (PDB)

His7 = HisH:HisF (ImGP-S) Fusionsprotein aus Hefe, TrpG = Glutaminase der Anthranilat-Synthase aus *S. solfataricus*, GMPS = Glutaminase der GMP Synthetase aus *E. coli*, CPS = Glutaminase (kleine Untereinheit) der Carbamoyl Phosphate Synthetase aus *E. coli*, Protease I = intrazelluläre Protease PH1704 aus *Pyrococcus horikoshii*

Treffer	#	Z-Score	SeqID (%)	rmsd [Å]	pdb
HisH vs. HisH	1	42,0	100	0	
His7	2	24,2	30	1,8	1jvn-A } ImGP-S
TrpG	3	16,1	17	2,6	1qdl-B } Glutaminasen
GMPS	4	14,7	22	2,7	1gpm-A }
CPS	5	14,0	21	2,6	1c3o-B }
Protease I	6	8,2	15	3,2	1g2i-A } Hydrolase

HisH aus *T. maritima* und TrpG aus *S. solfataricus* weisen den gleichen Faltungstyp auf und können sehr gut superpositioniert werden (Abbildung 1.6; Tabelle 5.1). Neben den Sekundärstrukturelementen kommen auch die katalytische Triade aus Cys84/84, His178/175, Glu180/177 von HisH / TrpG sehr gut übereinander zu liegen. Daher soll die Evolution der Glutaminasen am Beispiel von HisH und TrpG näher untersucht werden.

Da TrpG aus *S. solfataricus* nach heterologer Expression nur in sehr geringen Mengen in löslicher Form hergestellt wird (Ivens, 1998) ist es zur Verwendung von *in vivo* Interaktions-Assays, wie dem *yeast-2-hybrid* System, nur bedingt geeignet. Zudem sollten alle Proteine aus dem gleichen Organismus verwendet werden. Daher wurde mit TrpG aus *T. maritima* gearbeitet, welches bereits unter Standardbedingungen sehr starke Überexpression zeigt (s. Kapitel 3). Die Struktur von TrpG aus *T. maritima* ist bislang nicht gelöst, aufgrund der Sequenzähnlichkeit von 68% zu TrpG aus *S. solfataricus* kann jedoch von hoher struktureller Identität ausgegangen werden. Im Folgenden sind daher, wenn nicht anders erwähnt, immer Enzyme aus *T. maritima* bezeichnet.

5.1.2 Analyse der Proteine HisH, HisF und TrpG aus *T. maritima* und ihrer Kontaktflächen

Die Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung von HisF, HisH und TrpG soll Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Enzyme aufdecken. In Bezug auf die Untersuchungen der HisH:HisF Wechselwirkungen (Kapitel 3) sowie die Evolution der Glutaminasen (Kapitel 4) sind vor allem die Aminosäuren an den Kontaktflächen zum Interaktionspartner von Interesse.

Die Enzyme Imidazolglycerinphosphat-Synthase (HisH:HisF) und Anthranilat-Synthase (TrpG:TrpE) aus der Familie der GATasen bilden obligate Proteinkomplexe aus. Im Allgemeinen weisen solche obligaten Proteinkomplexe an der Kontaktfläche eine ebenso hydrophob dominierte Aminosäure-Zusammensetzung wie im gesamten Protein auf.

Zur Analyse der gesamten Proteine wurden die Sequenzen von HisH, HisF und TrpG herangezogen. Zur Definition der an der Kontaktfläche lokalisierten Aminosäuren wurden für *tm*HisH:HisF die Strukturdaten von Douangamath *et al.* (2002) verwendet. Da für *tm*TrpG keine Röntgenstruktur bekannt ist, wurden die Daten aus der Analyse der Kontaktfläche von *ss*TrpG im Anthranilat-Synthase Komplex (Abbildung 1.5) verwendet. Darüber hinaus wurden für alle Proteine solche Aminosäuren als Teil der Kontaktfläche definiert, die weniger als 5Å Abstand zur nächstgelegenen Aminosäure des Bindungspartners aufweisen (5Å Radius) und somit in einer Entfernung liegen, in der nicht-kovalente Wechselwirkungen stattfinden können. Die Oberflächen-bildenden Aminosäuren wurden mit dem SWISS PDB Viewer ausgewählt (Aminosäuren mit = 30% Lösungsmittlexposition).

In Enzymkomplexen sind neben katalytisch essentiellen Resten meist auch solche Aminosäuren konserviert, die für die Komplexbildung und die Weiterleitung allosterischer Signale verantwortlich sind. Daher wurde die Aminosäure-Zusammensetzungen unter besonderer Berücksichtigung konservierter Reste analysiert, welche über Sequenzalignments (*pile up*, GCG Wisconsin Package) und Angaben in der Literatur ermittelt wurden (Knöchel *et al.*, 1999; Lang *et al.*, 2000; Douangamath *et al.*, 2002).

Die Aminosäuren wurden nach ihrem chemischen Charakter in vier Gruppen eingeteilt: aromatisch (FYW), polar (QSTCMN), hydrophob (GAPLIV) und geladen (DERKH). In Tabelle 5.2 sind die Aminosäure-Zusammensetzungen von *tm*HisH, *tm*HisF und *tm/ss*TrpG im Ganzen, sowie ihren Kontakt- und Oberflächen gegenübergestellt. In den Abbildung 5.1-Abbildung 5.4 sind die Resultate der Analyse getrennt in Form von Balkendiagrammen gezeigt. In allen Abbildungen sind aromatische Reste in weinrot, polare in gelb, hydrophobe in lila und geladenen in hellblau gekennzeichnet.

Tabelle 5.2: Gegenüberstellung der Aminosäure-Zusammensetzung von *tmHisF*, *tmHisH* und *tm/ssTrpG* im Ganzen, sowie an ihren Ober- und Kontaktflächen

Die an der Kontaktfläche im *tmHisH*:HisF und *ssTrpG*:TrpE Komplex beteiligten Aminosäuren wurden zum einen aus der Literatur übernommen (Douangamath *et al.*, 2002; Knöchel *et al.*, 1999), zum anderen über den Abstand (< 5 Å) zur nächstgelegenen Aminosäure des Partnerproteins definiert. Für die Analyse von TrpG im Ganzen wurde die Sequenz von *tmTrpG* verwendet. Die an den Oberflächen lokalisierten Reste wurden mit dem Programm SWISS PDB Viewer identifiziert. Es wurde jeweils nach aromatischen, polaren, hydrophoben und geladenen Aminosäuren unterschieden und die Angaben absolut und prozentual aufgelistet. Die hier aufgelisteten Daten bilden die Grundlage für die Abbildung 5.1- Abbildung 5.4

	aromatisch		polar		hydrophob		geladen	
	FYW		QSTCMN		GAPLIV		RKHED	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<i>tm HisH</i> (201 AS)	20	10	34	17	83	42	64	32
Konservierte Reste (45 AS)	5	11	8	18	22	49	9	20
Kontaktfläche (Douangamath <i>et al.</i> , 2002; 14 AS)	2	14	5	36	2	14	5	36
Kontaktfläche (5Å Radius, 24 AS)	4	17	6	25	5	21	9	38
Konservierte Reste der Kontaktfläche (5Å Radius, 12 AS)	2	17	4	25	3	25	3	33
Oberfläche (42 AS)	0	0	4	10	8	19	30	71
<i>tm HisF</i> (253 AS)	18	7	43	17	118	47	74	29
konservierte Reste (64 AS)	5	8	5	8	37	58	17	27
Kontaktfläche (Douangamath <i>et al.</i> , 2002; 17AS)	0	0	5	29	5	29	7	41
Kontaktfläche (5Å Radius, 36 AS)	1	3	7	19	15	42	13	36
konservierte Reste der Kontaktfläche (5Å Radius, 13 AS)	0	0	1	8	6	46	6	46
Oberfläche (56 AS)	3	5	9	16	7	13	37	66
<i>tmTrpG</i> (197 AS)	13	7	35	18	92	47	60	30
<i>ssTrpG</i> (195 AS)								
Konservierte Reste (21 AS)	2	10	6	29	9	43	4	19
Kontaktfläche (5Å Radius, 30 AS)	4	13	7	23	9	30	10	33
Konservierte Reste der Kontaktfläche (5Å Radius, 12 AS)	2	17	3	25	3	25	4	33

Die Aminosäure-Zusammensetzung der Proteine HisH und HisF zeigt große Ähnlichkeiten (Abbildung 5.1). Wie allgemein üblich, dominieren hydrophobe Aminosäuren (>40%), gefolgt von geladenen (~30%). Polare und aromatische Reste spielen eine untergeordnete Rolle. Die Oberflächen der Proteine HisH und HisF sind sehr stark (>65%) von geladenen Aminosäuren geprägt, wie dies für lösliche Proteine üblich ist. Es sind kaum Unterschiede zwischen den beiden Proteinen festzustellen.

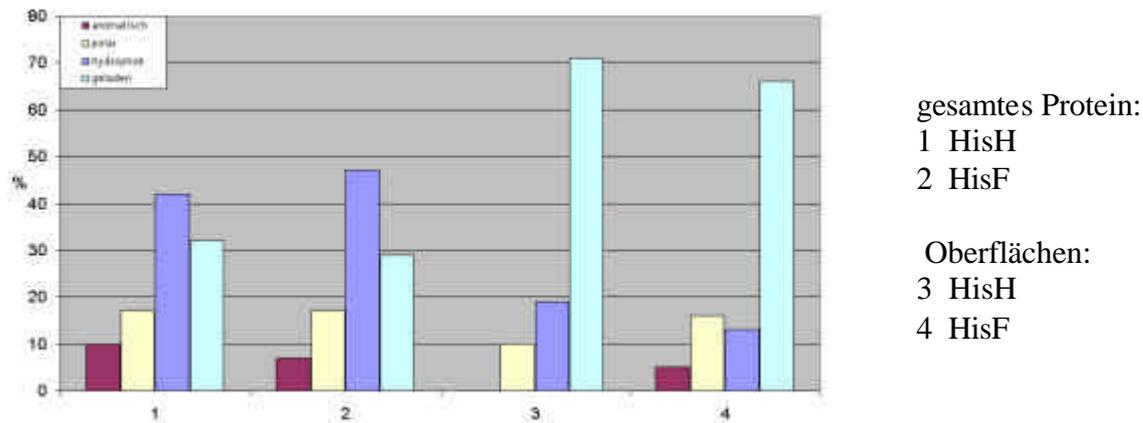


Abbildung 5.1: Die Aminosäure-Zusammensetzung von HisH und HisF als Ganzes und ihrer Oberflächen

Betrachtet man dagegen die an der Kontaktfläche lokalisierten Aminosäuren von HisH und HisF, dann zeigen sich deutliche Unterschiede (Abbildung 5.2, Daten 1-2). Während in HisH geladene Reste dominieren (38%) und hydrophobe, polare und aromatische Aminosäuren jeweils 17-25% ausmachen, zeigt die Kontaktfläche von HisF eine sehr ähnliche Aminosäure-Zusammensetzung wie im gesamten Protein und somit die für obligate Proteinkomplexe typische Dominanz hydrophober Aminosäuren (42%). Aber auch die geladenen Aminosäuren liegen in hohem Anteil vor (36%). Polare Reste machen 19% aus, aromatische sind vernachlässigbar (3%). Die Unterschiede der Kontaktflächen von HisH und HisF werden noch deutlicher, wenn man die Konservierung der Reste betrachtet (Abbildung 5.2, Daten 3-4).

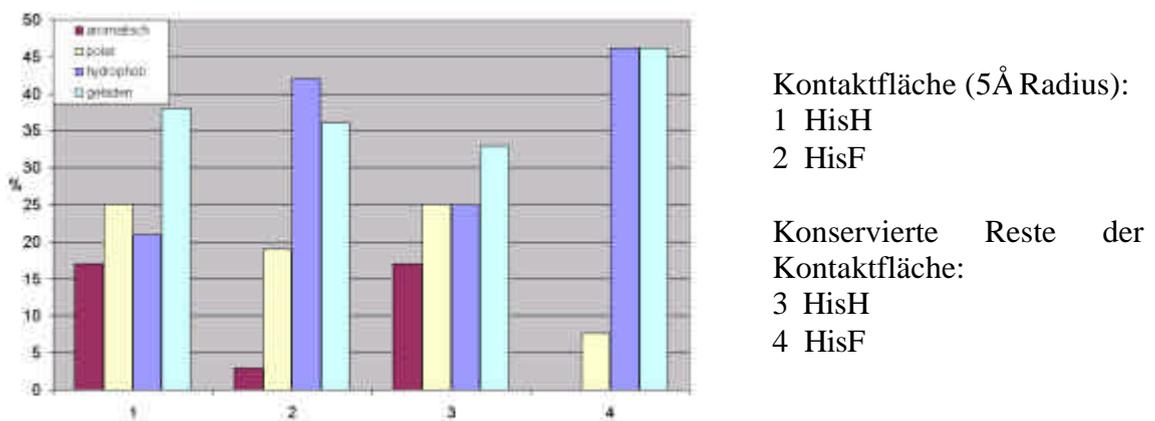
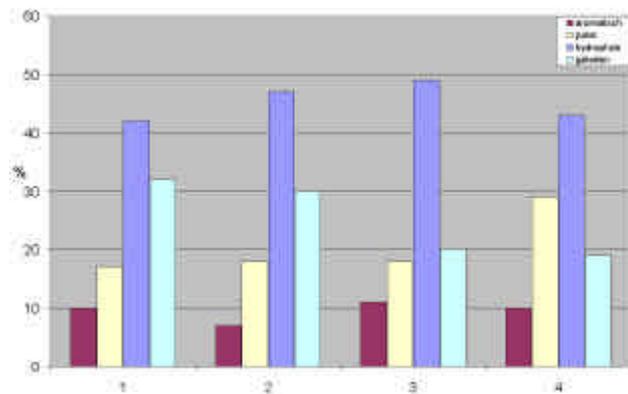


Abbildung 5.2: Die Aminosäure-Zusammensetzung von HisH und HisF an der Kontaktfläche

Während in HisH konservierte Aminosäuren an der Kontaktfläche aus den verschiedenen chemischen Klassen rekrutiert werden, sind in HisF konservierte Kontaktflächenreste praktisch ausschließlich hydrophob oder geladen.

Wenn die Glutaminasen HisH und TrpG wie postuliert aus einem gemeinsamen Vorläufer-Protein entstanden sind, wäre zu erwarten, dass auch die heutigen Proteine noch Ähnlichkeiten in der Zusammensetzung aufweisen. Abbildung 5.3 zeigt, dass dies tatsächlich der Fall ist.



Gesamtes Protein:

- 1 HisH
- 2 *tm*TrpG

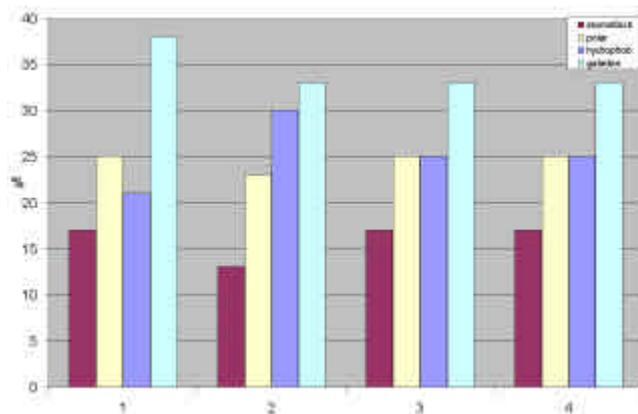
Konservierte Reste:

- 3 HisH
- 4 *ss*TrpG

Abbildung 5.3: Die Aminosäure-Zusammensetzungen von *tm*HisH, *tm*HisF und *tm/ss*TrpG sind ähnlich

Allerdings fällt in TrpG ein verhältnismäßig hoher Anteil an polaren Aminosäuren auf (29%). Dies entspricht den Beobachtungen von Hu *et al.* (2000). Zudem sind hydrophobe Aminosäuren im Unterschied zu HisH (und HisF) schwächer konserviert.

Betrachtet man die Kontaktflächen von HisH und *ss*TrpG, dann ergibt sich ein vergleichbares Bild (Abbildung 5.4, Daten 1 und 2).



Kontaktfläche (5Å Radius):

- 1 HisH
- 2 *ss*TrpG

Konservierte Reste der Kontaktfläche:

- 3 HisH
- 4 *ss*TrpG

Abbildung 5.4: Der chemische Charakter der Aminosäuren an der Kontaktfläche von HisH und TrpG und das Muster ihrer Konservierung sind identisch.

Sehr auffällig ist, dass der chemische Charakter konservierter Aminosäuren an den Kontaktflächen von HisH und TrpG identisch ist (Abbildung 5.4, Daten 3 und 4). Es dominieren geladene Reste (33%), polare und hydrophobe Aminosäuren sind zu je 25% vorhanden und ein vergleichsweise hoher Anteil von 17% der konservierten Aminosäuren sind Aromaten. Die große Ähnlichkeit der Konservierung an der Kontaktfläche von HisH und

ssTrpG bestärkt die Hypothese, HisH und TrpG seien durch divergente Evolution aus einer ursprünglichen Glutaminase entstanden, zumal die Unterschiede zum HisH-Bindungspartner HisF trotz „gemeinsamer“ Evolution sehr auffällig sind. Darüber hinaus deutet der hohe Anteil an konservierten geladenen Resten an der Kontaktfläche darauf hin, dass die obligate Bindung der Glutaminasen an Synthesen evolutiv relativ jung ist.

Wie die nachfolgend beschriebene Analyse der HisH- und TrpG-Varianten zeigt (Kapitel 2 und 4), sind intermolekulare Bindungen sehr robust gegenüber Mutationen (Hu *et al.*, 2000). Wenn jedoch einzelne Austausche eine Bindung nicht messbar stören, wäre, anders als bei katalytischen Aktivitäten, im Allgemeinen auch nicht anzunehmen, dass einzelne Aminosäuren für eine stabile Protein-Protein Interaktion essentiell sind.

Sind die Oberflächen physikalisch sehr ähnlich, wie dies bei HisH und TrpG aufgrund der ähnlichen Struktur der Fall ist, ist vermutlich der chemische Charakter der beteiligten Aminosäuren von größerer Bedeutung. Da jedoch die Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung zeigte, dass der allgemeine chemische Charakter der konservierten Kontaktflächen-bildenden Reste in HisH und TrpG WT ähnlich sind (Abbildung 5.4, Daten 4 und 6), könnte gefolgert werden, dass Unterschiede lediglich in der Anordnung der chemischen Eigenschaften an der Kontaktfläche und der relative Position zum Bindungspartner differiert. Darüber hinaus deutet dies darauf hin, dass die hohe Spezifität der Interaktion mit dem Bindungspartner auf einigen wenigen für HisH bzw. TrpG spezifische Reste zurückzuführen sein.

5.1.3 Zusammenfassung

Mit Hilfe von DALI wurde TrpG, eine Glutaminase der Klasse I aus der Tryptophanbiosynthese, als das Protein mit der zu HisH höchste Strukturhomologie identifiziert. Der dabei ermittelte Z-Wert von 16,1 ist ein deutlicher Hinweis auf eine evolutive Verwandtschaft der beiden Enzyme.

Die Analyse der Aminosäuren von HisF, HisH und TrpG zeigt für alle drei Proteine eine Zusammensetzung, wie sie für lösliche Proteine zu erwarten ist. Bei Betrachtung der Kontaktflächen und der konservierten Kontaktflächen-bildenden Aminosäuren zeigen sich dagegen Unterschiede im chemischen Charakter zwischen der Synthase HisF und den Glutaminasen HisH und TrpG. Diese weisen, obwohl sie aus unterschiedlichen Stoffwechselwegen stammen und unterschiedliche Bindungspartner besitzen, einen identischen chemischen Charakter der konservierten Aminosäuren an der Kontaktfläche auf, was die Hypothese einer gemeinsamen Evolution bestärkt. Bei den konservierten Aminosäuren der Kontaktfläche dominieren geladene Reste (33%), polare und hydrophobe Aminosäuren sind zu je 25% vorhanden. Auffällig ist der vergleichsweise hohe Anteil von Aromaten (17%).

Kapitel 2: Die Regulation der Protein-Protein Wechselwirkungen im Bi-Enzymkomplex HisH:HisF

5.2.1 Der Bi-Enzymkomplex aus HisH und HisF

HisH und HisF aus *T. maritima* bilden mit hoher Affinität einen stöchiometrischen 1:1 Komplex aus (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001), der sich nach der Einteilung von Ofran & Rost (2003) als „Hetero-Obligomer“ (permanenter hetero-oligomerer Komplex) beschreiben lässt. Zwischen den aktiven Zentren von HisH und HisF werden in beide Richtungen Signale transferiert, die auf ligandeninduzierten Konformationsänderungen beruhen. Dies äußert sich darin, dass die Glutaminase-Aktivität von HisH durch Bindung des Substrates PRFAR (bzw. des Substratanalogons ProFAR oder das Produkt ImGP) an HisF induziert und der dabei entstehende Ammoniak durch einen Kanal zum aktiven Zentrum von HisF geleitet wird (Chaudhuri *et al.*, 2001; Douangamath *et al.*, 2002).

Die Aminosäuren an der Kontaktfläche von HisH und HisF, die etwa 1050Å² umfasst (Douangamath *et al.*, 2002), zeigen eine sehr starke Konservierung. Während im gesamten HisH-Protein etwa 22% konservierte Reste zu finden sind, sind es an der Kontaktfläche etwa 50%. Auch HisF zeigt im Vergleich zum verwandten Protein HisA eine auffällig starke Konservierung von Aminosäuren am N-terminalen Ende des Fasses (Lang *et al.*, 2000), welches in Wechselwirkung mit HisH tritt. Diese Konservierung ist für Kontaktbereiche typisch (Valdar & Thornton, 2001). In *S. cerevisiae* liegt die Imidazolglycerinphosphat-Synthase auf einer Polypeptidkette vor und wird als His7 bezeichnet, innerhalb dessen die Glutaminase- und die Synthase-Domäne ähnliche Kontakte ausbilden wie sie zwischen HisH und HisF beobachtet werden (Chaudhuri *et al.*, 2001).

In diesem Kapitel wird der Frage nachgegangen, welche dieser konservierten Reste einzeln und innerhalb längerer Sequenzabschnitte für die strukturellen und funktionellen Interaktionen innerhalb des HisH:HisF Komplexes von Bedeutung sind.

5.2.2 Vergleich von Kristallstrukturen des HisH:HisF Komplexes mit Liganden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der native Bi-enzymkomplex HisH:HisF, sowie die inaktivierten Komplexe HisH:HisF_D11N und HisH_C84A:HisF_D11N wie früher beschrieben (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001; Häger, 2001) gereinigt, jeweils auf etwa 30mg/ml einkonzentriert und Dr. Cristina Vega-Fernandez (Arbeitsgruppe Dr. Matthias Wilmanns, EMBL Außenstation Hamburg) zur Ko-Kristallisation mit Liganden zur Verfügung gestellt. Dr. Vega-Fernandez gelang die Kristallisation von HisH:HisF mit dem HisH-Substrat Glutamin (1), sowie mit Glutamin zusammen mit dem HisF-Produkt ImGP (2). Zusätzlich konnten Strukturen von HisH:HisF_D11N mit dem HisH-Produkt Glutamat (3), sowie dem HisF-Produkt AICAR (4) gelöst werden. Die Auflösung der verschiedenen Strukturen liegt bei

2,4 - 2,84 Å (Abbildung 5.5; Vega-Fernandez, Häger, Sterner, Wilmanns, unveröffentlichte Daten). *Soaking* mit dem HisF-Substratanalogen ProFAR führte zum Bersten der Kristalle, was eine Strukturbestimmung verhinderte. Dies deutet darauf hin, dass durch die Bindung von ProFAR starke Konformationsänderungen induziert werden. In Einklang damit zeigten fluorimetrische Untersuchungen, dass die ProFAR-Bindung an HisF die Lösungsmittelzugänglichkeit des an der Kontaktfläche gelegenen Trp123 von HisH erhöht (Häger, 2001).

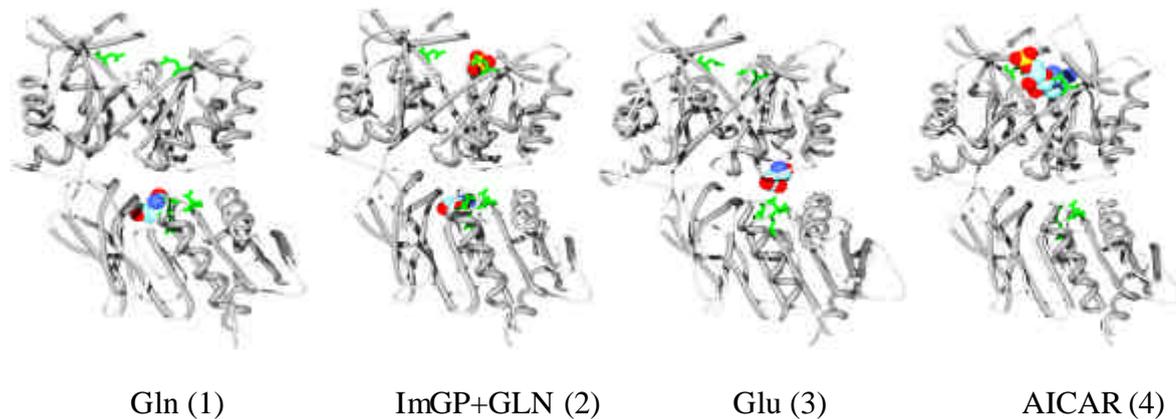


Abbildung 5.5: Röntgenstrukturen von HisH:HisF aus *T. maritima* mit verschiedenen Liganden

Gezeigt sind die Rückgrat-Strukturen von HisH und HisF (grau) mit ihren aktiven Zentren (grün) und den angegebenen Liganden (CPK-Farben). Im CPK-Farbschema (nach Corey, Pauling und Koltun) sind Kohlen- und Wasserstoffatome in cyan dargestellt, Stickstoff in blau, Sauerstoff in rot und Phosphor in gelb.

Im Folgenden werden die durch die Bindung der verschiedenen Liganden induzierten Strukturänderungen an der Kontaktfläche zwischen HisF und HisH diskutiert.

Das Innere des Fasses von HisF lässt sich in 4 optimal gepackte Ebenen (*layer*) einteilen, die aufeinander liegen und vom C-Terminus (aktives Zentrum) zum N-Terminus (Kontaktbereich zu HisH) durchnummeriert werden. Jede Ebene wird von Aminosäure-Seitenketten aus den vier geradzahligen oder den vier ungeradzahligen β -Strängen gebildet (Abbildung 5.6; Douangamath *et al.*, 2002).

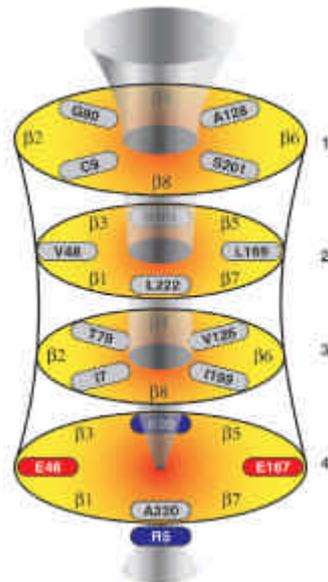


Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der vier layer

Die layer sind vom aktiven Zentrum in HisF bis zur Kontaktfläche zu HisH durchnummeriert (1-4). In jedem layer ragen die Aminosäureseitenketten entweder der gerad- oder der ungeradzahligen β -Stränge ins Innere. Während die layer 1-3 vorwiegend von kleinen hydrophoben Aminosäuren gebildet werden, besteht das 4. layer aus konservierten geladenen Seitenketten und bildet einen Salzbrückencluster aus, der in der apo-Struktur den Eintritt des Ammoniaks verhindern würde. R5 passt nicht in das übliche Muster, es positioniert jedoch seine lange Seitenkette vor die kleinere des A220, welches eigentlich Bestandteil von layer 4 wäre (nach Douangamath *et al.*, 2002).

5.2.2.1 Struktur mit gebundenem Glutamin

Die vierte Ebene unterscheidet sich von den drei anderen Ebenen, indem die geladenen Reste Arg5 (β -Strang 1), Glu46 (β -Strang 2), Lys99 (β -Strang 4) und Glu167 (β -Strang 6) ein Salzbrückencluster bilden, während sich die anderen Schichten aus kleinen hydrophoben und polaren Seitenketten zusammensetzen. Außerdem passt Arg5 nicht in das vierfache Symmetrieschema, schiebt es doch seine lange Seitenkette vor diejenige von Ala22 (β -Strang 8), welches das reguläre Mitglied von Ebene 4 wäre. In der apo-Struktur des HisH:HisF Komplexes verhindert das Salzbrückencluster vermutlich den Eintritt des an HisH erzeugten Ammoniaks in das Innere des Fasses von HisF (Douangamath *et al.*, 2002).

In der Struktur mit gebundenem Glutamin (Abbildung 5.5 - 1) interagiert die NH_2 -Gruppe der Seitenkette des Liganden mit dem Cys84 der katalytischen Triade von HisH und ist gleichzeitig in Richtung des Salzbrückenclusters von HisF orientiert. Dies deutet darauf hin, dass der bei der Hydrolyse entstehende Ammoniak direkt in den Kanal eintreten kann.

Entsprechend findet eine durch Glutamin-Bindung induzierte Veränderung am Salzbrückencluster statt. Während der Cluster in der apo-Struktur das Innere des Fasses verschließt, führt die Bindung von Glutamin zur Öffnung des Eingangs (Abbildung 5.7). Dies geschieht durch eine kleine Konformationsänderung der Seitenkette von HisF_K99 hin zu einem zweiten

bevorzugten Rotamer, welche zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke der terminalen NH₂-Gruppe mit der Hydroxylgruppe von HisH_Y138 führt (Abbildung 5.11). Diese neue Wechselwirkung kompensiert offensichtlich die Auflösung des Salzbrückenclusters und stabilisiert die offene Konformation des Kanals.

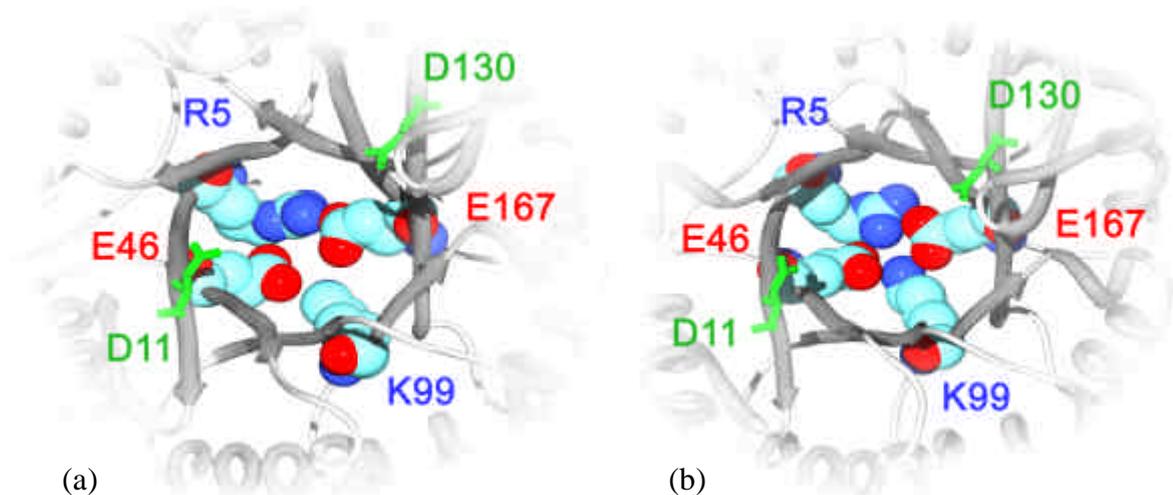


Abbildung 5.7: Die Bindung von Glutamin an HisH öffnet den Ammoniak-Kanal im Inneren des Fassens von HisF.

Die Aufsicht auf den HisF Salzbrücken-Cluster (CPK-Farben) vom aktiven Zentrum (grün) aus zeigt die Konformationsänderung von K99 in Ebene 4 und die damit verbundene Öffnung des Ammoniak-Kanals (a) im Vergleich zur apo-Struktur, in der der Kanal geschlossen ist (b).

Insgesamt führt die Glutamin-Bindung zu folgenden Änderungen intermolekularer Wasserstoffbrücken (Tabelle 5.3) und Salzbrücken (Tabelle 5.4):

Tabelle 5.3: Intermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen HisH und HisF in der HisH:HisF apo-Struktur im Vergleich zur Glutamin-gebundenen Struktur
(Angaben nach Douangamath *et al.*, 2002 und C. Vega-Fernandez, persönliche Mitteilung)

HisF Aminosäure	HisH Aminosäure	Wasserstoffbrücken in der Struktur von HisH:HisF	
		apo	mit gebundenem Glutamin
M1	N124	ja	nein
M1	E157	ja	nein
A3	W123	ja	ja
S40	S183	ja	ja
D45	W123	ja	ja
A70	R18	ja	ja

D74	K181	ja	ja
D74	S183	ja	ja (schwach)
D98	K181	ja	ja
K99	Y138	nein	ja
T195	R117	ja	ja
D219	R117	nein	ja
N247	Y136	ja	ja
E251	S183	nein	ja

Tabelle 5.4: Salzbrücken am Cluster in Ebene 4 von HisF in der HisH:HisF apo-Struktur im Vergleich zur Glutamin-gebundenen Struktur

Angegeben ist der Abstand der beteiligten Atome in Å.

Basische Aminosäure	Saure Aminosäure	apo-HisH:HisF	HisH:HisF + Glutamin
R5	E46	2,86	2,51
R5	E167	2,85	2,75
R5	E167	2,91	2,91
K99	E46	2,88	keine (Abstand: 4,72)
K99	E167	2,73	3,27

Die Superpositionierung der HisH:HisF apo-Struktur mit der Glutamin-gebundenen Struktur zeigt zudem eine Rotation des HisF-Rückgrates in Anwesenheit von Glutamin. Der N-Terminus von HisF dreht sich dabei um $6,5^\circ$ in Relation zum C-Terminus, wodurch sich der lösungsmittelzugängliche Spalt zwischen dem aktiven Zentrum von HisH und dem Salzbrücken-Cluster von HisF vergrößert. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um ein Artefakt als Folge der dichteren Packung am aktiven Zentrum von HisH durch die Anwesenheit von Glutamin handelt. Dennoch deckten sich diese Ergebnisse mit den oben erwähnten fluorimetrischen Analysen, nach denen Trp123 in HisH bei der Bindung von Glutamin stärker dem Lösungsmittel ausgesetzt wird (Häger, 2001).

Die Glutamin-Bindung führt zu weiteren Strukturänderungen im HisH:HisF Komplex. Während der HisF-Loop 1 zwischen β -Strang 1 und α -Helix 1 in der Nähe des aktiven Zentrums in der apo-Struktur von isoliertem HisF eine definierte offene Konformation einnimmt, liegt er in der apo-Struktur des HisH:HisF Komplexes in einer geschlossenen

Konformation vor (Lang *et al.*, 2000; Douangamath *et al.*, 2002). Die Anwesenheit von Glutamin führt zu einer Erhöhung der Flexibilität dieses Loops 1 (Strukturen 1 und 2 Abbildung 5.5), die sich in einer nicht mehr eindeutig definierten Elektronendichte bemerkbar macht. Es konnte bereits früher durch Fluoreszenzspektroskopie und limitierte Proteolyse gezeigt werden, dass Loop 1 die Bindung von Glutamin „spürt“ (Häger, 2001). In Anwesenheit von Glutamat (Struktur 3) und AICAR (Struktur 4) wird sowohl die offene als auch geschlossene Konformation beobachtet. In allen Strukturen ohne Glutamin nimmt Loop 1 jedoch eine definierte Struktur ein.

Die Kontaktfläche der HisH:HisF apo-Struktur hat eine Größe von $\sim 1050 \text{ \AA}^2$ und umschließt $\sim 7100 \text{ \AA}^3$. In der Glutamin-gebundenen Struktur vergrößert sich die Kontaktfläche auf $\sim 1200 \text{ \AA}^2$ und umschließt $\sim 6900 \text{ \AA}^3$. Zusätzlich vergrößert sich die Glutamin-Bindetasche.

5.2.2.2 Struktur mit gebundenem Glutamin und ImGP

Durch *soaking* des mit Glutamin kokristallisierten HisH:HisF Komplexes mit dem HisF-Produkt ImGP (2) wird scheinbar die Glutaminase-Reaktion von HisH induziert, da in einigen Kristallen ein Verlust des Glutamins zu beobachten ist (Struktur nicht gezeigt). Die Stimulierung der Glutaminase-Reaktion durch ImGP wurde auch in Messungen in Lösung beobachtet (Beismann-Driemeyer, 2001).

Diejenigen Kristalle, in denen Glutamin und ImGP vorhanden sind (Abbildung 5.5 - 2), zeigen ein geöffnetes Salzbrücken-Cluster und die Rotation des HisF-Rückgrates, analog zur Glutamin-gebundenen Struktur (1). Findet jedoch die Glutamin-Hydrolyse und die Abdiffusion des Glutamats statt, schließt sich der Salzbrücken-Cluster in HisF und die Wasserstoffbrücken an der Kontaktfläche ordnen sich wieder analog zur apo-Struktur an (Tabelle 5.3). Die Rotationsbewegung des HisF Rückgrates und damit die Erhöhung der Lösungsmittelzugänglichkeit an der HisH:HisF Kontaktfläche bleiben jedoch bestehen.

5.2.2.3 Strukturen mit gebundenem Glutamat und mit gebundenem AICAR

In der Glutamat-gebundenen Struktur (3) des HisH:HisF Komplexes zeigen sich keine Konformationsänderungen im Vergleich zur apo-Struktur. Das Produkt Glutamat befindet sich nicht an identischer Position wie Glutamin, sondern in einer einige \AA entfernt liegenden Tasche.

Die Struktur mit gebundenem HisF-Produkt AICAR (4) zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zur apo-Struktur.

5.2.2.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend lassen sich die ligandierten Kristallstrukturen in drei Gruppen einteilen, die den HisH:HisF Reaktionszyklus nachstellen. In der Struktur mit dem HisH-Substrat Glutamin (Abbildung 5.5 - 1) und einem Teil der Strukturen mit Glutamin plus dem HisF-Produkt ImGP

(2) zeigt sich im Vergleich zur apo-Struktur eine Umordnung der Wasserstoffbrücken an der HisH:HisF Kontaktfläche, ein dadurch in der geöffneten Konformation stabilisierter Salzbrücken-Cluster, sowie die Rotation des HisF-Rückgrates mit einer erhöhten Lösungsmittelzugänglichkeit der Kontaktfläche. In einem anderen Teil der Strukturen mit Glutamin zusammen mit ImGP hat die Hydrolyse des Glutamin bereits stattgefunden und die Anordnung der Salzbrücken am Cluster, sowie der Wasserstoffbrücken an der Kontaktfläche ist wieder in Ausgangsposition. Die Lösungsmittelzugänglichkeit der Kontaktfläche ist noch erhöht. In den Strukturen mit den gebundenen Produkten Glutamat (3) und AICAR (4) ist der HisH:HisF Komplex wieder komplett mit der apo-Struktur identisch.

Die Auflösung der Kristallstrukturen von HisH:HisF mit verschiedenen Liganden eröffnet neue Einsichten in den Mechanismus der Signalübertragung zwischen den aktiven Zentren und des Ammoniak-Channelings. Am Bedeutendsten ist sicherlich die Visualisierung der geöffneten und geschlossenen Konformationen des Eingangs in das Innere des Fasses von HisF und die damit verbundenen Veränderungen in der Orientierung einzelner Aminosäuren an der Kontaktfläche, des Wasserstoffbrücken-Netzwerkes, sowie Rückgrat-Bewegungen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Bedeutung von Aminosäuren an der Kontaktfläche von HisF und HisH für die Funktion des Komplexes und die Kommunikation zwischen den aktiven Zentren mittels Mutationsanalyse untersucht.

5.2.3 Mutationsanalyse der HisH:HisF Kontaktfläche

Alanin ist sowohl an Oberflächen als auch im Inneren von Proteinen und in allen Sekundärstrukturelementen häufig vorhanden (Klapper, 1977; Chothia, 1976; Rose *et al.*, 1985). Die kurze Seitenkette schränkt die konformelle Freiheit des Proteinrückgrates nicht ein, weshalb Alanin als "*standard state*" bezeichnet wird (Wells, 1991). In vielen Fällen konnten durch Alanin-Scanning-Mutagenese die Kontaktflächen von Proteinen charakterisiert und die Beiträge einzelner Reste zur Ausbildung einer Protein-Protein Wechselwirkung bestimmt werden (Bass *et al.*, 1991; Ashkenazi *et al.*, 1990; Cunningham *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 2004; Schofield *et al.*, 2004; Gibbs & Zoller, 1991). Dabei zeigte sich, dass die Effekte von Einzelaustauschen häufig additiv sind (Wells, 1990).

Häufig umfassen Protein-Protein Kontaktflächen Oberflächenbereiche, die sich diskontinuierlich aus Sequenzabschnitten (*stretches*) verschiedener Sekundärstrukturelemente zusammensetzen. Typischerweise sind etwa 10-20 Reste der beiden Interaktionspartner involviert, die sich auf 2-4 *stretches* aufteilen (Wells, 1991). Daher schien es zur Analyse der HisH:HisF Kontaktfläche sinnvoll, neben dem Austausch einzelner Reste gegen Alanin, auch ganze *stretches* zu mutagenisieren. Allerdings wurden keine Alanine eingefügt, da Alanin-*stretches* bevorzugt α -Helices bilden (Marqusee *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 1991). Stattdessen wurden verschiedene *stretches* gegen die entsprechenden Sequenzabschnitte der nahe

verwandten Glutaminase TrpG aus *T. maritima* ausgetauscht (Kapitel 1), wodurch die wildtypische Faltung von HisH erhalten werden sollte.

5.2.4 Auswahl der auszutauschenden Aminosäuren in HisH an der Kontaktfläche zu HisF

Der Vergleich der HisH:HisF apo-Struktur (Douangamath *et al.*, 2002) und der Struktur mit gebundenen Glutamin (Vega-Fernandez, Häger, Sterner, Wilmanns., unveröffentlichte Daten) zeigt, dass sich im Zuge der Ligandenbindung die Anzahl und Art der Wechselwirkungen zwischen einer Reihe von Aminosäuren an der Kontaktfläche ändern (Tabelle 5.4; Tabelle 5.5). Vermutlich sind diese Aminosäuren an den durch Glutamin-Bindung induzierten Konformationsänderungen beteiligt und somit für die intermolekulare Kommunikation zwischen HisH und HisF von Bedeutung.

Vier der fraglichen Reste aus HisH (R117, N124, Y138 und S183), deren Position in Abbildung 5.8 gezeigt ist, wurden einzeln durch Alanin ersetzt.

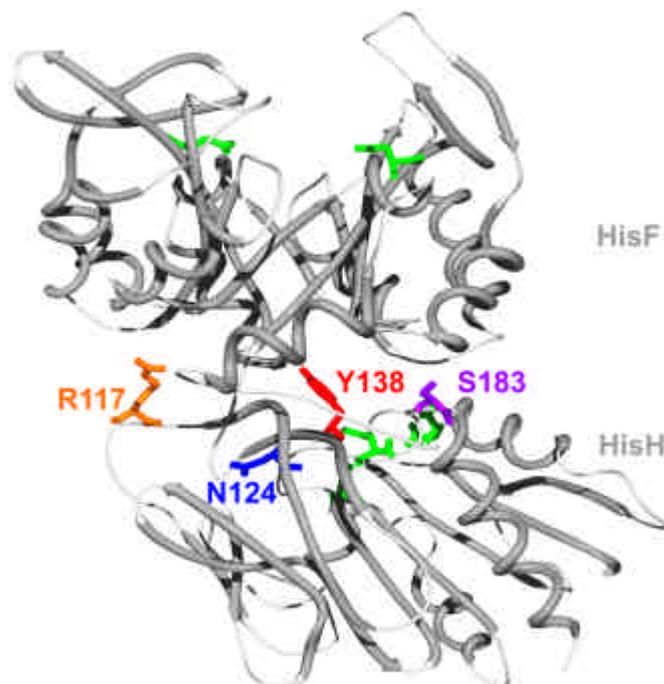


Abbildung 5.8: Position der in HisH gegen Alanin ausgetauschten Reste an der Kontaktfläche zu HisF

Neben den mutagenisierten Aminosäuren sind die katalytisch essentiellen Reste der beiden Enzyme (D11, D130 in HisF; C84, H178, E180 in HisH) grün hervorgehoben.

In den folgenden vier Abbildung 5.9- Abbildung 5.12 sind jeweils Ausschnittsvergrößerungen dieser vier Aminosäuren und der mit ihnen interagierenden Partner in HisF gezeigt, in denen die Unterschiede zwischen der apo- und der Glutamin-gebundenen Struktur deutlich werden. Die Reste der apo-Struktur sind jeweils im CPK-Farbschema dargestellt, die der Glutamin-gebundenen Struktur in rot. Wasserstoffbrücken sind als grüne gestrichelte Linien dargestellt.

Die Aminosäure R117 im β -Strang 5 von HisH bildet in der apo-Struktur eine intermolekulare Wasserstoffbrücke zu HisF_T195 aus. Nach Glutaminbindung entsteht durch Annäherung an HisF zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zu D219 (Tabelle 5.5; Abbildung 5.9).

Tabelle 5.5: Wasserstoffbrücken zwischen HisH_R117 und Aminosäuren aus HisF

Angegeben sind jeweils die Abstände zwischen HDonor und HAkzeptor. Die in Klammern aufgeführten Abstände sind zu groß für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke.

	Aminosäuren, zu denen HisH_R117 eine Wasserstoffbrücke ausbildet	Abstand in der apo-Struktur [Å]	Abstand in der Glutamin-gebundenen Struktur [Å]
HisH_R117	HisF_T195	2,95	3,38
HisH_R117	HisF_D219	(3,73)	2,49

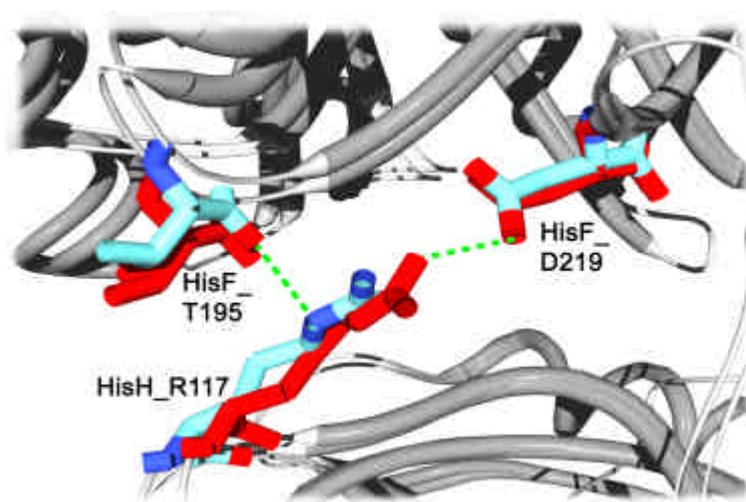


Abbildung 5.9: Die intermolekularen Wasserstoffbrücken von HisH_R117 ändern sich bei Glutamin-Bindung

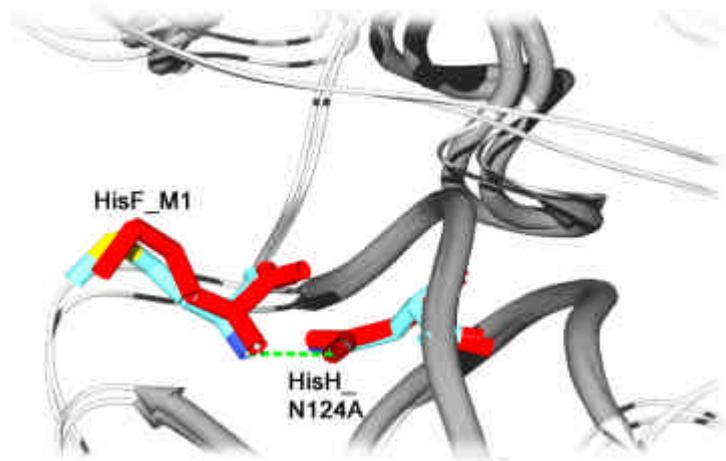
Gezeigt ist die Umgebung der Aminosäure HisH_R117 in der Superpositionierung des HisH:HisF apo-Komplexes (grau / CPK) und des Komplexes mit gebundenem Glutamin (grau / rot). Die Wasserstoffbrücken zu HisF_T195 in der apo-Struktur und zu HisF_D219 in der Glutamin-gebundenen Struktur sind in grün eingezeichnet.

Die streng konservierte Aminosäure N124 im β -Strang 6 von HisH bewegt sich bei Glutaminbindung von HisF weg, so dass sich die Wasserstoffbrücke zu M1 am N-Terminus von HisF auflöst (Tabelle 5.6; Abbildung 5.10). Der N-Terminus ist bereits in einem anderem Zusammenhang aufgefallen. Bei der Überlagerung der Strukturen von isoliertem (1thf) und mit HisH komplexiertem (1gpw) HisF, sowie von Glycerin-gebundenen (1h5y) HisF aus *Pyrobaculum aerophilum* (Lang *et al.*, 2000; Douangamath *et al.*, 2002; Banfield *et al.*, 2001) sind lediglich am N-Terminus und im Loop 1, die über β -Strang 1 miteinander verbunden sind, deutliche Unterschiede zu beobachten. Der Rest der Strukturen kommt sehr gut aufeinander zu liegen.

Tabelle 5.6: Wasserstoffbrücken zwischen HisH_N124 und Aminosäure n aus HisF

Angegeben sind jeweils die Abstände zwischen HDonor und HAkzeptor. Die in Klammern aufgeführten Abstände sind zu groß für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke.

	Aminosäure, zu denen HisH_N124 eine Wasserstoffbrücke ausbildet	Abstand in der apo-Struktur [Å]	Abstand in der Glutamin-gebundenen Struktur [Å]
HisH_N124	HisF_M1	2,85	(3,13)

**Abbildung 5.10: Die intermolekularen Wasserstoffbrücken von HisH_N124 ändern sich bei Glutamin-Bindung**

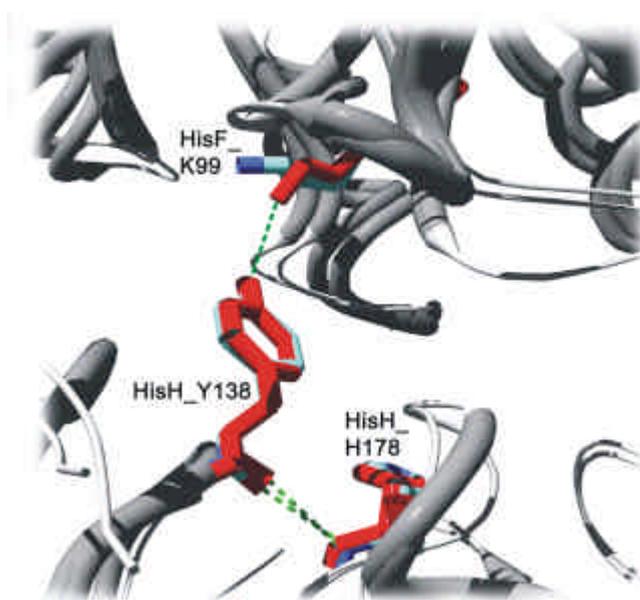
Gezeigt ist die Umgebung der Aminosäure HisH_N124 in der Superpositionierung des HisH:HisF apo-Komplexes (grau / CPK) und des Komplexes mit gebundenem Glutamin (grau / rot). Die Wasserstoffbrücke zwischen HisH_N124 und HisF_M1 in der apo-Struktur ist in grün eingezeichnet.

Die streng konservierte Aminosäure HisH_Y138 in β -Strang 7 von HisH bildet eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zu H178 aus, welches Teil der katalytischen Triade in HisH ist. Darüber hinaus bildet HisH_Y138 bei Glutaminbindung eine Wasserstoffbrücke mit K99 aus HisF aus, die in der apo-Struktur fehlt (Tabelle 5.7; Abbildung 5.11). Diese Wasserstoffbrücke erscheint besonders interessant, da K99 Teil des hochkonservierten Salzbrückenclusters im zentralen β -Fass von HisF ist und eventuell am Transport des Ammoniaks durch das Fass beteiligt ist (Abbildung 5.6; Douangamath *et al.*, 2002).

Tabelle 5.7: Wasserstoffbrücken zwischen HisH_Y138 und Aminosäuren aus HisH und HisF

Angegeben sind jeweils die Abstände zwischen HDonor und HAkzeptor. Die in Klammern aufgeführten Abstände sind zu groß für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke.

	Aminosäuren, zu denen HisH_Y138 eine Wasserstoffbrücke ausbildet	Abstand in der apo-Struktur [Å]	Abstand in der Glutamin-gebundenen Struktur [Å]
HisH_Y138	HisH_H178	3,01	2,92
HisH_Y138	HisF_K99	(4,37)	3,39

**Abbildung 5.11: Die intermolekularen Wasserstoffbrücken von HisH_Y138 ändern sich bei Glutamin-Bindung**

Gezeigt ist die Umgebung der Aminosäure HisH_Y138 in der Superpositionierung des HisH:HisF apo-Komplexes (grau / CPK) und des Komplexes mit gebundenem Glutamin (grau / rot). Die Wasserstoffbrücken zwischen HisH_Y138 und HisH_H178 (Teil der katalytischen Triade), sowie zu HisF_K99 (Teil des Salzbrückenclusters) in der Glutamin-gebundenen Struktur sind grün eingezeichnet.

Die Aminosäure S183 aus der α -Helix 5 von HisH ist in ein komplexes Wasserstoffbrücken-Netzwerk integriert und in der apo-Struktur an der Bildung von drei intermolekularen Wasserstoffbrücken beteiligt (HisF_S40 Rückgrat, HisF_S40 Seitenkette und HisF_D74). Bei Glutaminbindung wird die Wasserstoffbrücke zu D74 geschwächt. Es bildet sich zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zu E251 am C-Terminus von HisF aus, welches eine starke Konformationsänderung bei Glutaminbindung zeigt (Tabelle 5.8; Abbildung 5.12).

Tabelle 5.8: Wasserstoffbrücken zwischen HisH_S183 und Aminosäuren aus HisF
 Angegeben sind jeweils die Abstände zwischen HDonor und HAkzeptor. Die in Klammern aufgeführten Abstände sind zu groß für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke.

	Aminosäuren, zu denen HisH_S183 eine Wasserstoffbrücke ausbildet	Abstand in der apo-Struktur [Å]	Abstand in der Glutamin-gebundenen Struktur [Å]
HisH_S183	HisF_S40 (Rückgrat)	3,06	3,59
HisH_S183	HisF_S40 (Seitenkette)	3,31	3,34
HisH_S183	HisF_D74	2,93	2,96
HisH_S183	HisF_E251	(7,16)	3,29

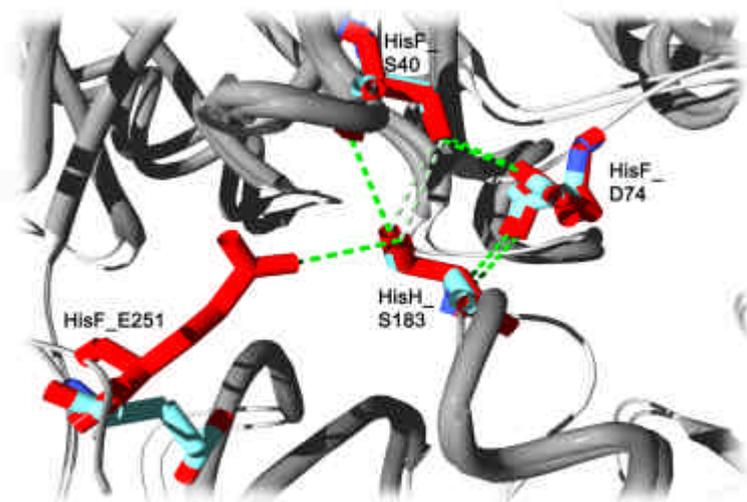
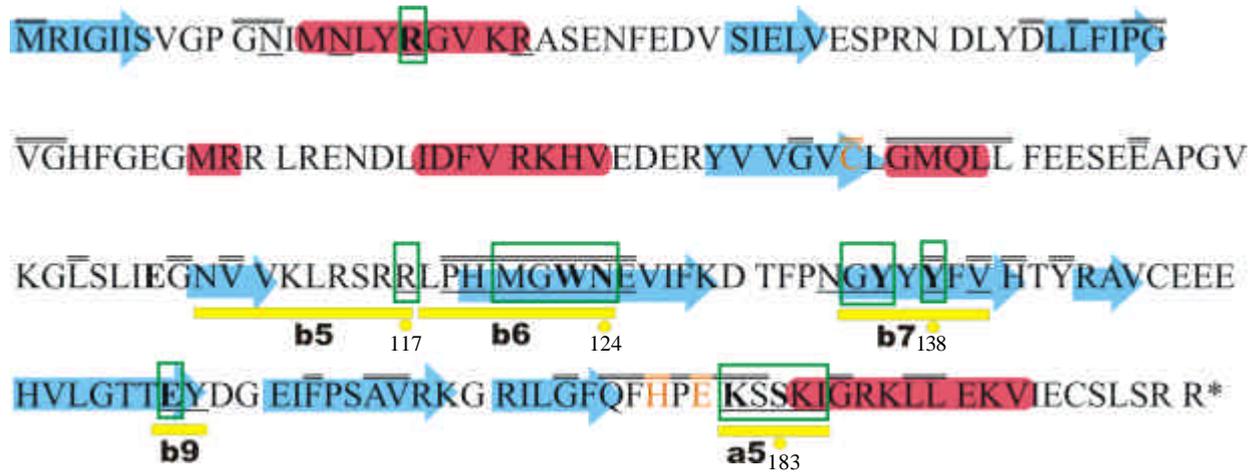


Abbildung 5.12: Die intermolekularen Wasserstoffbrücken von HisH_S183 ändern sich bei Glutamin-Bindung

Gezeigt ist die Umgebung der Aminosäure HisH_S183 in der Superpositionierung des HisH:HisF apo-Komplexes (grau / CPK) und des Komplexes mit gebundenem Glutamin (grau / rot). Die Wasserstoffbrücken zwischen HisH_S183 und Aminosäuren aus HisF sind in grün eingezeichnet.

In Abbildung 5.13 ist die Aminosäuresequenz von HisH gezeigt. Neben den Sekundärstrukturelementen sind darin die konservierten, an der Kontaktfläche zu HisF lokalisierten und an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Proteinen beteiligten Aminosäuren markiert. Wie allgemein beschrieben (Wells, 1991), so werden auch in HisH und HisF die Protein-Protein Kontaktflächen durch 10-20 diskontinuierliche Aminosäuren gebildet. Zum großen Teil liegen diese Reste in Sequenzabschnitten (*stretches*) vor, die nach den umliegenden Sekundärstrukturelementen mit b5, b6, b7, b9 und a5 benannt wurden. Zur Veranschaulichung sind diese *stretches* in der Struktur in Abbildung 5.14 gelb markiert.



Erläuterung:

$\overline{\text{A}}$ = Teil der Kontaktfläche (< 5Å Abstand zu HisF)

$\overline{\text{A}}$ = Teil der Kontaktfläche (Douangamath *et al.*, 2002)

A = bildet Wasserstoffbrücke zu His F aus

$\overline{\text{A}}$ = vollständig konserviert

A = aktives Zentrum

Abbildung 5.13: Aminosäuresequenz von HisH

Markiert sind Sekundärstrukturelemente (β -Stränge in blau, α -Helices in rot), sowie konservierte und für die Interaktion mit HisF potentiell wichtige Aminosäuren. Mit gelben Punkten sind einzeln gegen Alanin ausgetauschte Aminosäuren markiert, mit gelben Balken die gegen entsprechende Sequenzabschnitte aus TrpG ausgetauschten *stretches*.

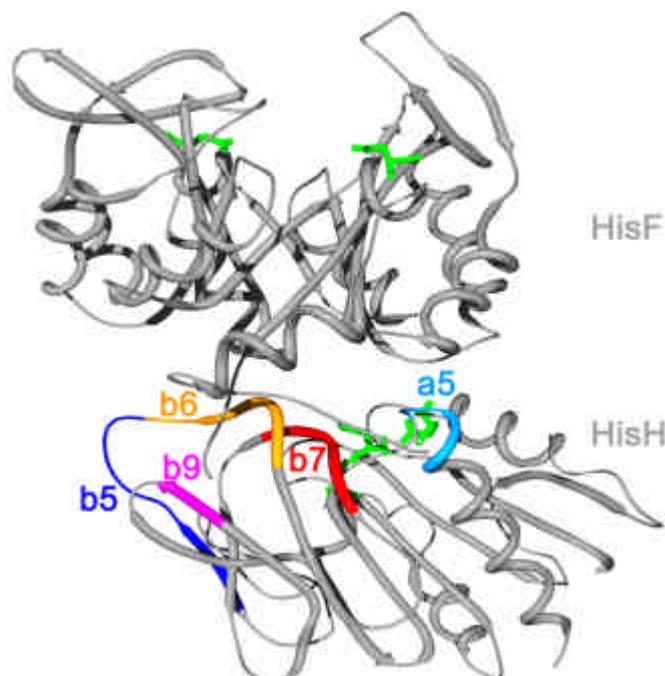


Abbildung 5.14: Position der *stretches* in HisH, die gegen entsprechende Sequenzabschnitte aus TrpG ausgetauscht wurden

Neben den *stretches* sind die katalytisch essentiellen Reste (D11, D130 in HisF; C84, H178, E180 in HisH) der beiden Enzyme grün hervorgehoben.

Diese *stretches* wurden gegen die entsprechenden Sequenzen von TrpG aus *T. maritima* ersetzt. Um diese Sequenzen zu identifizieren, wurden zunächst die Röntgenstrukturen von *ssTrpG* und *tmHisH* superpositioniert (Abbildung 1.6). Anschließend wurde ein multiples Sequenzalignment (Programm *PileUp* des GCG Wisconsin Package) aller bekannten TrpG Sequenzen erstellt, wodurch die Sekundärstrukturelemente aus der *ssTrpG* Struktur auf die Sequenz von *tmTrpG* projiziert werden konnten. Durch die Kombination der aus den beiden Operationen gewonnenen Informationen, wurde ein indirektes „strukturbasiertes“ Sequenzalignment zwischen *tmTrpG* und *tmHisH* erstellt (s. Anhang). So wurden die Sequenzbereiche im *tmTrpG* identifiziert, die den *stretches* b6, b7, b9 und a5 aus *tmHisH* entsprechen. Dies war die Planungsgrundlage für die Herstellung folgender HisH Varianten mit TrpG Sequenzabschnitten:

HisH_b6: L*118R_P*119I_H*120L_M*121H_W^{H*}123K_N^{H*}124T
 HisH_b7: G135L_Y^H136V_Y^{H*}138T_V*140Y
 HisH_b9: E^H157S_Y158D
 HisH_a5: K^{H*}181S_S*182V_S^H183L_(ins) T_K184E_I185E

^H: wildtypischer Rest bildet eine H-Brücke zu HisF aus

*: wildtypischer Rest ist streng konserviert

ins: inserierter Rest

Diese HisH Varianten enthalten nun an potenziell interessanten Sequenzabschnitten der Kontaktfläche zu HisF Aminosäure-Austausche, die in der ähnlichen Struktur von TrpG an äquivalenter Stelle liegen.

5.2.5 Auswahl der auszutauschenden Aminosäuren in HisF an der Kontaktfläche zu HisH

Es wurde bereits früher vermutet, dass das streng konservierte Gln123 aus HisF an der Kontaktfläche zu HisH an der Hydrolyse von Glutamin beteiligt sein könnte (Chaudhuri *et al.*, 2001; Klem *et al.*, 2001). Um dies zu überprüfen, wurde HisF_Q123 gegen Alanin ausgetauscht.

Weiterhin wurde Thr78 aus der Ebene 3 im Inneren des β -Fasses von HisF (Abbildung 5.6, Abbildung 5.15) gegen die voluminösere Aminosäure Methionin ausgetauscht. Dies sollte den Durchgang des Ammoniaks verlangsamen und so einen experimentellen Nachweis für den postulierten Kanal liefern (Abbildung 5.15).

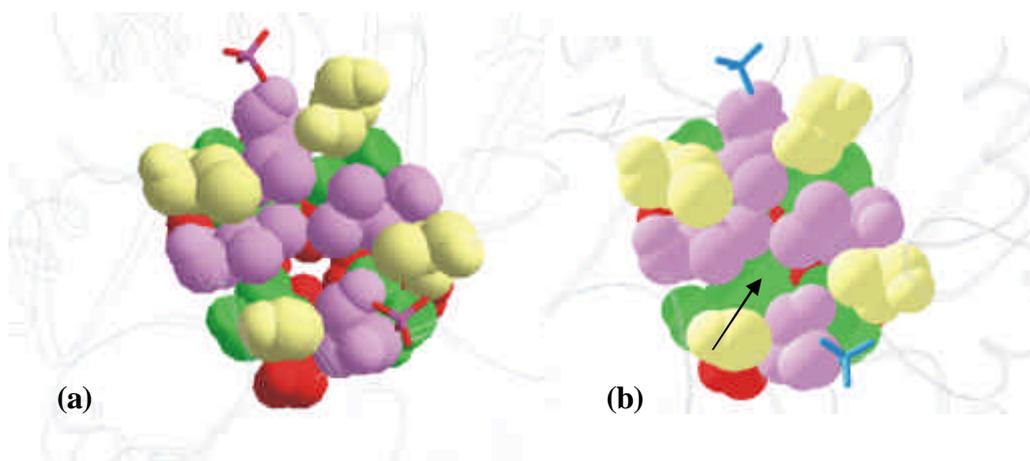


Abbildung 5.15: Durch den Austausch von Thr78 gegen die voluminösere Aminosäure Methionin in Ebene 3 soll der Ammoniak-Kanal verengt werden

Sicht auf das aktive Zentrum von HisF, welches durch die gebundenen Phosphatreste (rot und magenta in (a), blau in (b)) markiert ist, und durch den Ammoniak-Kanal in Richtung HisH. Die von den β -Strängen ins Innere des Fasses reichenden Seitenketten sind wie folgt markiert: Ebene 1 (gelb), Ebene 2 (lila), Ebene 3 (grün), Ebene 4 (Salzbrücken-Cluster, rot). Im wildtypischen HisF (a) ist die Kavität zu erkennen, durch die der Ammoniak transportiert wird. Durch den Austausch T78M in Ebene 3 (b, Pfeil) soll der Kanal verengt und der Ammoniak-Transport verlangsamt werden.

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

Die gewünschten Mutationen für die HisH Alanin-Varianten, die HisH *stretch* Varianten, sowie die HisF Varianten wurden über SOE-PCR in das *hisH* bzw. *hisF* Gen eingeführt (4.2.3). In einer ersten PCR wurde jeweils ein Vektor- oder Gen-spezifischer Primer mit einem Mutationsprimer zur Herstellung der Megaprimer kombiniert. Diese wurden dann zusammen mit Gen-spezifischen Primern zum Volllängenprodukt amplifiziert. In die Vektor- bzw. Gen-spezifischen Primer wurden Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in Expressionsplasmide eingebaut.

Alle Austausche wurden über Sequenzierung des kompletten Gens bestätigt. Bei den HisH *stretch* Varianten wurden in einigen Fällen unbeabsichtigte Aminosäureaustausche mit eingeführt, es kam jedoch in keinem Fall zu einer Verschiebung des Leserasters.

Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit zur Proteinproduktion hergestellten *hisF*-, *hisH*- (und *hisA*-) Genkonstrukte mit den Expressionsplasmiden und Restriktionsschnittstellen aufgelistet. Falls bei der Klonierung unbeabsichtigte Mutationen auftraten, sind diese mit aufgelistet.

(1) wildtypische *his*-Konstrukte:

pET 11c <i>his</i> F WT	(NdeI/BamHI)
pDS <i>his</i> H WT	(SphI/HindIII)
pDS <i>his</i> A WT	(SphI/HindIII); Hilfsenzym für kinetische Messungen

(2) *hisF* Konstrukte:

pET 11c <i>his</i> F Q123A	(NdeI/BamHI)
pET 11c <i>his</i> F T78M	(NdeI/BamHI)

(3) *hisH* Alanin-Konstrukte:

pDS <i>his</i> H R117A	(SphI/HindIII)
pDS <i>his</i> H N124A	(SphI/HindIII)
pDS <i>his</i> H Y138A	(SphI/HindIII)
pDS <i>his</i> H S183A	(SphI/HindIII)

(4) *hisH* stretch-Konstrukte:

pDS <i>his</i> H b6	(SphI/HindIII)
pDS <i>his</i> H b7	(SphI/HindIII)
pDS <i>his</i> H b9	(SphI/HindIII)
pDS <i>his</i> H a5	(SphI/HindIII)
pDS <i>his</i> H R117A_b7	(SphI/HindIII) (D65N, V146M)
pDS <i>his</i> H R117A_b9	(SphI/HindIII) (D65N)
pDS <i>his</i> H R117A_b7_b9	(SphI/HindIII) (D65N)
pDS <i>his</i> H R117A_b6_b7_b9	(SphI/HindIII) (D65N)

5.2.7 Herstellung der HisF und HisH Varianten durch heterologe Genexpression in *E. coli* und Proteinreinigung

Die verschiedenen Genvarianten wurden zunächst analytisch in einem Volumen von 10 ml exprimiert, um die optimalen Bedingungen für die präparative Expression zu ermitteln. Da es sich bei allen in *E. coli* heterolog hergestellten Proteinen um Enzyme aus *T. maritima* handelte, wurde als erster Reinigungsschritt der lösliche Zellextrakt erhitzt und dadurch ein großer Teil der Wirtsproteine ausgefällt. Die weitere Aufreinigung der HisF- und HisH-Varianten erfolgte über Ionenaustauschromatographie und/oder Ammoniumsulfat-Fällung.

5.2.8 Expression der *hisF* Konstrukte

Die Expression der pET11c *hisF* Konstrukte erfolgte über Nacht in frisch transformierten BL21 (DE3) oder BL21 (DE3) C+ RIPL Zellen bei 37°C ohne Induktion (4.3.3). Die HisF Varianten fanden sich dabei in großen Mengen im löslichen Teil des Zellextraktes. Durch Erhitzung (20

min bei 75°C) wurde der Großteil der thermolabilen Wirtsproteine ausgefällt. Die weitere Aufreinigung der HisF Varianten erfolgte über Anionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung einer MonoQ-Säule (4.3.4). Die Fraktionen mit sauberem Protein wurden vereinigt, dialysiert, einkonzentriert, in flüssigen Stickstoff eingetropfen und bei -80°C gelagert. Die Reinheit der Proteine wurde über SDS-PAGE abgeschätzt und lag generell bei über 95% (Abbildung 5.16). Die Ausbeuten der verschiedenen Varianten lagen zwischen 78 und 158 mg pro Liter Zellkultur und es wurden Konzentrationen von etwa 18 mg/ml erreicht.

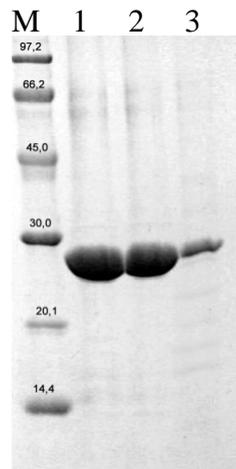


Abbildung 5.16: Nach der Reinigung lagen HisF_WT und die Varianten T78M und Q123A als lösliche und hochkonzentrierte Proteine vor.

Dargestellt ist jeweils das einkonzentrierte Protein vor dem Eintropfen in flüssigen Stickstoff. 1 = HisF_WT, 2 = HisF_T78M, 3 = HisF_Q123A, M = Markerproteine mit Größenangaben in kDa;

Die Abbildung 5.8 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Parameter bei der Herstellung der HisF-Varianten.

Tabelle 5.9: Übersicht über die wichtigsten Parameter bei der Herstellung der HisF Varianten.

Variante	Expressionsbedingungen		Hitzeschritt [°C / min]	Reinigungsergebnis	
	Temperatur [°C]	Induktion mit IPTG		Ausbeute mg/l Kultur	Konzentration des gelagerten Proteins [mg/ml]
HisF_WT	37	nein	75 / 20	121	18
HisF_T78M	37	nein	75 / 20	158	15
HisF_Q123A	37	nein	75 / 20	78	20

5.2.9 Expression der *hisH* Konstrukte

Die Expression der pDS *hisH* Konstrukte erfolgte in frisch transformierten SG200+50 oder KK8 Zellen, induziert durch die Zugabe von IPTG (4.3.3). Die HisH Varianten fanden sich dabei vorwiegend im löslichen Teil des Zellextraktes. Durch Erhitzung (i.d.R. 20 min bei 75°C, Tabelle 5.10) wurde ein Großteil der thermolabilen Wirtsproteine ausgefällt. In Abbildung 5.17 ist dies am Beispiel von HisH_R117A_b7 gezeigt.

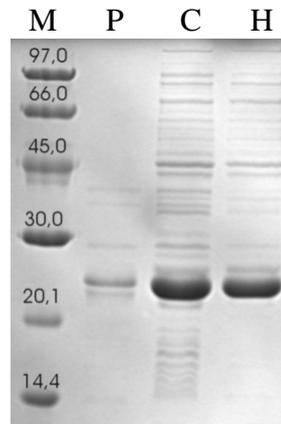


Abbildung 5.17: Herstellung von HisH_R117A_b7 mittels heterologer Genexpression in *E. coli* und erste Reinigung über Hitzeschritt

Dargestellt sind die unlösliche Fraktion (Pellet P) und der lösliche Überstand (crude extract C) der Proteinherstellung durch heterologe Genexpression, sowie die Reinigung durch Hitzefällung (Hitzeschritt H bei 50°C für 20min) für HisH_R117A_b7. M = Markerproteine mit Größenangaben in kDa;

Die weitere Aufreinigung erfolgte über Anionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung einer MonoQ-Säule oder Ammonium-Sulfat-Fällung (4.3.7). Sauberes Protein wurde dialysiert, einkonzentriert, in flüssigen Stickstoff eingetropfelt und bei -80°C gelagert. Die Reinheit der Proteine wurde über SDS-PAGE abgeschätzt und lag generell bei über 95% (Abbildung 5.18). Bei allen Reinigungen war neben der Bande für HisH auf SDS-Gelen eine weitere Bande zu entdecken, entsprechend einem um etwa 2kDa verkürzten Protein. Die Natur dieser Bande, deren Stärke im Vergleich zur Hauptbande stark variierte, ist unklar. Sie wurde bereits früher beobachtet und wird im Gegensatz zu HisH durch Trypsin vollständig abgebaut (Beismann-Driemeyer, 2001).

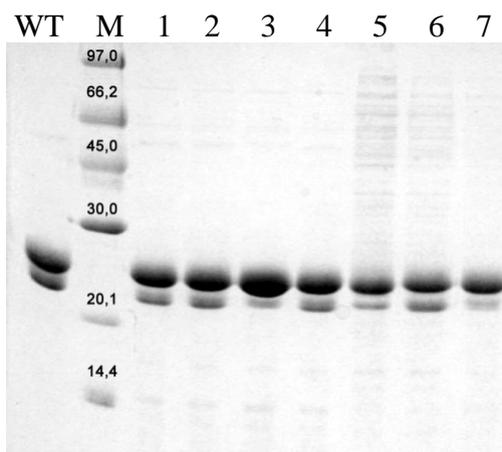


Abbildung 5.18: Nach der Reinigung lagen HisH_WT und sämtlichen Alanin-, sowie stretch Varianten als lösliche und hochkonzentrierte Proteine vor

Dargestellt ist jeweils das einkonzentrierte Protein vor dem Eintropfen in flüssigen Stickstoff. Teilweise wurden 1:10 Verdünnungen verwendet, um eine Überladung des Gels zu verhindern. Zusätzlich zu HisH ist ein um etwa 2kDa kürzeres unbekanntes Protein vorhanden. WT = HisH_WT, 1 = HisH_R117A, 2 = HisH_N124A, 3 = HisH_Y138A, 4 = HisH_S183A, 5 = HisH_b6, 6 = HisH_b7, 7 = HisH_b9, M = Markerproteine mit Größenangaben in kDa;

Die HisH Alanin-Varianten ergaben Ausbeuten von 25-34mg pro Liter Kulturmedium und wurden auf 5-8mg/ml einkonzentriert. Bei den HisH stretch Varianten HisH_b6, HisH_b7, HisH_b9 und HisH_R117A_b7 wurden Ausbeuten von 52-91 mg Protein pro Liter Kulturmedium erreicht und die Proteine auf 13-17mg/ml einkonzentriert..

Die klonierten Varianten *hisH* R117A_b9, *hisH* R117A_b7_b9, *hisH* R117A_b6_b7_b9 und *hisH*_a5 wurden in analytischem Maßstab produziert, jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht präparativ hergestellt und gereinigt.

Die Tabelle 5.10 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Parameter bei der Herstellung der HisH-Varianten. Bei allen Varianten erfolgte eine Induktion mit 1mM IPTG.

Tabelle 5.10: Übersicht über die wichtigsten Parameter bei der Herstellung der HisH Varianten.

Variante	Expressionsbedingungen		Hitzeschritt [°C / min]	Reinigungsergebnis	
	Temperatur [°C]	Zelltyp		Ausbeute mg/l Kultur	Konzentration des gelagerten Proteins [mg/ml]
HisH_WT	37	KK8 / SG200+50	75 / 20	48	5
HisH_R117A	37	SG200+50	75 / 20	25	6
HisH_N124A	37	SG200+50	75 / 20	34	6
HisH_Y138A	37	SG200+50	75 / 20	32	8

HisH_S183A	37	SG200+50	75 / 20	29	5
HisH_b6	37	KK8	50 / 10	81	16
HisH_b7	37	KK8	50 / 20	52	13
HisH_b9	37	SG200+50	50 / 10	91	17
HisH_R117A_b7	37	KK8	50 / 10	62	11

5.2.10 Strukturelle Charakterisierung der HisF Varianten

Der Austausch von Aminosäuren kann zu Konformationsänderungen und im Extremfall zur Denaturierung von Proteinen führen (Fersht, 1999). Um auszuschließen, dass beobachtete Änderungen funktioneller Eigenschaften auf solche indirekten Effekte zurückgehen, wurden die HisF Varianten im Vergleich zu wildtypischem HisF mittels Fluoreszenz- und Circular-Dichroismus Spektroskopie, sowie analytischer Gelfiltration charakterisiert (4.4.5 - 4.4.10).

5.2.10.1 Spektroskopische Untersuchung der Sekundär- und Tertiärstruktur

Veränderungen in der Proteinkonformation lassen sich oftmals durch Veränderungen der intrinsischen Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren nachweisen (Schmid, 1997). Nach Anregung bei 295nm fluoreszieren ausschließlich Tryptophane, während nach Anregung bei 280nm zusätzlich die Fluoreszenz von Tyrosinen beobachtet wird.

HisF besitzt nur ein Tryptophan an Position 156 in α -Helix 5. Dieses ist vom Lösungsmittel abgeschirmt (Lang *et al.*, 2000), entsprechend liegt das Fluoreszenzmissionsmaximum nach Anregung bei 280nm bei 325nm bzw. nach Anregung bei 295nm bei 323nm (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Die Emissionsmaxima der Varianten HisF_Q123A und HisF_T78M sind im Vergleich mit dem wildtypischen HisF praktisch unverändert (Tabelle 5.11). Dies bedeutet, dass die Lösungsmittelzugänglichkeit von Trp156 und damit auch die Tertiärstruktur von HisF durch diese Austausche unbeeinträchtigt bleibt.

Tabelle 5.11: Fluoreszenzmissions-Spektren der HisF Varianten.

Die Proteinkonzentration betrug jeweils 10 μ M in 10mM KP-Puffer pH 7,5 bei 25°C. Die gezeigten Spektren sind das Mittel aus 10 Spektren.

	Maxima der Fluoreszenzmissions-Spektren [nm] nach Anregung bei	
	280nm	295nm
HisF_WT	325	323
HisF_T78M	322	322
HisF_Q123A	325	323

Zusätzlich wurden fern- und nah-UV CD-Spektren aufgenommen. Fern-UV CD-Spektren (180-250nm) gehen auf die Absorption der Peptidbindung zurück und eignen sich deshalb sehr

gut zum Nachweis von Sekundärstrukturelementen, wobei α -Helices in der Regel das Spektrum dominieren. Fern-UV CD-Spektren (250-320nm) treten dann auf, wenn aromatische Aminosäuren sich in einer asymmetrischen Umgebung befinden, wie es normalerweise in gefalteten Proteinen der Fall ist. Deshalb eignen sie sich gut zum Nachweis nativer Tertiärstruktur (Schmid, 1997).

Sowohl die fern-UV (Tabelle 5.12; Abbildung 5.19) als auch die nah-UV (Abbildung 5.19) CD-Spektren von HisF_Q123A und _T78M sind im Vergleich zum wildtypischen HisF unverändert. Dies belegt, dass beide Varianten native Sekundär- und Tertiärstrukturen besitzen.

Tabelle 5.12: Charakteristische Eigenschaften der Fern-UV CD-Spektren von HisF und der Varianten HisF_Q123A und _T78M.

	Maximum [nm]	Nulldurchgang [nm]	Minima [nm]	
HisF_WT	196	203,2	210	220
HisF_T78M	196	203,6	211	220
HisF_Q123A	196	203,3	210	220

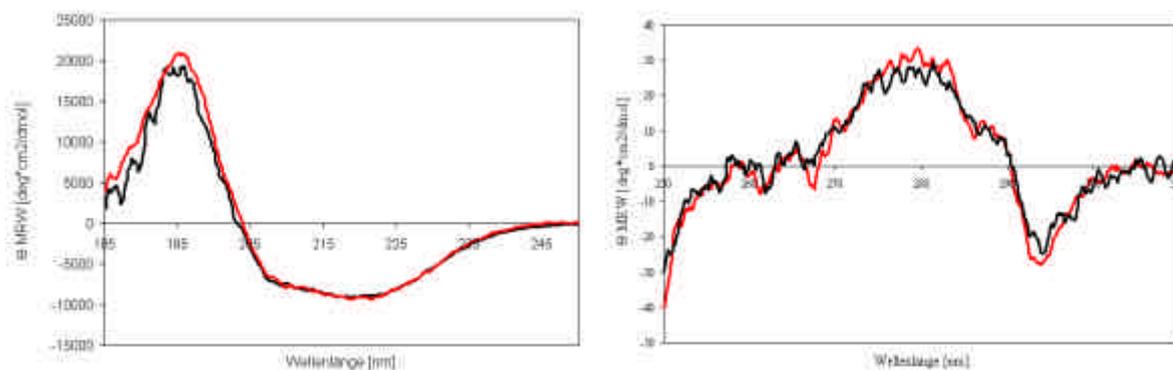


Abbildung 5.19: HisF und HisF_T78M weisen keine messbaren Änderungen in den Sekundär- und Tertiärstrukturen auf.

Gezeigt sind fern-UV und nah-UV CD-Spektren von HisF (schwarz) und HisF_T78M (rot) bei 25°C in 10mM KP-Puffer mit pH 7,5 in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 0,1cm. Es wurde über 10 Messungen gemittelt.

5.2.10.2 Bestimmung des Oligomerisierungszustandes durch analytische Gelfiltration

Analytische Gelfiltration auf einer Superdex 75 Säule wies HisF_Q123A und HisF_T78M als monomere Protein hoher Reinheit und Homogenität aus (Daten nicht gezeigt). Sie unterscheiden sich auch diesbezüglich nicht von wildtypischem HisF.

5.2.11 Strukturelle Charakterisierung der HisH Varianten

Die HisH Alanin-Varianten und die HisH- *stretch* Varianten wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie, limitierter Proteolyse und analytischer Gelfiltration charakterisiert und mit dem wildtypischen HisH verglichen (4.4.5 - 4.4.10).

5.2.11.1 Spektroskopische Untersuchung der Tertiärstruktur

HisH besitzt nur ein Tryptophan an Position 123, welches in β -Strang 6 an der Kontaktfläche liegt und in Abwesenheit von HisF dem Lösungsmittel zugänglich ist. Entsprechend liegt das Fluoreszenzemissionsmaximum nach Anregung bei 280nm bei 343nm bzw. nach Anregung bei 295nm bei 344nm. In Anwesenheit von tryptophanfreiem HisF erniedrigt sich das Maximum auf 323nm (Häger, 2001). Die Austausch der Aminosäuren R117, N124, Y138 und S183 gegen Alanin führen ebenso wie die Austausch der *stretches* b7, b9 und R117A_b7 zu keiner Veränderung der Fluoreszenzemission und scheinen folglich die Tertiärstruktur von isoliertem HisH nicht gravierend zu beeinflussen (Tabelle 5.13). In HisH_b6 ist Trp123 gegen Lysin ausgetauscht und somit kein Tryptophan-Emissionsspektren zu messen.

Tabelle 5.13: Fluoreszenz-emissions-Spektren der HisH Varianten

Die Proteinkonzentration betrug jeweils 10 μ M in 10mM KP-Puffer pH 7,5 bei 25°C. Die gezeigten Spektren sind das Mittel aus 10 Spektren.

	Maxima der Fluoreszenz-Emissions-Spektren [nm] nach Anregung bei	
	280nm	295nm
HisH_WT	343	344
HisH_R117A	338	339
HisH_N124A	337	340
HisH_Y138A	339	342
HisH_S183A	338	339
HisH_b6	-	-
HisH_b7	344	345
HisH_b9	343	345
HisH_R117A_b7	343	340

5.2.11.2 Analyse der Stabilität mittels limitierter Proteolyse

Der Einfluss der Aminosäure-Austausche auf die Stabilität der HisH Varianten wurde mittels proteolytischem Verdau durch Trypsin analysiert. Alle Varianten waren ebenso wie wildtypisches HisH auch bei O/N Inkubation resistent gegenüber proteolytischem Verdau durch

Trypsin (Abbildung 5.20). Dies bedeutet, dass alle Varianten ein kompakte und stabile Struktur aufweisen, im Einklang mit ihrer bei der Anreicherung gezeigten Hitzestabilität (Abbildung 5.17).

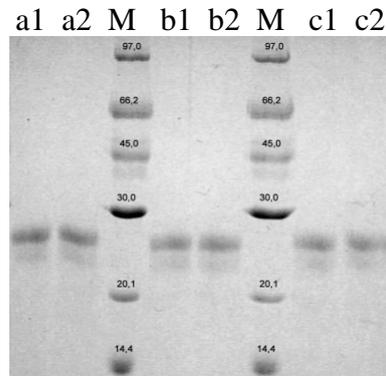


Abbildung 5.20: HisH_WT und die HisH Alanin- und *stretch* Varianten sind resistent gegen proteolytischen Verdau durch Trypsin.

Gezeigt sind wildtypisches HisH (a), die Alanin-Variante R117A (b) und die *stretch* Variante b7 (c) jeweils (1) zum Zeitpunkt $t = 0$ min, d.h. vor Zugabe von Trypsin, sowie (2) nach O/N-Inkubation mit Trypsin. Es wurden jeweils $10 \mu\text{M}$ Protein mit $1,6 \text{ mg/ml}$ Trypsin in 10 mM KP-Puffer pH 7,5 bei 25°C inkubiert. Die Trypsinspaltung der Proteine wurde durch SDS-PAGE analysiert. M = Markerproteine mit Größenangaben in kDa;

5.2.11.3 Bestimmung des Oligomerisierungszustandes durch analytische Gelfiltration

Isoliertes wildtypisches HisH liegt als monomeres Protein vor, eluiert jedoch in der analytischen Gelfiltration auf einer Superdex 75-Säule atypisch spät entsprechend $16,2 \text{ kDa}$, bei einem berechneten Molekulargewicht von $23,1 \text{ kDa}$ (Tabelle 5.14). Dieses retardierte Verhalten, dessen Ursache unbekannt ist, wurde bereits früher beobachtet (Beismann-Driemeyer, 2000). Die Alanin-Varianten eluieren von der Superdex75-Säule als homogene Spezies bei apparenten Molekulargewichten zwischen $16,4$ und $20,2 \text{ kDa}$ (Tabelle 5.14), sind also ebenfalls monomer. Die HisH *stretch* Varianten liegen dagegen als zwei Spezies vor, wobei die kleinere, dominierende zwischen $15,7$ und $23,2 \text{ kDa}$ und die größere, schwächer populierte zwischen $42,2$ und $49,5 \text{ kDa}$ eluiert. Die *stretch* Varianten, in denen längere Sequenzabschnitte von TrpG enthalten sind, liegen also hauptsächlich als Monomer vor, zu etwa einen Drittel jedoch als Dimere. Interessanter Weise ist TrpG ein reines Dimer (Tabelle 5.22).

Tabelle 5.14: Oligomerisierungszustand der HisH Varianten.

Gezeigt sind die Ergebnisse der analytischen Gelfiltration auf einer kalibrierten Superdex75 Säule (Amersham-Pharmacia). Die Elution erfolgte bei RT mit 0.5ml/min in 50mM KP-Puffer, pH 7.5, 300mM KCl. Das berechnete Molekulargewicht für monomeres HisH ist 23,1kDa. Entsprechend ist ein HisH-Dimer bei 46,2kDa zu erwarten. Das berechnete Molekulargewicht für monomeres TrpG beträgt 22,5kDa.

	Vol _{ret} [ml]	Apparentes MW [kDa]	Oligomerisierungszustand
HisH_WT	14,70	16,2	Monomer
HisH_R117A	14,31	19,8	Monomer
HisH_N124A	14,27	20,2	Monomer
HisH_Y138A	14,55	17,5	Monomer
HisH_S183A	14,67	16,4	Monomer
HisH_b6	14,00	23,2	Monomer
	12,66	46,7	Dimer
HisH_b7	14,31	19,8	Monomer
	12,84	42,5	Dimer
HisH_b9	14,75	15,7	Monomer
	12,56	49,2	Dimer
HisH_R117A_b7	14,21	20,9	Monomer
	12,80	43,4	Dimer

5.2.11.4 Untersuchung der Komplexbildung mit HisF

Die Komplexbildung aller HisH Varianten mit HisF wurde mittels nativer PAGE, analytischer Gelfiltration, sowie für einige Varianten mittels Fluoreszenzemissions-Spektroskopie untersucht. Alle HisH-Varianten zeigen die Ausbildung stabiler Komplexe mit HisF.

In der nativen PAGE wurden die jeweilige HisH-Variante und HisF einzeln und im 1:1 Gemisch analysiert. Die aufgetragenen Proteine werden nach Größe und Eigenladung (d. h. entsprechend ihrem pI-Wert) getrennt. HisF besitzt einen berechneten pI-Wert von 5,01, die HisH Varianten Werte zwischen 6,10 und 7,32. Bei einer Interaktion zwischen zwei Proteinen ist statt zweier Einzelbanden eine gemeinsame Bande zu erwarten. Für alle HisH Alanin und *stretch* Varianten wurde die Ausbildung stabiler Komplexe mit HisF beobachtet. Dies ist in Abbildung 5.21 exemplarisch für HisH_WT, HisH_R117A und HisH_b7 gezeigt.

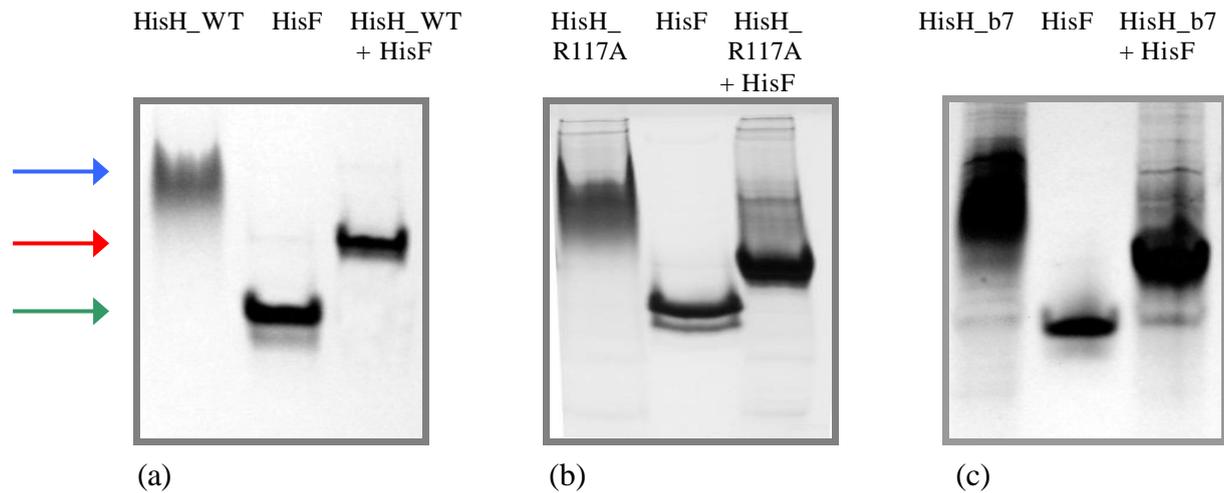


Abbildung 5.21: Native PAGE belegt die Komplexbildung zwischen HisH_WT, sowie den Alanin- und *stretch* Varianten mit HisF.

Die jeweilige HisH-Variante und HisF wurden einzeln und nach Mischung in einem molaren Verhältnis von 1:1 aufgetragen. Stellvertretend sind (a) HisH_WT, (b) HisH_R117A und (c) HisH_b7 gezeigt. Die Pfeile markieren HisH (blau), HisF (grün) und den HisH:HisF Komplex (rot).

Weiterhin wurden zur Analyse einer Komplexbildung der HisH-Varianten mit HisF Gemische beider Proteine im molaren Verhältnis 1:1 mittels analytischer Gelfiltration untersucht. In allen Fällen eluierte eine homogene Spezies, deren apparentes Molekulargewicht zwischen 36,8 und 48,3kDa betrug (Tabelle 5.15). Da das berechnete Molekulargewicht 50,1kDa beträgt, kann auf die Bildung stabiler 1:1 Komplexe geschlossen werden. Die Tendenz zur Bildung von Dimeren bei den HisH *stretch* Varianten konnte in Anwesenheit von HisF nicht mehr beobachtet werden (Tabelle 5.15).

Tabelle 5.15: Analytische Gelfiltration belegt die Komplexbildung zwischen den HisH Varianten und HisF.

Die HisH-Varianten wurden mit HisF in einem Verhältnis von 1:1 gemischt, auf eine Superdex75 Säule aufgetragen und bei einer Flussrate von 0.5 ml/min in 50mM KP-Puffer, pH 7.5, 300mM KCl eluiert. Aus dem Retentionsvolumen wurde anhand der erstellten Eichgerade das apparente Molekulargewicht (MW) der eluierten Komplexe bestimmt. Das berechnete MW der 1:1 Komplexe beträgt 50,1kDa.

	Apparentes MW [kDa]
HisH_WT : HisF	46,0
HisH_R117A : HisF	45,2
HisH_N124A : HisF	42,7
HisH_Y138A : HisF	39,4
HisH_S183A : HisF	43,2
HisH_b6 : HisF	44,8
HisH_b7 : HisF	37,5

HisH_b9 : HisF	36,8
HisH_R117A_b7 : HisF	48,3

Weiterhin wurde die Komplexbildung mit HisF durch eine Abschirmung von Trp123 an der Kontaktfläche zu HisF mittels Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie untersucht. Die Abschirmung von Trp123 vom Lösungsmittel durch Komplexbildung mit der gentechnisch hergestellten Tryptophan-freien Variante von HisF (HisF_W156F) führt zu einer Erniedrigung des Emissionsmaximums von 344nm auf 323nm (Häger, 2001, Tabelle 5.16). Für die HisH Alanin-Varianten, sowie die *stretch* Varianten mit Trp123 (alle außer HisH_b6) wurde die Komplexbildung nachgewiesen (Tabelle 5.16).

Tabelle 5.16: Die Komplexbildung zwischen den HisH Varianten und HisF kann über eine Erniedrigung des Fluoreszenzemissionsmaximums von Trp 123 aus HisH nachgewiesen werden.

Gezeigt sind die Emissionsmaxima (Anregung bei 295 nm) von 10 μ M der entsprechenden HisH Variante in isolierter Form und nach Mischung mit einer äquimolaren Menge an HisF_W156F. Die Messung erfolgte bei 25°C in 10 mM KP-Puffer, pH 7,5.

	Maxima der Fluoreszenz-Emissions-Spektren [nm] nach Anregung mit 295nm	
	isoliertes HisH	1: 1 gemischt mit HisF_W156F
HisH_WT	344	323
HisH_R117A	339	330
HisH_N124A	337	330
HisH_Y138A	342	328
HisH_S183A	338	330
HisH_b7	345	330
HisH_b9	345	325
HisH_R117A_b7	340	330

Für HisH_b7 und His_b9 sind die Fluoreszenzemissionsspektren exemplarisch gezeigt (Abbildung 5.22).

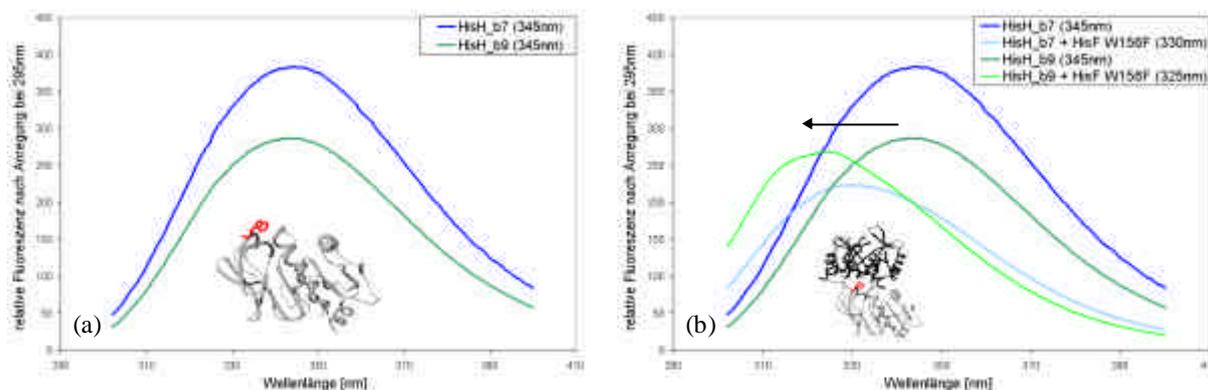


Abbildung 5.22: Fluoreszenzspektroskopie belegt die Komplexbildung von HisH_b7 und HisH_b9 mit HisF.

HisH_b7 und HisH_b9 enthalten einen einzigen Tryptophanrest 123, welcher in Abwesenheit von HisF dem Lösungsmittel exponiert ist. Dies zeigt sich durch ein Maximum der Fluoreszenzemission bei 345nm (a). Bei Komplexbildung mit tryptophanfreiem HisF (W156F) wird das Tryptophan abgeschirmt und es findet eine hypsochrome Verschiebung des Fluoreszenzemissions-Maximums zu 330 bzw. 325nm statt (b). Die Messungen wurden in 10 mM KP-Puffer, pH 7,5, 25°C durchgeführt. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 295nm.

Darüber hinaus wurde über fluorimetrische Titration die Stöchiometrie des Komplexes analysiert. Das Prinzip entspricht dem oben beschriebenen, jedoch wurden 10 μ M (bzw. 1 μ M für HisH_Y138A) einer HisH Variante (HisH_Y138A, HisH_b7 und HisH_b9) vorgelegt und schrittweise 1 μ M (bzw. 0,1 μ M für HisH_Y138A) HisF_W156F zutitriert (Abbildung 5.23 a). Jeder Titrationsschritt führte zu einer gleich starken hypsochromen Verschiebung des Maximums, bis äquimolare Mengen an HisH und HisF vorhanden waren und das Maximum bei 326nm lag. Fortgesetzte Zugabe von HisF_W156F führte zu keiner weiteren Verschiebung des Maximums. Dies ist in Abbildung 5.23 exemplarisch für HisH_Y138A gezeigt.

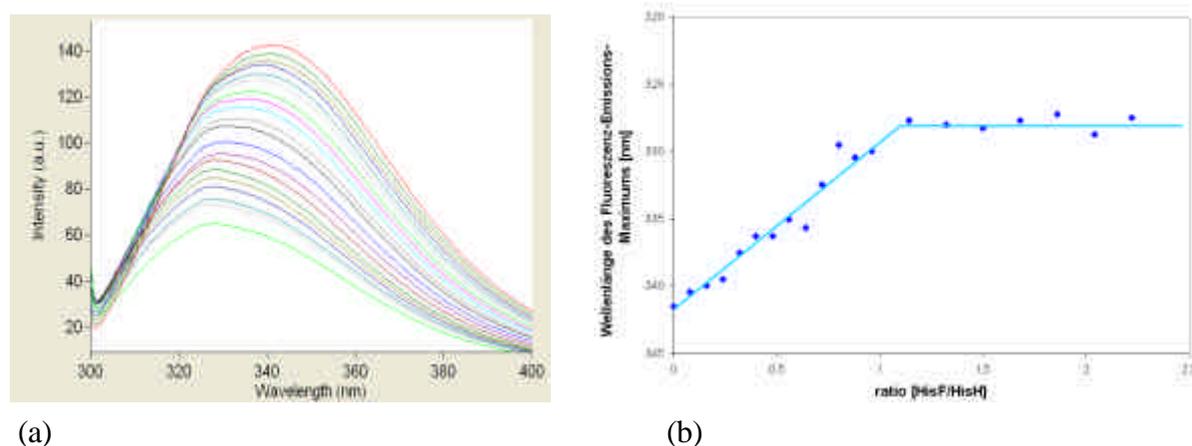


Abbildung 5.23: Fluoreszenz-Titration belegt die Ausbildung von 1:1 Komplexen zwischen HisH_Y138A und HisF.

Es wurde 1 μ M HisH_Y138A in 50mM KP, pH 7,5 bei 25°C, 1mM EDTA vorgelegt und in 0,1 μ M-Schritten HisF_W156F zutitriert. (a). Die durch die Abschirmung des Trp 123 bedingte Abnahme des Emissionsmaximums ist in (b) in Form einer Titrationskurve dargestellt. Bei Anwesenheit etwa äquimolare Mengen der beiden Proteine wird keine weitere Verschiebung des Maximums beobachtet, was die Ausbildung eines 1:1 Komplexes belegt.

Dies bedeutet, dass sich 1:1 Komplexe bilden, deren Dissoziationskonstante K_d weit unterhalb der eingesetzten Proteinkonzentration von $10\mu\text{M}$ (bzw. $1\mu\text{M}$) liegen. Entsprechendes war bereits früher für den Komplex aus wildtypischen HisH und HisF beobachtet worden (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass weder die Austausch gegen Alanin noch der Austausch der *stretches* zu signifikanten Änderungen der Struktur und Stabilität von HisH führen und die Komplexbildung mit HisF nicht messbar stören.

5.2.12 Funktionelle Charakterisierung der HisH und HisF Varianten durch *steady-state* Enzymkinetiken

Zur funktionellen Charakterisierung der HisH und HisF Varianten wurden enzymkinetische Messungen unter *steady-state* Bedingungen durchgeführt. Es wurde jeweils die glutaminabhängige Gesamtreaktion, die ammoniumabhängige HisF-Teilreaktion und die Glutaminase-HisH-Teilreaktion gemessen und die katalytischen Parameter ermittelt. Alle Messungen wurden mit HisH:HisF Komplexen durchgeführt, wozu die jeweils zu charakterisierende HisH bzw. HisF Variante mit wildtypischem Partnerenzym gemischt wurde. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 5.24 der HisH:HisF Komplex mit seinen Substraten und Produkten gezeigt, sowie die zur Erzeugung des Substrates PRFAR bzw. zur Analyse des Produktes Glutamat verwendeten Hilfsreaktionen.

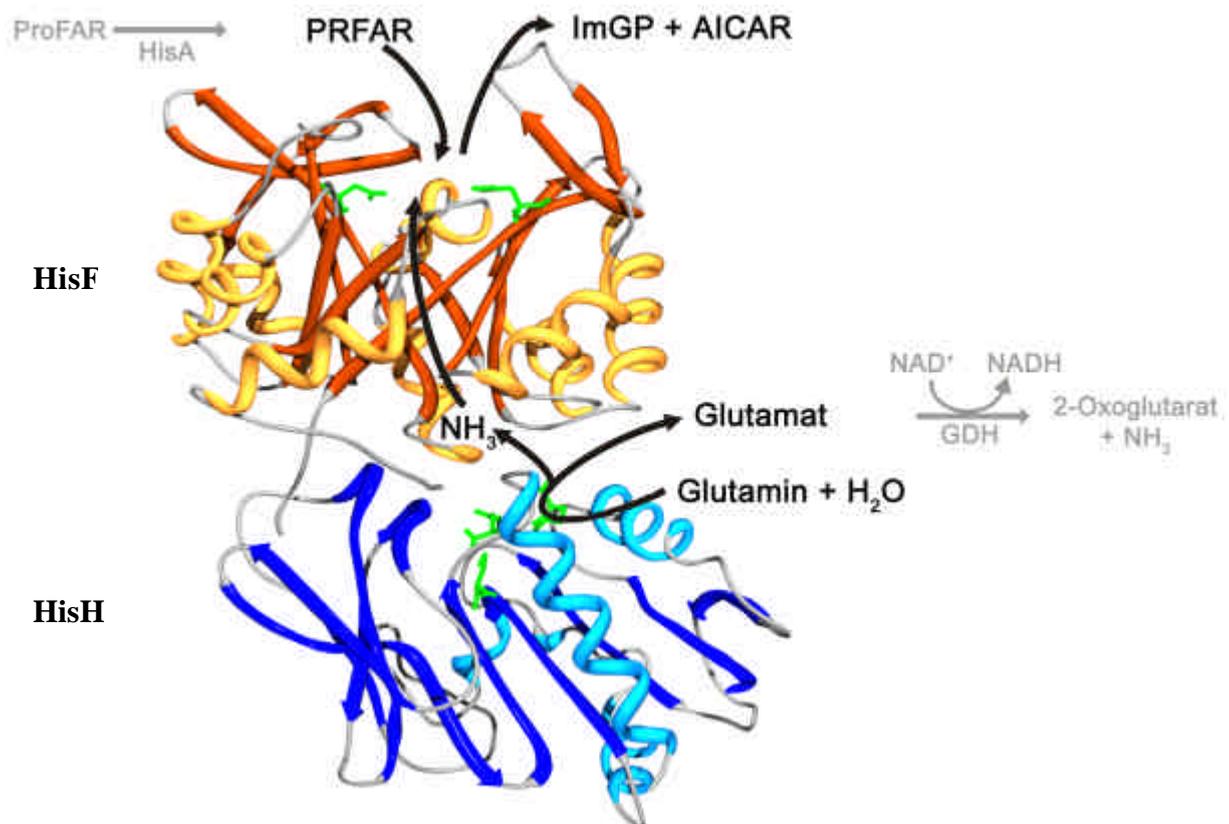


Abbildung 5.24: Ribbondiagramm des HisH:HisF Komplexes mit den von ihm katalysierten Reaktionen.

Gezeigt sind HisH (blau) und HisF (orange) mit den aktiven Zentren (grün), sowie den Substraten und Produkten (schwarz). Darüber hinaus sind die für die *steady-state* kinetischen Messungen verwendeten Hilfsreaktionen zur Erzeugung von PRFAR bzw. zum Nachweis von Glutamat dargestellt (grau).

In der glutaminabhängigen Gesamtreaktion wurde unter Sättigung mit Glutamin die Michaelis-Konstante K_M^{PRFAR} und die Wechselzahl k_{cat} ermittelt. Dazu wurde die Bildungsrate des

Produktes AICAR spektroskopisch über die zeitliche Abnahme der Absorption bei 300nm in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an PRFAR verfolgt (4.4.11.1). Die katalytischen Parameter der HisH und HisF Varianten sind in Tabelle 5.17 zusammengefasst.

Tabelle 5.17: Steady-state enzymkinetische Konstanten der glutaminabhängigen Gesamtreaktion des wildtypischen HisH:HisF Komplexes und der Varianten

Die Messung erfolgte bei RT in 50mM Tris Acetat, pH 8,0 und unter Glutamin-Sättigung, soweit dies möglich war. Die Konzentration an ProFAR, welche *in situ* zu PRFAR umgesetzt wurde, wurde variiert (4.4.11.1).

Enzymvariante	Gln	k_{cat}	$k_{cat}^{WT} / k_{cat}^{Var}$	K_M^{PRFAR}	K_M^{WT} / K_M^{Var}	k_{cat} / K_M	$k_{cat} / K_M^{WT} / k_{cat} / K_M^{Var}$
	[mM]	[s ⁻¹]		[μM]		[μM ⁻¹ s ⁻¹]	
HisH:HisF	40	1	-	3,5	-	0,29	-
HisH:HisF (SBD) ¹	5	0,8	1,25	1,5	2,3	0,53	0,55
HisH:HisF_T78M	40	0,23	4,3	24	0,15	0,0097	29,9
HisH:HisF_Q123A ²	40	> 0,17	< 5,9	6,6	0,53	0,025	< 11,6
HisH_R117A:HisF	60	0,03	33,3	97	0,036	0,0003	967
HisH_N124A:HisF ²	60	> 0,05	< 20,0	34	0,10	0,0015	< 193
HisH_Y138A:HisF	60	0,69	1,4	0,2	17,5	6,9	0,04
HisH_S183A:HisF	60	0,37	2,7	8,5	0,41	0,90	0,32
HisH_b6:HisF ²	40	> 0,024	< 41,7	14,5	0,24	0,0017	< 171
HisH_b7:HisF	5	0,05	20,0	1,2	2,9	0,04	7,25
HisH_b9:HisF ²	40	> 0,08	< 12,5	3,6	0,97	0,022	< 13,2

¹ Daten aus Beismann-Driemeyer & Sterner (2001).

² Die Messungen erfolgten in Anwesenheit von Glutaminkonzentrationen, die deutlich unterhalb der Sättigung lagen (vgl. Tabelle 5.19). Die angegebene k_{cat} -Werte stellen deshalb Untergrenzen dar und die $k_{cat}^{WT} / k_{cat}^{Var}$ und $k_{cat} / K_M^{WT} / k_{cat} / K_M^{Var}$ entsprechend Obergrenzen.

In der ammoniumabhängigen HisF-Teilreaktion wurden unter Sättigung mit Ammoniak, der in Form von Ammoniumsalzen zugegeben wurde, wiederum K_M^{PRFAR} und k_{cat} wie oben beschrieben ermittelt (4.4.11.2). HisH ist für die Reaktion im Prinzip nicht erforderlich, dennoch wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit der glutaminabhängigen Gesamtreaktion sämtliche Messungen mit komplexierten Proteinen durchgeführt. Die katalytischen Parameter sind in Tabelle 5.18 dargestellt.

Tabelle 5.18: Steady-state enzymkinetische Konstanten der ammoniumabhängigen HisF-Teilreaktion des wildtypischen HisH:HisF Komplexes und der Varianten

Die Messung erfolgte bei RT in 50mM Tris Acetat, pH 8,5 mit 100mM Ammonium-Acetat. Die Konzentration an ProFAR, welche *in situ* zu PRFAR umgesetzt wurde, wurde variiert (4.4.11.14.4.11.2).

Enzymvariante	k_{cat}	$\frac{k_{\text{cat}}^{\text{WT}}}{k_{\text{cat}}^{\text{Var}}}$	K_M^{PRFAR}	$\frac{K_M^{\text{WT}}}{K_M^{\text{Var}}}$	k_{cat} / K_M	$\frac{k_{\text{cat}} / K_M^{\text{WT}}}{k_{\text{cat}} / K_M^{\text{Var}}}$
	[s ⁻¹]		[μM]		[μM ⁻¹ s ⁻¹]	
HisH:HisF	8,1	1	16,7	1	0,48	1
HisF (SBD) ¹	2,2	3,68	1,7	9,8	1,3	0,37
HisH:HisF_T78M	0,8	10,1	3,9	4,3	0,19	2,5
HisH:HisF_Q123A	0,49	16,5	4,98	3,4	0,098	5,0
HisH_R117A:HisF ²	n.g.	-	n.g.	-	0,19	2,5
HisH_N124A:HisF ²	n.g.	-	n.g.	-	0,21	2,3
HisH_Y138A:HisF	1,88	4,3	2,9	5,8	0,65	0,74
HisH_S183A:HisF ²	n.g.	-	n.g.	-	0,24	2,0
HisH_b6:HisF ²	n.g.	-	n.g.	-	0,53	0,91
HisH_b7:HisF ²	n.g.	-	n.g.	-	0,025	19,2
HisH_b9:HisF ²	n.g.	-	n.g.	-	0,18	2,7

¹Daten aus Beismann-Driemeyer & Sterner (2001), wobei die ammoniumabhängige Reaktion in Abwesenheit von HisH gemessen wurde;

² Für diese Varianten wurde nur der lineare Anfangsbereich der Sättigungskurve ($[S]_{\max}=1\mu\text{M} \ll K_M^{\text{PRFAR}}$, vgl. Tabelle 5.17) gemessen. Die Steigung der Sättigungskurve in diesem Bereich entspricht $V_{\max}/K_M^{\text{PRFAR}}$. Daraus läßt sich bei bekannter Gesamtkonzentration an aktiven Zentren ($[E_0]$) die katalytische Effizienz $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{PRFAR}}$ berechnen, nicht jedoch die Einzelwerte für die Wechselzahl und die Michaelis-Konstante.
n.g. = nicht gemessen.

Die Glutaminase-Teilreaktion wird durch wildtypisches HisH nur dann mit messbarer Geschwindigkeit katalysiert, wenn ein Ligand (PRFAR, ProFAR, ImGP) an das aktive Zentrum von HisF gebunden hat (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Für die hier durchgeführten Messungen wurde das HisF-Substratanalogon ProFAR in sättigenden Konzentration ($50\mu\text{M}$ für wildtypisches HisH:HisF; Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001) verwendet. Da die Glutaminase-Reaktion kein spektroskopisches Signal liefert, wurde die Bildung des Glutamats über die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) an die Reduktion von NAD^+ gekoppelt und über den Anstieg der Absorption bei 340nm verfolgt wurde (4.4.11.3). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Glutamin gestartet. Die davor aufgenommene Basislinie zeigte aus unbekanntem Gründen bereits einen geringen Anstieg, welcher von der gemessenen Anfangssteigung abgezogen wurde. (In Vergleichsmessungen, die durch die Zugabe von Enzymen (HisH:HisF + GDH) gestartet wurden, wurde das Ansteigen der Basislinie nicht beobachtet.) Die katalytischen Parameter sind in Tabelle 5.18 dargestellt.

Weder bei wildtypischem HisH, noch bei einer der Varianten konnte unter Standardbedingungen (4.4.11.3) nachweisbare Aktivität in Abwesenheit der Synthese HisF detektiert werden.

Tabelle 5.19: Steady-state enzymkinetische Konstanten der Glutaminase-HisH-Teilreaktion des wildtypischen HisH:HisF Komplexes und der Varianten

Die Messung erfolgte bei RT in 50mM Tricin KOH, pH 8,0 und unter PRFAR-Sättigung, soweit dies möglich war. Die Konzentration an Glutamin wurde variiert (4.4.11.14.4.11.2).

Enzymvariante	ProFAR ²	k_{cat}	$k_{\text{cat}}^{\text{WT}} / k_{\text{cat}}^{\text{var}}$	K_M^{Gln}	$K_M^{\text{WT}} / K_M^{\text{var}}$	k_{cat} / K_M	$k_{\text{cat}} / K_M^{\text{WT}} / k_{\text{cat}} / K_M^{\text{var}}$
	[μM]	[min^{-1}]		[mM]		[$\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$]	
HisH:HisF	50	13,4	1	3,7	1	3,62	1
	ohne	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
HisH:HisF (SBD) ¹	ImGP	6	2,2	0,5	7,4	12	0,3
	ohne	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
HisH:HisF_T78M	150	8,2	1,6	4,3	0,86	1,95	1,86
	ohne	n.g.	-	n.g.	-	n.g.	-

HisH:HisF_Q123A	150	5,8	2,3	31,4	0,12	0,19	19,1
	ohne	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
HisH_R117A:HisF	214	1,8	7,6	9,4	0,39	0,19	19,1
	ohne	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
HisH_N124A:HisF	78	2,6	5,2	20,2	0,18	0,13	28,3
	ohne	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
HisH_Y138A:HisF	50	29,6	0,45	11,0	0,34	2,7	1,3
	ohne	17,9	0,75	0,62	6,0	28,9	0,13
HisH_S183A:HisF	115	1,8	7,5	8,7	0,43	0,20	18,1
	ohne	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
HisH_b6:HisF	112	~ 4,6	2,9	~ 73	0,051	~ 0,06	60,3
	ohne	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
HisH_b7:HisF	50	9,4	1,4	0,056	66	168	0,021
	ohne	3,3	4,1	0,15	25	22	0,17
HisH_b9:HisF	50	~ 5,1	2,6	~ 83	0,045	~ 0,06	60,3
	ohne	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

¹ Daten aus Beismann-Driemeyer & Sterner (2001), wobei die Aktivierung durch die Bindung von ImGP an HisF erfolgte;

² Die ProFAR-Konzentrationen wurden so gewählt, dass jeweils eine maximale Stimulation der Glutaminase-Aktivität erreicht wurde.

n.d. = nicht detektierbar, n.g. = nicht gemessen.

Im Folgenden werden die Konsequenzen der Austausche für jede Variante getrennt zusammengefasst und besprochen.

5.2.12.1 HisH:HisF_T78M

Der wildtypische Rest T78 von HisF liegt in Ebene 3 im Inneren des Fasses von HisF (Abbildung 5.15). Weder in der ammoniumabhängigen HisF-Teilreaktion noch in der

Glutaminase-HisH-Teilreaktion zeigen sich deutliche Unterschiede zum wildtypischen Komplex.

In der glutaminabhängigen HisH:HisF Gesamtreaktion ist dagegen eine 4-fache Erniedrigung des k_{cat} und eine 7-fache Erhöhung des $K_{\text{M}}^{\text{PRFAR}}$ zu beobachten, entsprechend ist die katalytische Effizienz etwa 30-fach erniedrigt. Diese Effekte sind jedoch zu gering, als dass man daraus auf die mit dem Austausch beabsichtigte Schließung des Ammoniakkanals schließen könnte. Vermutlich sind sie Folge von Konformationsänderungen im Zuge der Einpassung der voluminöseren Seitenkette des Methionins in das Innere des Fasses, die sich zum aktiven Zentrum hin fortsetzen. Diese Umlagerungen ist offensichtlich nur relativ geringfügig, da sie mittels Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie nicht nachgewiesen werden können (5.2.10).

5.2.12.2 HisH:HisF_Q123A

Der wildtypische Rest Q123 von HisF liegt an der Kontaktfläche zu HisH (Douangamath *et al.*, 2002). Sowohl in der ammoniumabhängigen HisF-Teilreaktion als auch in der glutaminabhängigen HisH:HisF Gesamtreaktion zeigen sich keine große Unterschiede zum wildtypischen Komplex, die katalytische Effizienz nimmt nur etwa um den Faktor 5 bzw. 12 ab.

In der Glutaminase-HisH-Teilreaktion fällt jedoch neben einer etwa 2-fachen Erniedrigung des k_{cat} Wertes ein nahezu 10-facher Anstieg des $K_{\text{M}}^{\text{Gln}}$ auf. Dies deutet darauf hin, dass der Rest Q123 aus HisF an der Bindung von Glutamin an HisH direkt oder indirekt beteiligt sein könnte.

5.2.12.3 HisH_R117A

Der wildtypische Rest R117 aus HisH liegt an der Kontaktfläche und bildet Wasserstoffbrücken zu T195 und D219 aus HisF aus (Tabelle 5.5; Abbildung 5.9; Abbildung 5.8). Die katalytische Effizienz der ammoniumabhängigen HisF-Teilreaktion ist durch den Austausch kaum beeinträchtigt. Die katalytische Effizienz der Glutaminase-HisH-Teilreaktion ist durch eine knapp 8-fach Erniedrigung des k_{cat} und eine 2,5-fache Erhöhung des $K_{\text{M}}^{\text{Gln}}$ etwa 20-fach verschlechtert. Ein noch deutlicherer Effekt zeigt sich in der glutaminabhängigen HisH:HisF Gesamt-Reaktion, in welcher der k_{cat} um den Faktor 33 reduziert und der $K_{\text{M}}^{\text{PRFAR}}$ um den Faktor 28 erhöht vorliegt. Dies führt zu einer fast 1000-fachen Abnahme der katalytischen Effizienz. Diese Ergebnisse sprechen für eine wichtige Rolle von R117 in der Gesamtreaktion, die wegen des relativ großen Abstandes von R117 zu beiden aktiven Zentren (Abbildung 5.8) vermutlich indirekter Natur ist. Eine Möglichkeit wäre, dass es durch den Austausch zu einem weitreichenden Effekt kommt, der die Bindung von PRFAR (bzw. ProFAR) an HisF erschwert bzw. weniger produktiv macht und dadurch die Effizienz der Aktivierung der Glutaminase-Reaktion herabsetzt. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass HisH_R117 Wasserstoffbrücken mit HisF_T195 und HisF_D219 ausbildet, welche im Loop 1 zwischen α -Helix 6 und β -Strang 7 bzw. am N-terminalen Ende von α -Helix 8 lokalisiert sind. Dadurch

ergibt sich eine Verknüpfung mit der am C-terminalen Ende von β -Strang 7 lokalisierten Bindestelle einer der beiden Phosphatgruppen von PRFAR.

5.2.12.4 HisH_N124A

Der streng konservierte wildtypische HisH_N124 Rest liegt an der Kontaktfläche und interagiert über eine Wasserstoffbrücke mit dem N-terminalen Methioninrest von HisF (Tabelle 5.6; Abbildung 5.10; Abbildung 5.8). Die katalytische Effizienz der ammoniumabhängigen HisF-Teilreaktion ist durch den Austausch kaum beeinträchtigt. Die katalytische Effizienz der Glutaminase-HisH-Teilreaktion ist um den Faktor 28 verringert, was sich etwa zu gleichen Teilen durch Veränderungen im k_{cat} und $K_{\text{M}}^{\text{Gln}}$ ergibt. Ebenso wie beim Austausch R117A ist der Effekt in der glutaminabhängigen HisH:HisF Gesamtreaktion mit einer knapp 200-fachen Erniedrigung der katalytischen Effizienz, bedingt durch eine 20-fachen Erniedrigung von k_{cat} und eine 10-fache Erhöhung von $K_{\text{M}}^{\text{PRFAR}}$, noch deutlich ausgeprägter. Ebenso wie R117A, liegt auch N124 recht weit von beiden aktiven Zentren entfernt. Es liegt die Vermutung nahe, dass er indirekt durch seine Interaktion mit dem N-terminalen M1 aus HisF den Loop 1 zwischen β -Strang 1 und α -Helix 1 am anderen Pol des Fasses beeinflusst. Dieser Loop 1 ist sehr flexibel und interagiert, vermutlich über K19, mit dem am aktiven Zentrum gebundenen PRFAR (Lang *et al.*, 2000; Douangamath *et al.*, 2002; Banfield *et al.*, 2001). Die Beeinträchtigung dieser Bewegung könnte, ähnlich wie für R117 diskutiert, die Produktivität der Bindung von PRFAR und damit die Effizienz der Glutaminase-Stimulation herabsetzen. Auch ist eine Beeinflussung des am C-terminalen Ende von β -Strang 1 lokalisierten und für die HisF-Reaktion essentiellen D11 nicht auszuschließen, die sich dann wiederum auf die Stimulation der Glutaminase-Aktivität auswirken könnte.

5.2.12.5 HisH_S183A

Der streng konservierte wildtypische HisH_S183 Rest befindet sich in unmittelbarer Umgebung des aktiven Zentrums und ist Teil eines komplexen Wasserstoffbrücken-Netzwerkes an der Kontaktfläche zu HisF, welches sich durch Glutaminbindung drastisch verändert (

Tabelle 5.7; Abbildung 5.11; Abbildung 5.8).

Dennoch führt der Austausch S183A weder in der glutaminabhängigen HisH:HisF Gesamtreaktion, noch in der ammoniumabhängigen HisF-Teilreaktion zu deutlichen Veränderungen der katalytischen Aktivität. In der Glutaminase-HisH-Teilreaktion ist eine Reduzierung der katalytischen Effizienz um den Faktor 18 zu beobachten, die hauptsächlich auf der 7,5 fachen Reduzierung von k_{cat} beruht. Die Aminosäure HisH_S183 scheint weder für die Katalyse der HisH:HisF Reaktion somit von geringer Bedeutung zu sein.

5.2.12.6 HisH_b6 und HisH_b9

In den Varianten HisH_b6 und HisH_b9 sind Sequenzabschnitte mit sechs hochkonservierten bzw. zwei nicht konservierten Aminosäuren in einiger Entfernung vom aktiven Zentrum substituiert (Abbildung 5.14). Die Charakterisierung der beiden Varianten erbrachte ähnliche Resultate. In der glutaminabhängigen Gesamtreaktion ist der K_M^{PRFAR} nur geringfügig erhöht. Für den k_{cat} ließen sich nur Untergrenzen ermitteln, da wegen des hohen K_M^{Gln} (siehe unten) Messungen unter gleichzeitiger Sättigung mit beiden Substraten nicht möglich waren. Diese Untergrenzen deuten darauf hin, dass die Wechselzahl nicht sehr stark herabgesetzt sein kann. Die katalytische Effizienz der ammoniumabhängigen Reaktion ist kaum beeinträchtigt. Sehr deutliche Effekte zeigen sich in der Glutaminase-HisH-Teilreaktion. Während die k_{cat} -Werte nur wenig beeinträchtigt sind, werden im Vergleich zum wildtypischen Enzym etwa 20-fach erhöhte K_M^{Gln} Werte (~73 mM bzw. ~83 mM) beobachtet. Generell litt die Genauigkeit der Auswertung dieser Messungen darunter, dass bei den höchsten eingesetzten Glutaminkonzentrationen Löslichkeitsprobleme auftraten. Zweifelsfrei lässt sich jedoch schließen, dass die ausgetauschten Bereiche eine Bedeutung in der Bindung von Glutamin haben, jedoch die Effizienz der Gesamtreaktion nicht drastisch beeinflussen. Dies ist insofern etwas erstaunlich, als sich in HisH_b6 unter anderem N124 befindet, dessen isolierter Austausch gegen Alanin die HisH:HisF Gesamtreaktion deutlich beeinträchtigt (siehe oben). Vermutlich hängt der Unterschied damit zusammen, dass N124 in HisH_b6 gegen Threonin ausgetauscht ist, welches im Gegensatz zu Alanin zur Ausbildung der Wasserstoffbrücken mit HisF_M1 prinzipiell befähigt ist.

Von einem Einfluss des Austausches W123 in HisH_b6 auf die Katalyse ist nicht auszugehen, da die tryptophanfreie HisH-Variante W123F keine Veränderungen der katalytischen Parameter im Vergleich zum wildtypischen Protein aufweist (Beismann-Driemeyer, 2001).

5.2.12.7 HisH_b7 und HisH_Y138A

In HisH_b7 ist ein Sequenzabschnitt mit vier Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums substituiert, zu dem unter anderem Tyrosin 138 gehört. Da dieser Rest hochkonserviert ist und bei Bindung von Glutamin sich die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu HisF-Resten ändert, wurde er zusätzlich gezielt gegen Alanin ausgetauscht (Abbildung 5.8; Abbildung 5.11). Während HisH_Y138A in der ammoniumabhängigen HisF-Teilreaktion keinen Unterschied

zum wildtypischen Protein aufweist, ist die katalytische Effizienz von HisH_b7 etwa 20-fach herabgesetzt. Dagegen ist in der glutaminabhängigen HisH:HisF Gesamt-Reaktion für HisH_Y138A eine 18-fache Erniedrigung (!) des K_M^{PRFAR} zu beobachten, bei praktisch gleichbleibendem k_{cat} . Der K_M^{PRFAR} von HisH_b7 ist dagegen nur 3-fach erniedrigt und der k_{cat} um den Faktor 20 verringert. Damit liegt die katalytische Effizienz von HisH_Y138A in der Gesamtreaktion etwa 25-fach über der des wildtypischen Enzyms und 170-fach über der von HisH_b7.

In der Glutaminase-HisH Reaktion zeigen sowohl HisH_b7 als auch HisH_Y138A ein grundsätzlich anderes Verhalten als das wildtypische Enzym, insofern sie auch in Abwesenheit von ProFAR eine deutlich messbare Aktivität aufweisen. Dies bedeutet, dass die konditionale Glutaminase HisH in eine konstitutive Glutaminase umgewandelt wurde. Durch die Zugabe von ProFAR wird die Aktivität weiter erhöht. Dies ist in Abbildung 5.25 exemplarisch für HisH_b7 gezeigt.

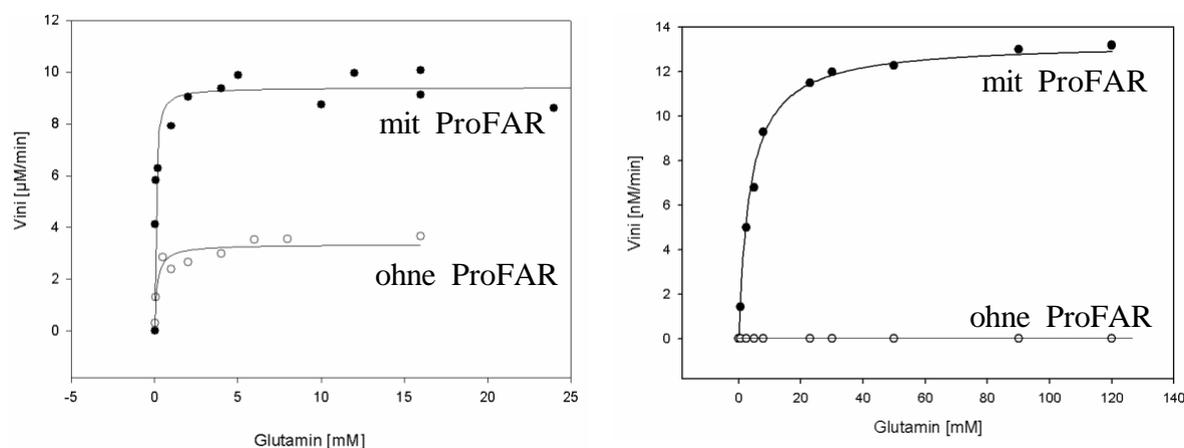


Abbildung 5.25: Durch den Austausch von *stretch 7* wird aus einer konditionale eine konstitutive Glutaminase.

Dargestellt sind die Sättigungskurven der Glutaminase-Aktivität von HisH_b7:HisF (a) und wildtypischem HisH:HisF Komplex (b), jeweils in An- und Abwesenheit sättigender Konzentrationen des HisF-Substratanalogons ProFAR. Die Messungen erfolgten in 50mM Tricin KOH Puffer, pH 8,0 bei 25°C mit jeweils 1 μM der beiden Proteinkomplexe.

In Anwesenheit von ProFAR entspricht der k_{cat} von HisH_b7 dem wildtypischen Wert, der von HisH_Y138A ist sogar doppelt so hoch. Ohne ProFAR ist der k_{cat} Wert von HisH_b7 um den Faktor 3 geringer, während der für HisH_Y138A dem wildtypischen Wert in Anwesenheit von ProFAR entspricht. Besonders auffallend ist, dass die K_M^{Gln} Werte von HisH_b7 und HisH_Y138A durch die Anwesenheit von ProFAR in unterschiedliche Richtungen verändert werden. Während für HisH_b7 ohne ProFAR der K_M^{Gln} 25-fach niedriger ist als der Wert des wildtypischen Enzyms, ist er in Anwesenheit von ProFAR sogar 66-fach niedriger. Dagegen ist für HisH_Y138A ohne ProFAR der K_M^{Gln} 6-fach niedriger ist als der Wert des wildtypischen Enzyms, in Anwesenheit von ProFAR jedoch 3-fach höher. Insgesamt bedeutet dies, dass die katalytische Effizienz der Glutaminasereaktion der beiden Varianten ohne ProFAR ca. 6-fach höher ist als die des wildtypischen Enzyms in Anwesenheit von ProFAR. In Anwesenheit von

ProFAR ist sie für HisH_b7 fast 50-fach höher als für HisH_Y138A und das wildtypische Enzym.

5.2.13 Zusammenfassung

HisH und HisF aus *T.maritima* bilden mit sehr hoher Affinität einen stöchiometrischen 1:1 Komplex aus (Beismann-Driemeyer *et al.*, 2001). Zwischen den aktiven Zentren von HisH und HisF, die etwa 25Å von einander entfernt liegen, werden in beide Richtungen Signale transferiert, die auf ligandeninduzierten Konformationsänderungen beruhen (Häger, 2001). Die strukturellen Grundlagen dieser bidirektionalen Signaltransduktion sollte durch eine Kombination aus Röntgenstrukturanalyse und Mutagenese der Kontaktfläche auf atomarer Ebene aufgedeckt werden.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Matthias Wilmanns am EMBL Hamburg wurden Kristallstrukturen von ligandiertem HisH:HisF Komplex mit einer Auflösung von 2,4-2,84 Å gelöst. Dies sind Strukturen mit (1) dem HisH-Substrat Glutamin, (2) dem HisH-Substrat Glutamin zusammen mit dem HisF-Produkt ImGP, (3) dem HisH-Produkt Glutamat und (4) dem HisF-Produkt AICAR. Die eindeutigsten Unterschiede zur apo-Struktur fanden sich in der Struktur mit gebundenem Glutamin. Aus dem Vergleich der apo- mit der Glutamin-gebundenen Struktur wurden vier Aminosäuren (R117, N124, Y138 und S183) in HisH identifiziert, die deutliche Unterschiede in ihrer Konformation oder der Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrücken zeigen, und gegen Alanin ausgetauscht.

Da bei der Ausbildung von Protein-Protein Wechselwirkungen typischerweise etwa 10-20 Aminosäuren der beiden Interaktionspartner involviert sind, die sich auf 2-4 *stretches* aufteilen (Wells, 1991), schien es zur Analyse der HisH:HisF Kontaktfläche sinnvoll, parallel zur Alanin-Scanning-Mutagenese längere Sequenzabschnitte (*stretches*) auszutauschen. Daher wurden in HisH Sekundärstrukturelemente (β -Strang 6, 7, 9, α -Helix 5) identifiziert, die Teil der Kontaktfläche zu HisF sind und konservierte Aminosäuren enthalten (Abbildung 5.13). Diese Elemente wurde gegen die entsprechenden Elemente der verwandten Glutaminase TrpG aus *T.maritima* ersetzt.

Ergänzend wurden zwei HisF Varianten erzeugt. Durch den Austausch von T78 im zentralen β -Fass gegen die voluminösere Aminosäure Methionin sollte versucht werden, den (postulierten) Ammoniak-Kanal zu verengen und somit die Effizienz des Channelings zu verringern. Die streng konservierte Aminosäure Q123 in HisF ist Teil der Kontaktfläche zu HisH liegt nahe an der katalytischen Triade. Durch seinen Austausch gegen Alanin sollte überprüft werden, ob Q123 an der Bindung und/oder der Hydrolyse von Glutamin beteiligt ist.

Sämtliche HisH und HisF Varianten wurden heterolog in *E. coli* exprimiert, mit Ausbeuten zwischen 25 und 121 mg pro Liter Kulturmedium zur Homogenität gereinigt und strukturell und funktionell charakterisiert. Für keine der Varianten konnten Änderungen der Sekundär-

oder Tertiärstruktur nachgewiesen werden (Fluoreszenz, Circular-Dichroismus) und die hohe Stabilität gegenüber Hitzedenaturierung und der Protease Trypsin lässt auf eine stabile und kompakte Faltung schließen. Während die Einzelaustausche den monomeren Oligomerisierungszustand von HisF bzw. HisH nicht beeinflussten, zeigten die HisH *stretch* Varianten eine Tendenz zur Dimerisierung. Dies bedeutet, dass durch die aus TrpG stammenden Sequenzabschnitte dessen dimerer Assoziationszustand (Kapitel 3 und 4) teilweise auf HisH übertragen wird. Alle HisF und HisH Varianten bildeten jedoch mit dem wildtypischen Partnerprotein hochaffine 1:1 Komplexe aus, wie über analytische Gelfiltration, fluorimetrische Titration und native PAGE nachgewiesen werden konnte.

Durch die Charakterisierung dieser HisH:HisF Komplexe mittels *steady-state* Enzymkinetiken wurde die funktionelle Bedeutung der ausgetauschten Aminosäuren analysiert.

Der HisH:HisF_T78M Komplex zeigte eine etwas erniedrigte Effizienz in der glutaminabhängigen Gesamtreaktion, was aber vermutlich eher auf kleinere konformationelle Anpassungen als auf einen Verschluss des Amoniakkanals zurückgeht. Die Ergebnisse mit dem HisH:HisF_Q123A Komplex deuten auf eine Beteiligung von Q123 an der Bindung, nicht jedoch an der Hydrolyse von Glutamin hin. Dies gilt in noch stärkerem Maße für die Varianten HisH_b6:HisF und HisH_b9:HisF, welche drastisch erhöhte Michaelis Konstanten für Glutamin aufweisen.

Während der HisH_S183A:HisF Komplex praktisch wildtypische Eigenschaften zeigte, wiesen die Komplexe HisH_R117A:HisF und HisH_N124A:HisF in der glutaminabhängigen Gesamtreaktion eine etwa 1000- bzw. 300-fach eingeschränkte katalytische Effizienz auf. Vermutlich geht dies auf die Induktion weitreichender Konformationsänderungen von der Kontaktfläche am N-terminalen Ende des zentralen β -Fasses von HisF zu dessen aktiven Zentrum zurück, welche die Stärke und die Produktivität der Bindung von PRFAR beeinträchtigen.

HisH_b7:HisF und HisH_Y138A:HisF zeigten ein grundsätzlich anderes Verhalten als der wildtypische Komplex (und alle anderen untersuchten Varianten). Die eingefügten Austausche führten dazu, dass aus der konditionalen eine konstitutive Glutaminaseaktivität wurde. Dies bedeutet, dass der katalytische Umsatz am aktiven Zentrum von HisH nicht länger von der Bindung eines Liganden an das aktive Zentrum von HisF abhängt. Mit dem streng konservierten Tyr 138 in HisH ist somit eine entscheidende Aminosäure in der Regulation der funktionellen Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Glutaminase und Synthase aufgefunden worden. Es ist davon auszugehen, dass die Wirkung von Tyr138 auf Wasserstoffbrückenbindungen sowohl mit HisF_K99 aus dem Salzbrücken-Cluster in HisF als auch mit HisH_H178 aus der katalytischen Triade von HisH beruht.

Kapitel 3: Die Charakterisierung der Glutaminase TrpG aus *Thermotoga maritima*

Im zweiten Teilprojekt sollten Gemeinsamkeiten zwischen den Glutaminasen HisH und TrpG analysiert und ein Komplex aus TrpG und HisF generiert werden. Die Voraussetzungen dafür waren die Reinigung und Charakterisierung von wildtypischem TrpG, die in Kapitel 3 beschrieben werden. Im folgenden Kapitel 4 wird die Herstellung und Charakterisierung von TrpG *stretch* Varianten beschrieben. In diesen wurden gezielt Kontaktflächen-Bereiche gegen die entsprechenden Regionen aus HisH ausgetauscht, in Analogie zu den im vorherigen Kapitel 2 beschriebenen HisH *stretch* Varianten.

5.3.1 TrpG, die Glutaminase der Anthranilat-Synthase, aus *Thermotoga maritima*

Die Synthase TrpE und die Glutaminase TrpG, die die Anthranilat-Synthase bilden, liegen in einigen Organismen fusioniert auf einer Polypeptidkette vor (Abbildung 5.26, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium meliloti*, Bae *et al.*, 1989). In *T. maritima* liegen TrpE und TrpG auf getrennten Polypeptidketten. Allerdings ist TrpG hier mit dem nachfolgenden Enzym der Tryptophan-Biosynthese, der Anthranilat-Phosphoribosyl-Transferase (TrpD) fusioniert. Dies ist auch bei *Salmonella thyphimurium* und *E. coli* der Fall (Hwang & Zalkin, 1971, Grieshaber & Bauerle, 1972, Yanofsky *et al.*, 1981). Weiterhin kommt TrpG in Pilzen als Fusionsprotein mit der Indolglycerolphosphat-Synthase (TrpC) vor (*Neurospora crasse*, *Saccharomyces cerevisiae*, Hütter *et al.*, 1986; Nichols *et al.*, 1980; Schechtman & Yanofsky, 1983). Abbildung 5.26 zeigt die genomische Organisation von TrpG und TrpE in verschiedenen Organismen.

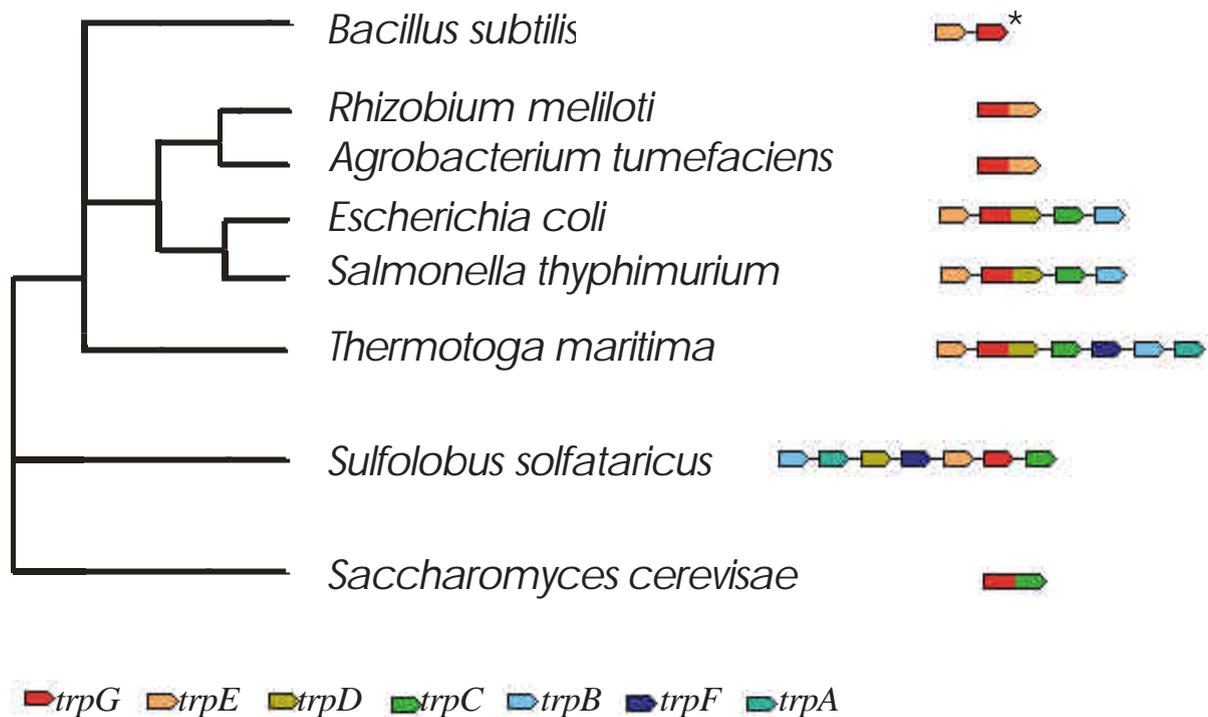


Abbildung 5.26: In verschiedenen Organismen liegt TrpG fusioniert mit TrpE, TrpD, und TrpC vor

Gezeigt ist die genomische Organisation des *trpG*-Gens. Erstellt nach Angaben der Datenbank STRING (<http://string.embl.de>, Stand: 17.05.2005, Eingabe: *trpG*); Bei den Organismen, die ein Tryptophan-Operon mit bekannter Struktur besitzen, ist dieses abgebildet. Zeichenerklärung: * amphibolare Glutaminase, die die Funktion von TrpG und PabA übernimmt,

Zwei funktionale Polypeptide, die gemeinsam eine enzymatische Reaktion katalysieren, liegen in Prokaryoten oft in Operons vor, um eine gemeinsame Regulation zu ermöglichen. Da in Eukaryoten einzelne kodierende Regionen für Gene vorhanden sind, ist die Tendenz zu Fusionsproteinen zu beobachten (Bonner *et al.*, 1965). Dies birgt neben der gemeinsamen Regulation auch die Vorteile einer Kollokalisierung, der Produktion gleicher Mengen an Enzym, sowie der Möglichkeit zu effizienterem Channeling von Intermediaten (Yanofsky, 1984). Als Beispiele sind u.a. die Tryptophan-Synthase (TrpA:TrpB in *E. coli* / Trp5 in *S. cerevisiae*, Zalkin & Yanofsky, 1981) und die Imidazolglycerinphosphat-Synthase (HisH:HisF in *E. coli* / His7 in *S. cerevisiae*, Brill & Fani, 2004) zu nennen.

5.3.2 Klonierung von *trpG* aus *Thermotoga maritima*

TrpG und TrpD aus *T. maritima* liegen auf einer Polypeptidkette. Die einzige zugängliche Trypsinschnittstelle des TrpG-TrpD Fusionsproteins nach K197 führt zum Zerfall der Kette in stabile und aktive TrpG (Aminosäure 1-197) und TrpD (Aminosäure 198-542) Domänen (Ivens, 1998) (Abbildung 5.27).

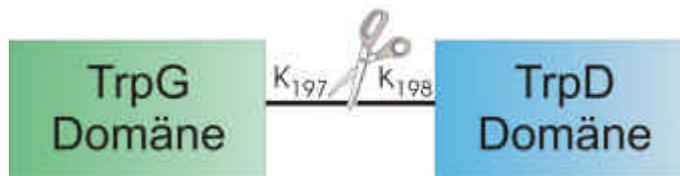


Abbildung 5.27: Das Fusionsprotein aus TrpG und TrpD aus *Thermotoga maritima* lässt sich durch Trypsinverdau in zwei stabile und katalytisch aktive Domänen trennen.

Die Schnittstelle zwischen K197 und K198 liegt in der flexiblen Verbindungssequenz zwischen den beiden Domänen (Ivens, 1998).

Mittels Gelfiltration-Chromatographie konnte gezeigt werden, dass die isolierten monofunktionalen Proteine TrpG und TrpD keinen Komplex ausbilden (Ivens, 1998). Multiple Sequenzalignments der C-terminalen Bereiche von monofunktionalen TrpGs und der N-terminalen Bereiche von monofunktionalen TrpDs aus *S. solfataricus*, *Serratia marcescens* und *Vibrio parahaemolyticus* mit den TrpG-D Fusionsproteinen aus *T. maritima* und *E. coli* zeigt, dass Trypsin genau zwischen den beiden Domänen schneidet (Abbildung 5.28).

	170	180	190	Trypsin	200	210
tm	QFHPESVLTE	EGKRIIKNFL	NIQDIQVK.	..	KV SEETEIDIVS	ALKKLVEFED
ec	QFHPESILTT	QGARLLEQTL	AWAQH.	..	KLEPANTLQP	ILEKLYQAQT
ss	QFHPESVGTS	LGYKILYNFL	NRV		<u>M</u> NINEILKK	LINKSDLEIN
sm	QFHPESILTT	HGARLLEQTL	AWALAK		<u>M</u> QP	ILEKLYRAES
vp	QFHPESIMTT	YGATLLGNAI	EWALEKNNNA		<u>M</u> EA	IINKLYEQQS
	C-Termini von TrpG				N-Termini von TrpD	

Abbildung 5.28: Trypsin schneidet exakt an der postulierten Domänengrenze von TrpG und TrpD

Die Sequenzen von *T. maritima* (tm) und *Escherichia coli* (ec), in denen TrpG und TrpD als Fusionsprotein vorliegen, sind mit den Termini der monofunktionellen Proteine aus *S. solfataricus* (ss), *Serratia marcescens* (sm) und *Vibrio parahaemolyticus* (vp) aligned. Das Start-Methionin von TrpD ist unterstrichen. Die Nummerierung richtet sich nach der Sequenz von *T. maritima*. Die Schere markiert die Trypsin-Schnittstelle in *T. maritima* (nach Ivens, 1998).

Im Weiteren sollte mit der isolierten TrpG-Domäne gearbeitet werden. Zu diesem Zweck wurde der dieser Domäne entsprechende Genbereich (Codon 1-197) mittels PCR amplifiziert, wobei genomische DNA aus *T. maritima* als Templat diente. Es wurden Primer verwendet, welche die Restriktionsschnittstellen NdeI und BamHI, sowie ein STOP Codon nach K197 einfügen. Das Amplifikationsprodukt wurde in den Expressionsvektor pET11c kloniert und die erfolgreiche Klonierung über Sequenzierung mit T7-Primern bestätigt.

5.3.3 Expression von *trpG* und Reinigung des Proteinproduktes

Zur heterologen Expression des *trpG*-Gens wurden BL21 DE3 C(+) Zellen mit dem Konstrukt pET11c-*trpG* transformiert und über Nacht in LB-Medium mit Ampicillin bei 37°C gezogen (4.3.3). Nach dem Aufschluss befanden sich jeweils etwa 50% des gebildeten TrpG-Proteins in der unlöslichen (Abbildung 5.29 „P“) und der löslichen Fraktion (Abbildung 5.29 „C“) des Zellextraktes. Das lösliche Protein wurde zunächst durch Hitzefällung der thermolabilen Wirtsproteine (20min bei 60°C) angereichert (Abbildung 5.29 „H“) und danach durch Anionenaustauscher-Chromatographie (HQ20) zur Homogenität aufgereinigt. Dabei konnten Ausbeuten von etwa 50mg TrpG pro Liter Kulturmedium erreicht und das Protein bis zu 15 mg/ml einkonzentriert werden (Abbildung 5.40).

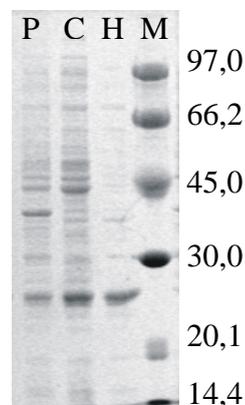


Abbildung 5.29: Herstellung von *tm*TrpG mittels heterologer Genexpression in *E. coli* und Anreicherung mittels Hitzefällung mesophiler Wirtsproteine

TrpG wird zu etwa gleichen Anteilen in der unlöslichen (P) und löslichen (C) Fraktion des Zellextraktes gefunden. Durch die Hitzefällung (H) der Wirtsproteine (20 min, 60°C) findet ein erster Reinigungsschritt statt. M = Markerproteine mit Größenangaben in kDa;

5.3.4 Biophysikalische Charakterisierung von TrpG

Das gereinigte TrpG Protein wurde mittels Circular dichroismus (CD), nativer PAGE und analytischer Gelfiltration charakterisiert. Zudem wurde untersucht, ob es bereits in wildtypischer Form einen nachweisbaren Komplex mit HisF bildet. Da TrpG kein Tryptophan enthält, wurde auf die Aufnahme von Fluoreszenzspektren verzichtet.

Die fern-UV CD-Spektren wiesen rekombinant hergestelltes TrpG als ein gefaltetes Protein mit einem signifikanten Anteil an α -Helices aus (Maximum: 192nm, Nulldurchgang: 203nm). Das ausgeprägte nah-UV CD-Spektrum deutete auf eine wohldefinierte Tertiärstruktur hin (Abbildung 5.30).

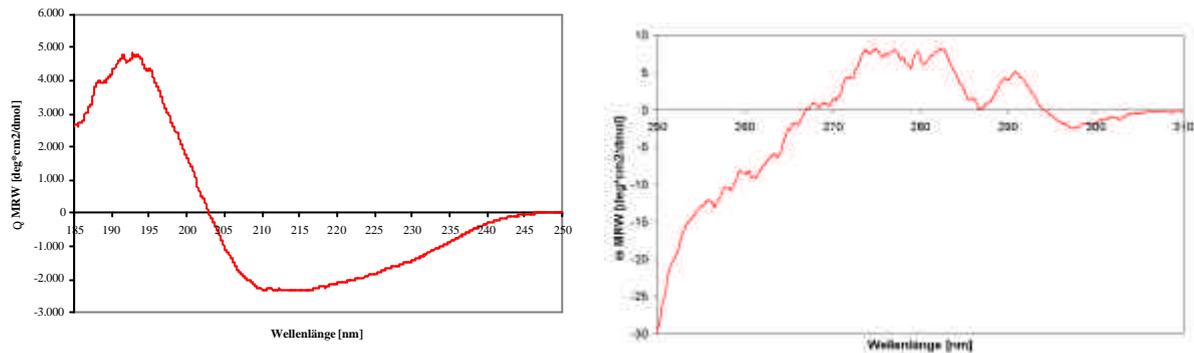


Abbildung 5.30: Die fern- (a) und nah- (b) UV-CD-Spektren belegen für TrpG eine wohldefinierte Sekundär- und Tertiärstruktur

Die Messungen erfolgten bei RT in 10mM KP-Puffer pH 7,5. Für das fern-UV-CD-Spektrum wurden 34 μ M TrpG in einer 0,1cm Küvette eingesetzt. Das gezeigte Spektrum ist das Mittel aus 10 Spektren. Für das nah-UV-CD-Spektrum wurden 742 μ M in einer 0,2cm Küvette verwendet. Das gezeigte Spektrum ist das Mittel aus 5 Spektren.

Die Existenz einer kompakten Struktur wurde durch die Resistenz gegenüber proteolytischem Verdau bestätigt. So waren selbst nach 15h Inkubation mit Trypsin keine Abbaubanden sichtbar (Daten nicht gezeigt).

Die analytische Gelfiltration (Superdex75-Säule) zeigt einen einzigen symmetrischen *peak*, dessen Elutionsvolumen einem apparenten Molekulargewicht von 45,8kDa entspricht. Dies deutet auf eine Dimerisierung von TrpG hin, da das berechnete Molekulargewicht des Monomers bei 22,25kDa liegt (Abbildung 5.31a). Die dimere Struktur von TrpG kann als erster Hinweis darauf interpretiert werden, dass die Anthranilat-Synthase aus *T. maritima* eine ähnliche Quartärstruktur wie das Enzym aus *S. solfataricus* aufweist: TrpE:TrpG-TrpG:TrpE (Knöchel *et al.*, 1999). Dazu passt, dass rekombinant hergestelltes TrpE als Monomer vorliegt (Felix List, persönliche Mitteilung).

Zur Analyse der Komplexbildung wurden Gelfiltrationsläufe eines 3:1 Gemisches von TrpG und HisF durchgeführt. Die beiden Elutions-*peaks* entsprachen denen der Einzelläufe, so dass nicht von einer Interaktion ausgegangen werden kann (Abbildung 5.31b).

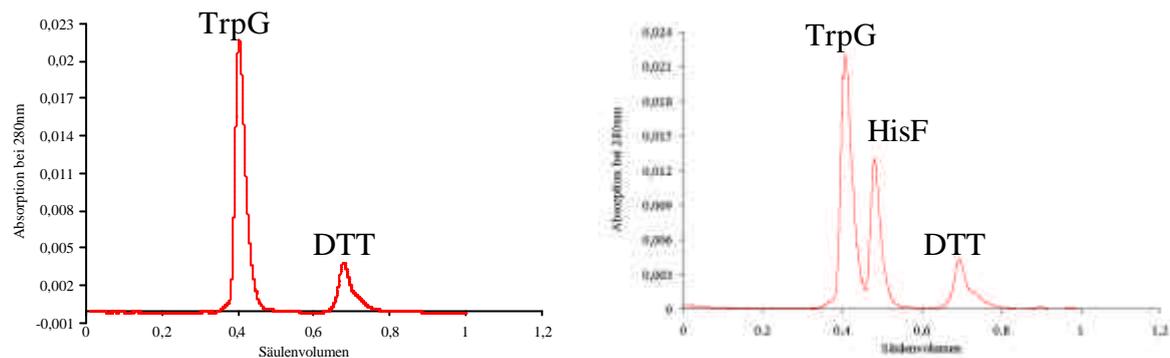


Abbildung 5.31: Analytische Gelfiltration (Superdex 75) weist TrpG als sauberes dimeres Protein aus (a), welches nicht mit HisF interagiert (b)

Die Elution wurde über die Absorption bei 280nm verfolgt, die Flussrate betrug 0,5ml/min in 50mM KP, 300mM KCl, pH 7,5 bei 25°C. Es wurden jeweils etwa 30µM TrpG und 10µM HisF aufgetragen. Die apparenten Molekulargewichte betragen 45kDa für TrpG und 26kDa für HisF. Zusätzlich ist das im Puffer enthaltene DTT als *peak* zu erkennen. Eine mit Proteinen bekannter Größe erstellte Eichgerade der Gelfiltrationssäule ist im Anhang zu finden.

Die native PAGE von TrpG in Gegenwart von HisF erbrachte ebenfalls keinen Hinweis auf eine stabile Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen (Abbildung 5.32). Auch die Untersuchung mittels dem *yeast-2-hybrid* System zeigte keine Anzeichen einer Komplexbildung. Ebenso konnte die Glutaminase-Aktivität von TrpG durch ligandiertes HisF unter Standardbedingungen (4.4.11.3) nicht induziert werden. Somit kann neben einer stabilen auch eine transiente funktionelle Komplexbildung ausgeschlossen werden.

TrpG HisF TrpG
+HisF



Abbildung 5.32: Die native PAGE liefert keinen Hinweis auf Komplexbildung zwischen TrpG und HisF

Nach Mischung im molaren Verhältnis 1:1 von TrpG (pI = 6,68) und HisF (pI = 5,01) finden sich nur die Banden der beiden Einzelproteine finden.

5.3.5 Vorhersage der Tertiärstruktur von TrpG aus *T. maritima* mit SWISS Model

Die Struktur von TrpG aus *T. maritima* ist bislang nicht gelöst worden. Für das rationale Design zur Etablierung der Bindung an HisF wären Informationen zur Sekundär- und Tertiärstruktur jedoch von großem Nutzen.

Um Informationen zur Tertiärstruktur von TrpG aus *T. maritima* zu erhalten, wurde das online verfügbare Tool SWISS Model vom Protein Modelling Server des Biozentrums Basel verwendet (<http://swissmodel.expasy.org>). Hierbei wird auf Basis der Aminosäure-Sequenz nach drei ähnlichen Proteinen gesucht, deren Struktur bekannt ist (Tool: BLAST). Für *tm*TrpG wurden die apo-Struktur von TrpG aus *S. solfataricus* (1qdl-B), sowie die Glutamin- und die Tryptophan-gebundenen TrpG-Struktur aus *S. marcescens* (1i7q-B/D; 1i7s-B/D) verwendet. Nach der Bestimmung der Sequenzidentität zwischen diesen Proteinen und der eingegebenen *tm*TrpG-Sequenz (Tool: SIM), wurde aus den bekannten Strukturen ein Modell für *tm*TrpG generiert (Tool: ProModII). Abschließend wurde eine Energie-Minimierung durchgeführt (Tool: Gromos96) und das Ergebnis in Form eines *pdb files* ausgegeben. Die aus der Tertiärstruktur mit SWISS PDB Viewer ermittelte Sekundärstruktur von *tm*TrpG ist in Abbildung 5.33 und im Anhang zu finden.

```

MKRVIVIDNYDSFVYNIVQYIGVEVPDCEIEVFRNDEITIEEIERKNPTH
-- EEEEE------- HHHHHHHHHH----- EEE----- HHHHHHH--E
IVISPGPGRPEEAGISVDVVRHFSGKVPILGVCLGHQVIGYAFGGKIVHA
EEEE----- HHHH----- EEEEEHHHHHHHHH----- EEEEE
KRILHGKTSKIVHNGKGVFSGVKNPLVATRYHSLVVEEASLPEVLEITAK
--- EEEEEEEEEEE----- EEEEEEEEEEE----- EEEEEEE--
SDDGEIMGLQHKEHPTFGVQFHPESVLTEEGKRIIKNFLNIQDIQVK*
---- EEEEEEE-- EEEEE----- HHHHHHHHHH-----

```

Abbildung 5.33: Aus der Tertiärstrukturvorhersage mit SWISS Model abgeleitete Sekundärstrukturvorhersage für TrpG

H = α -Helix, E = β -Strang, - = Loop

Das Modell der Tertiärstruktur selbst ist in Abbildung 5.34a dargestellt und mit den TrpG-Strukturen, die als *templates* dienten, verglichen (Abbildung 5.34b).

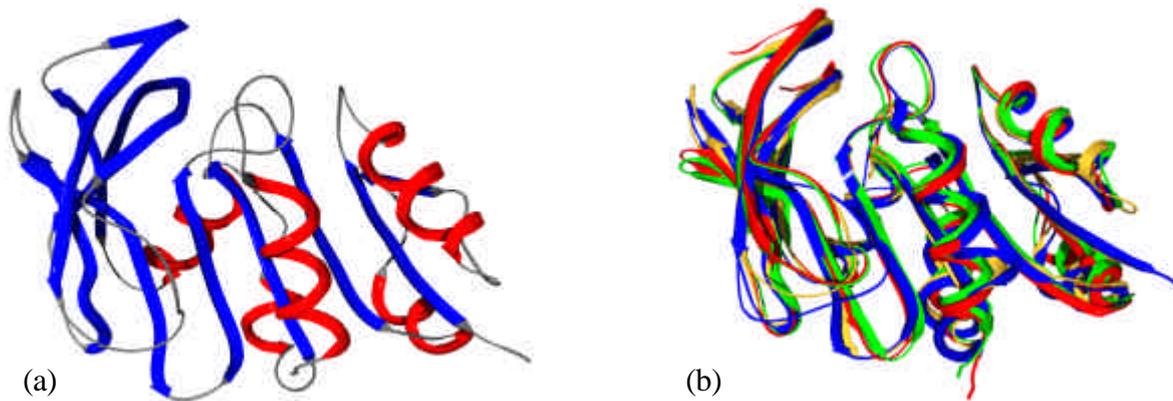


Abbildung 5.34: Ergebnis der Tertiärstrukturvorhersage für *tmTrpG* mit SWISS Model in Ribbondarstellung

Gezeigt ist (a) die für *tmTrpG* berechnete Struktur mit farblicher Markierung der Sekundärstrukturelemente, sowie (b) ihre Superpositionierung mit den von SWISS Model als *templates* ausgewählten TrpG Strukturen aus *S. solfataricus* (1qdl-B in blau) und *S. marcescens* (1i7q-B in rot; 1i7s-B in grün). Die gemodelte *tmTrpG* Struktur ist gelb.

Die für *tmTrpG* gemodelte Struktur lässt sich sehr gut mit der Struktur von HisH zur Deckung bringen (Abbildung 5.35). Die Unterschiede liegen mit einem rmsd von 1,16 Å für die C_α Atome (SWISS PDB Viewer, nach improvement) sogar unterhalb der zwischen *tmTrpG* *ssTrpG* ermittelten Ähnlichkeit, die 2,6 Å beträgt.

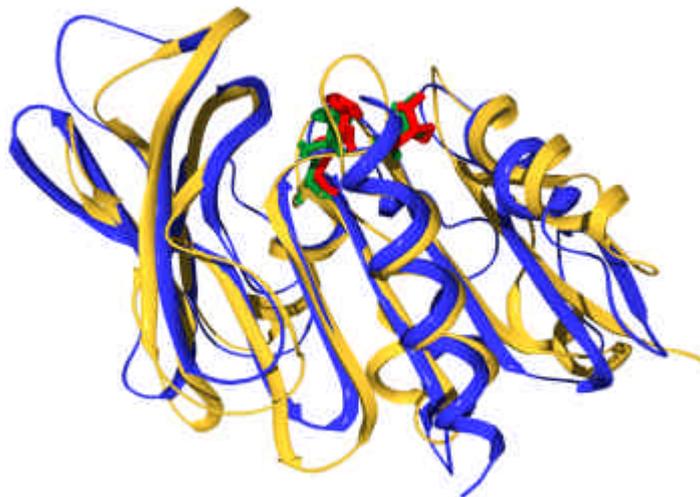


Abbildung 5.35: Die modellierte Struktur von *tmTrpG* ist der Struktur von *tmHisH* sehr ähnlich

Gezeigt ist die mit SWISS PDB Viewer erstellte Superpositionierung der mit SWISS Model vorhergesagten *tmTrpG* Struktur (gelb, mit katalytischer Triade in grün) mit der kristallographisch bestimmten Struktur (1k9v) von *tmHisH* (blau, mit katalytischer Triade in rot). Die rms Abweichung der übereinander gelagerten C_α Atome beträgt 1,16 Å.

Entsprechend stimmen Positionen und Ausrichtung der Sekundärstrukturelemente sehr gut überein (Abbildung 5.35). Wie zu erwarten, liegen die Unterschiede vor allem in den Loop-

Regionen. Während einige Loops gut zur Deckung kommen, sind sowohl an der „Unterseite“ als auch an der Kontaktfläche kleine Abweichungen zu erkennen.

5.3.6 Zusammenfassung

In *T. maritima* ist TrpG mit TrpD fusioniert. Durch Sequenzalignments und einen proteolytischen Verdau konnte die TrpG-Domäne identifiziert werden. Der entsprechende Genabschnitt wurde kloniert, heterolog in *E. coli* exprimiert, mit Ausbeuten von etwa 50mg pro Liter Kulturmedium gereinigt und charakterisiert. TrpG ist ein stabiles, dimeres Protein mit definierter Sekundär- und Tertiärstruktur.

Analytische Gelfiltration und nativen PAGE lieferten keine Hinweise auf eine stabile Komplexbildung von TrpG mit HisF. Da die Glutaminase-Aktivität von TrpG durch ligandiertes HisF nicht induziert wurde, gibt es auch keine Anzeichen für eine transiente Interaktion der beiden Proteine.

Bislang ist die Struktur von TrpG aus *T. maritima* nicht gelöst. Mittels dem online verfügbaren Programm SWISS Model konnten jedoch auf der Basis der bekannten Strukturen von TrpG aus *S. solfataricus* und *S. marcescens* zuverlässige Vorhersagen zur Sekundär- und Tertiärstruktur gemacht werden. Die für *tm*TrpG berechnete Struktur lässt sich sehr gut mit der von *tm*HisH zur Deckung bringen. Die Unterschiede liegen bei einem rmsd von nur 1,16 Å für die überlagerten C_α Atome.

Kapitel 4: Die Evolution der Glutamin-Amidotransferasen (GATasen)

In diesem Kapitel wird die Herstellung und Charakterisierung von TrpG *stretch* Varianten beschrieben. In diesen Varianten, die den HisH *stretch* Varianten aus Kapitel 2 analog sind, sind Sekundärstrukturelemente an der Kontaktfläche durch entsprechende Sequenzabschnitte aus HisH ersetzt. Es sollte untersucht werden, ob diese Varianten in stabiler Form hergestellt werden und zur Komplexbildung mit HisF befähigt sind.

5.4.1 Vergleich der GATasen HisH und TrpG

Die Glutaminasen HisH und TrpG weisen viele Gemeinsamkeiten auf (Tabelle 5.20). Beide sind in die Synthese von Aminosäuren involviert und Bestandteile von Bi-Enzymkomplexen. Sie sind rund 23kDa groß und gehören zur Klasse I der Glutaminasen mit der typischen β/α Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus Cystein, Histidin und Glutamat. Sowohl TrpG, als auch HisH zeigt eine konditionale Glutaminase-Aktivität, d.h. sie sind in isolierter Form ohne ligandierete Synthase inaktiv (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001; Knöchel *et al.*, 1999). Die Superpositionierung der C_{α} Atome der HisH Kristallstruktur und der modellierten TrpG Struktur (SWISS Model) zeigt einen rmsd von lediglich 1,16 Å (Kapitel 3), wobei die Reste der katalytischen Triade nahezu perfekt zur Deckung kommen. HisH und TrpG zeigen einen identischen Charakter der konservierten Aminosäuren der Kontaktfläche mit einem auffällig hohen Anteil aromatischer und polarer Reste (Kapitel 1).

Der entscheidende Unterschied zwischen HisH und TrpG liegt in der jeweils spezifischen Bindung und funktionellen Wechselwirkung mit einer Synthase (HisF bzw. TrpE).

Tabelle 5.20: Vergleich der beiden Glutaminasen HisH und TrpG aus *T. maritima*

	HisH	TrpG
Anzahl an Aminosäuren	201	197
Molekulargewicht [kDa]	23,1	22,3
Stoffwechselweg	Biosynthese der Aminosäure Histidin	Biosynthese der Aminosäure Tryptophan
Faltungstyp	β/α Hydrolase-Faltung	β/α Hydrolase-Faltung
Aktives Zentrum	Katalytische Triade	Katalytische Triade
	Cys84, His178, Glu180	Cys83, His175, Glu177
Substrat	Glutamin	Glutamin
Katalysierte Reaktion	Hydrolyse	Hydrolyse
Bindungspartner	HisF	TrpE

5.4.2 Wahl der zu untersuchenden Aminosäure-*stretches*

In Umkehr zu der in Kapitel 2 beschriebenen Vorgehensweise wurden die Sequenzbereiche (*stretches*) in TrpG, welche b5, b6, b7, b9 und a5 in HisH entsprechen, durch diese ersetzt. Dabei beschränkte sich die Mutagenese nicht auf einzelne *stretches*. Es wurden auch mehrere *stretches* von TrpG gemeinsam gegen die entsprechenden *stretches* aus HisH ausgetauscht. Wie aus Abbildung 5.13 (Kapitel 2) hervorgeht, liegen sämtliche ausgewählte *stretches* in der C-terminalen Hälfte von HisH. Daher wurde zusätzlich eine TrpG_HisH-Chimäre erstellt, welche aus der N-terminalen Hälfte von TrpG und der C-terminalen Hälfte von HisH besteht.

Als Grundlage für den Austausch von Sequenzabschnitten aus TrpG gegen die entsprechende Sequenz aus HisH diente ein indirektes „strukturbasiertes“ Sequenzalignment (s. Anhang), dessen Erstellung in Kapitel 2 beschrieben wurde. Die Konstruktion und Nomenklatur ist an die Sekundärstrukturelemente von HisH angelehnt. So enthält beispielsweise die Variante TrpG_b6 die Aminosäuren aus HisH, die dort β -Strang 6 ausbilden. Es wurde darauf geachtet, Sekundärstrukturelemente als Ganzes zu ‚transplantieren‘, um deren Ausbildung möglichst wenig zu stören. Dies war die Planungsgrundlage für die Herstellung folgender TrpG Varianten mit HisH Sequenzabschnitten:

TrpG_b5:	K96N_I97V*_H99K_A100L_K101R_(ins)S_(ins)R_(ins)R
TrpG_b6:	I103L_L104P*_H105M*_K107W* ^H _T108N* ^H _S109(del)
TrpG_b7:	L126G_V127Y ^H _T129Y* ^H _Y ⁺ 131V*
TrpG_b9:	S151E ^H _D152Y
TrpG_a5:	S ⁺ 175K* ^H _V176S*_L176S ^H _T177(del)_E178K_E179I
TrpG_HisH-Chimäre:	N-terminale Hälfte (ATG-His99) aus TrpG und C-terminale Hälfte (Lys112-STOP) aus HisH

⁺: wildtypischer Rest ist in TrpG streng konserviert

*: wildtypischer Rest ist in HisH streng konserviert

^H: wildtypischer Rest in HisH bildet eine H-Brücke zu HisF aus

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

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

5.4.3 Herstellung der Genkonstrukte

Die gewünschten Austausche wurden über overlap-extension (SOE) PCR (4.2.3) in das *trpG* Gen eingeführt. In einer ersten PCR wurde jeweils ein vektor- oder genspezifischer Primer mit einem Mutationsprimer zum Erhalt der Megaprimer kombiniert. Diese wurden dann mit genspezifischen Primern zum Vollängenprodukt amplifiziert.

Zur Herstellung der Genkonstrukte mit Kombinationen mehrerer Austausche wurde von den Konstrukten, die bereits einfache *stretch* Austausche enthielten, ausgegangen.

Zur Erstellung der TrpG_HisH-Chimäre wurde wie folgt vorgegangen: TrpG besitzt auf Genebene eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *SphI*, die auf Proteinebene einem Schnitt nach His98 entspricht. An äquivalenter Position in HisH wurde eine *SphI* Schnittstelle eingefügt. Dabei wurde versucht, die Aminosäure-Sequenz so wenig wie möglich zu verändern. Dies gelang über die Herstellung von *hisH_K112H_L113A*. Durch einen Verdau des in pET11c klonierten *trpG* mit *NdeI* und *SphI* wurde die N-terminale Hälfte isoliert. Ebenso wurde in pDS kloniertes *hisH_K112H_L113A* mit *SphI* und *BamHI* verdaut, um die C-terminale Hälfte zu erhalten. Um eine Drei-Punkt-Ligation zu umgehen, wurden die beiden Hälften zunächst zum Volllängenprodukt ligiert, welches im Anschluss daran über *NdeI* und *BamHI* in pET11c kloniert wurde.

Für die *in vivo* Untersuchungen mittels *yeast-2-hybrid* (5.4.4) wurden die wildtypischen *hisH*, *hisF* und *trpG* Gene, sowie einige Varianten in entsprechende Vektoren umkloniert (4.2.24.2.10; 4.2.11).

Alle Austausche wurden über Sequenzierung des kompletten Gens bestätigt. Bei den TrpG *stretch* Varianten wurden in einigen Fällen unbeabsichtigte Mutationen beobachtet, die jedoch in keinem Fall zu einer Verschiebung des Leserasters führten.

Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten *trpG*-Konstrukte, sowie sämtliche für die *in vivo* Analyse verwendeten Genkonstrukte mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen aufgeführt. Falls unerwünschte Zufallsmutationen auftraten, sind diese ebenfalls aufgelistet.

(1) wildtypisches TrpG zur Expression

pET 11c *trp G* WT

(*NdeI*/*BamHI*, Aminosäuren 1-197 des bifunktionellen Enzyms TrpG-D)

(1) TrpG *stretch* Konstrukte zur Expression

pET11c *trp G b5*

(*NdeI*/*BamHI*)

pET11c *trp G b6*

(*NdeI*/*BamHI*)

pET11c *trp G b7*

(*NdeI*/*BamHI*)

pET11c *trp G b9*

(*NdeI*/*BamHI*) (G158R)

pET11c *trp G a5*

(*NdeI*/*BamHI*)

pET11c *trp G b5_a5*

(*NdeI*/*BamHI*) (D36G)

pET11c *trp G b5_b6*

(*NdeI*/*BamHI*)

pET11c *trp G b5_b7*

(*NdeI*/*BamHI*) (D36G)

pET11c <i>trp G b5_b9</i>	(NdeI/BamHI) (D36G_G158R)
pET11c <i>trp G b6_b7</i>	(NdeI/BamHI) (L134H)
pET11c <i>trp G b6_b9</i>	(NdeI/BamHI) (G158R_D153N)
pET11c <i>trp G b6_a5</i>	(NdeI/BamHI) (N114D)
pET11c <i>trp G b5_b7_a5</i>	(NdeI/BamHI) (D36G_E137K_E155G)
pET11c <i>trp G b5_b7_b9</i>	(NdeI/BamHI) (D36G_E137K_G158R)
pET11c <i>trp G b5_b9_a5</i>	(NdeI/BamHI) (P165A)
pET11c <i>hisH-trpG Chimäre</i>	(NdeI/BamHI)
pET28a <i>hisH-trpG Chimäre</i>	(NdeI/BamHI, mit N-terminalem His-tag)

(2) Konstrukte für das *yeast-2-hybrid* System

Köder:

pAS 2.1 <i>his F</i>	(NdeI/BamHI)
pGBK T7 <i>p53</i>	(von Uli Rass, Institut für Genetik der Universität zu Köln)

Beute:

pGAD 424 <i>his H</i>	(BamHI/PstI)
pGAD 424 <i>trp G</i>	(EcoRI/BamHI)
pGAD 424 <i>trp G b5</i>	(EcoRI/BamHI)
pGAD 424 <i>trp G b6</i>	(EcoRI/BamHI)
pGAD 424 <i>his H-trp G Chimäre</i>	(EcoRI/BamHI)
pGAD 424 <i>LargeTAntigen</i>	(von Uli Rass, Institut für Genetik der Universität zu Köln)

(3) weitere Konstrukte

pTNA <i>his F</i>	(SphI/BamHI)
pTNA <i>his H</i>	(SphI/HindIII)
pTNA <i>trp G</i>	(SphI/HindIII)
pTNA <i>trp G b6</i>	(SphI/HindIII)

5.4.4 Das *yeast-2-hybrid* System zur Untersuchung der Komplexbildung *in vivo*

Parallel zur Untersuchung der Komplexbildung *in vitro* wurde die Komplexbildung *in vivo* untersucht (4.1.9; 4.1.10). Dazu wurde das *yeast-2-hybrid* System (Fields & Song, 1989) in der Arbeitsgruppe etabliert und an die spezifische Fragestellung des Projektes angepasst.

Es wurden AH109 Zellen verwendet (James *et al.*, 1996), wobei als „Köder“ pAS2.1-*hisF* verwendet wurden. Als „Beute“ dienten die Positivkontrolle pGAD424-*hisH* und die Negativkontrolle pGAD424-*trpG*, da über biochemische Methoden keine Komplexbildung von wildtypischem TrpG mit HisF nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3). Als weitere

Positivkontrolle wurde der Köder pGBKT-*p53* mit der Beute pGADT7-*LargeTAntigen* verwendet, die sehr starke Interaktion im *yeast-2-hybrid* System zeigen (Uli Rass, persönliche Mitteilung). Diese beiden Vektoren, sowie die AH109 Zellen wurden freundlicherweise von Uli Rass (Arbeitsgruppe Kemper, Institut für Genetik, Universität Köln) zur Verfügung gestellt.

Die Transfektion frischer kompetenter Hefezellen erfolgte nach der LiAc-Methode (Ito *et al.*, 1983; Guthrie & Fink, 1991). Alle Zellen zeigten am 2.Tag Wachstum auf Selektionsplatten ohne die Auxotrophiemarker Tryptophan und Leucin (SD-TL), was eine erfolgreiche Transfektion mit den verschiedenen Plasmiden belegt (Abbildung 5.37a). Zusätzlich zeigten Zellen mit pGBKT7-*p53* und pGADT7-*LargeTAntigen* am 3.Tag Wachstum auf Selektionsplatten ohne die Interaktionsmarker Adenin und Histidin (SD-TLA, SD-TLH und SD-TLAH). Die Zellen mit pAS2.1-*hisF* und pGAD424-*hisH* benötigten dafür 1-2 Tage länger (Abbildung 5.37b). Dies bedeutet, dass die Interaktion zwischen HisH und HisF mit dem *yeast-2-hybrid* System *in vivo* nachweisbar ist. Nach etwa 7 Tagen war ein leichter Hintergrund auf den Selektionsplatten zu sehen. Für die Kombination pAS2.1-*hisF* und pGAD424-*trpG* konnte bis zu diesem Zeitpunkt Wachstum nur auf Platten ohne Auxotrophiemarker, nicht aber ohne Interaktionsmarker beobachtet werden. Dies bestätigt die biochemischen Experimente, wonach TrpG keinen Komplex mit HisF ausbildet (Kapitel 3).

Da neben dem Nachweis der Komplexbildung zwischen TrpG *stretch* Varianten diese auch quantifiziert werden sollten, wurde zusätzlich der auf einer von β -Galaktosidase katalysierten Farbreaktion beruhende CPRG-Assay durchgeführt (Routledge & Sumpter, 1997; Imhof *et al.*, 2000). Wiederum funktionierten nach Anpassung der Bedingungen die Positivkontrollen mit *p53/LargeTAntigen* und *hisF/hisH* (4.1.10). Nach Zugabe von 80 μ g des Substrates CPRG und 1-stündiger Inkubation bei 37°C war der Farbumschlag von gelb nach dunkelrot abgeschlossen. Im *hisF/trpG*-System zeigte sich, wie erwartet, auch nach O/N-Inkubation keine Farbreaktion (Abbildung 5.36).

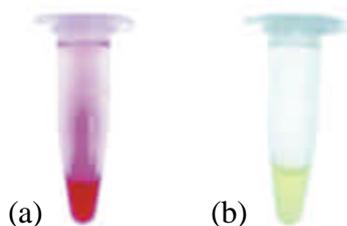


Abbildung 5.36: TrpG zeigt im CPRG-Assay keine Interaktion mit HisF

Hefezellen wurden mit (a) *hisH* und *hisF* als Positivkontrolle sowie (b) *trpG* und *hisF* zum Test auf Interaktion transfiziert. Der Überstand der lysierten Zellen wurde mit 80 μ g CPRG versetzt und 1h bei 37°C inkubiert. Der rote Farbumschlag in (a) zeigt eine Interaktion zwischen HisF und HisH an, während die unveränderte gelbe Färbung in (b) darauf hindeutet, dass HisF und TrpG keinen Komplex bilden.

Nach der Etablierung des Systems für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Protein-Protein Interaktionen mit HisF wurden die Varianten *trpG_b5*, *trpG_b6*, sowie die *trpG_hisH*-

Chimäre getestet. Über Wachstum auf Platten ohne die Auxotrophiemarker Tryptophan und Leucin konnte eine erfolgreiche Transfektion nachgewiesen werden (Abbildung 5.37a). Jedoch wurde kein Wachstum auf Platten ohne Interaktionsmarker Adenin und Histidin und somit keine Interaktion mit *hisF* beobachtet (Abbildung 5.37b). Dieses Ergebnis bestätigte sich im CPRG-Assay.

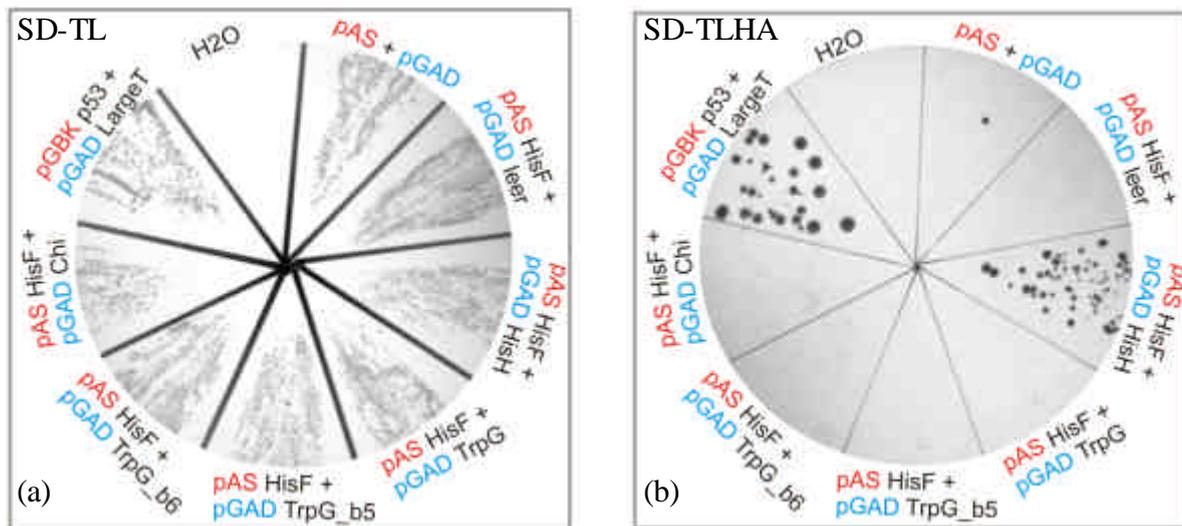


Abbildung 5.37: Die Varianten TrpG_b5, TrpG_b6, sowie die HisH_TrpG-Chimäre interagieren *in vivo* nicht mit HisF

Das Wachstum auf Platten ohne die Auxotrophiemarker Tryptophan und Leucin (SD-TL) belegt eine erfolgreiche Transfektion (a). Während die Positivkontrollen p53 und LargeT-Antigen, sowie HisH und HisF wechselwirken, ist für die Varianten TrpG_b5, TrpG_b6 und die TrpG_HisH-Chimäre mit HisF kein Wachstum auf Platten ohne die Interaktionsmarker Adenin und Histidin (SD-TLHA) zu beobachten (b).

Abkürzungen: Chi = TrpG_HisH-Chimäre, LargeT = LargeT-Antigen

Dies bedeutet, dass das *yeast-2-hybrid* System erfolgreich etabliert wurde, sich jedoch für keine der bisher analysierten TrpG-Varianten eine Komplexbildung *in vivo* mit HisF nachweisen ließ. Daher sollten die Varianten heterolog exprimiert und *in vitro* bezüglich einer Komplexbildung mit HisF analysiert werden. Zudem kann so ein biochemischer Vergleich mit der Glutaminase HisH durchgeführt werden.

5.4.5 Heterologe Genexpression der *trpG*-Varianten und Reinigung der Proteinprodukte

Die *trpG stretch* Varianten wurden zunächst unter den Bedingungen, die für das wildtypische Gen gewählt wurden (siehe Kapitel 2) heterolog in *E. coli* exprimiert. Da in vielen Fällen jedoch keine zufrieden stellende Expression beobachtet werden konnte, wurden die Wachstumsbedingungen variiert (4.3.3). Dabei wurden die Temperaturen von 18°C-37°C und die Expressionszeiten von 4h bis O/N gewählt. Es wurden BL21 (DE3) sowie BL21 (DE3) C+ RIPL Zellen getestet. In allen Fällen wurde bei Verwendung von BL21 (DE3) C(+) RIPL Zellen eine größere Menge an Protein erhalten, vermutlich weil *trpG* aus *T. maritima* in *E. coli* selten verwendete Codone enthält. Weiterhin wurde über die Zugabe von 10mM Glucose als

Energielieferant für ATP-abhängige Chaperone, 0,57% Glycerin (87%) zur Stabilisierung der Faltung, 10-50mM KP-Puffer pH 7,0 zur pH-Konstanthaltung des Mediums, sowie bis zu 500mM Glutamin zur Stabilisierung durch Substratbindung versucht, den Anteil löslichen Proteins zu erhöhen. So gelang es, die Menge und vor allem den löslichen Anteil der TrpG *stretch* Varianten deutlich zu erhöhen. Den größten Effekt zeigt die Variation der Expressionstemperatur (Tabelle 5.21).

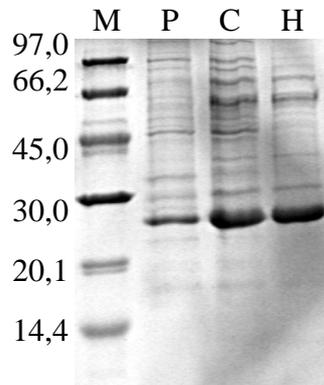


Abbildung 5.38: Herstellung von TrpG_b7 mittels heterologer Genexpression in *E. coli* und Anreicherung mittels Hitzefällung mesophiler Wirtsproteine

Dargestellt sind die unlösliche Fraktion (Pellet P) und die lösliche (crude extract C) Fraktion des Zellextraktes mit dem durch heterologe Genexpression hergestelltem Protein. Darüber hinaus ist die Reinigung durch Hitzefällung (Hitzeschritt H) abgebildet. M = Markerproteine mit Größenangaben in kDa;

Die Reinigung erfolgte analog zum wildtypischen TrpG mittels Hitzeschritt (i.d.R. 60°C, 20min), Ammonium-Sulfat-Fällung bei 50%iger Sättigung und, wenn nötig, Anionenaustauscher-Chromatographie (HQ20). Die Reinigung über Säulenchromatographie gelang aus bislang unverständlichen Gründen nicht für alle Varianten. Es ist nicht auszuschließen, dass die Veränderungen an der Oberfläche von TrpG die Bindungsfähigkeit an das HQ20-Säulenmaterial beeinträchtigen. So konnte z.B. für TrpG_b6 unter keiner Bedingung eine Bindung an die HQ20 Säule beobachtet werden. Die Ausbeuten pro Liter Kulturmedium lagen zwischen 28 und 143mg Protein bei Konzentrationen von 3,2-19,4mg/ml (Tabelle 5.21.).

Die TrpG_HisH-Chimäre war nach heterologer Expression in *E. coli* nahezu vollständig in der unlöslichen Fraktion des Zellextraktes zu finden (Abbildung 5.39). Dies ließ sich auch durch Variation der Wachstumsbedingungen (z.B. Expressionstemperatur zwischen 18°C und 37°C) nicht ändern. Auch verschiedenste Rückfaltungsversuche (nach Protokollen in Lilie *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 1992, 1996) führten nicht zu löslichem Protein.

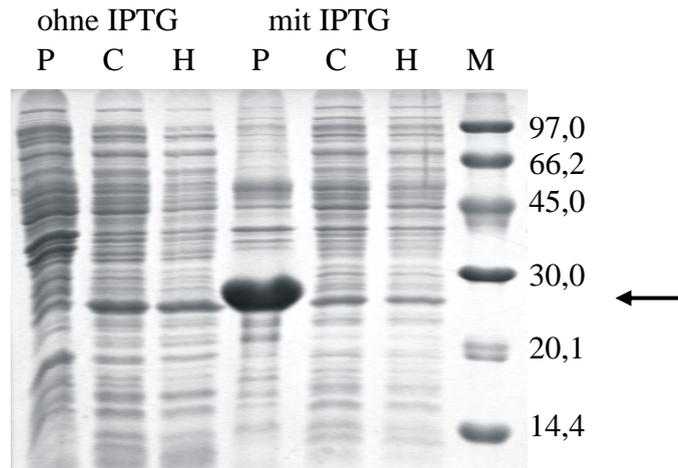


Abbildung 5.39: Die TrpG_HisH Chimäre konnte nicht löslich exprimiert werden

Nach Induktion durch IPTG ist eine große Menge der TrpG_HisH-Chimäre (Pfeil) in der unlöslichen Fraktion des Zellextraktes (Pellet P) vorhanden. Auch durch Variation der Expressionsbedingungen oder Rückfaltung wurde kein lösliches (crude extract C) oder gar hitzestabiles (H) Protein erhalten. M = Markerproteine mit Größenangaben in kDa;

Tabelle 5.21: Expressionstemperatur, Hitzeschritt und Ausbeute bei der Reinigung der TrpG stretch Varianten

Variante	Expressionstemperatur [°C]	Hitzeschritt [°C / min]	Ausbeute [mg/l Kulturmedium]	Konzentration des gelagerten Proteins [mg/ml]
TrpG_b5	37	60 / 20	63	19
TrpG_b6	37	60 / 20	86	18
TrpG_b7	37	60 / 20	56	19
TrpG_b9	22	60 / 20	143	14
TrpG_a5	37	60 / 20	73	9
TrpG_a5_b5	37	60 / 20	51	12
TrpG_a5_b6	37	60 / 20	127	10
TrpG_b5_b7	37	50 / 10	129	12
TrpG_b5_b9	22	60 / 10	42	11
TrpG_b6_b9	37	60 / 20	32	3
TrpG_b6_b7	37	50 / 10	98	10
TrpG_a5_b5_b7	37	50 / 10	62	9
TrpG_a5_b5_b9	37	-	28	6
TrpG_b5_b7_b9	22	60 / 20	113	15
TrpG_HisH- Chimäre	-	-	-	-

Alle TrpG *stretch* Varianten waren sehr sauber (Abbildung 5.40). Sie wurden in flüssigen Stickstoff eingetropfen und bei -80°C gelagert.

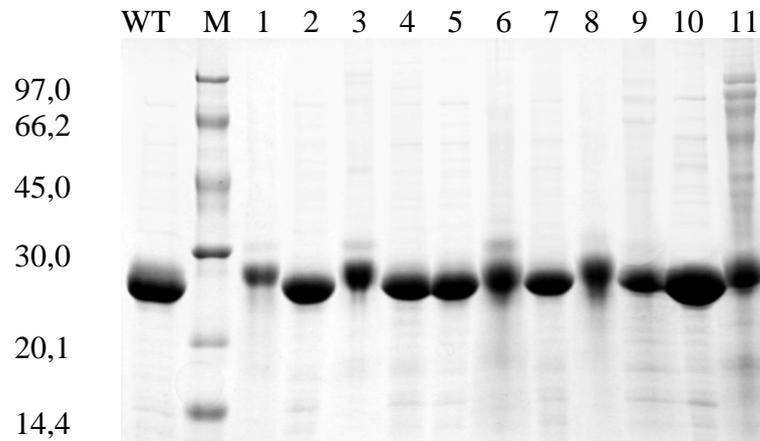


Abbildung 5.40: Nach der Reinigung lagen TrpG_WT und Variante als lösliche, reine und hochkonzentrierte Proteine vor

Dargestellt ist jeweils das einkonzentrierte Protein vor dem Eintropfen in flüssigen Stickstoff. Teilweise wurden 1:10 Verdünnungen aufgetragen, um eine Überladung des Geles zu verhindern. WT = TrpG_WT, 1 = TrpG_b5, 2 = TrpG_b6, 3 = TrpG_b7, 4 = TrpG_b9, 5 = TrpG_a5, 6 = TrpG_b5_a5, 7 = TrpG_b6_b7, 8 = TrpG_b6_a5, 9 = TrpG_b6b7, 10 = TrpG_b5_b9_a5, 11 = TrpG_b5_b7_b9, M = Markerproteine mit Größenangaben in kDa;

5.4.6 Strukturelle Charakterisierung der TrpG *stretch* Varianten

Sämtliche TrpG *stretch* Varianten wurden mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie und analytischer Gelfiltration mit dem wildtypischen Protein verglichen. Zusätzlich wurde eine limitierte Proteolyse mit Trypsin zur Abschätzung der Stabilität durchgeführt.

5.4.6.1 Native PAGE zur Untersuchung der Homogenität

Durch die eingeführten Austauschungen weisen einige TrpG Varianten Veränderungen im pI auf. Die mittels EMBL pI wrapper (<http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>) berechneten pI-Werte sind in Tabelle 5.25 und im Anhang aufgeführt. Dementsprechend ist in der nativen PAGE z.T. ein unterschiedliches Laufverhalten zu beobachten. Alle Varianten treten jedoch als einzelne, definierte Bande auf, was darauf hindeutet, dass es sich jeweils um eine strukturell einheitliche Spezies handelt (Abbildung 5.42).

5.4.6.2 Spektroskopische Untersuchung der Sekundär- und Tertiärstruktur

Wildtypisches TrpG enthält kein Tryptophan. In TrpG_b6 ist jedoch Trp123 aus HisH vorhanden. Daher wurden von TrpG_b6 Fluoreszenzemissions-Spektren nach Anregung bei 295nm aufgenommen (4.4.8). Das Maximum des Spektrums war im Vergleich zu wildtypischem HisH um 7nm verkürzt (337nm statt 344nm). Dies bedeutet, dass das neu

eingeführte Trp zu einem wesentlichen Teil vom Lösungsmittel abgeschirmt ist und TrpG₆ somit eine definierte Tertiärstruktur besitzt.

Zudem wurden für TrpG_{b6} nah- und fern-UV CD-Spektren aufgenommen und mit denen von wildtypischem TrpG verglichen. Die Spektren der beiden Proteine sind sehr ähnlich (Abbildung 5.41). Dies bedeutet, dass der Einbau von *stretch* b6 aus HisH, der Austausch von 6 teilweise streng konservierten Aminosäuren, keinen messbaren Einfluss auf die Faltung von TrpG hat.

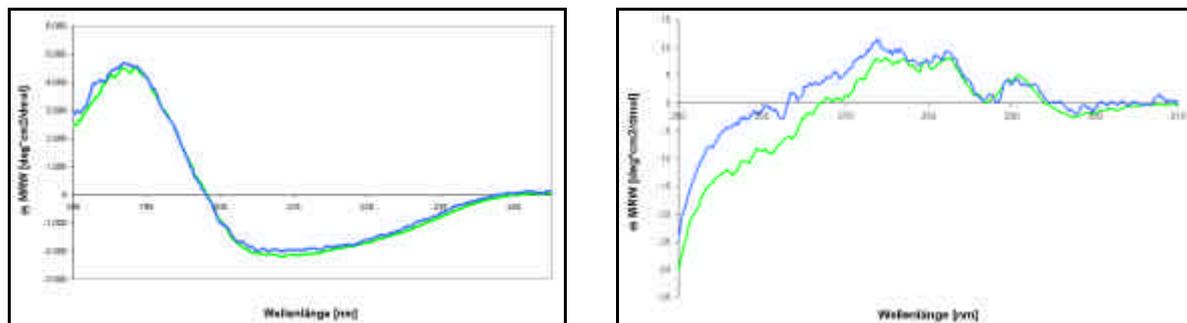


Abbildung 5.41: Der Austausch von b-Strang 6 aus TrpG gegen b-Strang 6 aus HisH führt zu keiner messbaren Änderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur

Gezeigt sind die nah- und fern-UV-CD-Spektren von TrpG_{WT} (grün) und TrpG_{b6} (blau) bei 25°C in 10mM KP-Puffer mit pH 7,5 in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 0,1cm. Es wurde über 10 Messungen gemittelt.

5.4.6.3 Bestimmung des Oligomerisierungszustandes durch analytische Gelfiltration

Wildtypisches TrpG eluiert bei der analytischen Gelfiltration als Dimer (Tabelle 5.22), ebenso die Varianten TrpG_{b6} und TrpG_{b6_b9} (Tabelle 5.22). Im Unterschied dazu ist bei der Mehrheit der TrpG Varianten ein gewisser Anteil an monomerem Protein nachweisbar. So liegen TrpG_{b7}, TrpG_{a5}, TrpG_{b6_a5} und TrpG_{b5_b9_a5} zu etwa $\frac{2}{3}$ als Monomere vor und zu $\frac{1}{3}$ als Dimere. Dagegen eluiert ein wesentlicher Anteil von TrpG_{b9} und TrpG_{b5b7b9} mit einem Molekulargewicht, das zwischen dem Dimer und dem Trimer liegt. Es fällt auf, dass die Kombination mehrerer *stretch*-Austausche die Tendenz zur Monomerisierung erhöht. So liegt TrpG_{b5} zu einem großen Teil (97%) als Aggregat vor (Elution im Ausschlussvolumen), während TrpG_{b5_a5} zur Hälfte und TrpG_{b5_b9_a5} sogar zu $\frac{2}{3}$ als Monomer eluiert. Dies bedeutet, dass sich die TrpG-Varianten tendenziell dem Oligomerisierungszustand von HisH annähern, welches generell als Monomer vorliegt (Kapitel 2).

Tabelle 5.22: Oligomerisierungszustand der TrpG *stretch* Varianten

Gezeigt sind die Ergebnisse der analytischen Gelfiltration auf einer kalibrierten Superdex75 Säule (Amersham-Pharmacia). Die Elution erfolgte bei RT mit 0.5 ml/min in 50 mM KP-Puffer, pH 7.5, 300 mM KCl. Das berechnete Molekulargewicht für monomeres TrpG ist 22,25kDa. Entsprechend ist ein TrpG-Dimer bei 44,5kDa zu erwarten, ein Trimer bei 66,8kDa. Das berechnete Molekulargewicht für monomeres HisH beträgt 23,1kDa. * = Der entsprechende peak lag im Ausschlussvolumen, welches für die verwendete Superdex75 Säule bei etwa 80kDa liegt. Das bedeutet, dass das apparente Molekulargewicht deutlich größer als 80kDa ist und das Protein somit als Aggregat vorliegt.

	Protein	Vol _{ret} [ml]	Anteil [%]	MW [kDa] apparent	Oligomerisierungs- zustand
WT	HisH WT	14,70	100	16,2	Monomer
	TrpG WT	12,72	100	45,3	Dimer
stretch Varianten	TrpG_b5	13,82	3	25,6	Monomer
		9,44	97	> 80kDa*	Aggregat
	TrpG_b6		100	45,1	Dimer
	TrpG_b7	14,36	68	19,3	Monomer
		12,80	32	43,4	Dimer
	TrpG_b9	14,61	5	16,9	Monomer
		12,45	95	52,1	Dimer-Trimer
	TrpG_a5	14,32	62	19,7	Monomer
		12,74	39	44,8	Dimer
	TrpG_b5a5	14,32	54	19,7	Monomer
		12,53	46	50,0	Dimer-Trimer
	TrpG_b6b7	14,41	4	18,8	Monomer
		12,74	96	44,8	Dimer
	TrpG_b6b9	12,74	100	44,8	Dimer
TrpG_b6a5	14,56	67	17,4	Monomer	
	12,72	33	45,3	Dimer	
TrpG-b5b7b9	14,25	1	20,4	Monomer	
	12,47	99	51,5	Dimer-Trimer	
TrpG_b5b9a5	14,24	64	20,5	Monomer	
	12,75	36	44,6	Dimer	

5.4.6.4 Limitierte Proteolyse zur Untersuchung der Stabilität

Limitierte Proteolyse ist eine gut geeignete Methode, um die Stabilität und die Flexibilität von Proteinen zu untersuchen. Die TrpG *stretch* Varianten wurden mit Trypsin gemischt, welches C-terminal der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin schneidet (4.4.6). Selbst nach Inkubation bei RT O/N ließ sich über SDS-PAGE für keine der Varianten proteolytischer Abbau nachweisen. Dies gilt auch für TrpG_b5, in die ein Lysin und drei Arginine eingefügt wurden (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass die eingefügten *stretches* sehr gut in die Tertiärstruktur integriert wurden und es sich bei allen Varianten um kompakte und stabile Proteine handelt.

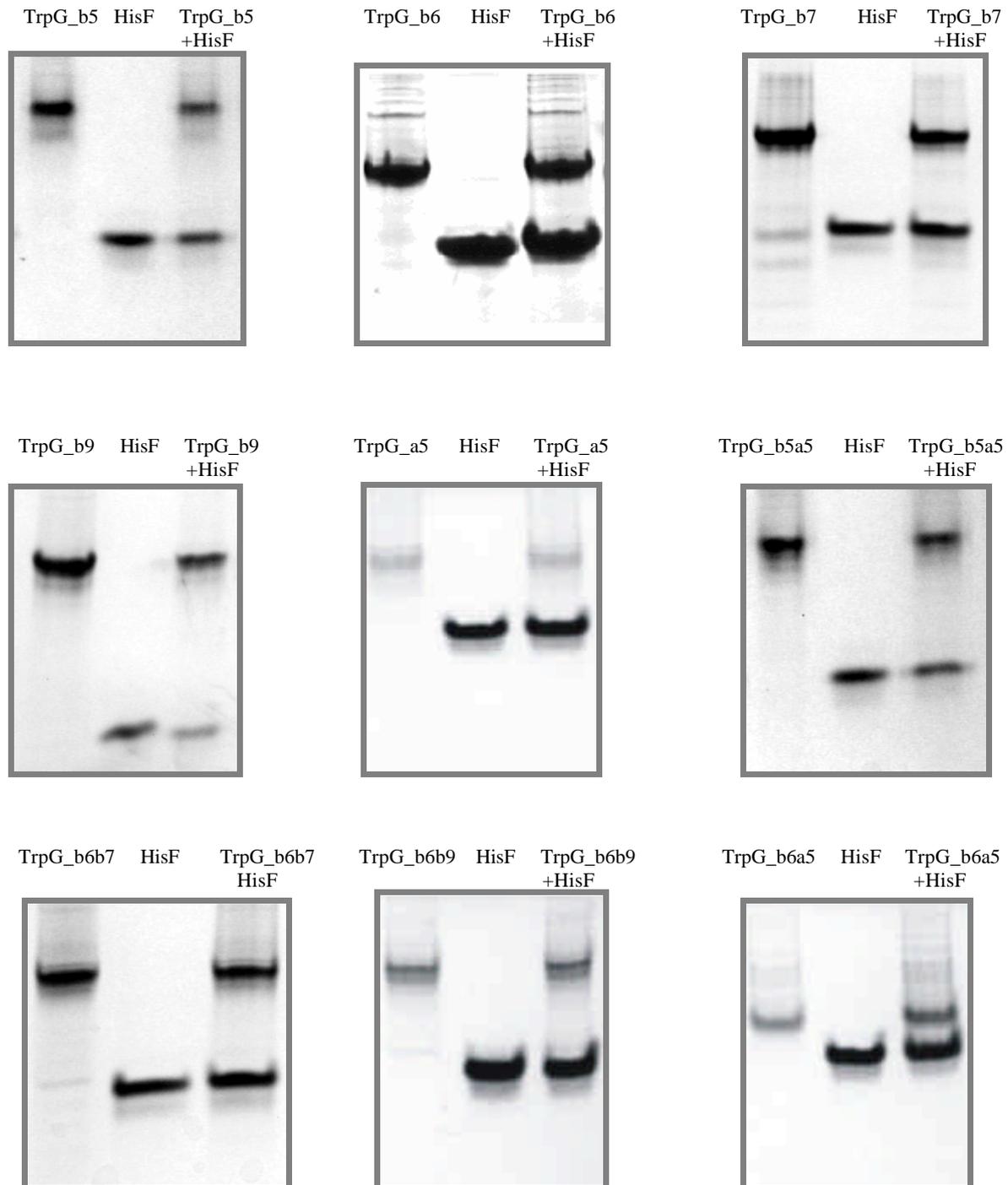
5.4.7 Untersuchung auf stabile Interaktion mit HisF

Alle TrpG Varianten wurden mittels nativer PAGE und analytischer Gelfiltration auf eine mögliche Interaktion mit HisF untersucht. Zusätzlich wurde die Interaktion von TrpG_b6 mit HisF mittels Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie getestet.

In der nativen PAGE wurden die jeweilige die TrpG-Variante und HisF einzeln und im 1:1 Gemisch analysiert. Die aufgetragenen Proteine werden nach Größe und Eigenladung (d. h.

entsprechend ihrem pI-Wert) getrennt. HisF besitzt einen berechneten pI-Wert von 5,01, die TrpG Varianten zwischen 6,00 und 8,72. Bei einer Interaktion zwischen zwei Proteinen wäre statt zweier Einzelbanden eine gemeinsame Bande zu erwarten. Als Positivkontrolle diente HisH (Abbildung 5.42), als Negativkontrolle wurde TrpG_WT verwendet, welches keine Anzeichen auf Interaktion mit HisF zeigt (Abbildung 5.32).

Weder bei TrpG Varianten mit einem ausgetauschten *stretch*, noch bei Kombinationen von bis zu drei *stretches* konnte ein Hinweis auf stabile Interaktion mit HisF_WT gefunden werden (Abbildung 5.42).



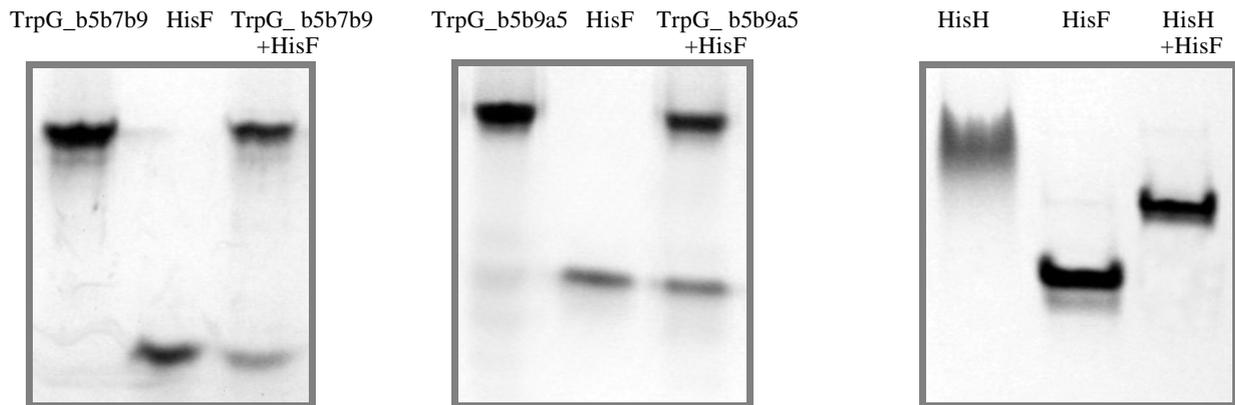


Abbildung 5.42: Native PAGE liefert keinen Hinweis auf eine Komplexbildung zwischen TrpG *stretch* Varianten und HisF

Die TrpG-Variante und HisF wurden jeweils einzeln und nach Mischung in einem molaren Verhältnis von 1:1 aufgetragen. Nur im Falle der Positivkontrolle HisH zeigte sich nach Mischung eine neue Bande, die dem HisH:HisF Komplex entspricht (Beismann-Driemeyer, 2001).

Weiterhin wurden zur Analyse einer Komplexbildung der TrpG-Varianten mit HisF Gemische beider Proteine (im molaren Verhältnis 1:3, 3:1 und 1:1) mittels analytischer Gelfiltration untersucht. Um TrpG-Dimere (Tabelle 5.23) zweifelsfrei von möglichen TrpG:HisF Komplexen unterscheiden zu können, wurden die Elutionsfraktionen über SDS-PAGE analysiert. Die drei Varianten TrpG_b9, TrpG_b5a5 und TrpG_b5b7b9, die in isolierter Form zur Bildung von größeren Oligomeren neigen (Tabelle 5.23), wurden nicht untersucht. Bei keiner der untersuchten TrpG Varianten zeigte sich eine Veränderung im Laufverhalten in Anwesenheit von HisF (Tabelle 5.23). Es liegen somit keine Hinweise auf Interaktion vor.

Tabelle 5.23: Analytische Gelfiltration liefert keinen Hinweis auf eine Komplexbildung zwischen den TrpG *stretch* Varianten und HisF

Die TrpG-Varianten wurden in isolierter Form und nach Mischung mit HisF in einem Verhältnis von 1:1 auf eine Superdex75 Säule aufgetragen und bei einer Flussrate von 0.5ml/min in 50mM KP-Puffer, pH 7.5, 300mM KCl eluiert. Das berechnete Molekulargewicht für HisF beträgt 27,7kDa, für monomeres TrpG 22,25kDa, für TrpG-Dimere 44,5kDa.

Protein	Vol _{ret} [ml]	MW [kDa] apparent	Protein	Hinweise auf Interaktion ?
HisF WT	13,73	26,8	HisF	-
TrpG WT	12,72	45,3	TrpG Dimer	-
TrpG_b5 + HisF	13,72	26,9	Aggregat	nein
	9,39	25,5	HisF	
TrpG_b6 + HisF	13,78	26,1	HisF	nein
	12,71	45,5	TrpG Dimer	
TrpG_b7 + HisF	14,29	20,0	TrpG Monomer	nein

	13,79 12,84	25,9 42,5	HisF TrpG Dimer	
TrpG_a5 + HisF	14,30 13,86 12,79	19,9 25,0 43,6	TrpG Monomer HisF TrpG Dimer	nein
TrpG_b6b7 + HisF	13,78 12,81	26,1 43,2	HisF TrpG Dimer	nein
TrpG_b6b9 + HisF	13,76 12,75	26,4 44,6	HisF TrpG Dimer	nein
TrpG_b6a5 + HisF	14,33 13,78 12,73	19,6 26,1 45,0	TrpG Monomer HisF TrpG Dimer	nein
TrpG_b5b9a5 + HisF	14,28 13,75 12,72	20,1 26,5 45,3	TrpG Monomer HisF TrpG Dimer	nein

TrpG_b6, welches das Trp123 aus HisH enthält, wurde analog zu HisH (Kapitel 2) über Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie auf Interaktion mit HisF untersucht. Da sich Trp123 an der Kontaktfläche befindet, wird es bei Komplexbildung mit Tryptophan-freiem HisF vom Lösungsmittel abgeschirmt, was zu einer Erniedrigung des Emissionsmaximums von 344nm auf 323nm führt (Häger, 2001). Die Zugabe von Tryptophan-freiem HisF zu TrpG_b6 führt jedoch zu keiner Änderung des bei 295nm angeregten Emissionsspektrums und liefert somit keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen HisF und TrpG_b6 (Abbildung 5.43).

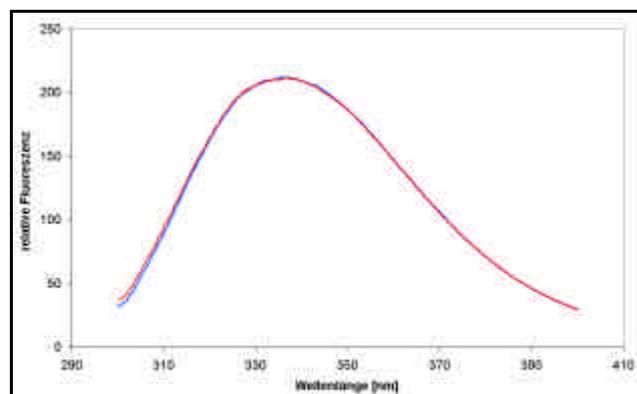


Abbildung 5.43: Fluoreszenzspektroskopie liefert keinen Hinweis auf eine Komplexbildung zwischen TrpG_b6 und HisF

Das einzige Tryptophan in TrpG_b6 entspricht W123 aus HisH. Gezeigt sind Fluoreszenzemissions-Spektren (Anregung bei 295nm) von 10µM TrpG_b6 in isolierter Form (blau) und nach Mischung mit einer äquimolaren Menge an Trp-freiem HisF, HisF_W156F, (rot). Die Messung wurden in 10mM KP-Puffer, pH 7,5 bei 25°C durchgeführt.

5.4.8 Untersuchung auf funktionelle Interaktion mit HisF

Neben den Untersuchungen auf stabile Komplexbildung wurde über enzymkinetische Messungen für einige TrpG-Varianten (TrpG_b6, _b7, _b9) die Bildung eines transienten Komplexes mit HisF untersucht.

HisH_WT und TrpG_WT sind nicht in der Lage, Glutamin ohne Bindung an ihre ligandierete Synthase zu hydrolysieren und werden daher als konditionale Glutaminasen bezeichnet (Knöchel et al., 1999; Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Durch Bindung des Substrates PRFAR (bzw. des Substratanalogons ProFAR oder das Produkt ImGP) an HisF wird jedoch im Komplex die Glutamin-Hydrolyse durch HisH induziert (4.4.11.3.). Es wurde untersucht, ob mit ProFAR ligandiertes HisF die Glutamin-Hydrolyse der getesteten TrpG-Varianten induzieren kann.

Die TrpG Varianten b6 und b9 hatten wie der TrpG_WT weder in isoliertem Zustand noch in Anwesenheit von ligandiertem HisF messbare Glutaminase-Aktivität. Dagegen zeigte sich, dass TrpG_b7 bereits in Abwesenheit von HisF zur Hydrolyse von Glutamin befähigt ist und diese Aktivität durch die Zugabe von HisF und ProFAR nicht weiter gesteigert wird. Die Experimente liefern somit keinen Hinweis auf eine funktionelle Interaktion zwischen TrpG_b7 und HisF. Sie belegen jedoch, dass die konditionale Glutaminase TrpG durch den Austausch des wildtypischen β -Stranges 7 gegen den entsprechenden Strang aus HisH in eine konstitutive Glutaminase umgewandelt wurde (Abbildung 5.44). Dies lässt den Schluss zu, dass der *stretch* b7 von TrpG eine oder mehrere Aminosäuren enthält, welche im wildtypischen TrpG-Protein die unkontrollierte Glutamin-Hydrolyse verhindern.

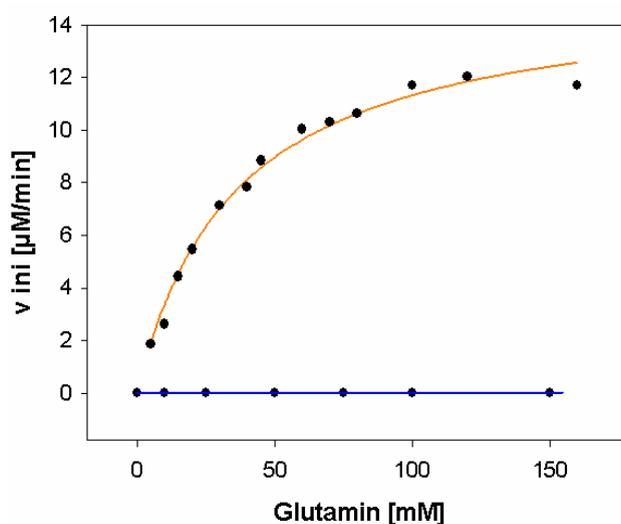


Abbildung 5.44: TrpG_b7 ist im Gegensatz zu wildtypischem TrpG eine konstitutive Glutaminase

Zur Messung der Glutaminaseaktivität in 50mM Tris Acetat pH8,5 wurden jeweils TrpG_b7 (orange) bzw. TrpG (blau) in Abwesenheit von HisF und ProFAR eingesetzt. Die Analyse der gezeigten Sättigungskurve von TrpG_b7 ergab mit einem hyperbolischen Fit ergab für TrpG_b7 einen K_M^{Gln} von 36mM und einen k_{cat} -Wert von $1,5\text{min}^{-1}$.

Interessanterweise zeigt HisH_b7 ebenfalls eine konstitutive Glutaminase-Aktivität (Kapitel 2). Im Unterschied zu TrpG_b7 ist in HisH_b7 die Anwesenheit von HisF erforderlich, an das jedoch kein Ligand gebunden sein muss (Tabelle 5.24). Dies bedeutet, dass in beiden Glutaminasen Aminosäuren in β -Strang 7 den „molekularen Schalter“ zur Regulation der

Glutamin-Hydrolyse bilden. Dies wäre ein weiterer deutlicher Hinweis auf die gemeinsame Evolution von HisH und TrpG.

In HisH_b7 reicht der Austausch des konservierten Tyrosins an Position 138 aus, um die Regulation der Glutaminase aufzuheben (Tabelle 5.24). In TrpG befindet sich im ersetzten *stretch* b7 mit Tyr 131 lediglich ein streng konservierter Rest. Der Austausch von Tyr 131 wird zeigen, ob auch in TrpG ein einzelner Rest eine Schlüsselposition in der Regulation der Glutaminase-Aktivität einnimmt.

Tabelle 5.24: Der „molekulare Schalter“ zur Regulation der Glutaminase-Aktivitäten von TrpG und HisH liegt jeweils in b-Strang 7

Schematischer Überblick über die stimulierte und unstimulierte Glutaminase-Aktivität von wildtypischem HisH und TrpG, sowie der Varianten HisH_b7 und TrpG_b7.

Glutaminase-Aktivität	HisH_WT	HisH_b7	TrpG_WT	TrpG_b7
in isolierter Form	nein	nein	nein	ja
mit nicht-ligandiertem HisF	nein	ja	nein	ja
mit ProFAR- ligandiertem HisF	ja	ja	nein	ja

Zusätzlich wurde die Glutamin-abhängige ImGP-Synthase Reaktion von HisF (Kapitel 2) in Anwesenheit von TrpG_b6, _b7 und _b9 untersucht. Es konnte in keinem Fall eine Aktivität detektiert werden.

5.4.9 Übersicht über die Ergebnisse der TrpG *stretch* Varianten

Die Eigenschaften von HisH, wildtypischem TrpG und den TrpG *stretch* Varianten sind in Tabelle 5.25 zusammengefasst. Neben der Größe der Proteine (Anzahl der Aminosäuren) ist der Anteil veränderter Aminosäuren aufgelistet, welcher für die TrpG-Varianten zwischen 1% und 10% liegt. Aus der Tabelle geht auch hervor, dass bis zu 63% der HisH-Kontaktfläche (TrpG_a5b6) und bis zu 67% der in HisH konservierten Aminosäuren der Kontaktfläche (TrpG_a5b6 und TrpG_b6b7) auf TrpG übertragen wurden. Weiterhin sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Stabilität, zur Oligomerisierung, zur Bindung an HisF, sowie zur Glutaminase-Aktivität der TrpG Varianten verglichen.

Tabelle 5.25: Gegenüberstellung der Eigenschaften von HisH, wildtypischem TrpG und den TrpG stretch Varianten

¹ nach dem Kriterium 5Å Radius (siehe Kapitel 1) sind insgesamt 24 Aminosäuren in HisH Teil der Kontaktfläche, 12 davon sind streng konserviert;

² für die TrpG Varianten wurden zur Reinigung keine stringenteren Hitzeschritte (mehr als 60°C / länger als 20min) getestet;

³ es ist nur der überwiegende Oligomerisierungszustand aufgelistet; Mono = das apparente Molekulargewicht (MW) entspricht einem Monomer (ca. 22kDa), Di-Tri = MW zwischen Dimer und Trimer; Aggreg = Aggregate: Protein eluiert im Ausschlussvolumen der Säule (MW > 80kDa).

5.4.10 Zusammenfassung

Die TrpG *stretch* Varianten konnten trotz der Vielzahl von bis zu 20 Aminosäure-Austauschen in großen Mengen und in löslicher Form durch heterologe Genexpression in *E. coli* gewonnen werden. Die Ausbeuten betragen teilweise über 100 mg gereinigtes Protein pro Liter Kulturmedium. Alle Varianten zeigen eine dem wildtypischen Protein vergleichbare Hitzestabilität, was zu ihrer Aufreinigung genutzt wurde, und sind stabil gegenüber proteolytischem Verdau durch Trypsin. Dies belegt, dass sie eine kompakte Tertiärstruktur aufweisen, die vermutlich der von wildtypischem TrpG sehr ähnlich ist. Analytische Gelfiltration zeigte jedoch für die meisten Varianten eine signifikante Reduzierung der Dimerisierungstendenz, die im wildtypischen TrpG sehr ausgeprägt ist. TrpG_b7, TrpG_a5, TrpG_b5a5, TrpG_b6a5 und TrpG_b5_b9_a5 liegen sogar überwiegend in monomerer Form vor. Dies lässt die Vermutung zu, dass vor allem das Einfügen der HisH-Aminosäuren aus β -Strang 7 und α -Helix 5 zur Bildung der für wildtypisches HisH typischen Monomere führt.

In den TrpG *stretch* Varianten wurden bis zu 63% der Aminosäuren, die in HisH die Kontaktfläche mit HisF bilden, an äquivalenter Position eingebaut. Dabei wurden konservierte Aminosäuren besonders berücksichtigt. Dennoch konnten für keine der 11 detailliert charakterisierten TrpG-Varianten im *yeast-two-hybrid* System *in vivo* oder mittels nativer PAGE, analytischer Gelfiltration, Fluoreszenzspektroskopie *in vitro* Hinweise auf eine stabile Interaktion mit HisF erhalten werden.

Die Messungen der Glutaminase-Aktivitäten von TrpG_6, _7 und _b9 Varianten ergaben ebenfalls keinen Hinweis auf eine Interaktion mit HisF. Jedoch wurde durch den Austausch von *stretch* b7 die konditionale Glutaminase-Aktivität von TrpG in eine konstitutive umgewandelt, so dass TrpG_b7 in isolierter Form Glutamin hydrolisieren kann. In ähnlicher Weise wurde durch den Austausch von *stretch* b7 die konditionale Glutaminase-Aktivität von HisH in eine konstitutive umgewandelt. In HisH_b7 ist die Glutaminase-Aktivität jedoch noch von HisF, nicht jedoch von dessen Liganden ProFAR abhängig (Kapitel 2). Dies lässt den Schluss zu, dass der *stretch* b7 sowohl in HisH als TrpG diejenigen Aminosäuren enthält, die im wildtypischen Komplex (mit HisF bzw. TrpE) die unkontrollierte Glutamin-Hydrolyse verhindern. In HisH ist hierfür Tyr138 entscheidend, in TrpG möglicherweise Tyr131.

6 Abschließende Diskussion

6.1 Struktur und Funktion der Imidazolglycerinphosphat-Synthase

Die Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus der Histidin-Biosynthese ist als ein vergleichsweise einfaches Modellprotein zur Analyse der strukturellen Grundlagen funktionaler Protein-Protein Wechselwirkungen gut geeignet und wurde daher in den letzten Jahren intensiv am Beispiel des HisH:HisF Komplexes aus *T. maritima* und des HIS7 Fusionsproteins aus der Hefe untersucht (Chittur *et al.*, 2000; Klem *et al.*, 2001; Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001; Chaudhuri *et al.*, 2001; Douangamath *et al.*, 2002; Myers *et al.*, 2003; Chaudhuri *et al.*, 2003; Amaro *et al.*, 2003, 2005).

Dabei standen und stehen drei Fragen im Mittelpunkt: 1. Welches sind die Katalysemechanismen der isolierten Glutaminase (HisH-) und Synthase (HisF-) Teilreaktionen? 2. Wie wird die HisH-Reaktion durch die Substratbindung an HisF stimuliert? 3. Auf welchem Wege gelangt der Ammoniak vom aktiven Zentrum von HisH über eine Strecke von 25 Å und die lösungsmittelzugängliche Kontaktfläche der beiden Untereinheiten hinweg zum aktiven Zentrum von HisF?

Die Frage nach dem Mechanismus der Glutaminhydrolyse an HisH kann durch Analogieschlüsse aus der Untersuchung anderer Glutamin-Amidotransferasen relativ eindeutig beantwortet werden. Die Reaktion wird durch eine katalytische Triade (Cys-His-Glu) ermöglicht und erfolgt über zwei tetraedrische Intermediate und einen Glutamyloxyester (Thoden *et al.*, 1999).

Im Zusammenhang mit der Reaktion der Synthase HisF wurden in der Röntgenstruktur von HIS7-Kristallen, die mit PRFAR gesoakt wurden, mehrere zentrale Kontakte zwischen der HisF Domäne und dem Substrat identifiziert (Chaudhuri *et al.*, 2003). Daran sind zum einen die Aspartate Asp245 (entspricht Asp11 in *tmHisF*) und Asp404 (Asp130 in *tmHisF*) beteiligt. Der „ImGP“-Teil von PRFAR tritt mit der C-terminalen Phosphatbindestelle (Asp474, entspricht Asp176 in *tmHisF*) in Wechselwirkung, der „AICAR“-Teil entsprechend mit der N-terminalen Phosphatbindestelle. Besonders auffallend war eine Interaktion zwischen Lys258 (entspricht Lys19 in *tmHisF*), das im flexiblen Loop 1 zwischen β -Strang 1 und α -Helix 1 liegt (Chaudhuri *et al.*, 2001; Douangamath *et al.*, 2002), und dem Glycerinphosphatteil von PRFAR. Dies deckt sich mit der Struktur von HisF aus *Pyrobaculum aerophilum*, in dem der entsprechende Lysinrest mit gebundenen Glycerinmolekülen interagiert (Banfield *et al.*, 2001). Der Austausch von Lys258 gegen Alanin oder Arginin in HIS7 und der Austausch von Lys19 gegen Serin in HisF führte zu verringerten katalytischen Aktivitäten, weshalb dieser

Rest an der HisF-Reaktion bzw. der Signalübertragung zwischen HisF und HisH in einer bisher nicht näher charakterisierten Weise beteiligt sein könnte (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001; Myers *et al.*, 2003). Zweifellos essentiell für die Synthesereaktion sind Asp11 und Asp130 an den C-terminalen Enden von β -Strang 1 und β -Strang 5, deren Austausch gegen Asparagin jeweils zu einem Abfall des k_{cat} -Wertes von HisF um mindestens 4-5 Größenordnungen führte. Aufbauend auf diesem Ergebnis wurde ein Modell für den Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, in dem Asp11 als allgemeine Base und Asp130 als allgemeine Säure wirkt (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Durch einen nukleophilen Angriff des Ammoniak an der Carbonylfunktion des Ribulosyteils von PRFAR wird unter Eliminierung von Wasser ein Imin und das erste Produkt AICAR gebildet. Daraufhin wird der Imidazolring des zweiten Produktes ImGP geschlossen (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001).

Weniger eindeutig waren bisher die Ergebnisse bei der Suche nach Resten, die an der Aktivierung der Glutaminasereaktion und dem Ammoniaktransport beteiligt sind. In diesem Zusammenhang wurden vor allem einzelne Reste im Inneren des Fasses von HisF und an der Kontaktfläche der beiden Untereinheiten (HisH:HisF Komplex) bzw. der beiden Domänen (HIS7) untersucht. Im hochkonservierten Salzbrückencluster (Arg5-Glu46-Lys99-Glu167), der im Inneren des HisF-Fasses die HisH benachbarte Schicht 4 bildet (Abbildung 5.6) führte die Substitution von Arg239 in HIS7 bzw. Arg5 in HisF gegen verschiedene andere Reste zu einer 1000- bzw. 400-fachen Abnahme des k_{cat} -Wertes, während die ammoniumabhängige Reaktion unbeeinträchtigt blieb bzw. sich nur relativ geringfügig verschlechterte (Myers *et al.*, 2003; Häger, 2001). Ein analoges Ergebnis wurde für die Arg5His Variante des HisH:HisF Komplexes von *E. coli* erhalten (Klem *et al.*, 2001). Daraus wurde in Zusammenhang mit Computermodellierungen geschlossen, dass die lange Seitenkette dieses Argininrestes eine Wand gegen das Lösungsmittel bildet und dadurch die Abdiffusion des Ammoniak auf seinem Weg von HisH zu HisF verhindert (Amaro *et al.*, 2005). Dafür spricht, dass in den Arg239Ala bzw. Arg239Lys Varianten auf 122 bzw. 40 hydrolysierte Glutaminmoleküle nur ein gebildetes ImGP kommt (Myers *et al.*, 2003). Weit weniger drastisch wirkt sich die Substitution des Salzbrückenrestes Lys360 in HIS7 bzw. Lys99 in HisF aus. Die Lys360Arg Variante weist sowohl in der Glutamin- als auch in der ammoniumabhängigen Reaktion eine nur 10-fache Reduktion des k_{cat} -Wertes auf (Myers *et al.*, 2003), während der k_{cat} -Wert der Lys99Leu Variante von HisF sowohl in der Glutamin-abhängigen Gesamtreaktion als auch in der ProFAR-stimulierten HisH-Teilreaktion identisch mit dem des wildtypischen Enzyms ist (Mohrlüder, 2003). Dem Lysinrest kommt somit weder in der Aktivierung der Glutaminase noch im Transport des Ammoniaks eine wichtige Rolle zu. Auch der Austausch von Thr74 in Schicht 3 des HisF-Fasses gegen das voluminösere Leucin führt weder in der Glutamin- noch in der ammoniumabhängige Reaktion zu einer deutlichen Aktivitätseinbuße (Häger, 2001). Lediglich der Doppelaustausch Thr74Leu plus

Ser101Ile in Schicht 2 hat in der Glutamin-abhängigen Reaktion eine 40-fache Reduktion der katalytischen Effizienz zur Folge, ist jedoch auch in der ammoniumabhängigen Reaktion beeinträchtigt (Häger, 2001). Dies bedeutet, dass durch die Substitution zweier kleiner polarer durch zwei große hydrophobe Seitenketten der Ammoniaktransfer durch das Innere des HisF-Fasses nicht entscheidend behindert wird. Gleiches gilt für die hier charakterisierte Variante Thr78Met (Abbildung 5.15; Tabelle 5.17-Tabelle 5.19).

In der vorliegenden Arbeit wurden die beschriebenen Mutationsanalysen an der Kontaktfläche zwischen HisH und HisF vertieft und erweitert. Dadurch sollten vor allem solche Aminosäuren identifiziert werden, die an der Kommunikation zwischen den beiden Untereinheiten beteiligt sind. Als Auswahlkriterien für zu testende Reste dienten neben ihrer Lokalisation an der Kontaktfläche ihre Konservierung und ihre Einbindung in intermolekulare, ligandenabhängige Wasserstoffbrücken (Abbildung 5.13; Tabelle 5.3). Dabei wurde neben Gln123 aus HisF vor allem Reste aus HisH einzeln oder in Form zusammenhängender Sequenzabschnitte gegen Alanin bzw. gegen die entsprechenden Abschnitte aus der verwandten Glutaminase TrpG ausgetauscht (9.3). Die Ergebnisse der strukturellen und enzymkinetischen Charakterisierungen der HisH und HisF Varianten sind in Kapitel 2 zusammengestellt und diskutiert. Insgesamt erwies sich der Kontaktbereich bemerkenswert tolerant gegenüber Aminosäuresubstitutionen. Alle HisH Varianten bildeten stabile Komplexe mit wildtypischem HisF aus (Abbildung 5.21; Tabelle 5.15; Tabelle 5.16) und die meisten dieser Komplexe waren sowohl in der Gesamtreaktion als auch in den HisH- und HisF-Teilreaktionen vergleichbar aktiv wie der wildtypische HisH:HisF Komplex (Tabelle 5.17-Tabelle 5.19). So führten der Austausch des konservierten Ser183 gegen Alanin und die Substitutionen in HisH_b6 und HisH_b9 zu keinen signifikanten Veränderung der katalytischen Aktivitäten, lediglich war in den beiden *stretch* Varianten eine Abnahme der Glutaminaffinität nachzuweisen (Tabelle 5.17-Tabelle 5.19). Bei den Einzelaustauschen zeigt sich die deutlichste Beeinträchtigung der Gesamtreaktion in der Variante HisH_R117A, deren katalytische Effizienz etwa 1000-fach herabgesetzt ist. Auch ist die katalytische Effizienz der HisH-Teilreaktion 20-fach herabgesetzt. Der Rest R117 bildet Wasserstoffbrücken zu den HisF-Resten T195 und D219, die wiederum über β -Strang 7 mit der C-terminalen Phosphatbindestelle von PRFAR verknüpft sind. Diese wird vom ImGP-Teil von PRFAR besetzt, während AICAR an die N-terminale Phosphatbindestelle bindet (Chaudhuri *et al.*, 2003). Da ImGP zu einer deutlich stärkeren Aktivierung der Glutaminase-Aktivität führt als AICAR (Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001; Myers *et al.*, 2003) scheint die C-terminale Phosphatbindestelle eine wichtigere Rolle bei der Signaltransduktion zu spielen, die nach den vorliegenden Ergebnissen vom aktiven Zentrum von HisF über T195 bzw. D219 zu R117 und von dort weiter zur katalytischen Triade von HisH verlaufen könnte. Die katalytischen Effizienzen der glutaminabhängigen Gesamtreaktion und der HisH-Teilreaktion der Variante N124A sind gegenüber dem wildtypischen Enzym um den Faktor 200 bzw. 30 herabgesetzt,

d.h. die beobachteten Effekte sind denen von R117A ähnlich. Der Rest N124 bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem N-terminalen Methionin von HisF und könnte über den β -Strang 1 mit Lys19 im flexiblen Loop 1 zwischen β -Strang 1 und α -Helix 1 interagieren. Lys19 (entspricht Lys238 in HIS7) interagiert mit dem ImGP-Teil von gebundenem PRFAR (siehe oben; Chaudhuri *et al.*, 2003), womit sich - ähnlich wie bei der R117A Variante diskutiert - eine Signalkette vom aktiven Zentrum von HisF zur katalytischen Triade unter Einbeziehung von HisF_Lys19, HisF_Met1 und HisH_N124 konstruieren lässt.

Die qualitativ auffallendsten Änderungen waren für die Varianten HisH_b7 und HisH_Y138A zu beobachten, die - im Gegensatz zum wildtypischen HisH - schon in Abwesenheit von PRFAR die HisH-Glutaminase-Reaktion mit einer messbaren Rate katalysieren (Tabelle 5.19; Abbildung 5.25).

Sowohl in HIS7 als auch im HisH:HisF Komplex aus *E. coli* sind basale Glutaminase-Aktivitäten in Abwesenheit von Synthase-Liganden nachweisbar (Chittur *et al.*, 2000; Klem & Davisson, 1993). Für HIS7 wurde nachgewiesen, dass die Bindung von PRFAR bzw. des reduzierten Analogons rPRFAR den K_M^{Gln} nicht beeinflusst und die Aktivierung ausschließlich auf eine fast 5000-fache bzw. 3000-fache Erhöhung des k_{cat} zurückgeht (Myers *et al.*, 2003). In früheren Untersuchungen war gezeigt worden, dass wildtypischer *T. maritima* HisH:HisF Komplex in Abwesenheit von ProFAR Glutamin mit einem K_d von 0,53 mM bindet, was in etwa dem unter sättigender ProFAR Konzentration bestimmten K_M^{Gln} von 0,32 mM entspricht (Häger, 2001; Beismann-Driemeyer & Sterner, 2001). Offensichtlich hängt auch in der ImGP-Synthase von *T. maritima* die Bindung von Glutamin nicht von der Anwesenheit eines HisF-Liganden ab, wohl jedoch die Glutamin-Hydrolyse. Da HisH auch in isolierter Form (ohne HisF) Glutamin nicht umsetzen kann, muss wildtypisches HisH in einer inaktiven Konformation vorliegen, die durch die Bindung von ProFAR (oder PRFAR oder ImGP) an HisF in eine aktive Konformation übergeführt wird. In HisH_b7 bzw. HisH_Y138A scheint diese Aktivierung konstitutiv zu erfolgen und nicht länger auf ProFAR-induzierte und von HisF auf HisH übertragene Konformationsänderungen angewiesen zu sein. Welcher Art könnte die Aktivierung sein? In frühen Arbeiten wurde postuliert, dass in apo-HIS7 die katalytische Triade der Glutaminasedomäne wegen einer fehlenden Oxyaniontasche nicht aktiv ist (Chaudhuri *et al.*, 2001). Danach müssten durch Ligandenbindung induzierte Konformationsänderung zur Umorganisation der Tasche führen, was aber mittels Röntgenstrukturanalyse nicht beobachtet werden konnte (Chaudhuri *et al.*, 2003). Auch unterscheiden sich die Konformationen der Seitenketten der katalytischen Triade im HisH:HisF Komplex in An- und Abwesenheit von ImGP nicht sichtbar (Vega-Fernandez, Häger, Sterner, Wilmanns, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine andere Möglichkeit wäre, dass Gln123 aus HisF in einer genauer zu definierenden Weise das aktive Zentrum von HisH vervollständigt. Dafür spricht, dass der entsprechende Rest in Q397 in His7 mit gebundenem Glutamin-Analog Acivicin interagiert (Chaudhuri *et al.*, 2001). Die Charakterisierung der Variante HisF_Q123A deutet jedoch nur auf eine geringe Beteiligung der Seitenkette an der

Glutaminbindung, jedoch nicht an seiner Hydrolyse hin (Tabelle 5.19). Es bleibt daher festzustellen, dass die bisher vorliegenden Röntgenstrukturen keinen eindeutigen Hinweis darauf geben, warum die katalytische Triaden von HIS7 und HisH:HisF nicht aktiv sind bzw. durch welche Mechanismen sie in eine aktive Konformation übergeführt werden. Somit kann auch nicht vollständig erklärt werden, warum der Austausch von β -Strang 7 bzw. von Tyr138 zu einer konstitutiven Glutaminase-Reaktion führt. Die bisherigen Ergebnisse zeigen jedoch eindeutig, dass Tyr138 eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der Liganden-induzierten Glutaminasereaktion zukommt, vermutlich weil dieser Rest Wasserstoffbrücken sowohl zum His178 der katalytischen Triade in HisH als auch zum Lys99 des Salzbrückenclusters in HisF ausbildet (Abbildung 5.11). Man könnte sich vorstellen, dass im apo-Enzym Tyr138 das His178 in einer nicht-produktiven Konformation hält. Bei der Bindung von ProFAR könnte es zu einer Konformationsänderung des Lys99 kommen, die zu einer Aufhebung oder Änderung der Wasserstoffbrücke mit Tyr138 führt. Dies könnte dadurch in eine Konformation überführt werden, in der sein Einfluss auf His178 abnimmt und die Hydrolyse von Glutamin erfolgt. Erschwert wird die Erklärung des Effektes durch Ergebnisse der Mutationsanalyse des entsprechenden Tyr144 in HIS7. Die Variante Tyr144F zeigt wildtypische Aktivität sowohl in der ammonium- als auch in der glutaminabhängigen Reaktion (Amaro *et al.*, 2005). Es besteht die Aussicht, dass die Röntgenstrukturen von HisH_b7 und HisH_Y138A im Komplex mit wildtypischem HisF hier weitere Aufschlüsse bringen. Entsprechende Kristallisationsansätze sind in Planung.

In einigen anderen Glutamin-Amidotransferasen kann ähnlich wie in der ImGP-Synthase Glutamin jederzeit binden und seine Hydrolyse durch das Substrat der Synthase induziert werden. Ein Beispiel ist die CPS aus *E. coli*, deren basale Glutaminase-Aktivität durch die Anwesenheit von Synthase-Liganden signifikant erhöht wird (Miles *et al.*, 1998; Miles & Raushel, 2000). Im Unterschied dazu ist die Anthranilat-Synthase aus *S. solfataricus* nicht befähigt, Glutamin zu binden. Erst die Anwesenheit des Synthase-Substrates Chorismat führt zu einer Konformationsänderung, die die katalytische Triade zugänglich macht und sowohl Glutamin-Bindung, als auch -Hydrolyse ermöglicht (Knöchel *et al.*, 1999). Die strukturellen Grundlagen dieser unterschiedlichen Mechanismen der Aktivierung der Glutaminase durch die Synthase sind nicht im Detail verstanden.

6.2 Die Evolution der GATasen

Bereits in den 70er Jahren lieferte die Isolierung amphibolarer Glutaminasen erste Hinweise auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung der Glutaminasen der Klasse I (Sawula & Crawford, 1972; Kane, 1977, Buvinger *et al.*, 1981). Nach Yanofsky (1984) soll es eine ursprüngliche unspezialisierte prokaryotische Glutaminase gegeben haben, die mit verschiedenen Synthasen interagieren konnte. Aus dieser sollen sich dann durch

Genduplikationen und Diversifikationen die heutigen spezialisierten Glutaminasen entwickelt haben, die in der Regel nur noch mit einer Synthase wechselwirken. Dafür sprechen identische katalytische Triaden (Cys-His-Glu), ein identischer Faltungstyp (α/β Hydrolase), sowie die konservierte Lage der Kontaktfläche zur Synthase.

Die vorliegende Arbeit lieferte eine Reihe von Indizien für einen gemeinsamen evolutiven Ursprung der Glutaminasen HisH und TrpG. Der über DALI ermittelte Z-Wert von 16,1 für HisH aus *T. maritima* und TrpG aus *S. solfataricus* ist ein deutlicher Hinweis auf eine evolutive Verwandtschaft (Kapitel 1), die durch die Superpositionierung (rmsd von 1,16 Å für die C α -Atome) der Struktur von HisH und eines Modells (SWISS Model) der TrpG-Struktur aus *T. maritima* weiter erhärtet wird (Kapitel 3).

Die Analyse der HisH und TrpG *stretch* Varianten, chimäre Protein, in denen jeweils Sekundärstrukturelemente des einen durch die entsprechenden Elemente aus dem anderen Enzym ersetzt wurden, spricht ebenfalls für einen gemeinsamen evolutionären Ursprung. So konnten TrpG *stretch* Varianten mit bis zu 3 Sekundärstrukturelementen und 14 Aminosäuren aus HisH (TrpG_a5_b5_b7) und ebenfalls HisH *stretch* Varianten mit bis zu 6 Aminosäuren aus TrpG (HisH_b6) hergestellt werden. Alle diese Varianten waren stabil gegenüber Erhitzen und proteolytischem Abbau und zeigten ähnliche Fluoreszenz- und CD-Spektren wie die wildtypischen Ausgangsproteine (Kapitel 2 und 4).

Den deutlichsten Hinweis auf einen gemeinsamen Ursprung liefern die Varianten HisH_b7 und TrpG_b7, die beide statt der wildtypischen konditionalen eine konstitutive Glutaminase-Aktivität zeigen (Tabelle 5.24; Abbildung 5.25; Abbildung 5.44). Dies bedeutet, dass durch den wechselseitigen Austausch von 4 Aminosäuren in β -Strang 7 die Regulation der Glutaminase-Aktivitäten von HisH bzw. TrpG durch die jeweilige Synthase eingeschränkt bzw. gänzlich aufgehoben wird. So ist HisH_b7 ist auch in Abwesenheit eines HisF-Liganden zur Hydrolyse von Glutamin befähigt (Abbildung 5.25), während für TrpG_b7 sogar in Abwesenheit der Synthase TrpE eine signifikante Glutaminase-Aktivität nachgewiesen wurde (Abbildung 5.44). Dies bedeutet, dass in beiden Enzymen ein molekularer Schalter zur Regulation der Glutamin-Hydrolyse in β -Strang 7 liegen muss. In HisH konnte der Effekt größtenteils der Aminosäure Y138 zugeschrieben werden, während in TrpG bisher keine vergleichbar bedeutende Aminosäure identifiziert wurde. In β -Strang 7 befindet sich jedoch auch in TrpG ein konserviertes Tyrosin an Position 131. Es wäre interessant, zu überprüfen, ob ein Austausch dieses Y131 für die Etablierung der konstituierten Glutaminase-Aktivität alleine verantwortlich ist. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob auch andere Glutaminasen der Klasse I durch den Austausch von β -Strang 7 konstitutive Glutaminase-Aktivität entfalten.

Wildtypisches HisH liegt in isolierter Form als Monomer vor, während wildtypisches TrpG Dimere bildet (Tabelle 5.22). Interessanterweise zeigen TrpG *stretch* Varianten mit Austausch in β -Strang 7 und α -Helix 5 eine Tendenz zur Monomerisierung, während die HisH *stretch* Varianten jeweils zur etwa 30% als Dimere vorliegen (Tabelle 5.14; Tabelle 5.22). Durch eine vergleichsweise geringe Anzahl von Austauschen an der Oberfläche konnte somit eine Übertragung der Eigenschaft „Oligomerisierungszustand“ von HisH auf TrpG, sowie in umgekehrter Richtung, erreicht werden.

Alle charakterisierten HisH *stretch* Varianten bilden stabile Komplexe mit HisF aus, während keine der untersuchten TrpG *stretch* Varianten nachweisbar mit HisF interagiert. Dies bedeutet zum einen, dass die HisH:HisF Interaktionen in struktureller und funktioneller Hinsicht sehr robust sind (siehe oben). Zum anderen genügt selbst die Transplantation eines großen Teils der Kontaktfläche von HisH in TrpG offensichtlich nicht, um den angestrebten TrpG:HisF Komplex herzustellen. Eine mögliche Ursache könnte darin begründet liegen, dass TrpG aus *T. maritima* natürlicherweise als TrpG-TrpD Fusionsprotein vorliegt, dessen zweite Domäne die Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (TrpD) bildet (Sterner *et al.*, 1995; Ivens, 1998). Es wurde kürzlich gezeigt, dass nur TrpG-TrpD, nicht aber isoliertes TrpG, einen stabilen und funktionalen Komplex mit TrpE bildet (Felix List, persönliche Mitteilung). Um die Rolle von TrpD bei der TrpG-TrpD:TrpE Komplexbildung und damit auch bei der angestrebten TrpG:HisF Komplexbildung abschätzen zu können, ist die Lösung der Röntgenstruktur des Anthranilat-Synthase Komplexes aus *T. maritima* erforderlich. Für die bisher gelösten Strukturen der TrpG:TrpE Komplexe wurden verschiedene Anordnungen der beiden [TrpG:TrpE] Einheiten gefunden (Abbildung 1.4). TrpE aus *T. maritima* ist ein monomeres Protein (Felix List, persönliche Mitteilung), während TrpG und TrpG-TrpD als Dimere vorliegen (Kapitel 3; Ivens, 1998). Diese Ergebnisse deuten auf ein Heterotetramer [TrpGD:TrpE]₂ (ähnlich dem Heterotetramer [TrpG:TrpE]₂ aus *S. solfataricus*) hin, in dem zwei TrpG-Domänen assoziieren und je eine TrpE-Domäne mit dem TrpG-TrpD-Fusionsprotein interagiert. Aus dieser Struktur sollten sich weitere Einblicke in die Interaktion von TrpG mit TrpE ziehen lassen, die für das Design eines TrpG:HisF Komplexes wichtig sein könnten. Bis dahin sollten die TrpG Varianten im Kontext des TrpG-TrpD-Fusionsproteines nochmals hergestellt und auf ihre Interaktion mit HisF überprüft werden.

7 Literatur

- Aho, S., Arffman, A., Pummi, T., *et al* (1997) A novel reporter gene MEL1 for the yeast two-hybrid system. *Anal Biochem*, **253**, 270-272.
- Alfarano, C., Andrade, C. E., Anthony, K., *et al* (2005) The Biomolecular Interaction Network Database and related tools 2005 update. *Nucleic Acids Res*, **33**, D418-424.
- Alifano, P., Fani, R., Lio, P., *et al* (1996) Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiol Rev*, **60**, 44-69.
- Al-Mulla, F., Milner-White, E. J., Going, J. J., *et al* (1999) Structural differences between valine-12 and aspartate-12 Ras proteins may modify carcinoma aggression. *J Pathol*, **187**, 433-438.
- Aloy, P. & Russell, R. B. (2002) The third dimension for protein interactions and complexes. *Trends Biochem Sci*, **27**, 633-638.
- Amaro, R., Tajkhorshid, E. & Luthey-Schulten, Z. (2003) Developing an energy landscape for the novel function of a (beta/alpha)₈ barrel: ammonia conduction through HisF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7599-7604.
- Amaro, R. E., Myers, R. S., Davisson, V. J., *et al* (2005) Structural Elements in IGP Synthase Exclude Water to Optimize Ammonia Transfer. *Biophys J*.
- Ames, B. N., Martin, R. G. & Garry, B. J. (1961) The first step of histidine biosynthesis. *J Biol Chem*, **236**, 2019-2026.
- Amuro, N., Paluh, J. L. & 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**, 14844-14849.
- Andras, P. & Andras, C. (2005) The origins of life -- the 'protein interaction world' hypothesis: protein interactions were the first form of self-reproducing life and nucleic acids evolved later as memory molecules. *Med Hypotheses*, **64**, 678-688.
- Archakov, A. I., Govorun, V. M., Dubanov, A. V., *et al* (2003) Protein-protein interactions as a target for drugs in proteomics. *Proteomics*, **3**, 380-391.
- Ashkenazi, A., Presta, L. G., Marsters, S. A., *et al* (1990) Mapping the CD4 binding site for human immunodeficiency virus by alanine-scanning mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 7150-7154.
- Babbitt, P. C. & Gerlt, J. A. (2000) New functions from old scaffolds: how nature reengineers enzymes for new functions. *Adv Protein Chem*, **55**, 1-28.
- Bae, Y. M., Holmgren, E. & Crawford, I. P. (1989) Rhizobium meliloti anthranilate synthase gene: cloning, sequence, and expression in Escherichia coli. *J Bacteriol*, **171**, 3471-3478.
- Banfield, M. J., Lott, J. S., Arcus, V. L., *et al* (2001) Structure of HisF, a histidine biosynthetic protein from Pyrobaculum aerophilum. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 1518-1525.
- Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., *et al* (1975) Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature*, **255**, 609-614.

- Bartel, P. L., Chien, C.T., Sternglanz, R., Fileds, S. (1993)** Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *D.A. Hartley (ed.) . Cellular Interactions in Development: A practical approach. Oxford University Press, Oxford*, 153-179.
- Bartel, P. L., Roecklein, J. A., SenGupta, D., et al (1996)** A protein linkage map of Escherichia coli bacteriophage T7. *Nat Genet*, **12**, 72-77.
- Bass, S. H., Mulkerrin, M. G. & Wells, J. A. (1991)** A systematic mutational analysis of hormone-binding determinants in the human growth hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 4498-4502.
- Bauerle, R., Hess, J. & French, S. (1987)** Anthranilate synthase-anthranilate phosphoribosyltransferase complex and subunits of Salmonella typhimurium. *Methods Enzymol*, **142**, 366-386.
- Beeckmans, S. (1999)** Chromatographic methods to study protein-protein interactions. *Methods*, **19**, 278-305.
- Beismann-Driemeyer, S. (2001)** Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Bienzymkomplexes Imidazolglycerinphosphate-Synthase aus *Thermotoga maritima*. *Dissertation Universität zu Köln*.
- Beismann-Driemeyer, S. & Sterner, R. (2001)** Imidazole glycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima*. Quaternary structure, steady-state kinetics, and reaction mechanism of the bienzyme complex. *J Biol Chem*, **276**, 20387-20396.
- Bera, A. K., Chen, S., Smith, J. L., et al (1999)** Interdomain signaling in glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. *J Biol Chem*, **274**, 36498-36504.
- Bera, A. K., Chen, S., Smith, J. L., et al (2000)** Temperature-dependent function of the glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase ammonia channel and coupling with glycinamide ribonucleotide synthetase in a hyperthermophile. *J Bacteriol*, **182**, 3734-3739.
- Bera, A. K., Smith, J. L. & Zalkin, H. (2000)** Dual role for the glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase ammonia channel. Interdomain signaling and intermediate channeling. *J Biol Chem*, **275**, 7975-7979.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., et al (2000)** The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, **28**, 235-242.
- Binda, C., Bossi, R. T., Wakatsuki, S., et al (2000)** Cross-talk and ammonia channeling between active centers in the unexpected domain arrangement of glutamate synthase. *Structure Fold Des*, **8**, 1299-1308.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bisswanger, H. (2000)** Enzymkinetik - Theorie und Methoden. *Wiley-VCH Verlag, Weinheim*, **3.Auflage**.
- Blanc-Potard, A. B., Figueroa-Bossi, N. & Bossi, L. (1999)** Histidine operon deattenuation in dnaA mutants of Salmonella typhimurium correlates with a decrease in the gene dosage ratio between tRNA(His) and histidine biosynthetic loci. *J Bacteriol*, **181**, 2938-2941.
- Blasi, F. & Bruni, C. B. (1981)** Regulation of the histidine operon: translation-controlled transcription termination (a mechanism common to several biosynthetic operons). *Curr Top Cell Regul*, **19**, 1-45.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., et al (1997)** The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science*, **277**, 1453-1474.

- Bogan, A. A. & Thorn, K. S. (1998)** Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol*, **280**, 1-9.
- Boldin, M. P., Mett, I. L. & Wallach, D. (1995)** A protein related to a proteasomal subunit binds to the intracellular domain of the p55 TNF receptor upstream to its 'death domain'. *FEBS Lett*, **367**, 39-44.
- Bond, J. P. & Francklyn, C. (2000)** Proteobacterial histidine-biosynthetic pathways are paraphyletic. *J Mol Evol*, **50**, 339-347.
- Bonner, D. M., DeMoss, J.A., Mills, S.E. (1965)** The evolution of an enzyme. *in: Bryson, V. & Vogel, H.J., Evolving genes and proteins, Academic Press, New York*, 305-318.
- Boulton, S. J., Vincent, S. & Vidal, M. (2001)** Use of protein-interaction maps to formulate biological questions. *Curr Opin Chem Biol*, **5**, 57-62.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brandon, C., Tooze, J. (1999)** Introduction to protein structure. *Garland Publishing Inc., second edition*
- Breeden, L. & Nasmyth, K. (1985)** Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **50**, 643-650.
- Brenner, M., Ames, B. N. (1971)** the histidine operon and its regulation. *Metabolic pathways, New York: Academic Press Inc., 5.*
- Brent, R & Ptashne, M. (1985)** A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, **43**, 729-736.
- Buchanan, J. M. (1973)** The amidotransferases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **39**, 91-183.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., et al (1987)** A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods Enzymol*, **155**, 416-433.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., et al (1996)** Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, **273**, 1058-1073.
- Burbelo, P., Wellstein, A. & Pestell, R. G. (2004)** Altered Rho GTPase signaling pathways in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, **84**, 43-48.
- Buvinger, W. E., Stone, L. C. & Heath, H. E. (1981)** Biochemical genetics of tryptophan synthesis in *Pseudomonas acidovorans*. *J Bacteriol*, **147**, 62-68.
- Caligiuri, M. G. & Bauerle, R. (1991)** Identification of amino acid residues involved in feedback regulation of the anthranilate synthase complex from *Salmonella typhimurium*. Evidence for an amino-terminal regulatory site. *J Biol Chem*, **266**, 8328-8335.
- Caligiuri, M. G. & Bauerle, R. (1991)** Subunit communication in the anthranilate synthase complex from *Salmonella typhimurium*. *Science*, **252**, 1845-1848.
- Camacho, C. J. & Vajda, S. (2002)** Protein-protein association kinetics and protein docking. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 36-40.
- Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., et al (1998)** Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, **17**, 1395-1413.
- Carlomagno, M. S., Chiariotti, L., Alifano, P., et al (1988)** Structure and function of the *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* K-12 histidine operons. *J Mol Biol*, **203**, 585-606.

- Casadaban, M. J. (1976)** Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol*, **104**, 541-555.
- Certa, U., Bannwarth, W., Stuber, D., et al (1986)** Subregions of a conserved part of the HIV gp41 transmembrane protein are differentially recognized by antibodies of infected individuals. *Embo J*, **5**, 3051-3056.
- Chaudhuri, B. N., Lange, S. C., Myers, R. S., et al (2001)** Crystal structure of imidazole glycerol phosphate synthase: a tunnel through a (beta/alpha)₈ barrel joins two active sites. *Structure (Camb)*, **9**, 987-997.
- Chen, S., Burgner, J. W., Krahn, J. M., et al (1999)** Tryptophan fluorescence monitors multiple conformational changes required for glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase interdomain signaling and catalysis. *Biochemistry*, **38**, 11659-11669.
- 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**, 284-290.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., et al (1991)** The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 9578-9582.
- Chittur, S. V., Chen, Y. & Davisson, V. J. (2000)** Expression and purification of imidazole glycerol phosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif*, **18**, 366-377.
- Chittur, S. V., Klem, T. J., Shafer, C. M., et al (2001)** Mechanism for acivicin inactivation of triad glutamine amidotransferases. *Biochemistry*, **40**, 876-887.
- Chothia, C. (1976)** The nature of the accessible and buried surfaces in proteins. *J Mol Biol*, **105**, 1-12.
- Clarke, P., Cuiv, P. O. & O'Connell, M. (2005)** Novel mobilizable prokaryotic two-hybrid system vectors for high-throughput protein interaction mapping in *Escherichia coli* by bacterial conjugation. *Nucleic Acids Res*, **33**, e18.
- Copley, R. R. & Bork, P. (2000)** Homology among (beta/alpha)₈ barrels: implications for the evolution of metabolic pathways. *J Mol Biol*, **303**, 627-641.
- Copley, S. D. (2000)** Evolution of a metabolic pathway for degradation of a toxic xenobiotic: the patchwork approach. *Trends Biochem Sci*, **25**, 261-265.
- Craig, D. B., Hall, T. & Goltz, D. M. (2000)** *Escherichia coli* beta-galactosidase is heterogeneous with respect to a requirement for magnesium. *Biometals*, **13**, 223-229.
- Crawford, I. P. (1975)** Gene rearrangements in the evolution of the tryptophan synthetic pathway. *Bacteriol Rev*, **39**, 87-120.
- Crawford, I. P., Nichols, B. P. & Yanofsky, C. (1980)** Nucleotide sequence of the trpB gene in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol*, **142**, 489-502.
- Cunningham, B. C. & Wells, J. A. (1991)** Rational design of receptor-specific variants of human growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3407-3411.
- Danziger, D. J. & Dean, P. M. (1989)** Automated site-directed drug design: a general algorithm for knowledge acquisition about hydrogen-bonding regions at protein surfaces. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **236**, 101-113.
- Das, R. & Gerstein, M. (2000)** The stability of thermophilic proteins: a study based on comprehensive genome comparison. *Funct Integr Genomics*, **1**, 76-88.

- Davisson, J. V., Deras, I.L., Hamilton, S.E., Moore, L.L. (1994)** A plasmid-based approach for the synthesis of histidine biosynthetic intermediate. *J Org Chem*, **59**, 137-143.
- DeLano, W. L. (2002)** The PyMol Molecular Graphics System. *DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA*.
- DeLano, W. L. (2002)** Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 14-20.
- DeLano, W. L., Ultsch, M. H., de Vos, A. M., et al (2000)** Convergent solutions to binding at a protein-protein interface. *Science*, **287**, 1279-1283.
- Deremble, C. & Lavery, R. (2005)** Macromolecular recognition. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 171-175.
- Dietmann, S. & Holm, L. (2001)** Identification of homology in protein structure classification. *Nat Struct Biol*, **8**, 953-957.
- Douangamath, A., Walker, M., Beismann-Driemeyer, S., et al (2002)** Structural evidence for ammonia tunneling across the (beta alpha)(8) barrel of the imidazole glycerol phosphate synthase bienzyme complex. *Structure (Camb)*, **10**, 185-193.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988)** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, **16**, 6127-6145.
- Drewes, G. & Bouwmeester, T. (2003)** Global approaches to protein-protein interactions. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 199-205.
- Duff, A. P., Andrews, T. J. & Curmi, P. M. (2000)** The transition between the open and closed states of rubisco is triggered by the inter-phosphate distance of the bound bisphosphate. *J Mol Biol*, **298**, 903-916.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., et al (1993)** The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev*, **7**, 555-569.
- Eberhard, M. (1990)** A set of programs for analysis of kinetic and equilibrium data. *Comput Appl Biosci*, **6**, 213-221.
- Eisenberg, D., Marcotte, E. M., Xenarios, I., et al (2000)** Protein function in the post-genomic era. *Nature*, **405**, 823-826.
- Endrizzi, J. A., Beernink, P. T., Alber, T., et al (2000)** Binding of bisubstrate analog promotes large structural changes in the unregulated catalytic trimer of aspartate transcarbamoylase: implications for allosteric regulation induced cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5077-5082.
- Erbeznik, M., Strobel, H. J. & Dawson, K. A. (2000)** Organization and sequence of histidine biosynthesis genes hisH, -A, -F, and -IE in *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Curr Microbiol*, **40**, 140-142.
- Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., et al (1990)** Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol*, **172**, 884-900.
- Estojak, J., Brent, R. & Golemis, E. A. (1995)** Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol Cell Biol*, **15**, 5820-5829.
- Fani, R., Lio, P., Chiarelli, I., et al (1994)** The evolution of the histidine biosynthetic genes in prokaryotes: a common ancestor for the hisA and hisF genes. *J Mol Evol*, **38**, 489-495.
- Fani, R., Lio, P. & Lazcano, A. (1995)** Molecular evolution of the histidine biosynthetic pathway. *J Mol Evol*, **41**, 760-774.

- Fani, R., Mori, E., Tamburini, E., et al (1998)** Evolution of the structure and chromosomal distribution of histidine biosynthetic genes. *Orig Life Evol Biosph*, **28**, 555-570.
- Feilotter, H. E., Hannon, G. J., Ruddell, C. J., et al (1994)** Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1502-1503.
- Fields, S. (1993)** The two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *METHODS: A Companion to Meth. Enzymol*, **5**, 116-124.
- Fields, S. & Song, O. (1989)** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Fields, S. & Sternglanz, R. (1994)** The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet*, **10**, 286-292.
- Fischer, T. B., Arunachalam, K. V., Bailey, D., et al (2003)** The binding interface database (BID): a compilation of amino acid hot spots in protein interfaces. *Bioinformatics*, **19**, 1453-1454.
- Fling, S. P. & Gregerson, D. S. (1986)** Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem*, **155**, 83-88.
- Formstecher, E., Aresta, S., Collura, V., et al (2005)** Protein interaction mapping: a Drosophila case study. *Genome Res*, **15**, 376-384.
- Fraser, H. B., Hirsh, A. E., Steinmetz, L. M., et al (2002)** Evolutionary rate in the protein interaction network. *Science*, **296**, 750-752.
- Galarneau, A., Primeau, M., Trudeau, L. E., et al (2002)** Beta-lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein protein interactions. *Nat Biotechnol*, **20**, 619-622.
- Garrick-Silversmith, L. & Hartman, P. E. (1970)** Histidine-requiring mutants of Escherichia coli K12. *Genetics*, **66**, 231-244.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., et al (2002)** Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, **415**, 141-147.
- Gavin, A. C. & Superti-Furga, G. (2003)** Protein complexes and proteome organization from yeast to man. *Curr Opin Chem Biol*, **7**, 21-27.
- Gerlt, J. A. & Raushel, F. M. (2003)** Evolution of function in (beta/alpha)₈-barrel enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, **7**, 252-264.
- Gerstein, M. (1997)** A structural census of genomes: comparing bacterial, eukaryotic, and archaeal genomes in terms of protein structure. *J Mol Biol*, **274**, 562-576.
- Gerstein, M. & Krebs, W. (1998)** A database of macromolecular motions. *Nucleic Acids Res*, **26**, 4280-4290.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., et al (1992)** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1425.
- Giniger, E. & Ptashne, M. (1988)** Cooperative DNA binding of the yeast transcriptional activator GAL4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 382-386.
- Giniger, E., Varnum, S. M. & Ptashne, M. (1985)** Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*, **40**, 767-774.
- Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., et al (2003)** A protein interaction map of Drosophila melanogaster. *Science*, **302**, 1727-1736.
- Goh, C. S., Milburn, D. & Gerstein, M. (2004)** Conformational changes associated with protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 104-109.

- Goldschmidt, E. P., Cater, M. S., Matney, T. S., et al (1970)** Genetic analysis of the histidine operon in *Escherichia coli* K12. *Genetics*, **66**, 219-229.
- Golemis, E. A., Gyuris, J. & Brent, R. (1996)** Analysis of protein interactions and interaction trap/two-hybrid systems to identify interacting proteins. *Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc.)*, **Ch. 20.0 and 20.1**.
- Golemis, E. A., Serebriiskii, I. & Law, S. F. (1999)** The yeast two-hybrid system: criteria for detecting physiologically significant protein-protein interactions. *Curr Issues Mol Biol*, **1**, 31-45.
- Goncharoff, P. & Nichols, B. P. (1984)** Nucleotide sequence of *Escherichia coli* pabB indicates a common evolutionary origin of p-aminobenzoate synthetase and anthranilate synthetase. *J Bacteriol*, **159**, 57-62.
- Goncharoff, P. & Nichols, B. P. (1988)** Evolution of aminobenzoate synthases: nucleotide sequences of *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella aerogenes* pabB. *Mol Biol Evol*, **5**, 531-548.
- Goodford, P. J. (1985)** A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem*, **28**, 849-857.
- Gorbunoff, M. J. (1985)** Protein chromatography on hydroxyapatite columns. *Methods Enzymol*, **117**, 370-380.
- Guillou, F., Liao, M., Garcia-Espana, A., et al (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**, 1656-1664.
- Guthrie, C. F., G. R. (1991)** Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology (Academic Press, San Diego)*, 1-932.
- Hadley, C. & Jones, D. T. (1999)** A systematic comparison of protein structure classifications: SCOP, CATH and FSSP. *Structure Fold Des*, **7**, 1099-1112.
- Häger, M. (2001)** Ammoniak-Channeling und allosterische Kommunikation im Bienzymkomplex Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus *Thermotoga maritima*. *Diplomarbeit Universität zu Mainz*.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., et al (1993)** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816.
- He, Z., Stigers Lavoie, K. D., Bartlett, P. A., et al (2004)** Conservation of mechanism in three chorismate-utilizing enzymes. *J Am Chem Soc*, **126**, 2378-2385.
- Henderson, E. J., Nagano, H., Zalkin, H., et al (1970)** The anthranilate synthetase-anthranilate 5-phosphoribosylpyrophosphate phosphoribosyltransferase aggregate. Purification of the aggregate and regulatory properties of anthranilate synthetase. *J Biol Chem*, **245**, 1416-1423.
- Henderson, E. J. & Zalkin, H. (1971)** On the composition of anthranilate synthetase-anthranilate 5-phosphoribosylpyrophosphate phosphoribosyltransferase from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, **246**, 6891-6898.
- Hennig, L. (1999)** WinGene/WinPep: user-friendly software for the analysis of amino acid sequences. *Biotechniques*, **26**, 1170-1172.

- Hennig, M., Jansonius, J. N., Terwisscha van Scheltinga, A. C., et al (1995)** Crystal structure of concanavalin B at 1.65 Å resolution. An "inactivated" chitinase from seeds of *Canavalia ensiformis*. *J Mol Biol*, **254**, 237-246.
- Hennig, M., Schlesier, B., Dauter, Z., et al (1992)** A TIM barrel protein without enzymatic activity? Crystal-structure of narbonin at 1.8 Å resolution. *FEBS Lett*, **306**, 80-84.
- Hennig, M., Sterner, R., Kirschner, K., et al (1997)** Crystal structure at 2.0 Å resolution of phosphoribosyl anthranilate isomerase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*: possible determinants of protein stability. *Biochemistry*, **36**, 6009-6016.
- Henn-Sax, M. (2001)** Evolution und katalytischer Mechanismus eines thermostabilen (beta-alpha)₈ Barrel Enzyms aus der Histidinbiosynthese. *Dissertation Universität zu Köln*.
- Henn-Sax, M., Hocker, B., Wilmanns, M., et al (2001)** Divergent evolution of (beta-alpha)₈-barrel enzymes. *Biol Chem*, **382**, 1315-1320.
- Henn-Sax, M., Thoma, R., Schmidt, S., et al (2002)** Two (beta-alpha)₈-barrel enzymes of histidine and tryptophan biosynthesis have similar reaction mechanisms and common strategies for protecting their labile substrates. *Biochemistry*, **41**, 12032-12042.
- Heslot, H., Gaillardin, C. (1992)** Molecular Biology and Genetic Engineering of Yeasts. *CRC Press Inc.*
- Hettwer, S. (2001)** Tryptophansynthasen bei hohen Temperaturen: Charakterisierung der thermostabilen Enzyme aus *Thermotoga maritima* und Etablierung eines Selektionssystems zur Stabilisierung thermostabiler Enzyme aus *Thermus thermophilus*. *Dissertation Universität zu Köln*.
- Hettwer, S. & Sterner, R. (2002)** A novel tryptophan synthase beta-subunit from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*. Quaternary structure, steady-state kinetics, and putative physiological role. *J Biol Chem*, **277**, 8194-8201.
- Hill, J., Donald, K. A. & Griffiths, D. E. (1991)** DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res*, **19**, 5791.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., et al (1989)** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51-59.
- Hocker, B. (2002)** Experimentelle Rekonstruktion der Evolution von Proteinen am Beispiel zweier (beta-alpha)₈ Barrel Enzyme aus der Histidinbiosynthese. *Dissertation Universität zu Köln*.
- Hocker, B. (2005)** Directed evolution of (beta-alpha)₈-barrel enzymes. *Biomol Eng*, **22**, 31-38.
- Hocker, B., Beismann-Driemeyer, S., Hettwer, S., et al (2001)** Dissection of a (beta-alpha)₈-barrel enzyme into two folded halves. *Nat Struct Biol*, **8**, 32-36.
- Hocker, B., Claren, J. & Sterner, R. (2004)** Mimicking enzyme evolution by generating new (beta-alpha)₈-barrels from (beta-alpha)₄-half-barrels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 16448-16453.
- Hocker, B., Jurgens, C., Wilmanns, M., et al (2001)** Stability, catalytic versatility and evolution of the (beta alpha)₈-barrel fold. *Curr Opin Biotechnol*, **12**, 376-381.
- Hocker, B., Schmidt, S. & Sterner, R. (2002)** A common evolutionary origin of two elementary enzyme folds. *FEBS Lett*, **510**, 133-135.
- Holm, L. & Sander, C. (1995)** Dali: a network tool for protein structure comparison. *Trends Biochem Sci*, **20**, 478-480.

- Hong, M., Zhou, F. & You, G. (2004)** Critical amino acid residues in transmembrane domain 1 of the human organic anion transporter hOAT1. *J Biol Chem*, **279**, 31478-31482.
- Hope, I. A. & Struhl, K. (1986)** Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, **46**, 885-894.
- Horowitz, N. H. (1945)** On the evolution of biochemical synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **31**, 153-157.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., et al (1989)** Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, **77**, 61-68.
- Hu, Z., Ma, B., Wolfson, H., et al (2000)** Conservation of polar residues as hot spots at protein interfaces. *Proteins*, **39**, 331-342.
- Hua, S., Guo, T., Gough, J., et al (2002)** Proteins with class alpha/beta fold have high-level participation in fusion events. *J Mol Biol*, **320**, 713-719.
- Huang, X., Holden, H. M. & Raushel, F. M. (2001)** Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem*, **70**, 149-180.
- Huang, X. & Raushel, F. M. (2000)** An engineered blockage within the ammonia tunnel of carbamoyl phosphate synthetase prevents the use of glutamine as a substrate but not ammonia. *Biochemistry*, **39**, 3240-3247.
- Huang, X. & Raushel, F. M. (2000)** Restricted passage of reaction intermediates through the ammonia tunnel of carbamoyl phosphate synthetase. *J Biol Chem*, **275**, 26233-26240.
- Hubbard, S. J. (1998)** The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1382**, 191-206.
- Hubbard, S. J., Beynon, R. J. & Thornton, J. M. (1998)** Assessment of conformational parameters as predictors of limited proteolytic sites in native protein structures. *Protein Eng*, **11**, 349-359.
- Hutter, R., Niederberger, P. & DeMoss, J. A. (1986)** Tryptophan biosynthetic genes in eukaryotic microorganisms. *Annu Rev Microbiol*, **40**, 55-77.
- Huynen, M. A., Snel, B., von Mering, C., et al (2003)** Function prediction and protein networks. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 191-198.
- Hwang, L. H. & Zalkin, H. (1971)** Multiple forms of anthranilate synthetase-anthranilate 5-phosphoribosylpyrophosphate phosphoribosyltransferase from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, **246**, 2338-2345.
- Hyde, C. C., Ahmed, S. A., Padlan, E. A., et al (1988)** Three-dimensional structure of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, **263**, 17857-17871.
- 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.
- Imhof, M. O., Chatellard, P. & Mermod, N. (2000)** A regulatory network for the efficient control of transgene expression. *J Gene Med*, **2**, 107-116.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., et al (1983)** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, **153**, 163-168.

- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., et al (2001)** A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4569-4574.
- Ivens, A. (1998)** Characterization of Anthranilate Synthase and Anthranilate Phosphoribosyltransferase from *Thermotoga maritima* and *Sulfolobus solfataricus*. *Dissertation Universität zu Basel*.
- Jaenicke, R. (1999)** Stability and folding of domain proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, **71**, 155-241.
- Jaenicke, R. & Bohm, G. (1998)** The stability of proteins in extreme environments. *Curr Opin Struct Biol*, **8**, 738-748.
- Jaenicke, R. & Bohm, G. (2001)** Thermostability of proteins from *Thermotoga maritima*. *Methods Enzymol*, **334**, 438-469.
- Jaenicke, R. & Sterner, R. (2003)** Protein design at the crossroads of biotechnology, chemistry, theory, and evolution. *Angew Chem Int Ed Engl*, **42**, 140-142.
- James, P., Halladay, J. & Craig, E. A. (1996)** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-1436.
- Jensen, R. A. (1996)** Evolution of metabolic pathways in enteric bacteria, in Neidhardt *et al.*: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. *ASM Press, Washington*, **2**, 2649-2662.
- Johnson, W. C. J. (1990)** Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins*, **7**, 205-214.
- Jones, S. & Thornton, J. M. (1996)** Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13-20.
- Joseph, D., Petsko, G. A. & Karplus, M. (1990)** Anatomy of a conformational change: hinged "lid" motion of the triosephosphate isomerase loop. *Science*, **249**, 1425-1428.
- Jousse, C., Averous, J., Bruhat, A., et al (2004)** Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun*, **313**, 447-452.
- Jürgens, C. (2000)** Änderung des Substratspektrums der 5'ProFAR-Isomerase aus *Thermotoga maritima* durch gerichtete Evolution. *Diplomarbeit Georg-August-Universität zu Göttingen*.
- Jürgens, C., Strom, A., Wegener, D., et al (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**, 9925-9930.
- Kane, J. F. (1977)** Regulation of a common amidotransferase subunit. *J Bacteriol*, **132**, 419-425.
- Kane, J. F., Holmes, W. M. & Jensen, R. A. (1972)** Metabolic interlock. The dual function of a folate pathway gene as an extra-operonic gene of tryptophan biosynthesis. *J Biol Chem*, **247**, 1587-1596.
- Kanno, T., Kasai, K., Ikejiri-Kanno, Y., et al (2004)** In vitro reconstitution of rice anthranilate synthase: distinct functional properties of the alpha subunits OASA1 and OASA2. *Plant Mol Biol*, **54**, 11-22.
- Kaplan, J. B., Goncharoff, P., Seibold, A. M., et al (1984)** Nucleotide sequence of the *Acinetobacter calcoaceticus* trpGDC gene cluster. *Mol Biol Evol*, **1**, 456-472.
- Kaplan, J. B., Merkel, W. K. & Nichols, B. P. (1985)** Evolution of glutamine amidotransferase genes. Nucleotide sequences of the pabA genes from *Salmonella*

- typhimurium, *Klebsiella aerogenes* and *Serratia marcescens*. *J Mol Biol*, **183**, 327-340.
- Kaplan, J. B. & Nichols, B. P. (1983)** Nucleotide sequence of *Escherichia coli* *pabA* and its evolutionary relationship to *trp(G)D*. *J Mol Biol*, **168**, 451-468.
- Kappock, T. J., Ealick, S. E. & Stubbe, J. (2000)** Modular evolution of the purine biosynthetic pathway. *Curr Opin Chem Biol*, **4**, 567-572.
- Karimova, G., Ladant, D. & Ullmann, A. (2002)** Two-hybrid systems and their usage in infection biology. *Int J Med Microbiol*, **292**, 17-25.
- Kempner, E. S. (1993)** Movable lobes and flexible loops in proteins. Structural deformations that control biochemical activity. *FEBS Lett*, **326**, 4-10.
- Kiel, C., Serrano, L. & Herrmann, C. (2004)** A detailed thermodynamic analysis of *ras*/effector complex interfaces. *J Mol Biol*, **340**, 1039-1058.
- Kim, C. W., Markiewicz, P., Lee, J. J., et al (1993)** Studies of the hyperthermophile *Thermotoga maritima* by random sequencing of cDNA and genomic libraries. Identification and sequencing of the *trpEG (D)* operon. *J Mol Biol*, **231**, 960-981.
- Kim, D. S., Lee, I. S., Jang, C. S., et al (2005)** Characterization of the altered anthranilate synthase in 5-methyltryptophan-resistant rice mutants. *Plant Cell Rep*.
- Kim, J., Howell, S., Huang, X., et al (2002)** Structural defects within the carbamate tunnel of carbamoyl phosphate synthetase. *Biochemistry*, **41**, 12575-12581.
- Kishore, G. M. & Shah, D. M. (1988)** Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu Rev Biochem*, **57**, 627-663.
- Klapper, M. H. (1977)** The independent distribution of amino acid near neighbor pairs into polypeptides. *Biochem Biophys Res Commun*, **78**, 1018-1024.
- Klem, T. J., Chen, Y. & Davisson, V. J. (2001)** Subunit interactions and glutamine utilization by *Escherichia coli* imidazole glycerol phosphate synthase. *J Bacteriol*, **183**, 989-996.
- Klem, T. J. & Davisson, V. J. (1993)** Imidazole glycerol phosphate synthase: the glutamine amidotransferase in histidine biosynthesis. *Biochemistry*, **32**, 5177-5186.
- Knochel, T., Ivens, A., Hester, G., et al (1999)** The crystal structure of anthranilate synthase from *Sulfolobus solfataricus*: functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9479-9484.
- Kobayashi, N., Yamato, T. & Go, N. (1997)** Mechanical property of a TIM-barrel protein. *Proteins*, **28**, 109-116.
- Kolter, R. & Yanofsky, C. (1982)** Attenuation in amino acid biosynthetic operons. *Annu Rev Genet*, **16**, 113-134.
- Korolev, S., Skarina, T., Evdokimova, E., et al (2002)** Crystal structure of glutamine amidotransferase from *Thermotoga maritima*. *Proteins*, **49**, 420-422.
- Kortemme, T. & Baker, D. (2002)** A simple physical model for binding energy hot spots in protein-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14116-14121.
- Kortemme, T., Kim, D. E. & Baker, D. (2004)** Computational alanine scanning of protein-protein interfaces. *Sci STKE*, **2004**, pl2.
- Kortemme, T., Morozov, A. V. & Baker, D. (2003)** An orientation-dependent hydrogen bonding potential improves prediction of specificity and structure for proteins and protein-protein complexes. *J Mol Biol*, **326**, 1239-1259.

- Kouadio, J. L., Horn, J. R., Pal, G., et al (2005)** Shot-gun alanine-scanning shows that growth hormone can bind productively to its receptor through a drastically minimized interface. *J Biol Chem*.
- Kovach, J. S., Berberich, M. A., Venetianer, P., et al (1969)** Repression of the histidine operon: effect of the first enzyme on the kinetics of repression. *J Bacteriol*, **97**, 1283-1290.
- Krahn, J. M., Kim, J. H., Burns, M. R., et al (1997)** Coupled formation of an amidotransferase interdomain ammonia channel and a phosphoribosyltransferase active site. *Biochemistry*, **36**, 11061-11068.
- Kuenzler, M., Balmelli, T., Egli, C. M., et al (1993)** Cloning, primary structure, and regulation of the HIS7 gene encoding a bifunctional glutamine amidotransferase: cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **175**, 5548-5558.
- Kumar, A. & Snyder, M. (2002)** Protein complexes take the bait. *Nature*, **415**, 123-124.
- Kumar, S., Ma, B., Tsai, C. J., et al (1999)** Folding funnels and conformational transitions via hinge-bending motions. *Cell Biochem Biophys*, **31**, 141-164.
- Kunkel, T. A., Roberts, J. D. & Zakour, R. A (1987)** Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol*, **154**, 367-382.
- Kusmierczyk, A. R. & Martin, J. (2001)** Chaperonins--keeping a lid on folding proteins. *FEBS Lett*, **505**, 343-347.
- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lakey, J. H. & Raggett, E. M. (1998)** Measuring protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol*, **8**, 119-123.
- Lang, D., Thoma, R., Henn-Sax, M., et al (2000)** Structural evidence for evolution of the beta/alpha barrel scaffold by gene duplication and fusion. *Science*, **289**, 1546-1550.
- Langlands, K., Yin, X., Anand, G., et al (1997)** Differential interactions of Id proteins with basic-helix-loop-helix transcription factors. *J Biol Chem*, **272**, 19785-19793.
- Larsen, T. M., Boehlein, S. K., Schuster, S. M., et al (1999)** Three-dimensional structure of *Escherichia coli* asparagine synthetase B: a short journey from substrate to product. *Biochemistry*, **38**, 16146-16157.
- Lazcano, A., Fox, G. E., 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., et al (1994)** Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal Biochem*, **219**, 164.
- Legrain, P., Wojcik, J. & Gauthier, J. M. (2001)** Protein--protein interaction maps: a lead towards cellular functions. *Trends Genet*, **17**, 346-352.
- Leopoldseder, S., Claren, J., Jurgens, C., et al (2004)** Interconverting the catalytic activities of (beta/alpha)₈-barrel enzymes from different metabolic pathways: sequence requirements and molecular analysis. *J Mol Biol*, **337**, 871-879.
- Lesk, A. M. (2001)** Introduction to protein architecture. *Oxford Press*.
- Lesk, A. M., Branden, C. I. & Chothia, C. (1989)** Structural principles of alpha/beta barrel proteins: the packing of the interior of the sheet. *Proteins*, **5**, 139-148.
- Li, Y., Urrutia, M., Smith-Gill, S. J., et al (2003)** Dissection of binding interactions in the complex between the anti-lysozyme antibody HyHEL-63 and its antigen. *Biochemistry*, **42**, 11-22.

- Liang, P. H. & Anderson, K. S. (1998)** Substrate channeling and domain-domain interactions in bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase. *Biochemistry*, **37**, 12195-12205.
- Lichtarge, O. (2001)** Getting past appearances: the many-fold consequences of remote homology. *Nat Struct Biol*, **8**, 918-920.
- Lichtarge, O. & Sowa, M. E. (2002)** Evolutionary predictions of binding surfaces and interactions. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 21-27.
- Lilie, H., Schwarz, E. & Rudolph, R. (1998)** Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol*, **9**, 497-501.
- Link, A. J., Phillips, D. & Church, G. M. (1997)** Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol*, **179**, 6228-6237.
- Lloyd, J. A., McGrew, D. A. & Knight, K. L. (2005)** Identification of residues important for DNA binding in the full-length human Rad52 protein. *J Mol Biol*, **345**, 239-249.
- Lo Conte, L., Chothia, C. & Janin, J. (1999)** The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol*, **285**, 2177-2198.
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998)** Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*.
- Luger, K., Hommel, U., Herold, M., et al (1989)** Correct folding of circularly permuted variants of a beta alpha barrel enzyme in vivo. *Science*, **243**, 206-210.
- Lynch, M. & Conery, J. S. (2000)** The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, **290**, 1151-1155.
- Macol, C. P., Tsuruta, H., Stec, B., et al (2001)** Direct structural evidence for a concerted allosteric transition in *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Nat Struct Biol*, **8**, 423-426.
- Mahan, S. D., Ireton, G. C., Stoddard, B. L., et al (2004)** Alanine-scanning mutagenesis reveals a cytosine deaminase mutant with altered substrate preference. *Biochemistry*, **43**, 8957-8964.
- Marcotte, E. M., Pellegrini, M., Ng, H. L., et al (1999)** Detecting protein function and protein-protein interactions from genome sequences. *Science*, **285**, 751-753.
- Mareya, S. M. & Raushel, F. M. (1994)** A molecular wedge for triggering the amidotransferase activity of carbamoyl phosphate synthetase. *Biochemistry*, **33**, 2945-2950.
- Marqusee, S., Robbins, V. H. & Baldwin, R. L. (1989)** Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5286-5290.
- Martin, R. G., Berberich, M.A., Ames, B.N, Davis, W.W, Goldberger, R.F, Yourno, J.D, (1971)** Enzymes and intermediates of histidine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. **Kapitel 147**.
- Massiere, F. & Badet-Denisot, M. A. (1998)** The mechanism of glutamine-dependent amidotransferases. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 205-222.
- Matsui, K., Miwa, K. & Sano, K. (1987)** Two single-base-pair substitutions causing desensitization to tryptophan feedback inhibition of anthranilate synthase and enhanced expression of tryptophan genes of *Brevibacterium lactofermentum*. *J Bacteriol*, **169**, 5330-5332.
- Mattevi, A., Obmolova, G., Schulze, E., et al (1992)** Atomic structure of the cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Science*, **255**, 1544-1550.

- Mazurie, A., Bottani, S. & Vergassola, M. (2005)** An evolutionary and functional assessment of regulatory network motifs. *Genome Biol*, **6**, R35.
- Meister, A. (1989)** Mechanism and regulation of the glutamine-dependent carbamyl phosphate synthetase of *Escherichia coli*. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **62**, 315-374.
- Miles, B. W., Banzon, J. A. & Raushel, F. M. (1998)** Regulatory control of the amidotransferase domain of carbamoyl phosphate synthase. *Biochemistry*, **37**, 16773-16779.
- Miles, B. W. & Raushel, F. M. (2000)** Synchronization of the three reaction centers within carbamoyl phosphate synthetase. *Biochemistry*, **39**, 5051-5056.
- 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. & Davies, D. R. (1999)** The molecular basis of substrate channeling. *J Biol Chem*, **274**, 12193-12196.
- Moore, S. A. & James, M. N. (1995)** Structural refinement of the non-fluorescent flavoprotein from *Photobacterium leiognathi* at 1.60 Å resolution. *J Mol Biol*, **249**, 195-214.
- Morollo, A. A. & Bauerle, R. (1993)** Characterization of composite aminodeoxyisochorismate synthase and aminodeoxyisochorismate lyase activities of anthranilate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9983-9987.
- Morollo, A. A. & Eck, M. J. (2001)** Structure of the cooperative allosteric anthranilate synthase from *Salmonella typhimurium*. *Nat Struct Biol*, **8**, 243-247.
- Morrison, K. L. & Weiss, G. A. (2001)** Combinatorial alanine-scanning. *Curr Opin Chem Biol*, **5**, 302-307.
- Moyed, H. S. & Magasanik, B. (1960)** The biosynthesis of the imidazole ring of histidine. *J Biol Chem*, **235**, 149-153.
- Muchmore, C. R., Krahn, J. M., Kim, J. H., et al (1998)** Crystal structure of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from *Escherichia coli*. *Protein Sci*, **7**, 39-51.
- Mullins, L. S., Raushel, F.M. (1999)** Channeling of ammonia through the intermolecular tunnel contained within carbamoyl phosphate synthase. *J Am Chem Soc*, **121**, 3803-3804.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987)** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- Myers, R. S., Jensen, J. R., Deras, I. L., et al (2003)** Substrate-induced changes in the ammonia channel for imidazole glycerol phosphate synthase. *Biochemistry*, **42**, 7013-7022.
- Nagano, N., Orenge, C. A. & Thornton, J. M. (2002)** One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J Mol Biol*, **321**, 741-765.
- Nagradova, N. (2003)** Interdomain communications in bifunctional enzymes: how are different activities coordinated? *IUBMB Life*, **55**, 459-466.
- Nagradova, N. K. (2001)** Interdomain interactions in oligomeric enzymes: creation of asymmetry in homo-oligomers and role in metabolite channeling between active centers of hetero-oligomers. *FEBS Lett*, **487**, 327-332.

- Najmanovich, R., Kuttner, J., Sobolev, V., *et al* (2000) Side-chain flexibility in proteins upon ligand binding. *Proteins*, **39**, 261-268.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., *et al* (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, **399**, 323-329.
- Nelson, M., McClelland, M. (1992) Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. *Methods Enzymol*, **216**, 279-303.
- Nichols, B. P., Miozzari, G. F., van Cleemput, M., *et al* (1980) Nucleotide sequences of the *trpG* regions of *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium* and *Serratia marcescens*. *J Mol Biol*, **142**, 503-517.
- Nooren, I. M. & Thornton, J. M. (2003) Diversity of protein-protein interactions. *Embo J*, **22**, 3486-3492.
- Nooren, I. M. & Thornton, J. M. (2003) Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. *J Mol Biol*, **325**, 991-1018.
- Nyfeler, B., Michnick, S. W. & Hauri, H. P. (2005) Capturing protein interactions in the secretory pathway of living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 6350-6355.
- Nygren, P. A. & Uhlen, M. (1997) Scaffolds for engineering novel binding sites in proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 463-469.
- O'Donoghue, P., Amaro, R. E. & Luthey-Schulten, Z. (2001) On the structure of hisH: protein structure prediction in the context of structural and functional genomics. *J Struct Biol*, **134**, 257-268.
- Ofran, Y. & Rost, B. (2003) Analysing six types of protein-protein interfaces. *J Mol Biol*, **325**, 377-387.
- Ofran, Y. & Rost, B. (2003) Predicted protein-protein interaction sites from local sequence information. *FEBS Lett*, **544**, 236-239.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., *et al* (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng*, **5**, 197-211.
- Omi, R., Mizuguchi, H., Goto, M., *et al* (2002) Structure of imidazole glycerol phosphate synthase from *Thermus thermophilus* HB8: open-closed conformational change and ammonia tunneling. *J Biochem (Tokyo)*, **132**, 759-765.
- Orengo, C. A., Bray, J. E., Hubbard, T., *et al* (1999) Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction. *Proteins, Suppl 3*, 149-170.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., *et al* (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*, **4**, 2411-2423.
- Pagel, P., Kovac, S., Oesterheld, M., *et al* (2005) The MIPS mammalian protein-protein interaction database. *Bioinformatics*, **21**, 832-834.
- Pal, G., Ultsch, M. H., Clark, K. P., *et al* (2005) Intramolecular cooperativity in a protein binding site assessed by combinatorial shotgun scanning mutagenesis. *J Mol Biol*, **347**, 489-494.
- Paluh, J. L., Zalkin, H., Betsch, D., *et al* (1985) Study of anthranilate synthase function by replacement of cysteine 84 using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, **260**, 1889-1894.
- Pan, P., Woehl, E. & Dunn, M. F. (1997) Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends Biochem Sci*, **22**, 22-27.

- Papworth, C., Braman, J., Wright, D.D. (1996)** *Strategies*, **9**, 3-4.
- Pawlyk, A. C. & Pettigrew, D. W. (2002)** Transplanting allosteric control of enzyme activity by protein-protein interactions: coupling a regulatory site to the conserved catalytic core. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11115-11120.
- Pawson, T. & Nash, P. (2003)** Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*, **300**, 445-452.
- Pazos, F. & Valencia, A. (2001)** Similarity of phylogenetic trees as indicator of protein-protein interaction. *Protein Eng*, **14**, 609-614.
- Petsko, G. A. (2001)** Design by necessity. *Genome Biol*, **2**, COMMENT1010.
- Piehler, J. (2005)** New methodologies for measuring protein interactions in vivo and in vitro. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 4-14.
- Piette, J., Nyunoya, H., Lusty, C. J., et al (1984)** DNA sequence of the carA gene and the control region of carAB: tandem promoters, respectively controlled by arginine and the pyrimidines, regulate the synthesis of carbamoyl-phosphate synthetase in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 4134-4138.
- Pokala, N. & Handel, T. M. (2001)** Review: protein design--where we were, where we are, where we're going. *J Struct Biol*, **134**, 269-281.
- Queener, S. W., Queener, S. F., Meeks, J. R., et al (1973)** Anthranilate synthase from *Pseudomonas putida*. Purification and properties of a two-component enzyme. *J Biol Chem*, **248**, 151-161.
- Rain, J. C., Selig, L., De Reuse, H., et al (2001)** The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature*, **409**, 211-215.
- Ramos, I. & Downs, D. M. (2003)** Anthranilate synthase can generate sufficient phosphoribosyl amine for thiamine synthesis in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, **185**, 5125-5132.
- Raushel, F. M., Thoden, J. B. & Holden, H. M. (1999)** The amidotransferase family of enzymes: molecular machines for the production and delivery of ammonia. *Biochemistry*, **38**, 7891-7899.
- Reardon, D. & Farber, G. K. (1995)** The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins. *Faseb J*, **9**, 497-503.
- Reed, G. H., Poyner, R. R., Larsen, T. M., et al (1996)** Structural and mechanistic studies of enolase. *Curr Opin Struct Biol*, **6**, 736-743.
- Rhee, S., Parris, K. D., Hyde, C. C., et al (1997)** Crystal structures of a mutant (betaK87T) tryptophan synthase alpha2beta2 complex with ligands bound to the active sites of the alpha- and beta-subunits reveal ligand-induced conformational changes. *Biochemistry*, **36**, 7664-7680.
- Rieder, G., Merrick, M. J., Castorph, H., et al (1994)** Function of hisF and hisH gene products in histidine biosynthesis. *J Biol Chem*, **269**, 14386-14390.
- Rison, S. C. & Thornton, J. M. (2002)** Pathway evolution, structurally speaking. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 374-382.
- Robb, F., Hutchinson, M. A. & Belser, W. L. (1971)** Anthranilate synthetase. Some physical and kinetic properties of the enzyme from *Serratia marcescens*. *J Biol Chem*, **246**, 6908-6912.
- Romero, R. M., Roberts, M. F. & Phillipson, J. D. (1995)** Anthranilate synthase in microorganisms and plants. *Phytochemistry*, **39**, 263-276.

- Rondard, P. & Bedouelle, H. (2000)** Mutational scanning of a hairpin loop in the tryptophan synthase beta-subunit implicated in allostery and substrate channeling. *Biol Chem*, **381**, 1185-1193.
- Rose, G. D., Geselowitz, A. R., Lesser, G. J., et al (1985)** Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins. *Science*, **229**, 834-838.
- Rossomando, E. F. (1990)** Ion-exchange chromatography. *Methods Enzymol*, **182**, 309-317.
- Rost, B., Liu, J., Nair, R., et al (2003)** Automatic prediction of protein function. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 2637-2650.
- Routledge, E. J. & Sumpter, J. P. (1997)** Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J Biol Chem*, **272**, 3280-3288.
- Roy, S. (1999)** Multifunctional enzymes and evolution of biosynthetic pathways: retro-evolution by jumps. *Proteins*, **37**, 303-309.
- Rubino, S. D., Nyunoya, H. & 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**, 4382-4386.
- Rudolph, R. & Lilie, H. (1996)** In vitro folding of inclusion body proteins. *Faseb J*, **10**, 49-56.
- Rudolph, R., Siebendritt, R. & Kiefhaber, T. (1992)** Reversible unfolding and refolding behavior of a monomeric aldolase from Staphylococcus aureus. *Protein Sci*, **1**, 654-666.
- Russell, R. B., Alber, F., Aloy, P., et al (2004)** A structural perspective on protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 313-324.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., et al (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Saks, M. E., Sampson, J. R. & Abelson, J. (1998)** Evolution of a transfer RNA gene through a point mutation in the anticodon. *Science*, **279**, 1665-1670.
- Samanta, M. P. & Liang, S. (2003)** Predicting protein functions from redundancies in large-scale protein interaction networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12579-12583.
- Sambrook, J., Fritsch, E. E. and Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. *New York: Cold Spring Harbour*.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sawula, R. V. & Crawford, I. P. (1972)** Mapping of the tryptophan genes of Acinetobacter calcoaceticus by transformation. *J Bacteriol*, **112**, 797-805.
- Sawula, R. V. & Crawford, I. P. (1973)** Anthranilate synthetase of Acinetobacter calcoaceticus. Separation and partial characterization of subunits. *J Biol Chem*, **248**, 3573-3581.
- Schagger, 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**, 368-379.
- Schechtman, M. G. & Yanofsky, C. (1983)** Structure of the trifunctional trp-1 gene from Neurospora crassa and its aberrant expression in Escherichia coli. *J Mol Appl Genet*, **2**, 83-99.
- Schiestl, R. H. & Gietz, R. D. (1989)** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet*, **16**, 339-346.

- Schmid, F. X. (1997)** Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. *Protein structure: A practical approach.*, (ed. T. E. Creighton), Oxford: IRL Press, 259-295.
- Schmidt, S. (1999)** Identifizierung von katalytisch essentiellen Aminosäuren der 5'-ProFAR-Isomerase aus *Thermotoga maritima*. *Diplomarbeit, Universität Göttingen*.
- Schneider, S., Buchert, M. & Hovens, C. M. (1996)** An in vitro assay of beta-galactosidase from yeast. *Biotechniques*, **20**, 960-962.
- Schneider, T. R., Gerhardt, E., Lee, M., et al (1998)** Loop closure and intersubunit communication in tryptophan synthase. *Biochemistry*, **37**, 5394-5406.
- Schneider, W. P., Nichols, B. P. & 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**, 2169-2173.
- Schofield, C. M., Trudell, J. R. & Harrison, N. L. (2004)** Alanine-scanning mutagenesis in the signature disulfide loop of the glycine receptor alpha 1 subunit: critical residues for activation and modulation. *Biochemistry*, **43**, 10058-10063.
- Schreiber, G. (2002)** Kinetic studies of protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 41-47.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., et al (2003)** SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3381-3385.
- Schwikowski, B., Uetz, P. & Fields, S. (2000)** A network of protein-protein interactions in yeast. *Nat Biotechnol*, **18**, 1257-1261.
- Seibert, C. M. & Raushel, F. M. (2005)** Structural and Catalytic Diversity within the Amidohydrolase Superfamily. *Biochemistry*, **44**, 6383-6391.
- Serebriiskii, I. G. & Golemis, E. A. (2000)** Uses of lacZ to study gene function: evaluation of beta-galactosidase assays employed in the yeast two-hybrid system. *Anal Biochem*, **285**, 1-15.
- Sharan, R., Suthram, S., Kelley, R. M., et al (2005)** Conserved patterns of protein interaction in multiple species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1974-1979.
- Sharp, P. A., Sugden, B. & Sambrook, J. (1973)** Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, **12**, 3055-3063.
- Sheinerman, F. B., Norel, R. & Honig, B. (2000)** Electrostatic aspects of protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 153-159.
- Shifman, J. M. & Mayo, S. L. (2002)** Modulating calmodulin binding specificity through computational protein design. *J Mol Biol*, **323**, 417-423.
- Simpson, R. J. & Dorow, D. S. (2001)** Cancer proteomics: from signaling networks to tumor markers. *Trends Biotechnol*, **19**, S40-48.
- Slock, J., Stahly, D. P., Han, C. Y., et al (1990)** An apparent *Bacillus subtilis* folic acid biosynthetic operon containing pab, an amphibolic trpG gene, a third gene required for synthesis of para-aminobenzoic acid, and the dihydropteroate synthase gene. *J Bacteriol*, **172**, 7211-7226.
- Smith, G. (1998)** Patch engineering: a general approach for creating proteins that have new binding activities. *Trends Biochem Sci*, **23**, 457-460.
- Smith, G. R. & Sternberg, M. J. (2002)** Prediction of protein-protein interactions by docking methods. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 28-35.

- Smith, J. L. (1995)** Structures of glutamine amidotransferases from the purine biosynthetic pathway. *Biochem Soc Trans*, **23**, 894-898.
- Spraggon, G., Kim, C., Nguyen-Huu, X., et al (2001)** The structures of anthranilate synthase of *Serratia marcescens* crystallized in the presence of (i) its substrates, chorismate and glutamine, and a product, glutamate, and (ii) its end-product inhibitor, L-tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6021-6026.
- Sprinzak, E., Sattath, S. & Margalit, H. (2003)** How reliable are experimental protein-protein interaction data? *J Mol Biol*, **327**, 919-923.
- Stan, R., McLaughlin, M. M., Cafferkey, R., et al (1994)** Interaction between FKBP12-rapamycin and TOR involves a conserved serine residue. *J Biol Chem*, **269**, 32027-32030.
- Stark, G. R. (1965)** Reactions of cyanate with functional groups of proteins. 3. Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry*, **4**, 1030-1036.
- Stephens, D. J. & Banting, G. (2000)** The use of yeast two-hybrid screens in studies of protein:protein interactions involved in trafficking. *Traffic*, **1**, 763-768.
- Sterner, R., Dahm, A., Darimont, B. et al (1995)** (Beta alpha)₈ barrel proteins of tryptophan biosynthesis in the hyperthermophilic *Thermotoga maritima*. *EMBO*, **18**, 4395-402.
- Sterner, R., Kleemann, G. R., Szadkowski, H., et al (1996)** Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer. *Protein Sci*, **5**, 2000-2008.
- Sterner, R. & Liebl, W. (2001)** Thermophilic adaptation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **36**, 39-106.
- Sterner, R., Merz, A., Thoma, R., et al (2001)** Phosphoribosylanthranilate isomerase and indoleglycerol-phosphate synthase: tryptophan biosynthetic enzymes from *Thermotoga maritima*. *Methods Enzymol*, **331**, 270-280.
- Sterner, R. & Schmid, F. X. (2004)** Biochemistry. De novo design of an enzyme. *Science*, **304**, 1916-1917.
- Stryer, L. (1996)** Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*, **4. Auflage**.
- Stubbe, J., Johnson, L.N. (1998)** Catalysis and regulation channels, terpenes and phosphates. *Curr Opin Struct Biol*, **8**, 675-678.
- 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., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., et al (1990)** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, **185**, 60-89.
- Suel, G. M., Lockless, S. W., Wall, M. A., et al (2003)** Evolutionarily conserved networks of residues mediate allosteric communication in proteins. *Nat Struct Biol*, **10**, 59-69.
- Sun, J. & Sampson, N. S. (1999)** Understanding protein lids: kinetic analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, **38**, 11474-11481.
- Tafelmeyer, P., Johnsson, N. & Johnsson, K. (2004)** Transforming a (beta/alpha)₈-barrel enzyme into a split-protein sensor through directed evolution. *Chem Biol*, **11**, 681-689.
- Tamir, H. & Srinivasan, P. R. (1972)** Studies of the mechanism of anthranilate synthase. Evidence for an acyl-enzyme. *J Biol Chem*, **247**, 1153-1155.

- Tang, X. F., Ezaki, S., Atomi, H., et al (2001)** Anthranilate synthase without an LLES motif from a hyperthermophilic archaeon is inhibited by tryptophan. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 858-865.
- Teplyakov, A., Obmolova, G., Badet-Denisot, M. A., et al (1998)** Involvement of the C terminus in intramolecular nitrogen channeling in glucosamine 6-phosphate synthase: evidence from a 1.6 Å crystal structure of the isomerase domain. *Structure*, **6**, 1047-1055.
- Tesmer, J. J., Klem, T. J., Deras, M. L., et al (1996)** The crystal structure of GMP synthetase reveals a novel catalytic triad and is a structural paradigm for two enzyme families. *Nat Struct Biol*, **3**, 74-86.
- Thoden, J. B., Holden, H. M., Wesenberg, G., et al (1997)** Structure of carbamoyl phosphate synthetase: a journey of 96 Å from substrate to product. *Biochemistry*, **36**, 6305-6316.
- Thoden, J. B., Huang, X., Kim, J., et al (2004)** Long-range allosteric transitions in carbamoyl phosphate synthetase. *Protein Sci*, **13**, 2398-2405.
- Thoden, J. B., Huang, X., Raushel, F. M., et al (1999)** The small subunit of carbamoyl phosphate synthetase: snapshots along the reaction pathway. *Biochemistry*, **38**, 16158-16166.
- Thoden, J. B., Huang, X., Raushel, F. M., et al (2002)** Carbamoyl-phosphate synthetase. Creation of an escape route for ammonia. *J Biol Chem*, **277**, 39722-39727.
- Thoma, R., Hennig, M., Sterner, R., et al (2000)** Structure and function of mutationally generated monomers of dimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from *Thermotoga maritima*. *Structure Fold Des*, **8**, 265-276.
- Thoma, R., Obmolova, G., Lang, D. A., et al (1999)** Efficient expression, purification and crystallisation of two hyperthermostable enzymes of histidine biosynthesis. *FEBS Lett*, **454**, 1-6.
- Thoma, R., Schwander, M., Liebl, W., et al (1998)** A histidine gene cluster of the hyperthermophile *Thermotoga maritima*: sequence analysis and evolutionary significance. *Extremophiles*, **2**, 379-389.
- Thorn, K. S. & Bogan, A. A. (2001)** ASEdb: a database of alanine mutations and their effects on the free energy of binding in protein interactions. *Bioinformatics*, **17**, 284-285.
- Toby, G. G. & Golemis, E. A. (2001)** Using the yeast interaction trap and other two-hybrid-based approaches to study protein-protein interactions. *Methods*, **24**, 201-217.
- Tsai, C. J. & Nussinov, R. (1997)** Hydrophobic folding units at protein-protein interfaces: implications to protein folding and to protein-protein association. *Protein Sci*, **6**, 1426-1437.
- Tsai, C. J., Xu, D. & Nussinov, R. (1997)** Structural motifs at protein-protein interfaces: protein cores versus two-state and three-state model complexes. *Protein Sci*, **6**, 1793-1805.
- Tsai, F. Y., Brotherton, J. E. & Widholm, J. M. (2005)** Overexpression of the feedback-insensitive anthranilate synthase gene in tobacco causes tryptophan accumulation. *Plant Cell Rep*, **23**, 548-556.
- Tutino, M. L., Scarano, G., Marino, G., et al (1993)** Tryptophan biosynthesis genes *trpEGC* in the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol*, **175**, 299-302.

- Uetz, P. (2002) Two-hybrid arrays. *Curr Opin Chem Biol*, **6**, 57-62.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., *et al* (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **403**, 623-627.
- Urfer, R. & Kirschner, K. (1992) The importance of surface loops for stabilizing an eightfold beta alpha barrel protein. *Protein Sci*, **1**, 31-45.
- Valdar, W. S. & Thornton, J. M. (2001) Protein-protein interfaces: analysis of amino acid conservation in homodimers. *Proteins*, **42**, 108-124.
- Valencia, A. & Pazos, F. (2002) Computational methods for the prediction of protein interactions. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 368-373.
- Valerius, O., Draht, O., Kubler, E., *et al* (2001) Regulation of hisHF transcription of *Aspergillus nidulans* by adenine and amino acid limitation. *Fungal Genet Biol*, **32**, 21-31.
- van den Heuvel, R. H., Curti, B., Vanoni, M. A., *et al* (2004) Glutamate synthase: a fascinating pathway from L-glutamine to L-glutamate. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 669-681.
- van den Heuvel, R. H., Svergun, D. I., Petoukhov, M. V., *et al* (2003) The active conformation of glutamate synthase and its binding to ferredoxin. *J Mol Biol*, **330**, 113-128.
- Vanoni, M. A. & Curti, B. (2005) Structure--function studies on the iron-sulfur flavoenzyme glutamate synthase: an unexpectedly complex self-regulated enzyme. *Arch Biochem Biophys*, **433**, 193-211.
- Vaughan, C. K., Buckle, A. M. & Fersht, A. R. (1999) Structural response to mutation at a protein-protein interface. *J Mol Biol*, **286**, 1487-1506.
- Vega, M. C., Lorentzen, E., Linden, A., *et al* (2003) Evolutionary markers in the (beta/alpha)₈-barrel fold. *Curr Opin Chem Biol*, **7**, 694-701.
- Vergnon, A. L. & Chu, Y. H. (1999) Electrophoretic methods for studying protein-protein interactions. *Methods*, **19**, 270-277.
- Vita, C. (1997) Engineering novel proteins by transfer of active sites to natural scaffolds. *Curr Opin Biotechnol*, **8**, 429-434.
- Voet, D. & Voet, J.G. (1995) Biochemistry. *Wiley Inc*, 2nd edition.
- von Mering, C., Jensen, L. J., Snel, B., *et al* (2005) STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res*, **33**, D433-437.
- von Mering, C., Krause, R., Snel, B., *et al* (2002) Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature*, **417**, 399-403.
- Walhout, A. J., Boulton, S. J. & Vidal, M. (2000) Yeast two-hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm. *Yeast*, **17**, 88-94.
- Walhout, A. J., Sordella, R., Lu, X., *et al* (2000) Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science*, **287**, 116-122.
- Wallach, D., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., *et al* (1998) The yeast two-hybrid screening technique and its use in the study of protein-protein interactions in apoptosis. *Curr Opin Immunol*, **10**, 131-136.
- Walsh, C. T., Erion, M. D., Walts, A. E., *et al* (1987) Chorismate aminations: partial purification of *Escherichia coli* PABA synthase and mechanistic comparison with anthranilate synthase. *Biochemistry*, **26**, 4734-4745.

- Walsh, J. B. (1995)** How often do duplicated genes evolve new functions? *Genetics*, **139**, 421-428.
- Wang, F., Li, W., Emmett, M. R., et al (1998)** Conformational and dynamic changes of Yersinia protein tyrosine phosphatase induced by ligand binding and active site mutation and revealed by H/D exchange and electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Biochemistry*, **37**, 15289-15299.
- Weaver, R. & Hedrick, P.W. (1997)** Genetics. *WCB Publishers*, **3rd edition**.
- Weber, A. L. & Miller, S. L. (1981)** Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acids. *J Mol Evol*, **17**, 273-284.
- Welch, G. R. & Easterby, J. S. (1994)** Metabolic channeling versus free diffusion: transition-time analysis. *Trends Biochem Sci*, **19**, 193-197.
- Wells, J. A. (1990)** Additivity of mutational effects in proteins. *Biochemistry*, **29**, 8509-8517.
- Wells, J. A. (1991)** Systematic mutational analyses of protein-protein interfaces. *Methods Enzymol*, **202**, 390-411.
- Wells, J. A. (1996)** Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1-6.
- Wierenga, R. K. (2001)** The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett*, **492**, 193-198.
- Wierenga, R. K., Noble, M. E., Postma, J. P., et al (1991)** The crystal structure of the "open" and the "closed" conformation of the flexible loop of trypanosomal triosephosphate isomerase. *Proteins*, **10**, 33-49.
- Wilson, G. G. & Murray, N. E. (1991)** Restriction and modification systems. *Annu Rev Genet*, **25**, 585-627.
- Wilson, K., Walker, J. L. (2000)** Principles and Techniques of Practical Biochemistry. *Cambridge Verlag*, **5th edition**.
- Winkler, M. E. (1987)** Biosynthesis of histidine. *Washington: American Society for Microbiology*.
- Winter, R., Noll, F. (1998)** Methoden der Biophysikalischen Chemie. *Teubner*.
- Wootton, J. C., Kavanagh, J. P., Baron, A. J., et al (1976)** Re-investigation of the effects of L-glutamine and L-asparagine on the *Neurospora crassa* NADP-specific glutamate dehydrogenase. *Biochem J*, **159**, 803-806.
- Xenarios, I., Salwinski, L., Duan, X. J., et al (2002)** DIP, the Database of Interacting Proteins: a research tool for studying cellular networks of protein interactions. *Nucleic Acids Res*, **30**, 303-305.
- Xiang, J., Sun, J. & Sampson, N. S. (2001)** The importance of hinge sequence for loop function and catalytic activity in the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase. *J Mol Biol*, **307**, 1103-1112.
- Yang, J., Swaminathan, C. P., Huang, Y., et al (2003)** Dissecting cooperative and additive binding energetics in the affinity maturation pathway of a protein-protein interface. *J Biol Chem*, **278**, 50412-50421.
- Yanofsky, C. (1981)** Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature*, **289**, 751-758.
- Yanofsky, C. (1984)** Comparison of regulatory and structural regions of genes of tryptophan metabolism. *Mol Biol Evol*, **1**, 143-161.

- Yanofsky, C. (1999)** Trp operon. *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Creighton, Ed., **4**, 2676-2689.
- Young, L., Jernigan, R. L. & Covell, D. G. (1994)** A role for surface hydrophobicity in protein-protein recognition. *Protein Sci*, **3**, 717-729.
- Zalkin, H. (1985)** Anthranilate synthase. *Methods Enzymol*, **113**, 287-292.
- Zalkin, H. (1985)** Glutamine amidotransferases. *Methods Enzymol*, **113**, 263-264.
- Zalkin, H. (1993)** The amidotransferases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **66**, 203-309.
- Zalkin, H. (1993)** Overview of multienzyme systems in biosynthetic pathways. *Biochem Soc Trans*, **21**, 203-207.
- Zalkin, H. & Kling, D. (1968)** Anthranilate synthetase. Purification and properties of component I from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry*, **7**, 3566-3573.
- Zalkin, H., Paluh, J. L., van Cleemput, M., et al (1984)** Nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* genes TRP2 and TRP3 encoding bifunctional anthranilate synthase: indole-3-glycerol phosphate synthase. *J Biol Chem*, **259**, 3985-3992.
- Zalkin, H., Smith, J. L. (1998)** Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **72**, 87-144.
- Zalkin, H. & Yanofsky, C. (1982)** Yeast gene TRP5: structure, function, regulation. *J Biol Chem*, **257**, 1491-1500.
- Zanzoni, A., Montecchi-Palazzi, L., Quondam, M., et al (2002)** MINT: a Molecular INTeraction database. *FEBS Lett*, **513**, 135-140.
- Zhang, X. J., Baase, W. A. & Matthews, B. W. (1992)** Multiple alanine replacements within alpha-helix 126-134 of T4 lysozyme have independent, additive effects on both structure and stability. *Protein Sci*, **1**, 761-776.
- Zhang, Z. & Palzkill, T. (2004)** Dissecting the protein-protein interface between beta-lactamase inhibitory protein and class A beta-lactamases. *J Biol Chem*, **279**, 42860-42866.

Erklärung:

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken 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. Reinhard Sterner betreut worden.

Teilpublikationen:

Haeger, M.C. & Sterner, R. (2004) Allosteric protein-protein interaction and ammonia tunneling across a (beta/alpha)₈ barrel enzyme, *Methods in Protein Structure Analysis (MPSA)*, book of abstracts, **15**, S. 58, International Association for Protein Structure Analysis and Proteomics, Seattle, USA

Haeger, M.C. (2003) Design of a novel functional protein-protein interaction: glutamine-amido-transferases as model systems, book of abstracts, Ernst Schering Research Foundation, Berlin,

8 Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren wurden gemäß der Einbuchstaben- oder Dreibuchstaben-Schreibweise abgekürzt. Bei Benennung der Selektiv-Medien für *S. cerevisiae* wurden die Aminosäuren durch ihre Anfangsbuchstaben abgekürzt.

PRFAR	N'-[(5'-phosphoribulosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid
ProFAR	N'-[(5'-phosphoribosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid
A	Absorption; Adenin; Ampère
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
<i>ade2</i>	Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase aus <i>S. cerevisiae</i>
AICAR	5'-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonucleotid
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure, Anthranilat-Synthase
ATP	Adenosintriphosphat
A_x	Absorption bei einer Wellenlänge $x \text{ nm}$
bla	β-Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	lösliche Fraktion des Zellextraktes (<i>crude extract</i>); Cytosin
c	Konzentration
ca.	circa
cat	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
CD	Circulardichroismus
cm	Zentimeter ($1 \cdot 10^{-2} \text{ m}$)
CPRG	Chlor-Phenol-Red-β-D-Galactopyranosid
CPK	Farbschema zur Darstellung von Atomen nach Corey, Pauling und Koltun
CPS	Carbamoylphosphat-Synthase

C-terminal	Carboxyterminales Ende einer Polypeptidkette
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
d. h .	das heißt
Da	Dalton [$\frac{g}{mol}$]
DALI	<i>distance matrix alignment</i>
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat (N = A, C, G oder T)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
D _x	x mM DTT
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E ₀	Enzymkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere (Autoren) (<i>et alii</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
E _x	x mM EDTA
F	Farad
f	Verdünnungsfaktor
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
fw	Zellfrischgewicht (<i>fresh weight</i>)
g	Gramm; Zentrifugalbeschleunigung
G	Guanosin
GATase	Glutamin-Amido-Transferase
GDH	Glutamat Dehydrogenase
GdmCl	Guanidiniumchlorid
H	löslicher Überstand des Hitzeschritts
h	Stunde
HEC	Hydroxyethylcellulose
<i>his</i>	Gene, die für Enzyme des Histidinbiosyntheseweges kodieren, z.B. kodiert <i>hisF</i> für das Enzym HisF
<i>his3</i>	Imidazoleglycerolphosphate Dehydratase aus <i>S. cerevisiae</i>
HisA	5'-ProFAR Isomerase

HisB	Imidazolglycerinphosphat-Dehydratase
HisF	Synthase-Einheit der ImGP-S
HisG	Adenosintriphosphat-Phosphoribosyltransferase
HisH	Glutaminase-Einheit der ImGP-S
HisI-E	Phosphoribosyl- ATP-Phosphohydrolase
His-Tag	Aminosäureschwanz bestehend aus sechs Histidinen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
i.d.R.	in der Regel
ImGP-S	Imidazolglycerinphosphat-Synthase
inkl.	inklusive
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
K	Kelvin; Gleichgewichtskonstante
K_a	thermodynamische Assoziationskonstante
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
k_{cat}	Wechselzahl
k_{cat}/K_M	katalytischer Effizienzparameter
K_d	thermodynamische Dissoziationskonstante
kDa	kiloDalton ($1 \cdot 10^3 \frac{g}{mol}$)
K_M	Michaelis-Konstante, entspricht der Enzymkonzentration, bei der halbmaximale Geschwindigkeit erreicht ist
KP	Kaliumphosphat Puffer
l	Liter
LB	Luria-Bertani (-Medium)
<i>leu2</i>	3-Isopropylmalat-Dehydrogenase aus <i>S. cerevisiae</i>
ln	natürlicher Logarithmus
log	dekadischer Logarithmus
M	Molar (mol/l); Längenstandard (Marker)
m	Steigung, Mili ($1 \cdot 10^{-3}$)
max.	maximal
min	Minute
MPa	Megapascal ($1 \cdot 10^3$ Pa)
MRW	mittleres Molekulargewicht der Aminosäuren [$\frac{g}{mol}$]
M_r	Relatives Molekulargewicht des Proteins[Da]

n	Nano ($1 \cdot 10^{-9}$)
N_A	Anzahl der Aminosäuren im Protein
NAD	Nicotinamiddinukleotid
$NADH+H^+$	reduziertes Nikotinamiddinukleotid
N_p	Anzahl der Nukleotide des Primers
N-terminal	Aminoterminales Ende einer Polypeptidkette
Ntn	N-terminales Nukleophil
O/N	über Nacht (<i>overnight</i>)
OD_x	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
ori	Replikationsstartpunkt eines Plasmids (<i>origin of replication</i>)
P	unlösliche Fraktion des Zellextraktes (Pellet)
<i>P. aerophilum</i>	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Datenbank
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pHisF	HisF aus <i>Pyrobaculum aerophilum</i>
pmol	pico mol ($1 \cdot 10^{-12}$ mol)
PRPP	5-Phosphoribosyl- α -1-Pyrophosphat
REN	Restriktionsendonuklease (z.B. SphI, NdeI, HindIII, BamHI)
rms	<i>root mean square</i>
RMSD	root mean square deviation
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
S	Substrat; Svedberg
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCOP	<i>Structural Classification of Proteins</i>
SD	Minimalmedium zur Anzucht von Hefen (<i>synthetic dropout</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SeqID	Sequenzidentität
SOE	<i>overlap extension</i>

ssDNA	Einzelstrang-DNA
T	Temperatur; Thymidin
<i>T. maritima</i> / <i>tm</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
t_0	Zeitpunkt $t = 0$
T_A	Annealing-Temperatur [°C]
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
TIM	Triosephosphat Isomerase
TM	Schmelztemperatur [°C]
T_E	Transformations-Effizienz
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>trp</i>	Gene, die für Enzyme des Tryptophanbiosynthesewege kodieren
<i>trp1</i>	Phosphoribosylanthranilat-Isomerase aus <i>S. cerevisiae</i>
U	Unit, 1U entspricht der Menge an Enzym, die unter Standardbedingungen 1 μ mol Substrat pro Minute umsetzt.
UAS	<i>upstream activation sequence; upstream activating site of transcription</i>
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
vgl.	vergleiche
v_i	Anfangsgeschwindigkeit
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
Vol	Volumen [l]
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
wt / WT	Wiltyp
YPD	Vollmedium zur Anzucht von Hefen (<i>yeast peptone dextrose</i>)
CSM	Mischung aus Aminosäuren und Nukleotiden (<i>complete supplement mixture</i>)
z. B.	zum Beispiel
% GC	relativer molarer GC-Gehalt
Ø	Durchmesser

?	Differenz
? <i>his</i>	<i>E. coli</i> Stamm mit Defizienz für die Aktivität des Enzyms des Histidinbiosyntheseweges
°C	Grad Celcius
μ	Mikro ($1 \cdot 10^{-6}$)
$0,1\% A_x$	spezifischer Extinktionskoeffizient bei x nm
?	Wellenlänge [nm]
?	Ohm
Δ	Differenz
Θ_{MRW}	durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure [$\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 / \text{dmol}$]
Θ_{obs}	gemessene Elliptizität [mGrad]
ϵ_x	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge x [$l / M \text{ cm}$]

9 Anhang

9.1 Nukleotidsequenzen der verwendeten Gene aus *Thermotoga maritima*

hisF (762bp)

1

60

ATG CTC GCT AAA AGA ATA ATC GCG TGT CTC GAT GTG AAA GAC GGT CGT GTG GTG AAG GGA
 ACG AAC TTC GAA AAC CTC AGG GAC AGC GGT GAT CCT GTC GAA CTG GGA AAG TTC TAT TCC
 GAA ATT GGA ATA GAC GAA CTC GTT TTT CTG GAT ATC ACC GCG TCC GTT GAG AAG AGG AAA
 ACC ATG CTG GAA CTG GTC GAA AAG GTG GCC GAG CAG ATC GAC ATT CCG TTC ACT GTT GGA
 GGA GGT ATC CAC GAC TTC GAA ACG GCC TCG GAG CTC ATT CTC CGT GGT GCG GAC AAG GTG
 AGC ATA AAC ACG GCG GCT GTG GAG AAT CCT TCT TTG ATC ACA CAG ATC GCT CAA ACT TTT
 GGG AGT CAG GCC GTT GTC GTG GCG ATA GAT GCA AAA AGA GTG GAT GGA GAG TTC ATG GTC
 TTC ACC TAC TCC GGA AAG AAG AAC ACG GGC ATA CTT CTG AGA GAC TGG GTG GTT GAA GTA
 GAA AAG AGA GGA GCA GGA GAG ATC CTG CTC ACC AGT ATC GAC AGA GAC GGC ACA AAA TCG
 GGT TAC GAT ACG GAG ATG ATA AGG TTC GTG AGG CCA CTA ACC ACA CTT CCC ATC ATC GCT
 TCC GGT GGT GCG GGA AAA ATG GAA CAT TTC CTT GAA GCC TTC CTG GCA GGT GCC GAC GCT
 GCC CTT GCG GCT TCT GTC TTT CAC TTC AGA GAG ATC GAC GTG AGA GAA CTG AAA GAG TAC
 CTC AAA AAA CAC GGA GTG AAC GTG AGA CTG GAG GGG TTG TGA

hisH (606bp)

1

60

ATG AGG ATC GGA ATA ATC TCT GTT GGT CCG GGG AAC ATA ATG AAT CTG TAT CGC GGA GTG
 AAA AGG GCA TCC GAG AAT TTT GAG GAT GTT TCG ATA GAG CTC GTG GAA TCA CCT CGA AAC
 GAC CTG TAC GAT CTT CTG TTC ATC CCG GGT GTG GGA CAC TTC GGC GAA GGG ATG AGA CGT
 CTC AGG GAG AAT GAT CTC ATC GAT TTC GTA AGA AAA CAC GTC GAA GAC GAG AGG TAC GTG
 GTC GGA GTT TGT CTT GGA ATG CAG CTT CTT TTT GAA GAG AGC GAA GAG GCA CCC GGC GTG
 AAA GGT CTT TCT CTC ATA GAA GGA AAC GTC GTG AAA CTG AGG AGC AGA AGA CTT CCC CAC
 ATG GGC TGG AAC GAG GTG ATC TTC AAA GAC ACG TTT CCG AAC GGG TAT TAC TAC TTC GTC
 CAC ACC TAC AGA GCT GTG TGC GAG GAG GAA CAC GTT CTG GGA ACA ACT GAA TAC GAC GGT
 GAG ATC TTT CCA TCC GCG GTG AGG AAG GGG AGA ATT CTG GGG TTT CAG TTC CAT CCC GAA
 AAG AGT TCA AAA ATC GGA AGA AAA CTG CTT GAG AAG GTG ATC GAA TGC TCG TTG TCC CGG
 CGA TAG

trpG (594bp)

1

60

ATG AAA AGA GTG ATC GTT ATA GAC AAC TAC GAT TCG TTC GTT TAC AAC ATC GTT CAG TAC
 ATC GGT GAG GTA GAA CCA GAC TGT GAA ATC GAA GTC TTC AGA AAC GAC GAG ATA ACG ATC
 GAA GAG ATA GAG AGA AAA AAT CCC ACT CAC ATA GTT ATA TCT CCT GGC CCC GGA AGA CCC
 GAA GAA GCG GGT ATC TCC GTT GAT GTT GTG AGG CAC TTC AGC GGG AAG GTT CCA ATA CTC
 GGT GTG TGT CTT GGA CAC CAG GTG ATC GGC TAC GCT TTT GGT GGA AAG ATC GTG CAT GCA
 AAG AGG ATT CTT CAT GGA AAG ACA TCG AAG ATC GTA CAC AAC GGA AAG GGT GTA TTC TCT
 GGT GTG AAA AAT CCA CTC GTT GCT ACG CGG TAC CAT TCA CTC GTT GTT GAA GAG GCA TCC
 CTT CCT GAA GTT CTG GAA ATC ACC GCC AAA AGT GAC GAT GGA GAG ATC ATG GGA CTC CAG
 CAC AAA GAA CAC CCA ACC TTT GGA GTT CAG TTT CAT CCA GAA TCC GTG CTG ACC GAA GAA
 GGA AAG AGA ATC ATA AAG AAC TTC CTG AAC ATC CAG GAT ATT CAG GTA AAG TGA

9.2 Aminosäuresequenzen von HisH, HisF und TrpG aus *Thermotoga maritima* mit Sekundärstrukturelementen

His F (253AS)

1 50

MLAKRIIACL DVKDGRVVKG TNFENLRDSG DPVELGKFYS EIGIDELVFL

DITASVEK RK TMLLEVEKVA EQIDIPFTVG GGIHDFET AS ELILRGADKV

SINTAAVENP SLITQIAQTF GSQAVVVAID AKRVDGEFMV FTYSGKKNTG

ILLRDWVVEV EKR GAGEILL TSIDRDGTKS GYDTEMIRFV RPLTTLPIIA

SGGAGKMEHF LEAFLAGADA ALAASVFHFR EIDVRELKEY LKKGHVNVRL

EGL*

His H (201AS)

1 50

MRIGIISVGP GNI MNLYRGV KRASENFEDV SIELVESPRN DLYDLLFIPG

VGHFGEG MR R LRENDLIDFV RKHVEDERYV VGVCLGMQLL FEESEEAPGV

KGLSLIEGNV VKLRSRRLPH MGWNEVIFKD TFPNGYYYFV HTYRAVCEEE

HVLGTTEYDG EIFPSAVRKG RILGFQFHPE KSSKIGRKLL EKVIECSLSR R*

TrpG (197AS) - Sekundärstrukturangaben nach SwissModel -

1 50

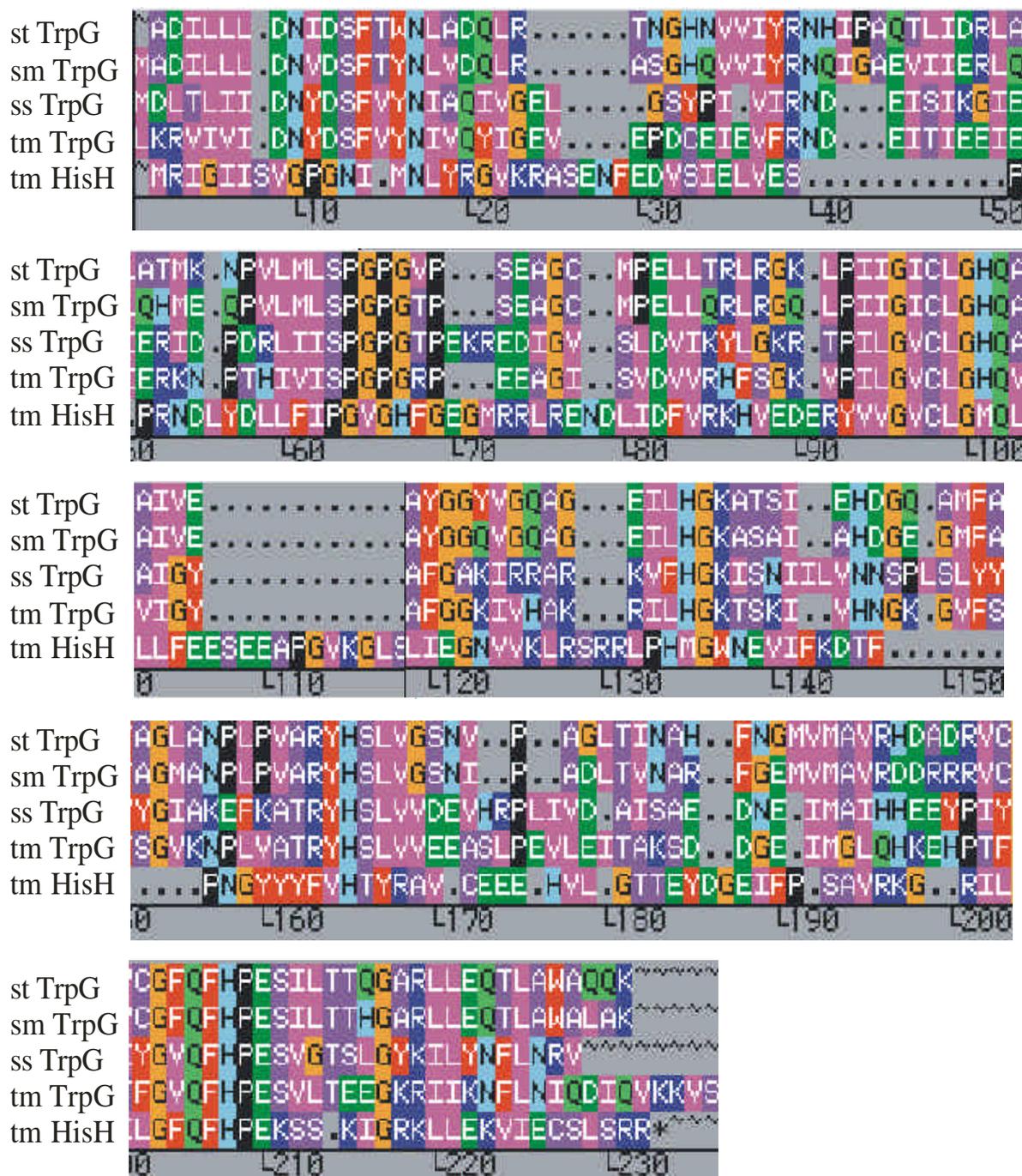
MKRVIDIDNY DSFV YNIVQY IGEVEPDCEI EVFRNDEITI EEIERKNPTH

IVISPGPGRP EEAGISVDVV RHFSGKVPIL GVC LGHQVIG YAFGGKIVHA

KRILHGKTSK IVHNGKGVFS GVKNPLVATR YHSLVVEEAS LPEVLEITAK

SDDGEIMGLQ HKEHPTFGVQ FHPESVLTEE GKRIKNFLN IQDIQVK*

9.3 Alignment von *tm* TrpG mit *tm* HisH



Zur Erstellung dieses Alignments wurden zunächst die Röntgenstrukturen von *ss*TrpG und *tm*HisH superpositioniert und anschließend ein multiples Sequenzalignment (Programm *PileUp* des GCG Wisconsin Package) aller bekannten TrpG Sequenzen erstellt, wodurch die Sekundärstrukturelemente aus der *ss*TrpG Struktur auf die Sequenz von *tm*TrpG projiziert werden konnten. Durch die Kombination der aus den beiden Operationen gewonnenen Informationen wurde ein indirektes „strukturbasiertes“ Sequenzalignment zwischen *tm*TrpG und *tm*HisH gewonnen. Zusätzlich sind die Sequenzen von TrpG aus *Salmonella typhimurium* (*st*), *Serratia marcescens* (*sm*) und *Sulfolobus solfataricus* (*ss*) gezeigt.

9.4 Charakteristische Größen der untersuchten wildtypischen Gene / Enzyme von *Thermotoga maritima*

	<i>hisA</i> / HisA	<i>hisF</i> / HisF	<i>hisH</i> / HisH	<i>trpG</i> / TrpG
Genlänge [bp]	726	762	606	594
Proteinlänge [AS]	241	253	201	197
M _r [Da]	27 031	27 700	23 100	22 250
^{0,1%} A ₂₈₀ [cm ² /mg] ⁺	0,48	0,41	0,75	0,35
ε ₂₈₀ [M ⁻¹ cm ⁻¹] ⁺	13,0	11,5	17,4	7,45
pdb entry	1qo2	1thf	1k9v	-
pI [*]	5,61	5,01	6,35	6,21

* berechnet mit EMBL pI wrapper nach Lehniger (1979)

⁺ berechnet nach Pace *et al.* (1995)

Spezifische Extinktionskoeffizienten⁺ und pI^{*} der untersuchten TrpG Varianten

	^{0,1%} A ₂₈₀ [cm ² /mg]	pI
TrpG_b5	0,35	6,56
TrpG_b6	0,58	6,00
TrpG_b7	0,27	6,22
TrpG_b9	0,40	6,22
TrpG_a5	0,35	7,52
TrpG_a5_b5	0,35	8,72
TrpG_a5_b6	0,58	6,88
TrpG_b5_b7	0,27	6,57
TrpG_b5_b9	0,40	6,57
TrpG_b6_b9	0,65	6,00
TrpG_b6_b7	0,52	6,00
TrpG_a5_b5_b7	0,27	8,70
TrpG_a5_b5_b9	0,40	8,70
TrpG_b5_b7_b9	0,35	6,57

Spezifischer Extinktionskoeffizienten⁺ und pI* der verwendeten HisH Varianten

	^{0,1%} A ₂₈₀ [cm ² /mg]	pI
HisH_R117A	0,75	6,10
HisH_N124A	0,75	6,35
HisH_Y138A	0,69	6,35
HisH_S183A	0,75	6,35
HisH_b6	0,52	7,32
HisH_b7	0,69	6,36
HisH_b9	0,69	6,36
HisH_a5	0,75	5,50
HisH_R117A_b7	0,69	6,10
HisH_R117A_b9	0,69	6,10

9.5 Daten zur Bestimmung der ProFAR-Konzentration / -Reinheit

(nach Klem & Davisson, 1993)

Konzentrationsbestimmung:
$$\frac{OD_{300}}{e_{300(\text{ProFAR})}} = \frac{OD_{300}}{6069\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}} = c[\text{M}]$$

Reinheit: Der Quotient aus $\frac{OD_{290}}{OD_{260}}$ sollte ≥ 1 sein

9.6 Programme der Säulen-Chromatographie

Vor jedem Lauf wurden die Säulen an der BioCAD / ÄKTA nach Bedarf mit mind. 2 Säulenvolumen Elutionspuffer und 2 Säulenvolumen Äquilibrationpuffer gespült, um sicher zu stellen, dass Verunreinigungen von vorherigen Läufen entfernt wurden. Nach der Benutzung der Säulen wurde mit mind. 1 Säulenvolumen Puffer regeneriert.

Mono Q (BioCAD / ÄKTA, RT) → präparativer starker Anionenaustauscher

(s. S.57 im Methodenteil)

Laufgeschwindigkeit = 2ml/min, CV = 20,106ml

Äquilibrieren		10mM Tris pH 8.0
Beladen	< 1,5 CV	Proteinlösung
Waschen	2 CV	10mM Tris HCl
Eluieren	10 CV	Gradient von 0-1,5M NaCl in 10mM Tris HCl
	1 CV	10mM Tris HCl 1,5M NaCl
Reinigung	1 CV	3M NaCl
Regenerieren		10mM Tris HCl
Lagerung		20% (v/v) Ethanol

An Stelle von 10mM Tris HCl pH 8.0 wurde z.T. auch 50mM KP-Puffer pH 7.5 verwendet.

Zum Eluieren wurde entsprechend ein 0-1,5 M KCl-Gradient angelegt.

Hydroxylapatit (BioCAD / ÄKTA, RT) → präparative Adsorptionschromatographie

(s. S. 57 im Methodenteil)

Auftragsgeschwindigkeit = 0,5ml/min, Laufgeschwindigkeit = 4ml/min, CV = 37,162ml

Äquilibrieren		10mM KP, 100mM KCl pH 7,5
Beladen	0,75 - 1 CV	Proteinlösung
Waschen	1 CV	10mM KP, 100mM KCl
Eluieren	5 CV	Gradient von 10-500mM KP, 100mM KCl
	1 CV	500mM KP, 100mM KCl
Reinigung	2 CV	1M KP
Regenerieren		10mM KP, 100mM KCl

Superdex 75 (BioCAD / ÄKTA, RT) → analytische Gelfiltration

(s. S.67 im Methodenteil)

Laufgeschwindigkeit = 0,5ml/min, CV = 23,562ml

Äquilibrieren		50mM KP, 300mM KCl pH 7,5
Beladen	< 0,05 CV	Proteinlösung
Eluieren	1,5 CV	50mM KP, 300mM KCl pH 7,5
Regenerieren		50mM KP, 300mM KCl pH 7,5

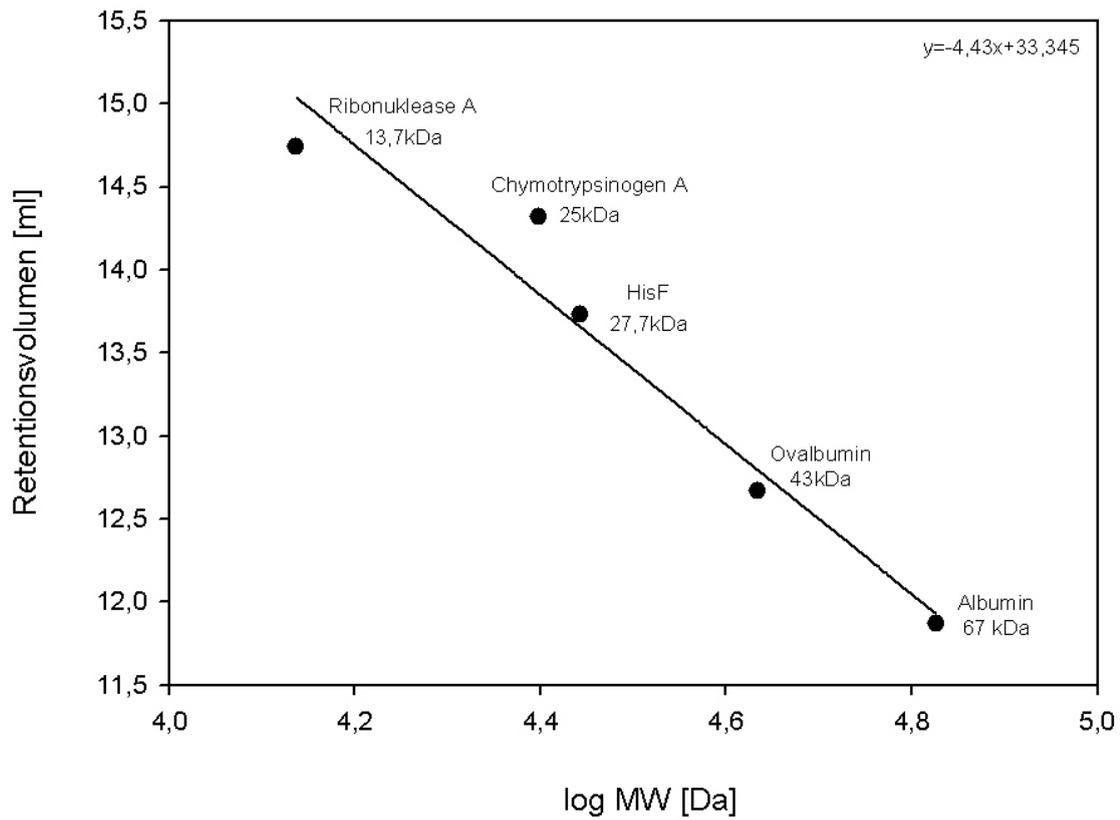
Superdex 75 (FPLC, 4°C) → präparative Gelfiltration

(s. S. 58 im Methodenteil)

Laufgeschwindigkeit = 0,5ml/min, CV = 320ml

Äquilibrieren		10mM KP, 300mM KCl pH 7,5
Beladen	0,1-0,3 CV	Proteinlösung
Eluieren	1,5 CV	10mM KP, 300mM KCl pH 7,5
Regenerieren		10mM KP, 300mM KCl pH 7,5

9.7 Kalibrierung der analytischen Gelfiltrationssäule Superdex 75



10 Kurzzusammenfassung

Glutamin-Amidotransferasen (GATasen) sind Bi-Enzymkomplexe, bestehend aus einer Glutaminase und einer Synthase, die als Modellenzyme zur Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen gut geeignet sind. Die Glutaminase erzeugt durch die Hydrolyse von Glutamin Ammoniak, der am aktiven Zentrum der Synthase mit einem spezifischen Substrat zu den für die jeweilige GATase charakteristischen Produkten reagiert. Besonders gut charakterisierte Vertreter der GATasen sind die Imidazolglycerinphosphat-Synthase (ImGP-S; 1:1 Komplex aus der Glutaminase HisH und der Synthase HisF) aus der Biosynthese des Histidin und die Anthranilat-Synthase (AS; 2:2 Komplex aus der Glutaminase TrpG und der Synthase TrpE) aus der Biosynthese des Tryptophan, deren Funktion und Evolution auf der Basis ihrer Röntgenstrukturen im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

Die beiden aktiven Zentren des HisH:HisF Komplexes aus *Thermotoga maritima* liegen etwa 25 Å voneinander entfernt und sind über einen Ammoniak-Kanal miteinander verbunden. Die Aufklärung der Kristallstrukturen verschiedener ligandierter HisH:HisF Komplexe in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Matthias Wilmanns am EMBL Hamburg führte zur Identifizierung von Aminosäuren an der Kontaktfläche (HisH: R117, N124, Y138, S183; HisF: Q123), die mutmaßlich an der Kommunikation der beiden aktiven Zentrum beteiligt sind. Die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von HisH:HisF Komplexen, in denen diese Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht waren, zeigte, dass der HisF Rest Q123 an der Bindung von Glutamin in HisH mitwirkt und die HisH-Reste R117 und N124 eine wichtige Bedeutung für den Ablauf der ImGP-S Reaktion haben.

Darüber hinaus wurden an der Kontaktfläche von HisH ganze Sekundärstrukturelemente mit konservierten Aminosäuren durch die entsprechenden Abschnitte aus TrpG ersetzt, und umgekehrt. Diese Austausche führten zu keiner messbaren Änderung der Löslichkeit, Stabilität oder der Fähigkeit bzw. Unfähigkeit zur Komplexbildung mit HisF. Dagegen wurde der Oligomerisierungszustand (HisH ist ein Monomer, TrpG ist ein Dimer) durch die Austausche teilweise übertragen. Durch den wechselseitigen Austausch von β -Strang 7 wurden die Glutaminase-Aktivitäten von TrpG und HisH unabhängig von der Anwesenheit von TrpE bzw. der Substratbindung an HisF. Für HisH konnte gezeigt werden, dass für diesen Übergang von einer konditionalen zu einer konstitutiven Glutaminaseaktivität das konservierte Tyrosin Y138 verantwortlich ist, in TrpG ist dies möglicherweise Y131.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Austausch größerer Sequenzbereiche zwischen HisH und TrpG zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der Struktur führt und in beiden Enzymen der „molekulare Schalter“ zur Regulation der Glutaminase-Aktivität in β -Strang 7 liegt. Dies spricht für einen gemeinsamen evolutionären Ursprung von HisH und TrpG.

11 Abstract

Glutamine amidotransferases (GATases) are bi-enzyme complexes, consisting of a synthase and a glutaminase subunit, which are well suited to analyze protein-protein interactions. The glutaminase generates ammonia by hydrolyzing glutamine, which reacts at the active site of the synthase with a specific substrate to products that are characteristic of each GATase. The imidazole glycerol phosphate synthase (ImGP-S; 1:1 complex of the glutaminase HisH and the synthase HisF) from histidine biosynthesis and the anthranilate synthase (AS; 2:2 complex of the glutaminase TrpG and the synthase TrpE) from tryptophan biosynthesis are well-characterized GATases, whose function and evolution was analyzed here on the basis of their X-ray structures.

The two active sites within the HisH:HisF complex from *Thermotoga maritima* lie 25 Å apart from each other and are connected by an ammonia channel. The elucidation of several crystal structures of ligand-bound HisH:HisF complexes, which was achieved in cooperation with Dr. Matthias Wilmanns at the EMBL Hamburg, identified amino acids at the interface (HisH: R117, N124, Y138, S183; HisF: Q123), which are presumably involved in the communication between the two active sites. The structural and functional characterization of HisH:HisF complexes, in which these residues have been replaced by alanine, showed that the HisF residue Q123 is involved in glutamine binding to HisH and that the HisH residues R117 and N124 are important for the ImGP-S reaction.

Furthermore, stretches of secondary structure elements containing conserved residues at the contact site of HisH were replaced by the corresponding sequences of TrpG, and vice versa. These exchanges did not cause measurable changes of solubilities, stabilities, and the ability or inability of binding to HisF. In contrast, the association state (HisH is a monomer, TrpG is a dimer) was transferred partly by the exchanges. The mutual exchange of β -strand 7 rendered the glutaminase activities of TrpG and HisH independent of the presence of the synthase TrpE or substrate binding to HisF. It was shown for HisH that tyrosine 138 is crucial for this conversion from a conditional to a constitutive glutaminase activity. In TrpG, tyrosine 131 might play the same role.

These data show that the mutual exchange of large sequence stretches between HisH and TrpG does not compromise their structural integrity, and that in both enzymes the molecular switch for the regulation of the glutaminase activity is located in β -strand 7. These results support a common evolutionary origin of HisH and TrpG.

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Sterner für ein spannendes und herausforderndes Thema mit vielen wissenschaftlichen Freiheiten, sowie seine Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Prof. Dr. Herbert Tschochner danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Dr. Matthias Wilmanns und Dr. Cristina Vega-Fernandez vom EMBL in Hamburg danke ich für die langjährige Kooperation im HisH:HisF Projekt und das Zurverfügungstellen der wertvollen Strukturdaten, die das Projekt in dieser Form erst ermöglicht haben.

Der Ernst Schering Forschungsgesellschaft danke ich für die finanzielle und wissenschaftliche Unterstützung meiner Arbeit und die Möglichkeit der Teilnahme an interessanten Tagungen und Workshops.

Allen „Sterners“ danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor, in der es sich gut arbeiten ließ.

Ein ganz großes Dankeschön geht an die „alten Kölner“ Birte Höcker, Stefan Hettwer und Andreas Ivens von denen ich in der Anfangszeit sehr viel lernen durfte, die stets ein offenes Ohr und unglaubliche Geduld hatten. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Nina Mohrlüder, Manal Bosnali, Natalie Heuer und Jörg Claren für nicht nur wissenschaftliche Gespräche und das Gefühl, ein wichtiger Teil der Arbeitsgruppe zu sein. Jörg Claren ist über die Jahre zu einem guten Freund geworden. Wir hatten immer viel Spaß zusammen, egal ob bei wissenschaftlichem Austausch, beim Feiern, beim Surfen oder bei den Honks. Danke!

Besonderer Dank gebührt auch Markus Richter fürs Dolmetschen in den ersten Wochen in Bayern, seine kontinuierliche Hilfsbereitschaft und den ausgiebigen Ausgleich zum Labor. Ihm und den Kölnern in Regensburg, (Iris Lambeck, Birgit Schneider, Susanne Marquardt und Sonja Leopoldseder) danke ich für einen sehr schönen Sommer. Bei Sonja Leopoldseder bedanke ich mich darüber hinaus für das plötzliche Entdecken vieler Gemeinsamkeiten, den wissenschaftlichem Austausch und die vielen Fahrten nach Hause.

An Jeannette Ueckert ein großes Dankeschön. Ohne ihre zuverlässige Hilfe und unermüdliche Ausdauer mit den TrpG Varianten wäre das Projekt nicht so weit voran geschritten. Felix List danke ich für viele interessante Diskussionen, die nicht ganz freiwilligen Quälereien mit TrpE und seinen (Galgen-)Humor. Bei Dr. Helmut Durchschlag, Klaus Tiefenbach, Melanie Vollmer und Barbara Kellerer bedanke ich mich für immer gute Laune, sowie sehr viele lustige und ironische Szenen in 4.1.31. Marion Strieder war eine große Hilfe im Umgang mit PyMol. André Fischer danke ich für viele unerwartete Fragen, absurde Ideen und spannende Gespräche. Bei Simona Cerrone, Christiane Endres, Dr. Catharina Dönges, Dr. Rainer Merkl und Lorella Ungar bedanke ich mich für das organisatorische Talent, besonders während des Umzugs. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Miriam Deuss, Susanne Dietrich und Tobias Seitz.

Auch den Meisterköchen der „L´auberge de Ratisbona“ ein herzliches Dankeschön. Die Überraschung war echt gelungen.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. H.-W. Klein und seiner Arbeitsgruppe für die gute Atmosphäre in der „kleinen Biochemie“ und die Bereitstellung des Hefelabors, sowie Prof. Dr. D. Schomburg für die Nutzung des CD-Gerätes.

Ming Fründ us dämm Millionedorf ahm Rhing danke ich för de superjeile Zick un dat Gefühl, hee zo Hus zo sin.

Muchas gracias a mio busy busy doble doble por fiesta en madrid y que me ha hecho más alegre.

Ganz herzlich danke ich meinen Parents, für ihre vielen Bemühungen und ihre ständige Unterstützung. Ausserdem möchte ich Ihnen danken, das sie mir so viel Optimismus und Ausdauer mit auf den Weg gegeben haben.

Einen besonderen Dank richte ich an Martin für seine enorme Geduld, seine unendlich vielen Aufmunterungen, sowie sein Verständnis für diverse berufliche Umzüge und Dienstreisen. Allerbeste, wo gibt!

13 Lebenslauf

Michaela C. Häger, geboren am 30.03.1978 in Mainz

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand ledig

Schulausbildung

1984-1988 Carl Zuckmayer Grundschule Mainz-Lerchenberg

1988-1994 Staatlich Integrierte Gesamtschule Mainz-Bretzenheim

1994-1997 Gymnasium am Kurfürstlichen Schloss, Mainz

Hochschulausbildung

10/97- 03/99 Diplomstudiengang Biologie, Grundstudium, Universität Mainz

03/99 - 10/99 Auslandspraktikum bei Prof. Dr. Peter Burbelo, Lombardi Cancer Center, Georgetown University Medical Center, Washington, D.C., USA, gefördert durch ein Reisekosten-Stipendium der Karl-Gückinger-Stiftung

10/99- 01/01 Diplomstudiengang Biologie, Hauptstudium, Universität Mainz

01/01 Diplomprüfungen in Molekulare Biophysik, Molekulargenetik, Botanik, physiologische Chemie

01/01 – 12/01 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Reinhard Sterner am Institut für Biochemie, Universität Köln in Kooperation mit Prof. Dr. Heinz Decker am Institut für Molekulare Biophysik, Universität Mainz, Thema der Arbeit: „Ammoniak-Channeling und allosterische Kommunikation im Bienzymkomplex Imidazolglycerinphosphat-Synthase aus *Thermotoga maritima*“, gefördert durch ein Diplomanden-Förderungsstipendium der Universität Mainz

12/01 Diplom in Biologie

01/02-06/05 Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation bei Prof. Dr. Reinhard Sterner am Institut für Biochemie, Universität Köln, seit 05/04 am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie, Universität Regensburg, gefördert durch ein Promotionsstipendium der Schering Forschungsgesellschaft