

**Kinetische Untersuchungen und Modellstudien
zur Funktion essentieller Reste
im aktiven Zentrum der
L-Asparaginase II aus *E. coli***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Stefan Schleper

aus
Oberhausen

Marburg / Lahn 1999

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn

als Dissertation angenommen: 29.01.99

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.99

Erstgutachter: Prof. Dr. H. Kindl

Zweitgutachter: Prof. Dr. K.H. Röhm

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Allgemeiner Hintergrund	1
1.2	L-Asparaginase II aus <i>E. coli</i>	2
1.2.1	Struktur	2
1.2.2	Reaktionsmechanismus und aktives Zentrum	5
1.3	Hydrolasen	10
1.4	Nomenklatur	12
1.5	Zielsetzung der Arbeit	13
2.	Material	14
2.1	Chemikalien	14
2.2	Kits und Enzyme	14
2.3	Oligonukleotide	15
2.4	Bakterien, Plasmide	15
2.5	Puffer	15
2.6	Geräte	16
3.	Methoden	17
3.1	Molekularbiologische Methoden	17
3.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	17
3.1.2	Expressionssystem	18
3.1.3	Herstellung und Transformation kompetenter Zellen	19

3.1.4	Ethanol-fällung von DNA	20
3.1.5	DNA-Präparation	20
3.1.6.	Isolierung von Einzelstrang-DNA im präparativen Maßstab	21
3.1.7	Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	22
3.1.8	Agarose-Gelelektrophorese	23
3.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten	24
3.1.10	DNA-Sequenzierung	24
3.1.11	Aufbereitung von Oligonukleotiden	27
3.1.12	Ortsspezifische Mutagenese	27
3.2	Proteinchemische Methoden	29
3.2.1	Isolierung der Mutanten	29
3.2.1.1	Isolierung periplasmatischer Enzyme	29
3.2.1.2	Chromatofokussierung	30
3.2.1.3	Gelfiltration	31
3.2.2	Proteinbestimmungen	13
3.2.3	Protein-Gelelektrophorese	32
3.2.4	Aktivitätstests	34
3.2.4.1	Bestimmung mit L-Asparaginsäure- β -hydroxamat	34
3.2.4.2	Gekoppelter optischer Test	35
3.2.4.3	Messungen in D ₂ O/H ₂ O-Mischungen (Proton inventories)	36
3.2.4.4	Bestimmung von Asparaginsäure	38
3.2.4.5	Bestimmung von Asparagin und Aspartat durch Aminosäureanalyse	39
3.2.5	Untersuchungen zur Proteinstabilität	40
3.2.5.1	Chemische Denaturierungsuntersuchungen	40
3.2.5.2	Thermische Denaturierung	43
3.3	Molecular Modeling	44

4.	Ergebnisse	47
4.1	Gerichtete Mutagenese und Charakterisierung der Mutanten	47
4.1.1	Auswahl der Reste zur Mutagenese	47
4.1.2	Herstellung der Mutanten	47
4.1.3	Expression und Reinigung der Mutanten	48
4.1.4	Charakterisierung der Mutanten	49
4.1.4.1	Kinetische Analyse	49
4.1.4.2	pH-Abhängigkeit der kinetischen Parameter	51
4.1.4.3	Stabilitätsuntersuchungen	56
4.2	Proton inventories und Untersuchungen zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Mutanten	60
4.2.1	Proton inventories	60
4.2.2	„Burst“-Messungen	70
4.2.3	Messungen in binären H ₂ O-/Methanolgemischen	72
4.2.4	Messungen mit L-Aspartat- β -methylamid	74
4.3	Molecular Modeling	75
4.3.1	Ermittlung der Ausgangsstruktur	76
4.3.2	Simulation des Reaktionsweges	80
4.3.2.1	Acylierung	80
4.3.2.2	Deacylierung	85
5.	Diskussion	95
5.1	Expression und Reinigung der EcA2-Mutanten	95
5.2	Substratumsatz und Substrataffinität der erzeugten EcA2-Mutanten	96
5.3	Stabilitätsuntersuchungen	102

5.4	Proton inventories	104
5.5	Untersuchungen zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Mutanten	112
5.5.1	„Burst“-Messungen	112
5.5.2	Messungen in H ₂ O/Methanol-Gemischen	113
5.5.3	Messungen mit L-Aspartat- β -methylamid	115
5.6	Molecular Modeling	116
5.7	Abschließende Betrachtung und Ausblick	122
6.	Zusammenfassung	124
7.	Literaturverzeichnis	126
8.	Abkürzungsverzeichnis	134
9.	Danksagung	136

1. Einleitung

1.1 Allgemeiner Hintergrund

Die Zeit der Asparaginase-Forschung begann im Jahre 1953 als Kidd zeigen konnte, daß Meerschweinenserum das Wachstum von Tumortransplantaten bei der Maus und der Ratte hemmt. Im Jahre 1961 wurde diese tumorhemmende Eigenschaft dann einer im Serum enthaltenen L-Asparaginase zugeschrieben (Broome, 1961). Der durch sie verursachte Abbau von L-Asparagin hemmt das Wachstum der Tumore, die auf die exogene Zufuhr dieses Stoffes angewiesen sind (Haley *et al.*, 1961). Im allgemeinen wird hierfür ein genetischer Defekt der L-Asparagin-Synthetase in den Tumoren verantwortlich gemacht (Prager & Bachynsky, 1968; Horowitz & Meister, 1972).

Nach umfangreicheren klinischen Studien mit Asparaginasen aus verschiedenen Organismen fanden vorzugsweise die L-Asparaginase II aus *E. coli* (Campbell *et al.*, 1967) und die L-Asparaginase aus *Erwinia chrysanthemi* (Howard & Carpenter, 1972) Eingang in die Behandlung der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL), einer Art des Blutkrebses, die vor allem im frühen Kindesalter auftritt. Im Laufe der Therapie kommt es jedoch auch zu unerwünschten Nebenwirkungen. So können unter anderem immunologische Überempfindlichkeitsreaktionen und Leberfunktionsstörungen auftreten. Für einen Teil der Komplikationen, insbesondere die Hepatotoxizität, wird die Glutaminase-Nebenaktivität der Asparaginasen verantwortlich gemacht (Kafkewitz und Bendich, 1983; Ollenschläger *et al.*, 1988). Sie führt zu einem signifikanten Absinken des L-Glutamin-Spiegels im Blut und damit zu einer Störung des Glutamin-Stoffwechsels.

Parallel zu der Isolierung und Charakterisierung neuer Enzyme aus der Asparaginase-Familie richtete sich das Interesse der Forschung schon recht früh auch auf die Entschlüsselung des zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus und der beteiligten Aminosäure-Reste. Insbesondere die Erforschung der L-Asparaginase II aus *E. coli* gewann Anfang der neunziger Jahre durch die Klonierung des entsprechenden Gens (Jennings & Beacham, 1990), die Aufstellung eines effektiven Expressions- und Reinigungssystems (Harms *et al.*, 1991a) sowie der Aufklärung der Kristallstruktur (Swain *et al.*, 1993) und dem Einsatz der gerichteten Mutagenese neuen Auftrieb.

1.2 L-Asparaginase II aus *E. coli*

Neben der schon erwähnten L-Asparaginase II (EcA2) existiert in *Escherichia coli* eine weitere Isoform des Enzyms (L-Asparaginase I, EcA1), die jedoch keine tumorhemmenden Eigenschaften besitzt und daher auch auf weniger Interesse in der Forschung stieß. Sie befindet sich im Gegensatz zur periplasmatisch lokalisierten L-Asparaginase II im Cytosol, besitzt eine geringere Affinität zum Substrat und wird konstitutiv exprimiert (Jerlström *et al.*, 1989). Auch in ihren Aminosäuresequenzen unterscheiden sich die beiden Enzyme bis auf einige signifikant homologe Regionen deutlich, wodurch man auch die Asparaginasen aus anderen Organismen in Typ I und Typ II - Asparaginasen aufteilen kann.

Die L-Asparaginase II wird bevorzugt unter anaeroben Bedingungen exprimiert, (Cedar & Schwartz, 1967; Cedar & Schwartz, 1968), unterliegt der Katabolit-Repression (Chesney, 1983), (Willis & Woolfolk, 1974) und ihr Gen (*ansB*) wird durch das cAMP-bindende Regulatorprotein CRP und das FNR-Protein reguliert (Jennings & Beacham, 1990; Jerlström *et al.*, 1987). In Abbildung 1.1 ist die DNA- und die aus ihr abgeleitete Aminosäuresequenz der EcA2 dargestellt.

1.2.1 Struktur

Schon in frühen biochemischen Untersuchungen zur L-Asparaginase II wurde gezeigt, daß das Enzym in seiner aktiven Form aus vier identischen Untereinheiten (Epp, 1971) mit einer Masse von jeweils 34.6 kDa besteht (Maita & Matsuda, 1980), die als Monomere keine katalytische Aktivität zeigen (Meng *et al.*, 1983). Die schon erwähnte Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 2.3 Å lieferte eine Fülle weiterer Erkenntnisse. So treten je zwei Untereinheiten durch starke, paarweise Wechselwirkungen miteinander in Kontakt und die beiden so gebildeten Dimere lagern sich zu einem nativen, tetrameren Enzym zusammen.

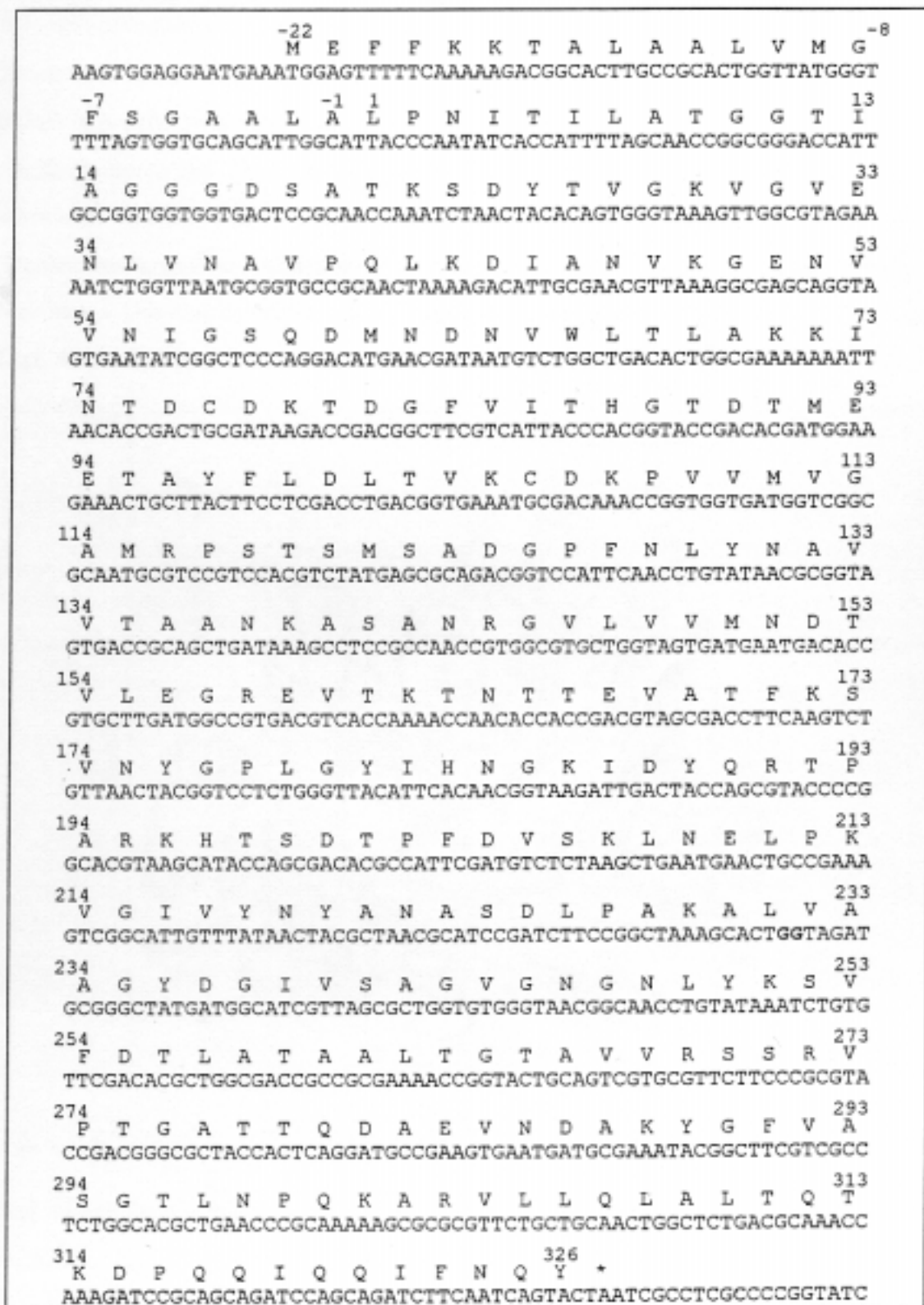


Abb. 1.1: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der L-Asparaginase II aus *E. coli* nach Jennings & Beacham (1990). Die Aminosäurereste sind numeriert. Negative Numerierung: Signalsequenz. Das Stopp-Codon ist mit einem Stern markiert.

Jedes Monomer enthält eine größere N-terminale Domäne, die sich durch eine achtsträngige β -Faltblattstruktur sowie vier α -Helices auszeichnet und über eine Linker-Sequenz mit der kleineren C-terminalen Domäne verbunden ist. Diese wiederum wird durch eine viersträngige, parallele β -Faltblattstruktur und vier α -Helices geprägt (Abb. 1.2).

Mithin konnten pro Tetramer vier aktive Zentren über das in ihnen gebundene L-Aspartat lokalisiert werden. Diese aktiven Zentren befinden sich zwischen den beiden, über starke Wechselwirkungen verbundenen Monomeren und setzen sich jeweils aus Resten der N-terminalen Domäne der einen und C-terminalen Resten der anderen Untereinheit zusammen (vgl. Abb 1.2). Jedes Dimer besitzt somit zwei aktive Zentren.

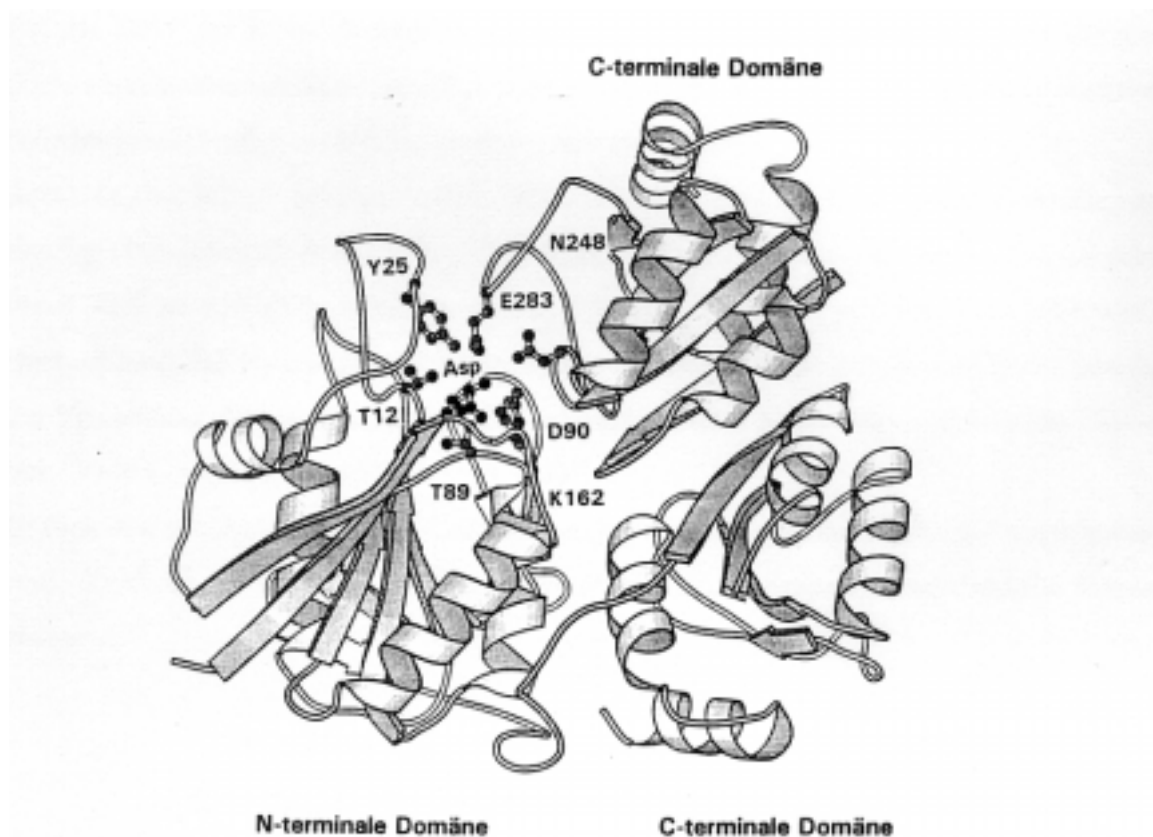
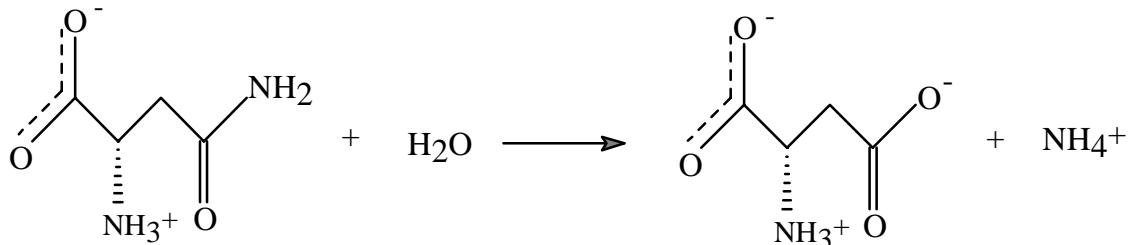


Abb. 1.2: *E. coli* L-Asparaginase II (EcA2), Lokalisierung des aktiven Zentrums.

Das seltene Strukturmotiv eines „left-handed crossover“ zwischen zwei parallelen β -Faltblattstrukturen der N-terminalen Domäne wurde anhand der Asparaginase-Kristallstruktur aus *Erwinia chrysanthemi* als charakteristisches Motiv in Asparaginasen erkannt (Miller *et al.*, 1993). Obwohl keine Reste dieses Elements direkt im katalytischen Zentrum angeordnet sind, haben doch einige direkten Kontakt zu diesem und könnten unter anderem zum wirkungsvollen Freisetzen des Produktes beitragen.

1.2.2 Reaktionsmechanismus und aktives Zentrum

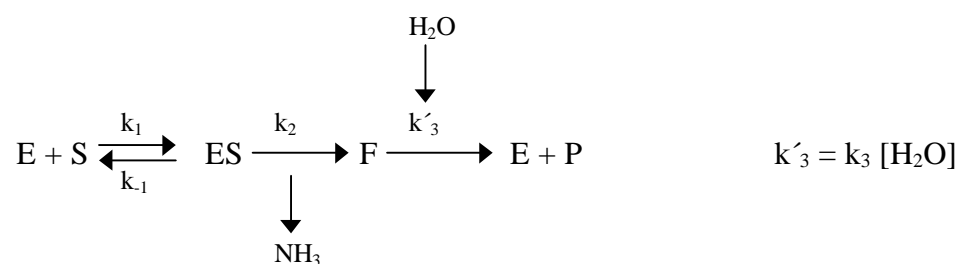
Wie schon erwähnt, katalysieren Asparaginasen die Hydrolyse von L-Asparagin zu L-Aspartat:



Bei der EcA2 aus *E. coli* beträgt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V) 90 U/mg und die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) etwa 20 μM (Herrmann *et al.*, 1974). Die Glutaminase-Nebenaktivität beträgt 2 - 5 % bei einer K_m von ca. 2.5 mM.

Schon in den frühen siebziger Jahren wurden Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus durchgeführt (Ehrman *et al.* 1971, Röhm *et al.* 1971) und ein kovalent an das Enzym gebundener Rest als Zwischenprodukt postuliert. Für diese Annahme sprachen unter anderem die Beobachtung, daß Hydroxylamin bei der Reaktion in Konkurrenz zum Wasser treten kann und zur Freisetzung der entsprechenden Hydroxamsäure führt sowie der Nachweis des Einbaus von ^{18}O in L-Aspartat beim Einsatz von H_2O^{18} .

In Einklang mit den kinetischen Untersuchungen steht der sogenannte Ping-Pong-Mechanismus, der durch das alternierende Binden der Substrate und Freisetzen der Produkte charakterisiert ist:



Der Einsatz von Substratanaloga (Herrmann, 1974; Röhm *et al.*, 1971) ermöglichte es, die Acylierung, also den Angriff des ersten Nucleophils auf das Amid, als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zu definieren.

Unklarheit herrschte zunächst noch über den Charakter des dabei gebildeten Intermediats. Die Alternative zwischen einem kovalenten β -Aspartyl-Enzym wie man es auch aus den Serin-Proteasen kennt und der intramolekularen Katalyse durch den Angriff der C-1-

Carboxylgruppe, wurde durch die Untersuchung des ^{18}O -Effektes bei ^{13}C -NMR-Messungen zugunsten der erstgenannten Annahme entschieden (Röhm & van Etten, 1986).

Zur Klärung der Frage welche Aminosäurereste an der Katalyse beteiligt sind, war man über längere Zeit auf den Einsatz von Modifizierungsreagentien und Inhibitoren beschränkt (Nishimura *et al.*, 1971; Citri *et al.*, 1972; Meng *et al.*, 1985; Peterson *et al.*, 1977). Die Untersuchungen führten zu einer Reihe von Annahmen, die erst später mittels der gerichteten Mutagenese überprüft werden konnten.

So wurde unter anderem eine Beteiligung von Tyrosinresten an der Reaktion postuliert, und über das Quenching der entsprechenden Signale bei der Bindung des kompetitiven Inhibitors Aspartat im ^1H -NMR-Spektrum (Bagert und Röhm, 1989) wurde die Beteiligung eines Tyrosin-Restes in die Katalyse bewiesen. Nachfolgende Mutagenese-Experimente an hochkonservierten Tyrosinen identifizierten Tyrosin-25 (Derst *et al.*, 1994) als essentiell für die Reaktion (die Mutanten haben 0.4 - 1 % der Wildtyp-Aktivität).

Die naheliegende Vermutung, daß Histidine eine wichtige Rolle bei der Hydrolyse spielen könnten, wurde durch den Austausch aller drei in einer Untereinheit enthaltenen Histidin-Reste durch andere Aminosäuren widerlegt; weder an der Substratbindung noch am Umsatz des L-Asparagins sind sie direkt beteiligt (Wehner *et al.*, 1992).

Großes Interesse richtete sich natürlich auch auf die Frage nach der Art des reaktiven Nukleophils des Enzyms, welches den ersten Angriff auf die Amidbindung vollzieht. Durch die Gruppe um Handschumacher wurde mit Hilfe des Modifizierungsreagens DONV (5-Diazo-4-oxonorvalin) festgestellt, daß Threonin-119 oder Serin-120 hierfür in Frage kommen (Peterson *et al.*, 1977). Etwa um die gleiche Zeit gelang es jedoch Holcenberg *et al.* (1978), den zu Threonin-12 der EcA2 homologen Rest der Asparaginase-Glutaminase aus *Acetivobacter glutaminasificans* mit DON, dem Leucin-Analogen zu DONV, zu modifizieren. Mutageneseexperimente (Harms *et al.*, 1991b; Derst *et al.*, 1992) bestätigten die letztgenannte Beobachtung; Threonin-12 besitzt eine herausragende Rolle bei der Umsetzung, nicht jedoch bei der Bindung des Substrats (vgl. auch Tab. 1.1).

Abbildung 1.3 zeigt das reaktive Zentrum der L-Asparaginase II wie es aus der Kristallstruktur erhalten wurde (mit gebundenem L-Aspartat). Einige wichtige Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 1.1 zusammengefaßt.

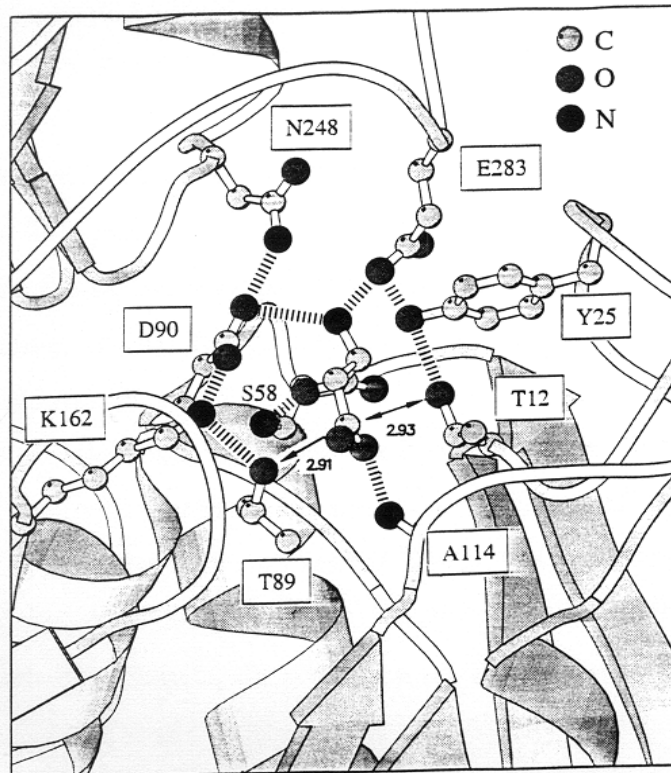


Abb. 1.3: Aktives Zentrum der L-Asparaginase II aus *E. coli* mit gebundenem Aspartat. Dargestellt sind die katalytischen Reste, die Wasserstoffbrückenbindungen sowie die Abstände der Threonin-Sauerstoffatome zum Carbonylkohlenstoff des Substrats.

Enzym	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)
WT	54	0.07
T12S	16	0.14
T12V	0.0005	0.10
T89S	7	0.10
T89V	0.0005	0.10
K162Y	0.0042	0.02
K162C	0.0061	0.05
Y25F	0.090	0.08
N248A	37.4	0.370
S58A	18	2.5
D90E	5	42
E283Q	32	1.50

Tab. 1.1: Kinetische Daten der L-Asparaginase II und einiger Mutanten. Messungen mit L-Aspartat- β -hydroxamat (AHA) als Substrat (vgl. 3.2.4.1). Daten aus Aung, 1997; Derst, 1995; Specht, 1994.

Die kinetischen Daten zeigen eine Zweiteilung des katalytischen Zentrums. Die Reste in der Nähe der umzusetzenden Amidbindung, Threonin-12 und -89, Lysin-162 und Tyrosin-25 sind entscheidend für die Katalyse, nicht jedoch für die Substratbindung, wohingegen die Gruppen Serin-58, Asparagin-248, Aspartat-90 und Glutamat-283 eine wichtige Rolle bei der Substratbindung spielen. Für die beiden letztgenannten Aminosäurereste sind die Daten jedoch noch nicht umfassend genug, so daß eine zusätzliche Beteiligung an der Substratumsetzung nicht ausgeschlossen werden kann.

Wie aus der Struktur ersichtlich und durch die kinetischen Daten bestätigt (s. Abb. 1.3, Tab. 1.1), sind nur zwei Aminosäurereste, Threonin-12 und -89, zu einem nukleophilen Angriff auf die Amidbindung in der Lage. Die Mutanten beider Gruppen zeigen nur marginale Unterschiede in ihren kinetischen Eigenschaften. Threonin-89 bildet jedoch zusammen mit Lysin-162 und Aspartat-90 eine Triade, die über starke Wasserstoff-Brücken verbunden ist. Dies führte zu der Annahme, daß die Nukleophilie des Threonin-89 mittels der potentiellen Base Lysin verstärkt und die Basizität der letztgenannten durch das Aspartat verstärkt wird. Ein möglicher Mechanismus in Anlehnung an die katalytische Triade der Serin-Proteasen (Ser-His-Asp) wird durch die Inaktivierung des Enzyms beim Austausch der Threonin-89- und Lysin-162-Gruppe untermauert, andererseits aber u.a. durch das entscheidende Problem eines für die Reaktion nötigen deprotonierten Lysins (freies Lysin: $pK = \text{ca. } 10.5$) unwahrscheinlich. Auf der anderen Seite der zu spaltenden Amidbindung wäre eine ähnliche Triade aus Threonin-12, Tyrosin-25 und Glutamat-283 denkbar; die noch recht hohen Restaktivitäten der Tyrosin-25-Mutanten und der ebenfalls hohe pK -Wert des freien Tyrosins (ca. 10.0) sprechen jedoch auch in diesem Fall gegen einen solchen Mechanismus. Weitere Fragen richten sich auf die Art des beim nukleophilen Angriff entstehenden aktiven Zwischenproduktes. In der Regel wird von einem tetraedrischen Übergangszustand ausgegangen, dessen stark negativ geladener Sauerstoff durch H-Brücken stabilisiert wird.

Thr-12 und Tyr-25 sind Bestandteil eines flexiblen Loops der die Reste 11 - 27 umfaßt (Derst *et al.*, 1994) und sich nach der Substratbindung schließt, um das aktive Zentrum gegen das umliegende Lösungsmittel abzuschirmen (Abb. 1.2). Diese Beobachtung führte zu weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Bewegung des Loops und seiner Rolle während der Katalyse. Mit Hilfe einer Doppelmutante, bei der das einzige pro Untereinheit im Enzym enthaltene Tryptophan (Position 66) an die Stelle von Tyrosin-25 "verlegt" wurde, konnte mittels der Fluoreszenz dieses Tryptophans und der Stopped-Flow-Technik die Loop-Bewegung verfolgt werden, und der oben dargestellte Ping-Pong-Mechanismus ließ sich erweitern (Aung, 1997):

1.3 Hydrolasen

Proteasen gehören sicherlich zu den am besten untersuchten Enzymen. Dies beruht auf ihrer weiten Verbreitung und ihren vielfältigen Funktionen in der Natur. Sie bauen unter anderem unkorrekt gefaltete Proteine ab, spalten Signalpeptide und kontrollieren die Apoptose. Die meisten dieser Enzyme lassen sich vier Gruppen zuordnen: den Serin-, den Cystein-, den Aspartat- und den Metallo-Proteasen. Der postulierte Standard-Mechanismus der Serin-Proteasen beinhaltet eine „katalytische Triade“, in der ein Histidin die Rolle einer zentralen Base einnimmt, die von der Hydroxyl-Gruppe des Serins das Proton abstrahiert und so den Angriff dieses Nucleophils auf die Amid-Bindung ermöglicht. Der dritte Bestandteil der Triade ist eine saure Gruppe, die den Histidin-Rest orientiert und das geladene Histidin-Intermediat neutralisiert (Abb. 1.4).

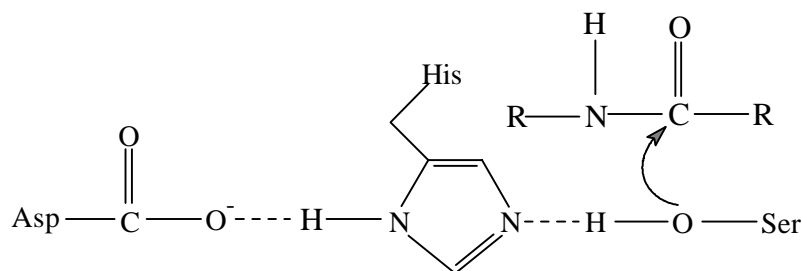


Abb. 1.4: Klassische katalytische Triade der Serin-Proteasen

Die Deacylierung benötigt ein aktiviertes Wassermolekül als Nucleophil (Perona *et al.*, 1995). Untersuchungen mittels der gerichteten Mutagenese bestätigten diese Annahmen. Im Falle von Subtilisin und Trypsin führte der Austausch eines jeden dieser drei Reste zu einem deutlichen Aktivitätsverlust. Es ließ sich jedoch eine Abstufung in dem Sinne erkennen, daß Serin und Histidin für die Katalyse von größerer Bedeutung sind als Aspartat. Mutanten der beiden erstgenannten Reste verringerten die Aktivität um das 10^6 -fache, die des Aspartats nur um das 10^4 -fache (Carter & Wells, 1988, Corey & Craik, 1992).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche mechanistisch neue Proteasen isoliert und charakterisiert, die Zweifel am Mechanismus der Triade aufkommen ließen. Zhou *et al.* (1994) beschrieben einen hydrolytisch aktiven Antikörper, der Norleucin- und Methionin-Phenylester spaltet und ein den Serin-Proteasen ähnliches aktives Zentrum besitzt, das jedoch nur einen Serin- und Histidin-Rest, aber kein Aspartat enthält. In der Esterase aus *Streptomyces scabies* nimmt ein Tyrosin den Platz des Aspartats ein (Wei *et al.*, 1995) und in der Serin-Carboxy-

peptidase des Weizens ist das Aspartat des aktiven Zentrums nicht co-linear zum Imidazolring des Histidins (Liao, 1992). Cystein-Proteasen enthalten in der Regel eine Cys/His/Asn-„Triade“. Im Falle des Papains führte ein Austausch des Asparagins gegen Alanin lediglich zu einem 150-fachen Aktivitätsverlust, und die Autoren schrieben diesem Rest keine essentielle Rolle bei der Katalyse zu (Vernet *et al.*, 1995). Aufgrund der geschilderten Ergebnisse sprechen viele Autoren nicht mehr von einer Triade, sondern von einer „Diade“; die Ser/His/Asp-Triade teilen sie in zwei Ser/His- und His/Asp-Diaden auf (Liao, 1992).

Es gibt eine wachsende Liste von Serin-Proteasen, die anstelle des Histidins ein Lysin enthalten. In diesen Fällen wird von einem „Ser/Lys-Diaden“-Mechanismus ausgegangen, bei dem das Lysin als Base wirkt und die Nukleophilie des Serins erhöht. Beispiele hierfür sind die Leader-Peptidase, der LexA-Repressor und die Tsp-Protease aus *E. coli* (Tschantz *et al.*, 1993, Slilaty & Little, 1987, Keiler *et al.*, 1995).

Eine weitere Gruppe eingehend untersuchter Enzyme sind die β -Lactamasen, die die Hydrolyse von β -Lactam-Antibiotika und acyclischen Depsipeptiden katalysieren. Auch über ihren Reaktionsmechanismus herrschen noch viele Unklarheiten. β -Lactamasen der Klasse A sind Serin-Hydrolasen. Anhand der Kristallstruktur einer Mutante der Lactamase aus *E. coli* konnte Serin-70 als das angreifende Nukleophil charakterisiert werden. Man fand das Substrat Penicillin G kovalent an den Sauerstoff dieses Restes gebunden (Strynadka *et al.*, 1992). Katalytische Bedeutung wird zudem den im aktiven Zentrum konservierten Resten Glu-166, Lys-73 und Ser-130 zugeschrieben. Einige Autoren favorisieren dabei das Lysin als potentielle Base (Strynadka *et al.*, 1992), andere das Glutamat (Vijayakumar *et al.*, 1995). Bei Lactamasen der Klasse C geht man von einer analogen Funktion der Aminosäuren Lys-67 und Tyr-150 aus; in diesen Enzymen befindet sich keine dem Glutamat-166 entsprechende Gruppe (Adediran *et al.*, 1996; Rahil & Pratt, 1994).

Eine weitere Gruppe mechanistisch sehr bemerkenswerter Enzyme sind die Penicillin-Acylase (Duggleby *et al.*, 1995), die Glutamin PRPP Amidotransferase (GAT; Smith *et al.*, 1994) und das von der Gruppe um Huber (Löwe *et al.*, 1995) kristallisierte 20S-Proteosom aus *Thermoplasma acidophilum*. Das postulierte Nukleophil aller dieser Enzyme ist die, in eine β -Faltblattstruktur eingebundene, N-terminale Seitenkette. Im Falle der Penicillin Acylase handelt es sich dabei um ein Serin, in der GAT um Cystein und im Proteosom um Threonin. Brannigan *et al.* (1995) bezeichnen diese Gruppe an Enzymen entsprechend als Ntn (N-terminal nucleophil) Hydrolasen. Die Aktivierung dieser Nukleophile soll durch ihre eigene α -Amino-

gruppe erfolgen. Alle diese Entwicklungen berücksichtigend, sprechen Paetzel und Dalbey (1997) allgemeiner von katalytischen “Hydroxyl/Amino-Diaden”.

Die dargestellten Beispiele zeigen die große Vielfalt, die die Natur bei der Durchführung nur eines Reaktionstypus aufzubieten hat, sie veranschaulichen aber auch, daß noch viele Fragen zum katalytischen Mechanismus der hydrolytisch wirksamen Enzyme ungeklärt sind. Die Asparaginase II aus *E. coli* scheint dabei insbesondere deshalb von Interesse, da sie auf beiden Seiten der umzusetzenden Gruppe potentielle Nukleophile (und Triaden) enthält und sich daher eine noch komplexere Situation darbietet.

1.4 Nomenklatur

Mutanten der EcA2 werden mit [ursprüngliche Aminosäure] [Position] [neue Aminosäure] bezeichnet. D90G bedeutet somit eine EcA2-Variante, bei dem ein Austausch von Aspartat-90 gegen Glycin vorgenommen wurde.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

- 1.) Untersuchungen zur Funktion der beiden im aktiven Zentrum lokalisierten Reste Aspartat-90 und Glutamat-283 sowie der Triade aus Threonin-89/Lysin-162/Aspartat-90. Dazu sollten verschiedene Mutanten der beiden Reste, sowie Doppelmutanten die die Triade betreffen erzeugt und umfassend kinetisch charakterisiert werden.
- 2.) Untersuchungen zur Anzahl der an der Reaktion beteiligten Protonen sowie zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt von verschiedenen Mutanten der wichtigsten im aktiven Zentrum enthaltenen Reste. Hierzu sollten die kinetischen Messungen um Lösungsmittel-Isotopeneffekte (Proton inventories), den Einsatz des substratanalogen L-Aspartat- β -methylamids sowie Messungen in binären Methanol/Wasser-Gemischen und von „Burst“-Effekten erweitert werden.
- 3.) Auf der Basis der Kristallstruktur sollte durch den Einsatz des Amber-Kraftfeldes und der semiempirischen PM3-Methode die Katalyse durch EcA2 simuliert werden.

2. Material

2.1 Chemikalien

Alle üblichen Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

An Spezialchemikalien und Verbrauchsmaterial wurden eingesetzt:

Polybuffer 74	Pharmacia (Freiburg)
PBE-94-Säulenmaterial	Pharmacia (Freiburg)
Sephacryl-S 200 HR-Säulenmaterial	Pharmacia (Freiburg)
Centriprep-20 Konzentratoren	Amikon (USA)
Molekulargewichtsmarker:	
Lambda-DNA/ <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i>	Eurogentech (Seraing, Belgien)
pBR322-DNA/ <i>HaeII</i>	Sigma (München)
MW-SDS-17	Sigma (München)
Deuteriumoxid (>99.9%)	Sigma (München)

Radiochemikalien:

³⁵ S-dATP	DuPont (Bad Homburg)
----------------------	----------------------

2.2 Kits und Enzyme

In vitro-Mutagenese Kit	Amersham (Braunschweig)
Sequenase Version 2.0 Kit	USB, Amersham (Braunschweig)
QIAex Agarosegel Extraktionskit	Diagen (Düsseldorf)
QIAprep-spin Plasmid Kit	Diagen (Düsseldorf)
T4-DNA Ligase	Boehringer (Mannheim)
T4-Polynukleotid-Kinase	Boehringer (Mannheim)
Glutamat-Dehydrogenase	Sigma (München)

2.3 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden bei Herr Dr. Krause, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung synthetisiert (Austauschbasen sind unterstrichen).

MUT D90GV	5'-CACGGTACCGT/ <u>GC</u> ACGATGGAA-3'
MUT E283GV	5'-CAGGATGCCGT/ <u>GAG</u> TGGATGAT-3'
MUT D90N	5'-CACGGTACCA <u>AC</u> ACGATGGAA-3'

Zusätzlich wurden T7-, M13-Universal- und M13-Reverse-Primer verwendet.

2.4 Bakterien, Plasmide

Bakterienstämme:

E. coli TG1 Amersham (Braunschweig)

E. coli CU1783 (BL21Ω) Harms *et al.* (1991)

Plasmide, Vektoren:

M13mp19/18 Boehringer (Mannheim)

pT7-7 Tabor & Richardson (1985)

pTWEI Harms *et al.*, (1991)

2.5 Puffer

Agarose-Gel-Elektrophoresepuffer

TBE-Puffer(10x), pro Liter

121.14 g Tris

55 g Borsäure

40 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0

TAE-Puffer (50x), pro Liter

242 g Tris

57.1 ml Eisessig

100 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0

Sequenzgelpuffer

TTE-Puffer (20x), pro Liter

216 g Tris

72 g Taurin

20 ml 0.5 M EDTA

SDS-Elektrophoresepuffer

25 mM Tris

190 ml Glycin

3.5 mM SDS

2.6 Geräte

DNA Thermo Cycler	Perkin-Elmer (Langen)
Inkubationsschüttler G25	New Brunswick (USA)
Suprafuge 22	Heraeus (Osterode)
Power Supply 3000/150	Pharmacia (Freiburg)
Power Supply 200/15	Pharmacia (Freiburg)
Fraktionssammler Frac 100	Pharmacia (Freiburg)
Peristaltische Pumpe	Pharmacia (Freiburg)
pH-Meßgerät SA 524	Orion, Colora (Lorch)
Mini-Protean-Cell, PAGE-Einheit	Biorad (München)
Mikrotiterplattenlesegerät Reader 450	Biorad (München)
Spektorfluorimeter FP 770	Jasco (Tokio, Japan)
Spektrophotometer U2000	Hitachi (Tokio, Japan)
Refraktometer	Carl-Zeiss (Jena)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Alle hier beschriebenen Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Maniatis *et al.* (1982) durchgeführt.

Sicherheitsmaßnahmen

Sämtliche Arbeiten mit Bakterienstämmen und Bakteriophagen wurden gemäß Gentechnikgesetz (GenTG) vom 20.05.90 durchgeführt und fielen unter die Sicherheitstufe S1. Alle bei den Arbeiten anfallenden Lösungen und Gefäße, die mit Bakterien oder Phagen kontaminiert wurden, sammelte man und unterzog sie für 30 Minuten bei 130 °C einer Hitzesterilisation. Radioaktive Abfälle wurden gesammelt und entsprechend der Strahlenschutzverordnung entsorgt.

3.1.1 Kultivierung von *E. coli* – Stämmen

TG1 – Zellen

Die TG1 – Zellen dienen als Wirtszellen für den M13 – Phagen.

Zur Selektion der infizierbaren Zellen wurden die im Mutagenesekit (s. 3.1.11) gefriergetrocknet vorliegenden TG1 – Zellen in 3 ml 2xYT-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator herangezogen. Um Einzelkolonien zu erhalten, strich man die Bakterien auf Minimalmedium aus und inkubierte für 36 – 48 Stunden bei 37 °C. Die Platten wurden bei 4 °C gelagert.

Zur Anzucht der Bakterien impfte man 3 ml 2xYT-Medium mit einer Einzelkolonie an und schüttelte für 5 – 7 Stunden bei 37 °C.

Im Falle von mit M13-Phagen infizierten Zellen wurden die auf H-Platten in Form von aufgehellten Plaques vorliegenden Einzelkolonien zusammen mit 10 bis 20 µl einer 3 ml-Kultur von TG1-Zellen in 3 ml 2xYT-Medium überimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator für 5 – 7 Stunden angezogen.

CU1783-Zellen

Die CU1783-Zellen wurden auf LB-Platten kultiviert. Bei Verwendung von mit Expressionsplasmiden transformierten Zellen enthielten die Platten zusätzlich das entsprechende Antibiotikum. Für die Herstellung von Übernachtskulturen wurden Einzelkolonien in 3 ml LB-Medium (bei Bedarf mit Antibiotikum) überführt und bei 37 °C im Inkubator geschüttelt.

Zur Langzeitlagerung gab man zu 500 µl einer Übernachtskultur 500 µl 40 % Glycerin und bewahrte diese bei -80 °C auf.

3.1.2 Expressionssystem

Zur Expression der EcA2 wurde der von Harms *et al.* (1991) beschriebene Expressionsvektor pTWE1 verwendet, ein Derivat des pT7-7-Vektors (Tabor & Richardson, 1985). Nach Transformation (s. 3.1.3) in den *E. coli*-Stamm CU1783 (s. 3.1.1) steht die Transkription des *ansB*-Gens unter der Kontrolle des Φ 10-Promotors des T7-Bakteriophagen. Das β -Lactamase-Gen verleiht den Bakterien zudem eine Ampicillin-Resistenz.

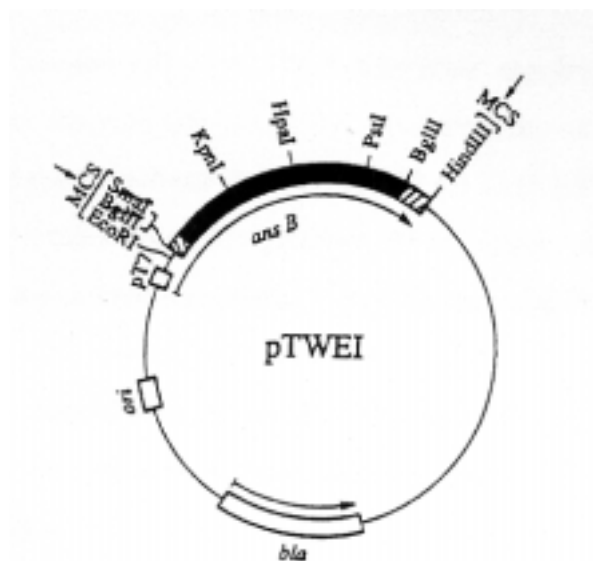


Abb. 3.1: Expressions-Plasmid pTWE1. MCS: Multiple cloning site, pT7: T7-Promotor, ori: Replikationsursprung, bla: β -Lactamase kodierendes Gen.

3.1.3 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen

Transformationspuffer TFB-1: 100 mM RbCl
50 mM
30 mM Kaliumacetat
10 mM CaCl₂
15 % Glycerin
pH 5.8 (Essigsäure)
sterilfiltriert

Transformationspuffer TFB-2: 10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
15 % Glycerin
pH 8.0 (Essigsäure)
sterilfiltriert

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C solange inkubiert, bis eine OD₅₅₀ von 0.4 – 0.5 erreicht war. Man zentrifugierte nun für 10 min. bei 3000 rpm, resuspendierte das Pellet in 30 ml TFB-1 Puffer, inkubierte 10 min. auf Eis und zentrifugierte erneut unter den gleichen Bedingungen. Abschließend nahm man die Zellen in 4 ml TFB-2 auf, aliquotierte sie in 150 µl-Portionen und lagerte sie bei –80 °C.

Zur Durchführung der Transformation wurden 150 µl kompetente Zellen zu der jeweiligen DNA-Lösung gegeben und 20 min. auf Eis inkubiert. Nach einer 90-sekündigen Behandlung bei 42 °C gab man 500 µl LB-Medium hinzu und schüttelte für 90 min. bei 37 °C. Abschließend wurde der Ligationsansatz auf LB-Platten (gegebenenfalls mit Ampicillin) ausplattiert.

3.1.4 Ethanolfällung von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit 0.1-fachem Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.5 und 2.5-fachem Volumen an eiskaltem abs. Ethanol versetzt und mindestens für 30 min. bei -20 °C oder 15 min bei -80 °C inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation (13,000 x g) nahm man den Überstand vorsichtig ab und wusch das Pellet mit eiskaltem 80 % Ethanol. Nach erneuter 5 minütiger Zentrifugation und Entfernung des Überstandes trocknete man das Pellet entweder an der Luft oder für 15 min. am Wasserstrahlvakuum. Die DNA wurde dann, abhängig von der nachfolgenden Verwendung, in 10 - 50 µl TE-Puffer oder H₂O gelöst.

3.1.5 DNA-Präparation

Doppelstrang-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers mit Hilfe des "QIAprep-spin-Kits". Aus 3 ml Übernachtskultur konnten so 1 - 5 µg DNA gewonnen werden.

Einzelstrang-DNA

PEG/NaCl-Lösung:	20 % PEG 6000 2.5 M NaCl
Roti®-Phenol:	TE-gesättigtes Phenol

Phagenfällung

3 ml einer 5-Stunden-Kultur von plasmidhaltigen TG1-Zellen wurden 10 min abzentrifugiert, der phagenhaltige Überstand abgenommen und dieser erneut 5 min rezentrifugiert. Die Fällung der Phagen erfolgte durch Zugabe von 1/5 bis 1/4 Volumen PEG/NaCl und mindestens 30-minütiger Inkubation bei 4 °C. Anschließend wurde 10 min zentrifugiert (12,000 x g) und nach Verwerfen des Überstandes das Pellet in 100 µl TE gelöst.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Die phagenhaltige Lösung wurde mit 100 µl Roti®-Phenol versetzt, 20 s am Vortex gemischt und zur Phasentrennung kurz zentrifugiert. Die wässrige Phase extrahierte man dann zweimal in analoger Weise mit dem gleichen Volumen an Chloroform. Abschließend unterzog man die wässrige Phase einer Ethanol-fällung (s. 3.1.3). Das erhaltene DNA-Pellet nahm man in 10 - 30 µl H₂O auf.

3.1.6 Isolierung von Einzelstrang-DNA im präparativen Maßstab

PEG/NaCl-Lösung:	20 % PEG 6000 2.5 M NaCl
Roti®-Phenol:	TE-gesättigtes Phenol

3 ml 2 x YT-Medium wurden mit 40 µl einer TG1/M13mp19/*ansB*-Übernachtskultur angeimpft und 5 bis 6 Stunden bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Zur Gewinnung des Phagenüberstandes wurde zweimal zentrifugiert (15 min, 12,000 x g) und der Überstand jeweils vorsichtig abgenommen. Dieses phagenhaltige Medium ließ sich bei 4 °C lagern.

Nun wurden 100 ml 2 x YT-Medium mit 1 ml TG1-Übernachtskultur infiziert und bei 37 °C geschwenkt bis man eine OD₅₅₀ von 0.25 erreichte, um sodann 1 ml des zellfreien Phagenüberstandes hinzuzugeben. Nach weiteren 4 Stunden Inkubation bei 37 °C zentrifugierte man die Lösung für 30 min bei 5,000 x g, 4 °C, verwarf die Pellets und leitete im Überstand die Phagenfällung durch Zugabe von 0.2-fachem Volumen an PEG/NaCl-Lösung ein. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C wurde zunächst 20 min unter analogen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand verworfen und nochmals für 5 min zentrifugiert. Nach sorgfältiger Entfernung des restlichen Überstandes resuspendierte man das erhaltene Pellet in 500 µl TE-Puffer. Zur erneuten Phagenfällung gab man 200 µl PEG/NaCl-Lösung hinzu, zentrifugierte die Probe zweimal 5 min bei 14,000 x g und verwarf jeweils den Überstand. Das Phagenpellet wurde wiederum in 500 µl TE gelöst. Die nun folgende Phenol-Chloroform-Extraktion begann man mit der Zugabe von 500 µl Roti®-Phenol, gründlichem Vortexen und 3-minütigem Zentrifugieren zur Phasentrennung. Der wäßrige Überstand wurde nachfolgend in gleicher

Weise je zweimal mit 500 µl Diethylether und Chloroform extrahiert. Abschließend erfolgte eine Ethanol-fällung (s. 3.1.3).

Zur DNA-Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl der erhaltenen Lösung auf 1000 µl mit a. bidest verdünnt und die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml.

3.1.7 Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen:	s. 2.2 mit zugehörigen 10fach konzentrierten Reaktionspuffern des Herstellers
Auftragspuffer (6fach konz.):	0.25 % Bromphenolblau 0.25 % Xylencyanol 30 % Glycerin in H ₂ O
alkalische Phosphatase (CIP):	1 U/µl

Im Falle einer analytischen Spaltung (1-3 µg DNA) wurden zur DNA-Lösung 1/10 End-Vol. Puffer und 1-3 U Restriktionsendonuklease hinzugegeben und auf ein Vol. von 20 µl mit a. bidest aufgefüllt. Diese Probe inkubierte man dann bei der jeweils optimalen Temperatur für 60 min.

Für einen präparativen Verdau (bis zu 20 µg DNA) betrug das Reaktionsvolumen 50 µl, es wurden 5 U Enzym eingesetzt und die Reaktionszeit verlängerte sich auf 4 Stunden. Bei Mehrfachverdau und Pufferinkompatibilität erfolgte eine Ethanol-fällung als Zwischenschritt.

Wurde Vektor-DNA linearisiert um sie nachfolgend zur Ligation einzusetzen (s.3.1.8), gab man 15 min vor Beendigung der Spaltungsreaktion 1 U alkalische Phosphatase hinzu. Die Spaltung beendete man jeweils durch Zugabe von 1/6 Vol. des Auftragepuffers.

3.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Gellösung:	0.8-1.5 % Agarose in 1x TAE- oder TBE-Puffer
	0.01 % Ethidiumbromid
Elektrophoresepuffer:	1 x TAE bzw. TBE
Auftragepuffer:	s. 3.1.6

Zur Herstellung der Gellösung wurde die Agarose bis zur vollständigen Auflösung in TAE- bzw. TBE-Puffer aufgekocht, abgekühlt bis auf ca. 50 °C und die entsprechende Menge an Ethidiumbromid-Stammlösung hinzugegeben. Das Gemisch wurde in die gewünschte Apparatur gegossen und nach dem Erstarren mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Zusammensetzung des Gels hing von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente ab; für DNA-Stücke von 0.1-1.5 kb verwendete man hochprozentige (1-1.5 %) TBE-Gele, für Fragmente >1 kb geringer konzentrierte (0.7-1 %) TAE-Gele.

Die mit 1/6 Vol. Auftragspuffer versetzten Proben wurden nun bei einer Spannung von 8V/cm Gellänge ca. 1 h lang aufgetrennt, bis der erste Farbstoff 2/3 der Gellänge zurückgelegt hatte. Größe und Menge der einzelnen DNA-Banden wurden anhand von standardisierten Größenmarkern abgeschätzt.

DNA-Extraktion aus Agarosegelen

QIAquick Gel Extraction Kit: Fa. Diagen

Mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraktion Kit" wurden DNA-Fragmente aus Agarosegelen isoliert. Zunächst schnitt man die entsprechende Bande mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel heraus, daß weitere Vorgehen richtete sich nach den Angaben des Herstellers.

3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligase-Puffer:	660 mM Tris-HCl, pH 7.5
(10fach konz.)	10 mM Dithiothreitol (DTT)
	50 mM MgCl ₂
T4-DNA-Ligase:	1 U/μl

Die Ligationen wurden in einem möglichst kleinen Volumen (< 20 μl) mit 50 – 100 ng Vektor-DNA durchgeführt. Die Menge an Insert-DNA bemaß man so, daß die freien DNA-Enden in äquimolaren Mengen oder einem Verhältnis von 1 : 3 (Vektor : Insert) vorlagen.

Die Inkubation erfolgte für 12 – 16 Stunden bei 4 °C. Als Negativkontrolle wurde dephosphorylierte, lineare Vektor-DNA (s. 3.1.6) verwendet. Bei der abschließenden Transformation der Ligationsansätze (s. 3.1.2) führte man zudem intakte Plasmid-DNA als Positivkontrolle mit.

3.1.10 DNA-Sequenzierung

Denaturierungslösung:	2 M NaOH
	2 mM EDTA
Sequenase Version 2.0:	13 U/μl T7-DNA-Polymerase in
	20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
	1 mM DTT
	0.1 mM EDTA
	50 % Glycerin
Pyrophosphatase:	5 U/μl in
	10 mM Tris/HCl, pH 7.5
	0.1 mM EDTA
	50 % Glycerin
Sequenase-Puffer:	250 mM NaCl
	100 mM MgCl ₂
	200 mM Tris/HCl, pH 7.5
Verdünnungs-Puffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7.5

	2 mM DTT
	0.1 mM EDTA
	50 % Glycerin
Sequenzierungsprimer:	20 µM Lösung eines entsprechenden Oligonukleotids
5 x Markierungslösung:	jeweils 7.5 µM dGTP, dCTP, dTTP
α - ³⁵ S-dATP:	0.37 mBq/µl
ddG-Terminationslösung:	je 80 µM dGTP, dATP, dCTP, dTTP 8 µM ddGTP 50 mM NaCl
ddA-Terminationslösung:	analog, aber 8 µM ddATP statt ddGTP
ddC-Terminationslösung:	analog, aber 8 µM ddCTP statt ddGTP
ddT-Terminationslösung:	analog, aber 8 µM ddTTP statt ddGTP
Stopplösung:	95 % Formamid 0.05 % (w/v) Xylencyanol FF 0.05 % (w/v) Bromphenolblau 20 mM EDTA

0.1 M DTT

Alkalische Denaturierung

Im Falle einer Doppelstrangsequenzierung mußte die DNA zuvor denaturiert werden. Hierzu gab man zu 20 µl DNA-Lösung (ca. 1-3 µg) 2 µl Denaturierungslösung und inkubierte für 5min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt.

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der von Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Methode durchgeführt. Hierzu verwendete man das Sequenase Version 2.0-Sequencing-Kit der Firma USB (Tabor & Richardson, 1987)

Für die Annealing-Reaktion wurde 7 µl DNA-Lösung mit 2 µl Sequenase-Puffer und 1 µl Primer-Lösung versetzt, die Mischung für 2 min im Wasserbad auf 65 °C erhitzt und anschließend in ca. 30 min auf unter 35 °C abgekühlt. Bis zur weiteren Verwendung lagerte man die Probe auf Eis.

Während des Annealings pipettierte man jeweils 2.5 µl der Terminationslösungen in verschiedene Reaktionsgefäße, verdünnte die Markierungslösung 1:5 mit a. bidest und die Sequenase mit gleichem Volumen an Pyrophosphatase sowie 6-fachem Volumen Verdünnungspuffer.

Zur Durchführung der Polymerisationsreaktion versetzte man den Annealingansatz mit 1 µl 0.1 M DTT, 2 µl 1:5 verdünnte Markierungslösung, 0.5 µl α -³⁵S-dATP und 2 µl 1:8 verdünnter Sequenase. Es wurde für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, während dieser Inkubation überführte man schon jeweils 3.3 µl der Probe in die Deckel der die Terminationslösung enthaltenden Reaktionsgefäße.

Die Abbruchreaktion wurde dann durch kurze Zentrifugation gestartet und für 5 bis 10 min bei 42 °C durchgeführt. Abschließend versetzte man die Proben mit 4 µl Stopplösung und lagerte sie bis zur Gelelektrophorese bei 20 °C.

Gelelektrophorese und Autoradiographie

Acrylamidlösung:	38 % Acrylamid 2 % Bisacrylamid
Gellösung:	50 g Harnstoff 15 ml Acrylamidlösung 4 ml 20 x TTE ad 100 ml mit a.bidest filtriert (1.2 µm Nitrocellulosefilter), entgast
Bindsilan:	3 % 10 % Essigsäure 0.3 % γ -Methacryloxypropyltrimethylsilan in Ethanol
Trennsilan:	5 % Dichlordimethylsilan in Chloroform
Laufpuffer:	0.8 x TTE
Waschlösung:	5 % Ethanol 5 % Essigsäure
Entwickler:	Kodak D-19
Fixierer:	500 g Natriumthiosulfat 50 g Kaliumdisulfit ad 1 l mit a. dest.

Zur Fertigstellung des Sequenzgels wurden die Elektrophorese-Glasplatten zunächst gründlich gereinigt. Die eine Platte behandelte man dann mit 25 ml Trennsilan, die andere mit 25 ml Bindsilan und baute sie unter Verwendung von 0.4 mm-Abstandshaltern ("Spacern") zusammen. Nun versetzte man die Gellösung mit 550 µl 10 % APS sowie 25 µl TEMED, füllte die Lösung zügig und luftblasenfrei zwischen die Glasplatten ein und dichtete mit einem Kamm ab. Die Polymerisation war nach ca. 4 h beendet.

Die Elektrophorese wurde bei 2200 V je nach abzulesendem Sequenzbereich 2-14 Stunden lang durchgeführt. Die Proben erhitze man vor dem Auftrag für 2 min bei 75 °C, stellte sie sofort auf Eis und setzte für den Gellauf 2-2.5 µl ein. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst 15 min in der Waschlösung geschwenkt und anschließend im Ofen bei 80 °C getrocknet. Anschließend legte man zur Autoradiographie ein Röntgenfilm auf (mindestens 18h), der abschließend entwickelt und fixiert wurde.

3.1.11 Aufbereitung von Oligonukleotiden

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden im Oligonukleotid-syntheselabor des IMT Marburg hergestellt. Sie lagen in ammoniakalischer Lösung vor und wurden zunächst an der Speed-Vac-Zentrifuge im Ölpumpenvakuum zur Trockne eingengt. Man nahm das Pellet in 200 µl a. bidest auf, führte eine Ethanol-fällung durch (s. 3.1.3) und löste die DNA in 40 µl a. bidest. Die Konzentration der so erhaltenen Lösung wurde nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\mu\text{g DNA} = E_{260} \cdot 33 \cdot \text{ml Gesamtlösung} \cdot \text{Verdünnung}$$

3.1.12 Ortsspezifische Mutagenese

Die gezielte Mutagenese am *ansB*-Gen der EcA2 aus *E. coli* erfolgte nach der Methode von Sayers *et al.* (1988). Es wurde ein Kit der Firma Amersham verwendet (Sculptor™ *in vitro* mutagenesis system).

Folgende im Kit enthaltenden Reagentien wurden verwendet (Zusammensetzung siehe Herstellerangaben):

Klenow-Polymerase

T4-DNA-Ligase

T5-Exonuklease

*Nci*I Restriktionsendonuklease

Exonuklease III

DNA-Polymerase I

Puffer A – D

dNTP-Mix A und B

5'-Phosphorylierung des Oligonukleotids

Kinasepuffer (10 x): 500 mM Tris/HCl
 100 mM MgCl₂
 50 mM DTE
T4-Polynukleotidkinase: 9 U/μl

Eine vorliegende Oligonukleotidlösung (s. 3.1.10) wurde mit a. bidest auf eine Konzentration von $E_{260} = 0.025$ pro Base eingestellt (für ein 21mer somit $E_{260} = 0.525$). Dies entspricht einer Konzentration von 1.6 pmol/μl. Zu 30 μl dieser Lösung gab man nun 3 μl 10 x Kinase Puffer und 9 U T4-Polynukleotidkinase. Man inkubierte für 15 min bei 37 °C und inaktivierte anschließend durch Erhitzen auf 70 °C (10 min). Das phosphorylierte Oligonukleotid kann bei -20 °C aufbewahrt werden.

Annealing

Zu 1 μl des phosphorylierten Oligonukleotids pipettierte man 2 μl M13mp19/*ansB*-Einzelstrang-DNA-Lösung (s. 3.1.5), 1 μl Puffer A sowie 5 μl a. bidest, erhitzte für 3 min auf 70 °C und beließ danach 30 min bei 37 °C. Der Annealing-Ansatz wurde bis zur Weiterverwendung auf Eis gelagert.

Synthese und Ligation des mutierten DNA-Stranges

Zur Annealing-Reaktion gab man 10 μl dNTP-Mix A, 2.5 U T4-DNA-Ligase, 4 U Klenow-Polymerase, inkubierte ca. 16 h bei 16 °C und hitzeinaktivierte dann 15 min lang bei 70 °C.

Entfernung von Einzelstrang-Template-DNA

Zur Synthesereaktion wurden 50 µl Puffer B sowie 2000 U T5-Exonuklease gegeben, man inkubierte für 30 min bei 37 °C und erhitzte 15-20 min lang auf 70 °C.

Spaltung („Nicking“) und Abbau des nicht-mutierten DNA-Stranges

Man versetzte die Lösung für die Spaltung zunächst mit 5 µl Puffer C und 5 U *Nci*I. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 90 min. Anschließend wurden 20 µl Puffer D und 160 U Exonuklease III hinzugegeben, die Probe 30 min bei 37 °C belassen und 15 min bei 70 °C hitzeinaktiviert.

Repolymerisation des 2. DNA-Stranges

Sie erfolgte innerhalb einer Stunde bei 37°C nachdem 20 µl dNTP-Mix B, 3.5 U DNA-Polymerase I und 2.5 U T4-DNA-Ligase zur obigen Lösung hinzugegeben worden waren.

Der Mutageneseansatz wurde bis zur Transformation in TG1-Zellen (s. 3.1.2) bei -20 °C gelagert. Die Identifikation der positiven Klone erfolgte mittels DNA-Sequenzierung (s. 3.1.9).

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Isolierung der Mutanten

Sämtliche Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

3.2.1.1 Isolierung periplasmatischer Enzyme

Sphäroblasten-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8.5
 500 mM Saccharose
 0.5 mM EDTA

Für eine präparative Isolierung der Mutanten wurde 1 ml einer CU1783/pTWE-Übernachtskultur in 100 ml LBA-Medium überführt und 6 h im Schüttelinkubator bei 37 °C herangezogen. Diesen Ansatz gab man anschließend in 2 Liter frisches LBA-Medium und setzte die

Inkubation über Nacht fort. Eine Induktion mittels IPTG erbrachte keine signifikante Steigerung der Expression, so daß auf die Zugabe von IPTG verzichtet wurde.

Die Kultur zentrifugierte man anschließend bei 4 °C und 1800 x g für 15 min, verwarf den Überstand, resuspendierte das Bakterienpellet in 200 ml eiskaltem Sphäroblasten-Puffer und ließ 10 min auf Eis stehen. Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 6000 x g, 4 °C. Der Überstand wurde gründlich entfernt und das Pellet auf 37 °C erwärmt. Der osmotische Schock erfolgte, indem die Bakterien in 50 ml eiskaltem a. bidest resuspendiert wurden. Nach weiteren 10 min auf Eis zentrifugierte man für 30 min bei 10000 x g, 4 °C und entnahm vorsichtig ohne Bakterienkontamination den die periplasmatischen Enzyme enthaltenden Überstand. Diesen Überstand versetzte man anschließend portionsweise bis zur 95%-igen Sättigung mit Ammoniumsulfat (32.5 g / 50 ml) und lagerte die Protein-Fällung bei 4 °C.

3.2.1.2 Chromatofokussierung

Säulenmaterial:	PBE 94, Fa. Pharmacia
Startpuffer:	25 mM Piperazin/HCl, pH 5.5 bzw. 25 mM Histidin/HCl, pH 6.2
Elutionspuffer:	Polybuffer 74/HCl, 1:10 mit a.bidest verdünnt, pH 4.0

Das durch 15-minütige Zentrifugation der Ammoniumsulfatfällung (s. 3.2.1.1) bei 15,000 x g erhaltene Proteinpellet wurde in möglichst wenig Startpuffer aufgenommen und über Nacht gegen 2 x 500 ml des gleichen Puffers dialysiert. Die Wahl des Startpuffers hing dabei vom isoelektrischen Punkt der zu reinigenden Mutante ab. Anschließend zentrifugierte man 20 min bei 12,000 x g.

Die Chromatofokussierungssäule (35 x 1 cm) äquilibrierte man mit 200 ml des entsprechenden Startpuffers und spülte sie vor dem Auftrag der Proteinlösung mit 2 - 3 ml Elutionspuffer. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 25 ml pro Stunde, und es wurden 90 Fraktionen zu je 2ml aufgefangen. Der Nachweis des Proteins erfolgte mittels Aktivitätstest (3.2.4), der Extinktionsbestimmung bei 280 nm (3.2.2) und SDS-Gelelektrophorese (3.2.3). Asparaginasehaltige Fraktionen wurden vereinigt, bis zur 95%-igen Sättigung mit

Ammoniumsulfat versetzt und bei 4 °C aufbewahrt. Nach beendigter Chromatofokussierung wurde die Säule mit 50 ml 1.5 M NaCl gespült und konnte dann bei 4 °C gelagert werden.

3.2.1.3 Gelfiltration

Säulenmaterial: Sephacryl S-300 HR
Laufpuffer: 150 mM NaCl
30 mM Tris/HCl, pH 7.1
filtriert (0.4 µm-Nitrocellulosefilter), entgast

Zur Entfernung des Elutionspuffers aus 3.2.1.2 wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Die Ammoniumsulfatfällung der Chromatofokussierung zentrifugierte man hierzu wie unter 3.2.1.2 beschrieben ab, nahm sie in möglichst wenig Laufpuffer auf und dialysierte gegen 2 x 200 ml des gleichen Puffers über Nacht. Die Gelfiltrationssäule (100 x 2 cm) wurde mit Laufpuffer äquilibriert (300 ml) und die Probe vor dem Auftrag zentrifugiert (12,000 x g, 4 °C). Die Elution erfolgte bei einer Laufgeschwindigkeit von 12 ml/h. Es wurden 2 ml Fraktionen aufgefangen; den Proteinnachweis führte man wie unter 3.2.2 beschrieben durch.

3.2.2 Proteinbestimmungen

Bestimmung durch UV-Spektroskopie

Der Proteingehalt einer gereinigten EcA2-Lösung wurde über die Beziehung $E_{280} (1\%) = 7.7$ bestimmt.

Bestimmung nach Bradford

Bradford-Reagenz: 0.01 % (w/v) Serva Blau G
5 % (v/v) Ethanol
10 % (v/v) 85 % Phosphorsäure

In Anlehnung an die Methode nach Bradford (1976) wurde diese Proteinbestimmung in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Sie diente der Konzentrationsbestimmung im Falle von nicht gereinigten Proteinproben.

Man legte je 10 µl der zu bestimmenden Proteinlösungen vor und fügte 250 µl Bradford-Lösung hinzu. Nach 25-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm ermittelt. Zur Erstellung einer Eichgeraden dienten BSA-Lösungen von 5-500 µg/ml.

3.2.3 Protein-Gelelektrophorese

SDS-Page

In Anlehnung an die Methode nach Laemmli (1979) wurde die SDS-Gelelektrophorese in einer Minigel-Apparatur durchgeführt.

Acrylamidlösung:	30 % Acrylamid
	0.8 % Bisacrylamid
Trenngelpuffer:	1.5 M Tris/HCl, pH 8.8
Sammelgelpuffer:	0.5 M Tris/HCl, pH 6.8
Probenpuffer:	0.1 M Tris/HCl, pH 6.8
	2 % SDS
	3 % Mercaptoethanol
	10 % Glycerin
	0.01 % (w/v) Bromphenolblau
Elektrodenpuffer (10 x):	250 mM Tris
	1.9 M Glycin
	35 mM SDS
Molekulargewichtsmarker:	Dalton-Mark VII-L™, Fa. Sigma

Gellösungen

Trenngellösung (12 % Acrylamid)	Sammelgellösung (4.5 % Acrylamid)	
4 ml	0.65 ml	Acrylamidlösung
2.5 ml	-----	Trenngelpuffer
-----	1.25 ml	Sammelgelpuffer
1 ml	0.5 ml	1 % SDS
1 ml	-----	87 % Glycerin
1.45 ml	2.5 ml	H ₂ O
50 µl	25 µl	10 % APS
10 µl	5 µl	TEMED

Zunächst wurde die Trenngellösung in die Apparatur eingefüllt und dann sofort vorsichtig mit der Sammelgellösung überschichtet. Die Proben wurden vor dem Auftrag 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 3 min durch Kochen denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst für 15 min bei 80 V und anschließend für ca. 1 h bei 200 V bis zum Auslaufen der Farbstofffront.

Proteinfärbung mit Coomassie

Färbelösung: 45 % Methanol
 10 % Essigsäure
 0.1 % (w/v) Serva Blau R

Entfärbelösung: 45 % Methanol
 10 % Essigsäure

Das Gel wurde 15 min bei 50 °C in der Färbelösung geschwenkt und anschließend bis zur Entfärbung der nicht proteinhaltigen Bereiche mehrmals mit Entfärbelösung behandelt. Nach kurzem Abspülen mit Wasser konnte es dann im Wasserstrahlpumpenvakuum und 70 °C getrocknet werden.

3.2.4 Aktivitätstests

Zum Nachweis der Asparaginase-Aktivität stehen prinzipiell verschiedene Methoden zu Verfügung. Die einzelnen Verfahren unterscheiden sich jedoch in ihrer Anwendungsmöglichkeit, und welcher Nachweis zum Einsatz kam richtete sich somit nach der jeweiligen Fragestellung.

Der Einsatz des Substratanalogons L-Asparaginsäure- β -hydroxamat (AHA) bietet den Vorteil eines in der Regel etwa um den Faktor 10 höheren K_m -Wertes, so daß bei den Kinetiken mit diesem Substrat entsprechend höhere Substratkonzentrationen eingesetzt werden konnten. Hinzu kommt der wesentlich empfindlichere Nachweises des anstatt des Ammoniaks entstehenden Hydroxylamins. Dieser Test fand somit Anwendung bei umfassenden kinetischen Untersuchungen der Mutanten.

Diente L-Asparagin als Substrat, so verfolgte man die Reaktion über die Detektion der entstehenden Ammoniumionen mittels des gekoppelten optischen Tests. Aufgrund der im Vergleich zum Umsatz mit AHA geringeren Empfindlichkeit und des niedrigeren K_m -Wertes, wurde die Reaktion mit L-Asparagin zumeist bei Substratsättigung durchgeführt. Vollständige Kinetiken ließen sich zuverlässig nur bei Mutanten mit deutlich erhöhtem K_m -Wert aufnehmen. Der Nachweis über HPLC wurde wegen des hohen Zeitaufwandes nur bei Umsetzungen mit Substratanaloga angewendet, bei denen die Reaktion über das entstehende L-Aspartat oder seiner Derivate verfolgt werden mußte.

3.2.4.1 Bestimmung mit L-Asparaginsäure- β -Hydroxamat (Derst *et al.*, 1994)

L-Asparaginsäure- β -Hydroxamat:	0.025 – 100 mM in Puffer
Puffer:	50 mM MES (pH 5.0-6.5)
	50 mM MOPS (pH 7.0-7.5)
	50 mM Tris/HCl (pH 8.0-8.5)
	50 mM CHES (pH 9.0-10.0)
TCA-Lösung:	12 % Trichloressigsäure in Wasser
Oxin-Lösung:	25 % 2 % Hydroxychinolin in Ethanol
	75 % 1 M Na ₂ CO ₃

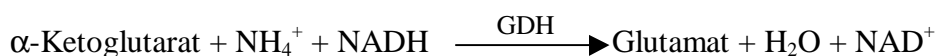
Zur Vorbereitung des einzusetzenden Enzyms wurde ein Teil der entsprechenden Ammoniumsulfatfällung abzentrifugiert (12,000 x g, 4 °C), das Pellet in möglichst wenig Volumen des gewünschten Puffers aufgenommen und mindestens 5 Stunden gegen den gleichen Puffer dialysiert. Abschließend wurde erneut zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entnommen und die Enzymkonzentration UV-spektroskopisch (s. 3.2.2) bestimmt. Die Konzentration stellte man je nach Aktivität der Mutante auf 0.02 – 5 mg/ml ein.

Für eine vollständige Kinetik legte man je 500 – 1000 µl der Puffer/Substratlösungen vor (im Bereich von $0.1 - 10 \cdot K_m$), gab 10 – 100 µl Enzym hinzu, entnahm nach verschiedenen Zeiten 50 – 200 µl Aliquots und gab diese zum Abstoppen der Reaktion auf 10-25 µl TCA-Lösung. Der Nachweis des entstandenen Hydroxylamins erfolgte durch Zugabe von 500-1000 µl Oxin-Lösung, Erhitzen für 1 Minute auf 100 °C, abkühlen lassen auf Raumtemperatur und anschließender Vermessung der Proben bei 705 nm. Der Extinktionskoeffizient des entstehenden Farbstoffes beträgt bei dieser Wellenlänge $17,500 \text{ l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

Für einfache Routineuntersuchungen wurde zumeist 1mM AHA in MES-Puffer (pH 6.0) verwendet.

3.2.4.2 Gekoppelter optischer Test

Mit dieser Methode läßt sich direkt der Umsatz an natürlichem Substrat Asparagin über die Detektion der entstehenden Ammoniumionen ermitteln. In Gegenwart eines hohen Überschusses des Enzyms Glutamat-Dehydrogenase kann man die Abnahme von NADH bei 340 nm verfolgen gemäß der Reaktion



Der Extinktionskoeffizient beträgt $6220 \text{ l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Substrat:	Asparagin-Stammlösungen; 1.0 - 100 mM in Puffer
Puffer:	100 mM Na-Acetat; pH 5.0 100 mM MOPS; pH 7.0
α -Ketoglutarat:	240 mM in H ₂ O; pH 7.0
NADH/ADP-Lösung:	10 mM NADH, 50 mM ADP in H ₂ O (frisch angesetzt)

Glutamat-Dehydrogenase: 1.3 U/μl; in 50 % Glycerol

Der Nachweis wurde in Mikrotiterplatten bei einem Gesamtvolumen von 300 μl durchgeführt. Zu 268 μl Puffer-/Substratlösung gab man 10 μl α-Ketoglutarat- und 10 μl NADH/ADP-Lösung sowie 2 μl Glutamat-Dehydrogenase. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl Asparaginase gestartet und die Abnahme an NADH mittels eines Mikrotiterplattenlesegerätes und des Computer-Programms PC-Kinetik-Collector (Fa. BioRad) direkt am PC verfolgt.

3.2.4.3 Messungen in D₂O/H₂O-Mischungen (Proton inventories)

Zur Durchführung und Auswertung von Proton inventory-Messungen siehe Quinn & Sutton, 1991; Schowen & Schowen, 1982.

Die kinetischen Messungen in D₂O/H₂O-Mischungen wurden im Prinzip wie unter 3.2.4.2 beschrieben durchgeführt; unter Berücksichtigung folgender Änderungen:

Herstellung der Reagentien:

Die unter 3.2.4.2 erwähnten Puffer-, Substrat-, NADH/ADP-, und α-Ketoglutaratlösungen wurden alle zusätzlich in D₂O (99.9%, Fa.Sigma) angesetzt. Aufgrund der Hygroskopizität des Deuteriumoxids verwendete man die Reagentien entweder sofort oder lagerte sie verschlossen in kleinen Aliquots. Die Einstellung der pH-Werte erfolgte mit NaOD unter Berücksichtigung der folgenden Korrektur:

$$pD = \text{gemessener Wert} + 0.4.$$

(Glasoe & Long, 1960)

Vorbereitung der Enzymlösungen:

Ein Teil der entsprechenden Ammoniumsulfatfällung zentrifugierte man ab (12,000 x g, 4 °C) und dialysiert ihn über Nacht gegen 10 mM Tris, pH 8.5. Um die durch die Enzymlösung in den Test eingebrachte Menge an H₂O möglichst gering zu halten

a) wurde bei sehr inaktiven Mutanten an der Speed-Vac bis zur Trockne eingengt, in H₂O aufgenommen, nochmals eingengt und abschließend das Pellet in geeignetem Volumen an Puffer gelöst, oder

b) bei aktiveren Mutanten bzw. Wildtyp-Enzym dialysierte man zunächst analog über Nacht und dann für weitere 4 h gegen den gewünschten Puffer, engte die Lösung gegebenenfalls mittels Centricon (Ausschlußvolumen 12 kD) ein und verdünnte auf die gewünschte Enzymkonzentration mit Puffer.

In beiden Fällen konnte keine Abnahme an Enzymaktivität festgestellt werden.

Durchführung:

Die Zusammensetzung der Reaktionslösungen entsprach den Angaben unter 3.2.4.2, die verschiedenen H₂O/D₂O-Mischungsverhältnisse wurden durch Zusammenpipettieren von verschiedenen Mengen an in H₂O und D₂O angesetzten Reagentien hergestellt. In der Regel wurden pro Mischungsverhältnis 2 - 4-fach-Bestimmungen angesetzt. Alle Reaktionen einer Meßreihe startete man direkt hintereinander mit Asparaginase und verschloß die Mikrotiterplatte zügig mit selbstklebender, UV-durchlässiger Folie, um ein konstantes H₂O/D₂O-Verhältnis über die Dauer der Datenaufnahme hinweg zu gewährleisten.

Auswertung:

Das Einbringen des Enzyms und des Substrats in deuteriumhaltiges Medium verursacht an vielen Positionen der Substanzen einen H-/D-Austausch und führt zu einem kinetischen Isotopeneffekt der auf den unterschiedlichen Aktivierungsenergien beim Isotopenübergang während der Reaktion basiert.

Ist n der molare Anteil an D₂O, so gilt: $[D_2O]/[H_2O] = n/(1-n)$

und für einen Reaktanten AH analog: $[AD]/[AH] = n/(1-n)$

Dies gilt für den Fall, daß die Gleichgewichtskonstante des Austausches für das Proton und das Deuterium an der bestimmten Substrat-Position den gleichen Wert hat wie die des Lösungsmittels mit dem sie äquilibriert werden. Dies ist in der Regel nicht der Fall, so daß ein sogenannter Fraktionierungsfaktor Φ eingeführt wird. Somit ergibt sich $[D_2O]/[H_2O] = \Phi \cdot n/(1-n)$. Ein signifikant vom Wert 1 abweichender Fraktionierungsfaktor-Wert liegt zum Beispiel bei einem transferierten Proton aber auch einer sehr starken Wasserstoffbrücke vor. Ein H-/D-Austausch kann nicht nur im Grundzustand, sondern auch im Übergangszustand stattfinden und auch hier gilt demgemäß $\Phi^\# \cdot n/(1-n)$.

Für die Geschwindigkeit der Reaktion ergibt sich dann (nach einigen Zwischenstufen) über alle betroffenen Protonen:

$$V(n) = V_0 \frac{\prod (1-n + n \cdot \Phi^{\#})}{\prod (1-n + n \cdot \Phi)} \quad (\text{Gross-Butler-Gleichung})$$

mit V_0 = Geschwindigkeit in H_2O .

Die Energiedifferenzen und damit die Auswirkung auf die Reaktionsgeschwindigkeit beim Isotopenaustausch sind für die überwiegende Mehrheit der Positionen vernachlässigbar gering, dies gilt für die meisten Protonen im Übergangszustand und insbesondere im Falle des Grundzustandes. Die obige Gleichung vereinfacht sich somit zu:

$$V(n) = V_0 (1-n + n \cdot \Phi^{\#})$$

$V(n)$ linear; Ein-Protonen-Katalyse

$$V(n) = V_0 (1-n + n \cdot \Phi_1^{\#}) (1-n + n \cdot \Phi_2^{\#})$$

$V(n)$ = quadratisch; Zwei-Protonen-Katalyse

$$V(n) = V_0 e^{q_T(\Phi^{\#} - 1)n}$$

(q_T = Anzahl der beteiligten Positionen)

$V(n)$ exponentiell, „Solvatations-Effekte“

Die Anzahl der am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beteiligten Protonen läßt sich dann über die Anpassung dieser Gleichungen an die Meßpunkte ermitteln.

3.2.4.4 Bestimmung von Asparaginsäure

Asparaginsäure wurde im gekoppelten Test mit Aspartat-Aminotransferase (GOT) und Malat-Dehydrogenase (MDH) bestimmt.



Gemessen wird die Abnahme der Extinktion von NADH bei 340 nm. Der Extinktionskoeffizient beträgt $6220 \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$. Der Test wurde als Endpunktbestimmung durchgeführt.

Puffer:	100 mM MOPS; pH 7.0
α -Ketoglutarat:	240 mM in H ₂ O; pH 7.0
NADH:	10 mM NADH, (frisch angesetzt)
Aspartat-Aminotransferase:	2 U/ μ l
Malat-Dehydrogenase:	2.5 U/ μ l

Der Test wurde in der Mikrotiterplatte bei einem Gesamtvolumen von 300 μ l durchgeführt. Die Ansätze enthielten neben der Probe 10 μ l α -Ketoglutaratlösung, 10 μ l NADH-Lösung und 2.5 U MDH. Mit Puffer wurde auf 300 μ l aufgefüllt. Zunächst wurde die Extinktion für 5 - 10 min ohne die Zugabe von GOT aufgezeichnet. Nach der Zugabe von GOT verfolgte man die Reaktion bis zur Konstanz der Extinktion. Die Gesamtänderung der Extinktion ist dann proportional zur Menge an Asparaginsäure.

3.2.4.5 Bestimmung von Asparagin und Aspartat durch Aminosäureanalyse

Substrat:	L-Asparagin, L-Asparagin- β -methylamid in 50 mM MES, pH 5.0 oder 50 mM MOPS, pH 7.0
PITC:	Phenylisothiocyanat
Kopplungspuffer:	35 % H ₂ O 30 % Acetonitril 25 % Pyridin 10 % Triethylamin
Puffer A:	50 mM Natriumacetat 2.75 % Triethylamin pH 6.4 (Phosphorsäure), durch Membranfilter filtriert
Puffer B:	50 % Puffer A 40 % Acetonitril 10 % Methanol
Säule:	RP-Selekt, 5 μ m, 0.45 cm \varnothing , 20 cm Länge, Fa. Merck

Zu 500 µl Substratlösung wurden, abhängig von spezifischer Aktivität und Enzymkonzentration, 10 – 100 µl Enzymlösung gegeben. In verschiedenen Zeitabständen entnahm man 100 µl, versetzte sie mit 50 µl 12 % TCA-Lösung, ließ 15 min auf Eis stehen und zentrifugierte von ausgefallenem Protein ab.

Den Überstand nahm man ab und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Das Pellet unterzog man nun einer Derivatisierung mittels PITC, indem man es zunächst in 50 µl Kopplungspuffer aufnahm, mit 5 µl PITC versetzte und 30 min bei Raumtemperatur inkubierte. Das Lösungsmittel wurde erneut im Vakuum entfernt und der Rückstand in 200 µl Puffer A mit 10 µl Acetonitril gelöst. Man trug jeweils 20 µl Portionen auf die Säule auf; die Elution erfolgte isokratisch mit 90 % Puffer A / 10 % Puffer B und wurde bei 254 nm verfolgt.

Die erhaltenen Chromatogramme wurden integriert. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer mit L-Aspartat erstellten Eichkurve.

3.2.5 Untersuchungen zur Proteinstabilität

(Becktel & Schellman, 1987; Jaenicke, 1987; Shirley, 1992)

3.2.5.1 Chemische Denaturierungsuntersuchungen

Denaturanten-Stammlösung: 3 M Guanidin·HCl

Probenpuffer-Stammlösung: 1 M Tris/HCl, pH 8.0

Das als Ammoniumsulfatfällung vorliegende Enzym wurde über Nacht gegen 50 mM Tris/HCl, pH 8.0 dialysiert um eventuell gebundenes L-Aspartat zu entfernen. Danach erfolgte eine Zentrifugation (20 min, 12,000 x g, 4 °C) um von unlöslichen Bestandteilen abzutrennen. Anschließend bestimmte man die Enzymkonzentration der Lösung (s. 3.2.2) und stellte sie mit Puffer auf 1 - 1.3 mg/ml ein.

Die Denaturanten-Stammlösung und a. bidest filtrierte man nun durch 0.4 µm Nitrocellulosemembranen. Zu jeweils 50 µl Probenpuffer-Stammlösung gab man unterschiedliche Volumina an a. bidest und 3 M Gu·HCl und versetzte die Proben mit 50 µl Enzymlösung. Das Endvolumen betrug jeweils 1 ml. Die Lösungen wurden gut durchmischt und für 3 h bei 25 °C

inkubiert, damit sich ein Gleichgewicht zwischen nativem und denaturiertem Enzym einstellen konnte.

Während der Inkubationszeit bestimmte man die Brechungsindizes $n_D^{25\text{ °C}}$ der einzelnen Proben; aus ihnen kann über die Gleichung (Pace *et al.*, 1989)

$$[D] = 57.147 \cdot (\Delta n) + 38.68 \cdot (\Delta n)^2 - 91.60 \cdot (\Delta n)^3$$

die Denaturantenkonzentration genau bestimmt werden.

Fluorimetrie

Während der Inkubationszeit stellt sich in jeder Probe ein Gleichgewicht zwischen denaturierter und nativer Konformation des Proteins ein. Als Sonde für die Konformation des Proteins diente die Fluoreszenz des einzigen in der EcA2 enthaltenen Tryptophanrestes, dessen Emissionsmaximum bei einer Anregungswellenlänge von 285 nm bei 323 nm liegt. Das denaturierte Enzym besitzt zwei Maxima, welche den Tyrosinresten (ca. 310-315 nm) und dem dann in hydrophiler Umgebung vorliegenden Tryptophanrest (350 nm) zugeschrieben wurden (Shifrin *et al.*, 1971). Es wurde dementsprechend ein Emissionsspektrum von 300-360 nm aufgezeichnet und die Werte bei 323 und 350 nm protokolliert.

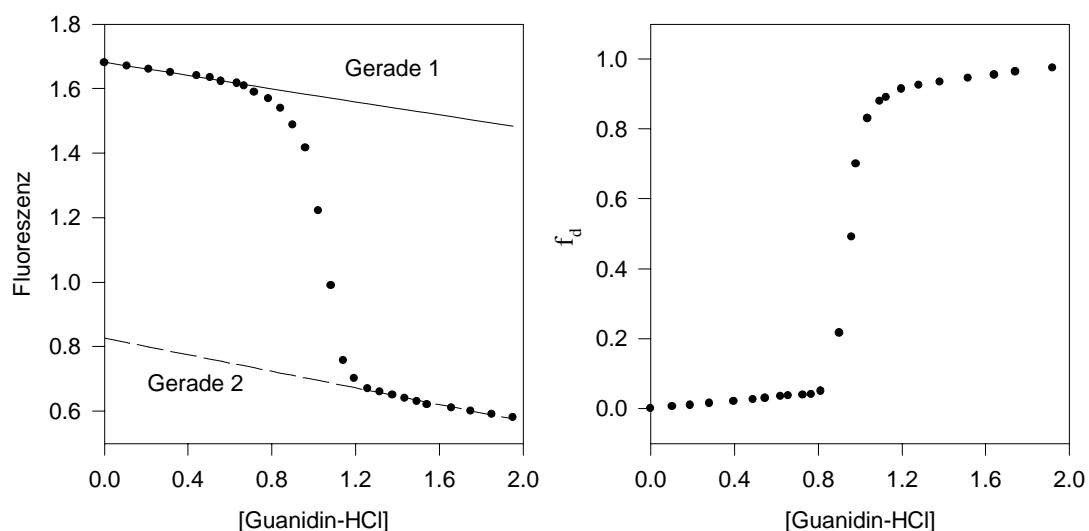


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der bei der chemischen Denaturierung erhaltenen Kurvenverläufe. Links: Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Denaturantenkonzentration, Rechts: Anteil an denaturiertem Enzym (f_d) in Abhängigkeit von der Denaturantenkonzentration.

Es ergibt sich der in Abbildung 3.2 schematisch gezeigte Verlauf der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Denaturantenkonzentration:

Da die Fluoreszenzintensitäten auch oberhalb und unterhalb des Denaturierungsbereiches variieren, werden der Ausgangs- und der Endpunkt der Messung als Geradengleichung formuliert. Für den Anteil an denaturiertem Enzym läßt sich dann formulieren:

$$f_d = (F_{(D)} - \text{Gerade 1}) / (\text{Gerade 2} - \text{Gerade 1}) \quad [1]$$

$F_{(D)}$ ist die Fluoreszenzintensität bei einer bestimmten Denaturantenkonzentration.

Im Falle eines einphasigen Überganges zwischen den beiden Zuständen gilt über den gesamten Bereich:

$$f_n + f_d = 1 \quad [2]$$

wobei f_n den relativen Anteil des nativen, f_d den des denaturierten Enzyms wiedergibt.

Nach dem Massenwirkungsgesetz ist die Gleichgewichtskonstante $K_{(D)}$ der reversiblen Denaturierung gegeben durch:

$$K_{(D)} = f_d / f_n \quad [3]$$

und man erhält:

$$f_d = K_{(D)} / (1 + K_{(D)}) \quad [4]$$

Für die freie Enthalpieänderung gilt

$$\Delta G_{(D)} = -RT \cdot \ln K_{(D)} \quad [5]$$

Trägt man die nun für jede Konzentration an Guanidin-Hydrochlorid berechenbare, freie Enthalpie gegen die Denaturantenkonzentration auf, so ergibt sich eine lineare Abhängigkeit aus der man die Stabilität des Proteins in denaturantenfreier Lösung ($\Delta G_{(H_2O)}$) entnehmen kann:

$$\Delta G_{(D)} = \Delta G_{(H_2O)} - m [\text{GuHCl}] \quad [6]$$

Als weiteren charakteristischen Wert erhält man hierbei m , der als Steigung die Abhängigkeit der Denaturierung von der Denaturantenkonzentration beschreibt.

Den aus Gleichung [1] erhaltenen, experimentellen Daten für f_d wurde unter Berücksichtigung von [5] und [6] die Gleichung [4] angepaßt und die erhaltenen Werte für m und $\Delta G_{(H_2O)}$ entnommen.

3.2.5.2 Thermische Denaturierung

Substratlösung:	1 - 20 mM AHA in Puffer
Puffer:	50 mM MES, pH 5.0
	50 mM MOPS, pH 7.0
	50 mM CHES, pH 9.0

Die Gewinnung der Enzymlösung erfolgte wie unter 3.2.5.1 angegeben. Jeweils 100 μ l dieser Probe wurden in 0.5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Enzymkonzentration richtete sich nach der Aktivität der untersuchten Mutante, betrug jedoch maximal 0.3 mg/ml. Man überschichtete nun mit 2 Tropfen Mineralöl, beließ die Proben zunächst 1 Minute bei 25 °C im Thermocycler, erwärmte nachfolgend mit einer Temperaturänderung von 1 °C/Minute bis auf 85 °C, entnahm dabei alle 1 - 2 min 10 - 15 μ l Lösung und bestimmte die Aktivität gemäß 3.2.4.1. Man erhält einen, im Prinzip zu Abbildung 3.1 analogen, Verlauf der Aktivität mit der relativen Aktivität auf der y- und der Temperatur auf der x-Achse. Durch Anpassung der Meßwerte an die Gleichung [7] läßt sich dann die Halbdenaturierungstemperatur T_m bestimmen:

$$F = \text{Gerade 1} + (\text{Gerade 2} - \text{Gerade 1}) \cdot \frac{0.1 T_m \cdot n}{0.1 T_m \cdot n + 0.1 T_m \cdot n} \quad [7]$$

3.3 Molecular Modeling

Software

Hyper Chem, Release 3.0 for Windows	Autodesk, Inc.
Swiss-PdbViewer, V. 3.0 (SPDBV)	Geneva Biomedical Research Institute
PC Spartan <i>Plus</i>	Wavefunction, Inc.

Hardware

Für Spartan-*Plus* und SPDBV: PC Pentium II, 233 MHz, 64 MB Arbeitsspeicher unter Windows NT

Für Hyper Chem: PC Pentium, 166 MHz , 32 MB Arbeitsspeicher unter Windows 3.11

Amber-Minimierung (Weiner *et al.*, 1984)

Ausgangspunkt der Amber-Minimierung war die Kristallstruktur der L-Asparaginase II aus *E.coli* (Swain *et. al.*, 1993; 2.3 Å-Auflösung) mit gebundenem L-Aspartat.

Der Teil der Struktur in einem Kugel-Radius von 20 Å um das C₂-Atom des Substrats herum wurde extrahiert und in Hyper-Chem importiert. Anschließend wurde das enthaltene L-Aspartat in L-Asparagin bzw. L-Asparagin-β-methylamid umgewandelt.

Die eigentliche Minimierung erfolgte mit dem in Hyper-Chem enthaltenen Amber-Kraftfeld.

Dabei wurden folgende Konditionen gewählt:

- Die beweglich gehaltenen Atome minimierte man mit den All-Atom Parametern, die fixierten Atome mit United-Atom-Parametern.
- Als Algorithmus wurde die Conjugate Gradient-Methode nach Polak-Ribiere verwendet.
- Der RMS-Gradient betrug 0.1 kcal Å⁻¹ mol⁻¹.

Die erhaltenen Strukturen wurden für die weiteren Berechnungen eingesetzt.

Semi-Empirische PM3-Minimierungen (Stewart, 1989)

Für die quantenmechanischen Berechnungen wurde das Programm PC Spartan *Plus* verwendet. Die für diese Kalkulationen benötigte Rechnerleistung ist wesentlich höher als bei Amber-Minimierungen; daß Programm akzeptiert dementsprechend nur maximal 100 Atome. Die Zahl der Atome im aktiven Zentrum mußte daher verringert werden. Alle Reste bis auf Thr-12, Thr-89, Lys-162, Asp-90, Glu-283, Ser-58 und das Substrat wurden entfernt. Zudem wurden vier Wassermoleküle in dem System belassen (vgl. 4.3.1). Die verbliebenen Reste wurden dann wie in Abb. 3.3 dargestellt reduziert.

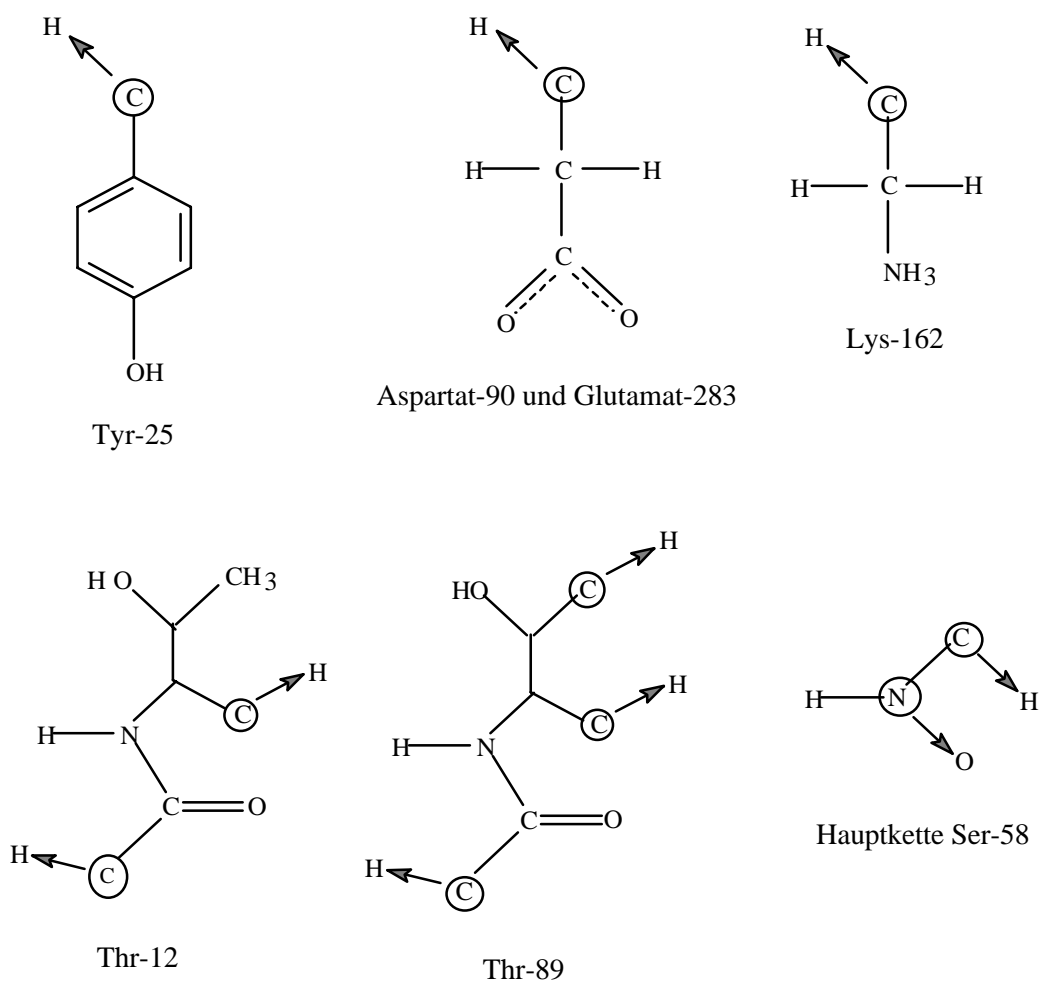


Abb. 3.3: Reduzierung der katalytischen Reste. Die mit einem Kreis markierten Atome wurden gegen die am Ende des Pfeils angegebenen Atome ausgetauscht.

Die eigentlichen Rechnungen wurden wie folgt ausgeführt:

- Das gesamte System, mit Ausnahme der eingefrorenen Atome, wurde geometrieoptimiert.
- Zur Simulation von Reaktionsschritten wurde der Abstand der Atome, die miteinander reagieren sollen, schrittweise verringert.
- Die Kalkulationen wurden bis zu einem RMS-Gradient von $0.0001 \text{ kcal } \text{Å}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ durchgeführt.
- Die Endstruktur jedes simulierten Reaktionsschrittes wurde dahingehend überarbeitet, daß alle alten, dann gelösten Bindungen entfernt und entsprechend die neuen Bindungen voll ausgebildet wurden. Bei letzteren wurden (sofern nicht explizit anders angegeben) keine Atomabstände mehr vorgegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Gerichtete Mutagenese und Charakterisierung der Mutanten

4.1.1 Auswahl der Reste zur Mutagenese

Eine der entscheidenden Fragen hinsichtlich des Reaktionsmechanismus der EcA 2 bezieht sich auf die Aktivierung der beiden Nukleophile. Dies sind eines der beiden Threonine (T12 oder T89) und das bei der Deacylierung angreifende Wassermolekül. Eine naheliegende und auch bei anderen mechanistisch verwandten Enzymen diskutierte Vermutung ist die Beteiligung von sauren Resten an dieser Aktivierung. Im aktiven Zentrum der L-Asparaginase kommen hierfür, wie schon in der Einleitung erwähnt, Aspartat-90 und Glutamat-283 in Betracht. Eine weitere Aufgabe dieser Reste könnte in der Neutralisierung positiv geladener Gruppen im aktiven Zentrum liegen. An der Substratbindung sind sie mit Sicherheit beteiligt (vgl. 1.2.2). Um die Bedeutung dieser beiden Reste genauer zu definieren wurden sie gegen Glycin und Valin ausgetauscht; Aspartat-90 wurde zusätzlich noch durch Asparagin ersetzt.

Auf die mögliche Rolle der über starke Wasserstoffbrücken verbundenen „Triade“ aus Thr-89, Lys-162 und Asp-90 wurde ebenfalls schon in der Einleitung ausführlicher eingegangen (s. 1.2.2). Bisherige Mutationen bezogen sich auf einzelne Reste dieser Triade, sie führten bei Thr-89 und Lys-162 zu starken Aktivitätsverlusten. Ein radikalerer Ansatz wurde hier mit dem Austausch von je zwei Resten gewählt. Dies führte zu den Doppelmutanten D90N/K162Y, D90E/K162Y, D90A/K162Y und T89A/K162Y.

4.1.2 Herstellung der Mutanten

Die Herstellung der Aspartat-90- und Glutamat-283-Mutanten erfolgte mit Hilfe der unter 2.3 aufgeführten Oligonukleotide wie in 3.1.11 beschrieben. Als Template diente M13mp19/*ansB* - ssDNA. Positive Klone wurden mittels Einzelstrang-Sequenzierung ermittelt. Das entsprechende Gen wurde in den Expressionsvektor pT7-7 umkloniert, und es erfolgte eine nochmalige Überprüfung durch Doppelstrang-Sequenzierung im Bereich der Mutation.

Die Doppelmutanten wurden mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *PvuII* erzeugt, die die EcA2 hinter Alanin-136 spaltet. Zunächst wurde die Plasmid-DNA der Mutanten D90N, D90E, D90A und T89A isoliert (s. 3.1.4) und mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *PvuII* gespalten (s. 3.1.6). Eine analoge Spaltung erfolgte mit der K162Y-DNA und den Enzymen *PvuII* und *HindIII*. Anschließend wurden die beiden entsprechenden DNA-Fragmente mit der zuvor mit *EcoRI* und *HindIII* geschnittenen pT7-7 - DNA in einem Ansatz ligiert (vgl. 3.1.8). Die positiven Klone wurden auch in diesem Fall durch Sequenzierung ermittelt.

4.1.3 Expression und Reinigung der Mutanten

Die Expression und Reinigung der Mutanten wurde durchgeführt wie unter 3.2.1 beschrieben. Sie orientierten sich an der schon früher beschriebenen Methode (Wehner, 1993). Je nach Mutante erhielt man aus 1 L LB-Kultur 5 - 25 mg Protein. Die sehr inaktiven Mutanten wurden in der Regel einer Rechromatofokussierung unterzogen. In Abbildung 3.1 und 3.2 ist exemplarisch eine Reinigung der Mutante D90G wiedergegeben.

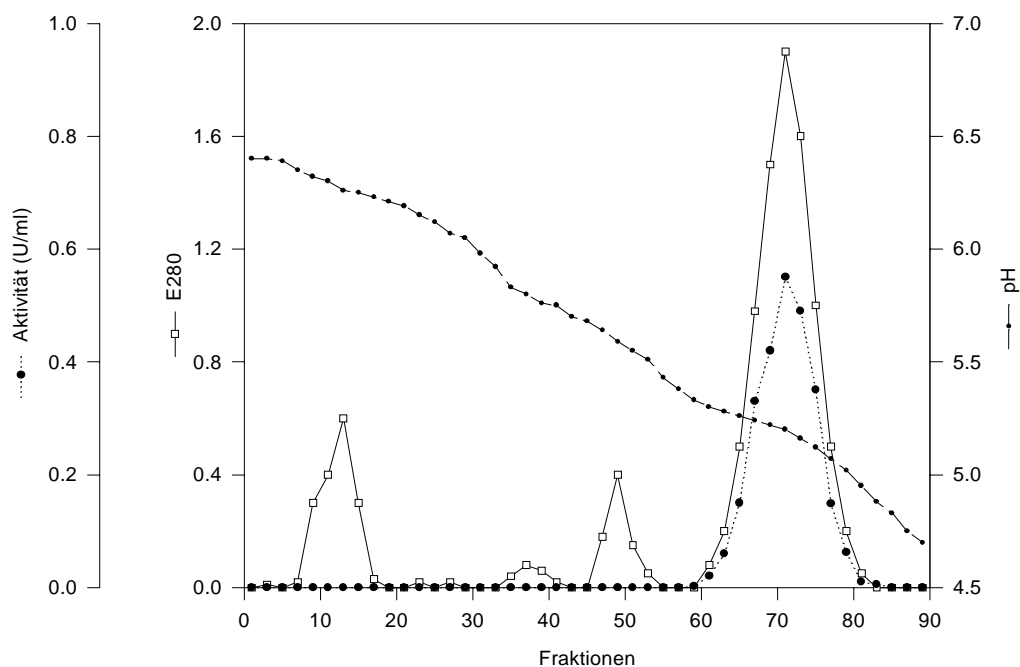


Abb. 4.1: Elutionsprofil einer Chromatofokussierung der Mutante D90G. Das Diagramm beruht auf einem Säulenlauf, der durchgeführt wurde wie unter 3.2.1.2 beschrieben. Dargestellt sind die Extinktion bei 280nm (Proteingehalt), die Volumenaktivität sowie der pH-Wert jeder zweiten Fraktion.

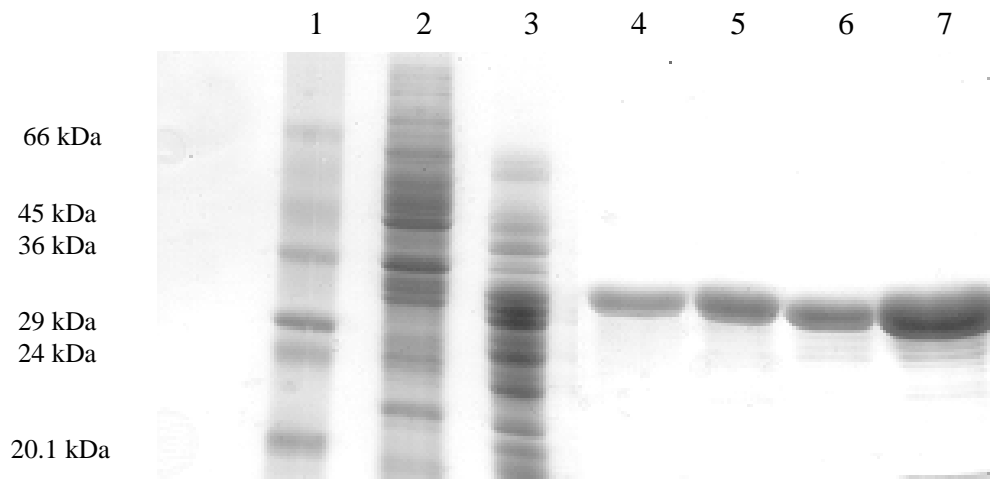


Abb. 4.2: Coomassie-Färbung eines SDS-Gels. 1: Marker, 2: Zellextrakt nach Überexpression; 3: periplasmatische Proteine nach osmotischem Schock; 4-6: Fraktionen 65, 70 und 75 des Säulenlaufs aus Abb. 4.1; 7: vereinigte Fraktionen des Säulenlaufs aus Abb. 4.1.

4.1.4 Charakterisierung der Mutanten

4.1.4.1 Kinetische Analyse

Die nachfolgend geschilderte kinetische Analyse der Mutanten erfolgte wie unter 3.2.4 beschrieben. Um Verfälschungen der Daten durch eventuell mitexpremiertes und gereinigtes Wildtyp-Enzym möglichst auszuschließen, wurden jeweils mindestens zwei Expressionen mit anschließender Reinigung durchgeführt und die erhaltenen Ergebnisse auf Übereinstimmung überprüft. Die verwendeten Enzyme lagen als Ammoniumsulfatfällung vor (s. 3.2.1); für sämtliche Messungen wurde frisch dialysiertes Enzym verwendet. Für die in Lösung vorliegenden Mutanten trat ein Aktivitätsverlust erst nach 5-6 Tagen auf.

Tabelle 4.1 zeigt die kinetischen Daten der hergestellten Mutanten für L-Aspartat- β -hydroxamat (AHA) mit dem natürlichen Substrat L-Asparagin bei pH 7.0 und 25°C. Trotz der geringeren Empfindlichkeit des bei L-Asparagin angewendeten gekoppelten Tests (s. 3.2.4.2) konnten aufgrund des erhöhten K_m -Wertes der Mutanten und der dadurch einzusetzenden höheren Substratkonzentrationen zuverlässige Ergebnisse erhalten werden. Die Werte für k_{cat} und K_m wurden durch nichtlineare Regression berechnet. k_{cat} ist die Wechselzahl (turnover number) des Enzyms, sie gibt die Anzahl der Substratmoleküle an, die pro Sekunde von einer Unter-einheit umgesetzt werden. Ist die Gesamtkonzentration der aktiven Zentren, $[E_T]$, bekannt, so ergibt sich $k_{cat} = V/[E_T]$. Für die EcA2 gilt: 1U/mg entspricht einem k_{cat} von 0.558 s^{-1} .

Als weitere Größe ist $\Delta\Delta G^*$ angegeben, sie gibt den Verlust an Übergangszustands-Stabilisierungsenergie an, der durch die Einführung einer Mutation eintritt. $\Delta\Delta G^*$ wird nach der Formel

$$\Delta\Delta G^* = -R \cdot T \cdot \ln \frac{(k_{\text{cat}}/K_{\text{m}})_{\text{Mutante}}}{(k_{\text{cat}}/K_{\text{m}})_{\text{WT}}}$$

berechnet.

Mutante	AHA				L-Asparagin	
	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	$\Delta\Delta G^*$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)
WT	54.4 \pm 1.2	0.075 \pm 0.008	725,000	--	12.3	ca. 0.02
D90N	0.043 \pm 0.002	3.7 \pm 0.5	11.5	27.4	0.012 \pm 0.0002	0.66 \pm 0.04
D90G	0.38 \pm 0.01	7.9 \pm 0.8	48.2	23.8	0.48 \pm 0.02	17.0 \pm 3.5
D90V	< 0.001	n. m.	n. m.	n. m.	n. m.	n. m.
E283G	8.6 \pm 0.5	0.66 \pm 0.08	13	9.9	1.07 \pm 0.02	0.39 \pm 0.02
E283V	15.1 \pm 0.4	1.3 \pm 0.1	12	10.2	2.3 \pm 0.1	0.70 \pm 0.03
D90N/K162Y	1.2 \pm 0.1	6.4 \pm 1.7	183	20.5	0.15 \pm 0.01	1.72 \pm 0.42
D90A/K162Y	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
D90E/K162Y	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
T89A/K162Y	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.

Tab.4.1: Kinetische Eigenschaften einiger EcA2 - Mutanten bei pH 7.0, 25°C. Die Messungen erfolgten in 50 mM MOPS (AHA) bzw. 100 mM MOPS (L-Asn). n.m.: nicht meßbar.

Die gezeigten Daten bestätigen die schon erwähnte direkte Beteiligung der Reste Asp-90 und Glu-283 an der Substratbindung; Mutanten beider Reste zeigen stark erhöhte K_{m} -Werte. Für die D90-Mutanten ist dieser Effekt stärker ausgeprägt. Für das Glu-283 kann zudem eine katalytisch bedeutsame Rolle ausgeschlossen werden, da beide E283-Mutanten sehr aktiv sind. Die Aktivität beträgt je nach Substrat und eingeführter Aminosäure 8.6 bis 27.8% des k_{cat} -Wertes für das Wildtyp-Enzym.

Wesentlich inhomogener erscheinen die Mutanten des Asp-90. Ein Austausch gegen Valin führte zu einem so starken Aktivitätsverlust, daß keine Werte ermittelt werden konnten. Durch den deutlich erhöhten K_{m} -Wert der Mutanten müssen so hohe Substratkonzentrationen eingesetzt werden, daß die Nachweisgrenze aufgrund des Leerwertes in etwa bei einem k_{cat} von etwa 0.001 s^{-1} liegt. Das D90V-Enzym hat somit eine Aktivität unterhalb von 0.002% des

Wildtyp-Enzyms. Demgegenüber besitzen die D90N- und D90G-Mutante einen k_{cat} -Wert, der in etwa 0.1 bzw. 1% des Wildtyp-Enzyms entspricht. Diese unterschiedlichen Restaktivitäten bei Substratsättigung legen die Vermutung nahe, daß es sich hierbei eventuell um einen indirekten Effekt handeln könnte, d.h., daß die sehr voluminöse und hydrophobe Valin-Gruppe möglicherweise andere katalytische Reste oder Wassermoleküle verdrängt. Auf die Rolle des Aspartats wird aber in späteren Kapiteln noch genauer einzugehen sein.

Die größte Auffälligkeit stellt sicherlich die Aktivität der Doppelmutante D90N/K162Y dar, die etwa 2% des WT-Wertes beträgt. Dies ist insofern überraschend, als der alleinige Austausch von Lysin-162 gegen Tyrosin zu einem k_{cat} von lediglich 0.004 s^{-1} (0.007%) führt. Auch erscheint die Inaktivität der anderen Asp/Lys-Doppelmutanten im Vergleich dazu schwer verständlich. Die Inaktivität des T89A/K162Y-Enzyms ist plausibler, da schon jeder Aminosäureaustausch für sich zu einem großen Aktivitätsverlust führt (vgl. 1.2.2).

4.1.4.2 pH-Abhängigkeit der kinetischen Parameter

Die Aktivität von Enzymen zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom pH-Wert des umgebenden Mediums. Ein über den gesamten pH-Bereich stabiles Enzym vorausgesetzt, beeinflussen die am katalytischen Mechanismus beteiligten ionischen Gruppen den Verlauf der pH-Abhängigkeit.

Die Messungen erfolgten in einem pH-Bereich von 5 - 10 wie unter 3.2.4.1 beschrieben. Als Substrat wurde L-Aspartat- β -hydroxamat (AHA) eingesetzt. In den Abbildungen 4.3 bis 4.7 sind die pH-Abhängigkeiten der kinetischen Parameter für die Mutanten mit meßbarer Aktivität angegeben. Um zwischen dem Einfluß der Mutation auf die Substratbindung und auf die Katalyse zu unterscheiden, wurden über den gesamten pH-Bereich die Werte von k_{cat} und K_{m} bestimmt.

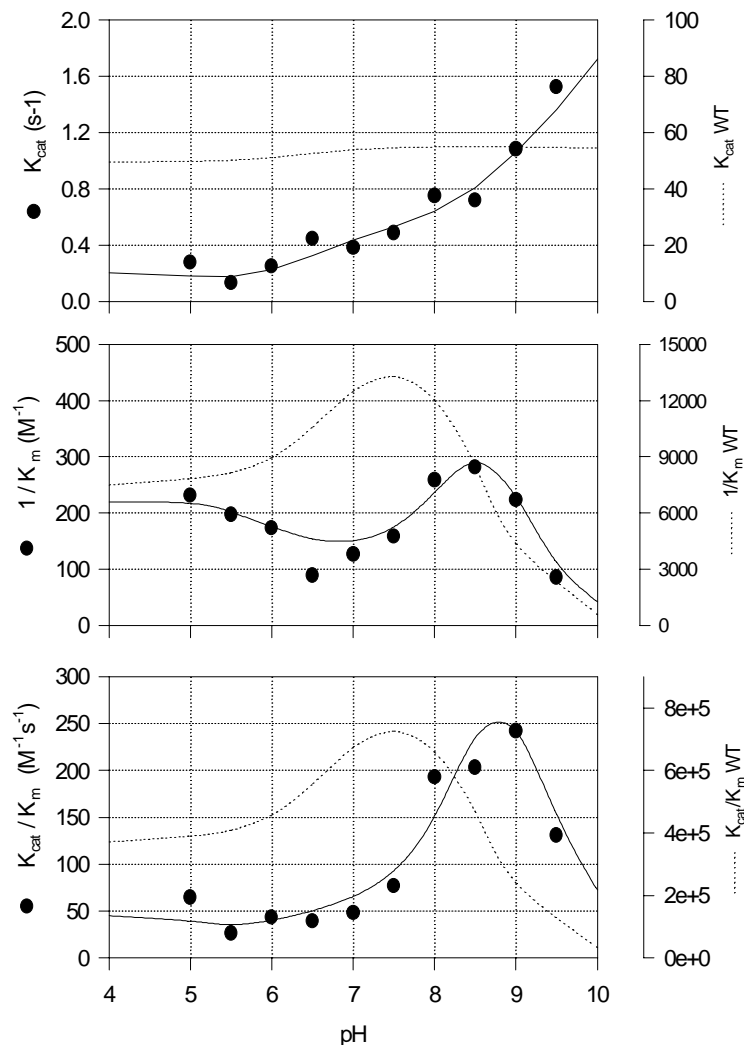


Abb.4.3: pH-Profil der D90G-Mutante mit AHA als Substrat. Die Kurven ergeben sich aus der in Kapitel 5.2 beschriebenen Auswertung. Zusätzlich ist der Verlauf für das WT-Enzym gezeigt (Aung, 1997).

In den Abbildungen 4.3-4.7 ist zusätzlich zum pH-Verlauf der D90G-Mutante noch die pH-Abhängigkeit des WT-Enzyms abgebildet. Für die WT-Asparaginase ist vor allem der nahezu pH-unabhängige Wert für k_{cat} über den gesamten pH-Bereich von 5.0 - 10.0 auffallend. Die glockenförmige Kurve für k_{cat}/K_m mit einem pH-Optimum bei pH 7.5 wird durch eine geringere Substrataffinität im sauren und alkalischen pH-Bereich verursacht. Für das Substrat Asparagin ist der Verlauf der Kurven ähnlich, mit in etwa gleich großen k_{cat} -Werten aber einem verringerten K_m (nicht gezeigt).

Im Gegensatz hierzu zeigt die D90G-Mutante einen deutlichen Anstieg des k_{cat} -Wertes im alkalischen Bereich (in etwa eine Vervielfachung des Wertes bei Erhöhung des pH von 7 auf

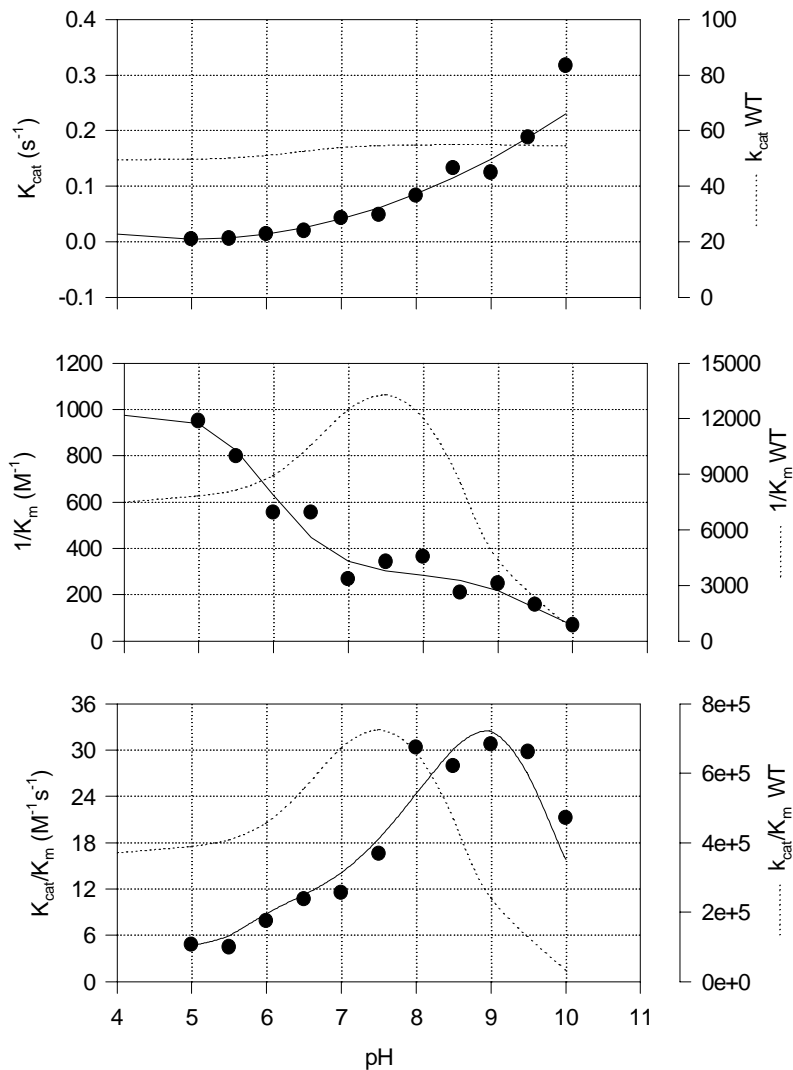


Abb. 4.4: pH-Profil der D90N-Mutante mit AHA als Substrat. Die Kurven ergeben sich aus der in Kapitel 5.2 beschriebenen Auswertung. Zusätzlich ist der Verlauf für das WT-Enzym gezeigt (Aung, 1997).

9.5). Zudem verbessert sich die Substrataffinität unterhalb von pH 6.5 und oberhalb von pH 7.5 leicht. Im stärker alkalischen Milieu nimmt der K_m -Wert dann wieder zu. Diese Effekte verschieben das pH-Optimum der k_{cat}/K_m -Kurve zu einem höheren Wert zwischen pH 8.5 und 9.0.

Für die D90N-Mutante ergibt sich eine analoge pH-Abhängigkeit der Wechselzahl (Abb. 4.4). In ihrem Fall ist zudem eine deutliche Abnahme des K_m -Wertes im sauren Milieu festzu-

stellen, von pH 7 - 9 bleibt er annähernd konstant, um dann im alkalischen Bereich abzunehmen. Die k_{cat}/K_m -Kurve zeigt einen der D90G-Mutante entsprechenden Verlauf. Gleiches gilt für die Doppelmutante D90N/K162Y, deren Profile im wesentlichen denen der D90G-Mutante ähneln. Dies gilt im besonderen für den Verlauf der K_m -Kurve, die ein

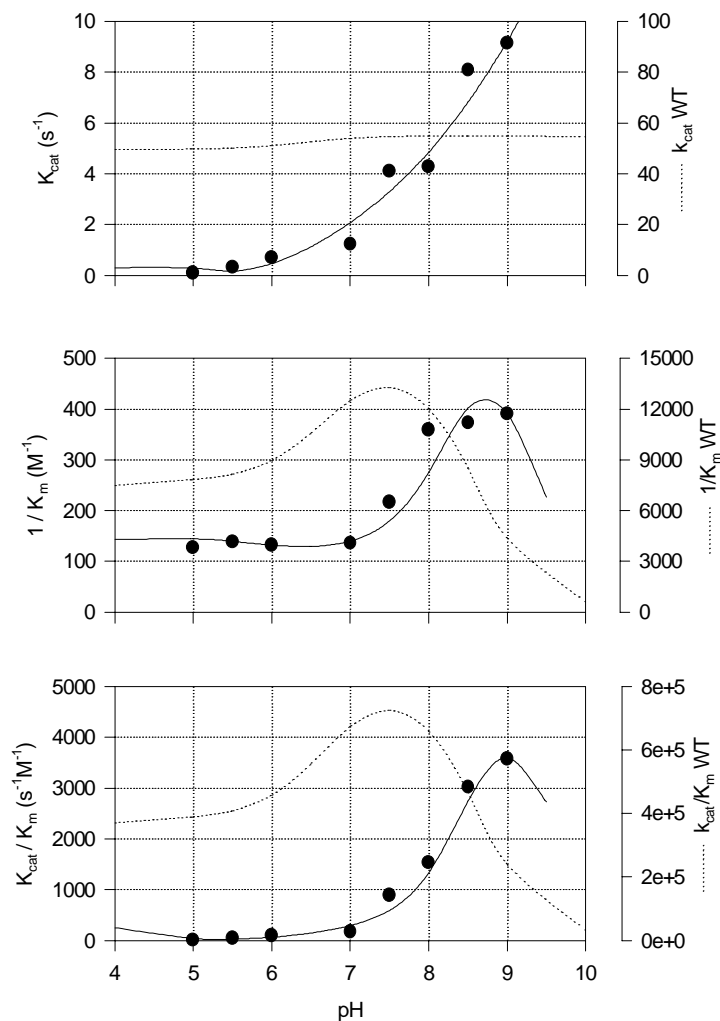


Abb. 4.5: pH-Profil der D90N/K162Y-Mutante mit AHA als Substrat. Die Kurven ergeben sich aus der in Kapitel 5.2 beschriebenen Auswertung. Zusätzlich ist der Verlauf für das WT-Enzym gezeigt (Aung, 1997).

analoges Bild im alkalischen pH-Bereich zeigt. Die konstante Zunahme des k_{cat} -Wertes ab ca. pH 7.5 aufwärts fällt noch etwas deutlicher aus. Dieser bei allen diesen drei Mutanten und auch bei den Lysin-162-Mutanten (Aung, 1997) beobachtete Effekt, wird noch zu diskutieren sein.

Der Austausch des Glutamats-283 gegen Glycin und Valin verursacht hingegen gegenüber dem WT-Enzym wesentlich geringere Veränderungen (vgl. Abb. 4.6 und 4.7). Auffallend ist lediglich der Abfall des k_{cat} -Wertes für beide Mutanten unterhalb von pH 6.5. Die bei den D90-Mutanten festgestellte Erhöhung des Umsatzes im alkalischen Milieu ist nicht feststellbar, lediglich im Falle der Glycin-Mutante ist eine schwache Zunahme des k_{cat} -Wertes zu beobachten.

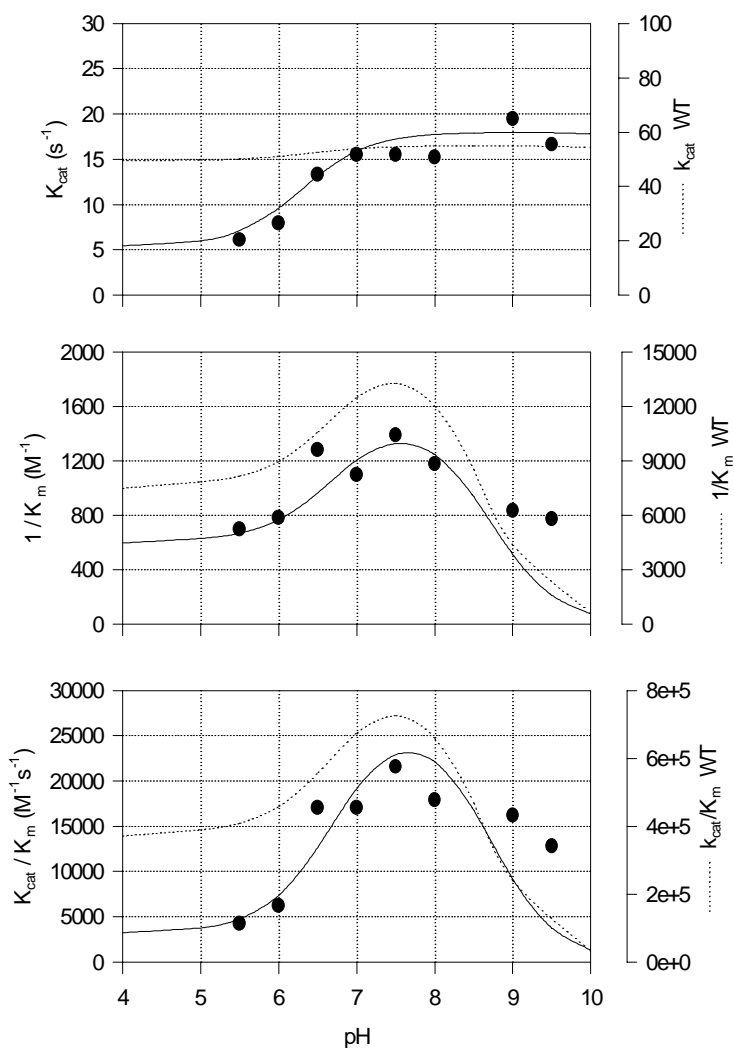


Abb. 4.6: pH-Profil der E283V-Mutante mit AHA als Substrat. Die Kurven ergeben sich aus der in Kapitel 5.2 beschriebenen Auswertung. Zusätzlich ist der Verlauf für das WT-Enzym gezeigt (Aung, 1997).

Der Interpretation der Werte liegt das in Abbildung 5.2 gezeigte Modell zugrunde (Segel, 1975). Die mittels dieses Modells an die Meßwerte angepaßten Kurven sind in den jeweiligen Abbildungen mit angegeben.

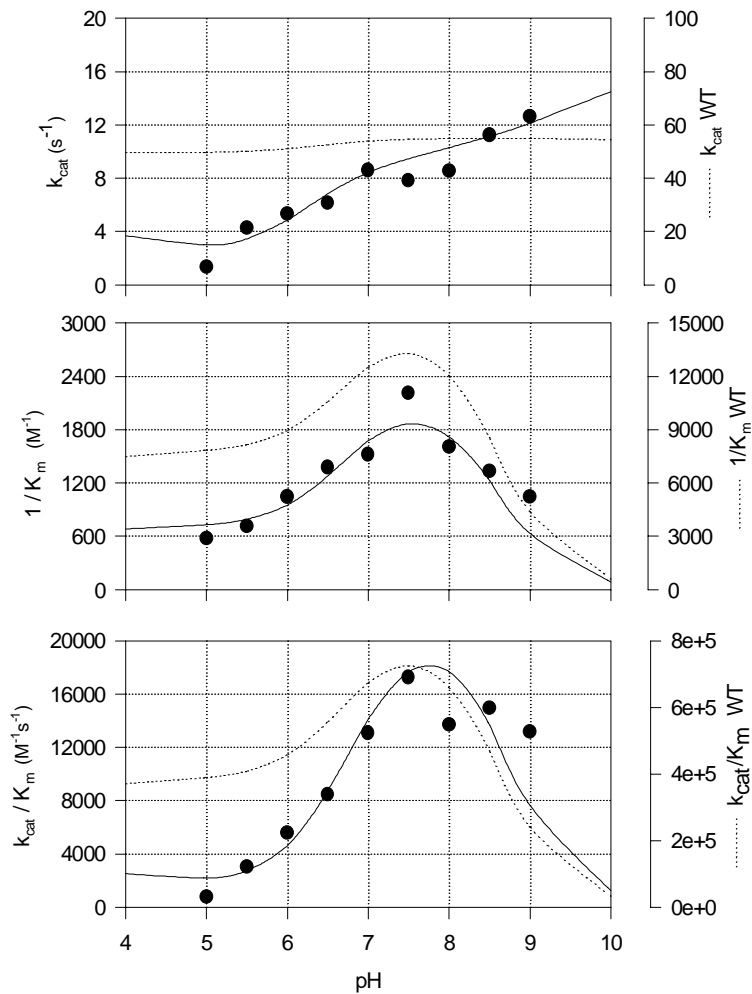


Abb. 4.7: pH-Profil der E283G-Mutante mit AHA als Substrat. Die Kurven ergeben sich aus der in Kapitel 5.2 beschriebenen Auswertung. Zusätzlich ist der Verlauf für das WT-Enzym gezeigt (Aung, 1997).

4.1.4.3 Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilitätsuntersuchungen wurden durchgeführt wie unter 3.2.5 beschrieben. Bei der chemischen Denaturierung wurde Guanidin-HCl als Denaturant verwendet und man verfolgte die Konformationsänderung des Proteins über die Änderung der Fluoreszenzintensität des einzigen in der Eca2 enthaltenen Tryptophans (Trp-66). Die Durchführung orientierte sich an einer früher publizierten Methode (Derst *et al.*, 1994) und die Auswertungen wurden wie in Kapitel 3.2.5 angegeben durchgeführt. Alle Messungen erfolgten bei pH 8.0 und 25°C.

Abbildung 4.8 zeigt den Verlauf der chemischen Denaturierung der Mutanten. Aufgetragen ist dabei der Anteil an denaturiertem Enzym (f_d) gegen die Denaturantenkonzentration:

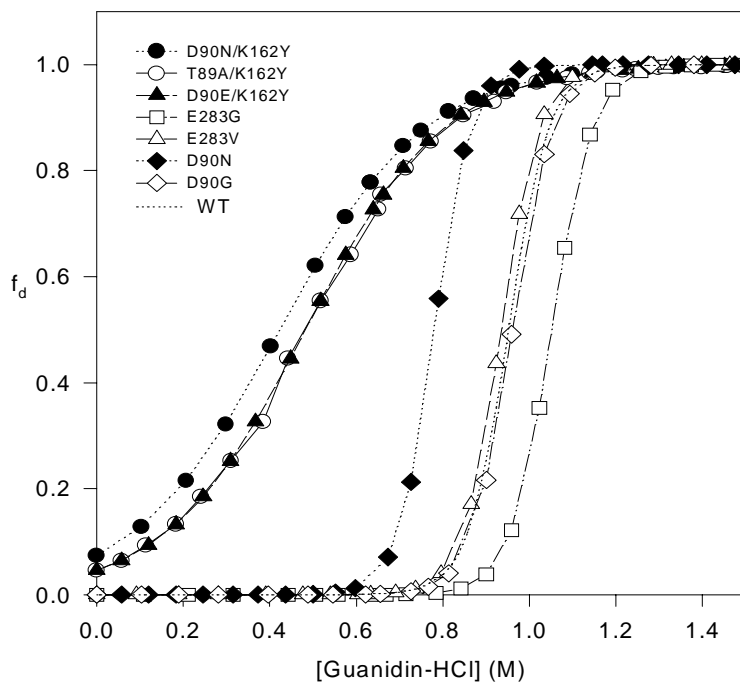


Abb. 4.8: Guanidin-HCl - Denaturierungskurven der Mutanten. Messungen in 50mM Tris, pH 8.0, 25 °C. Die abgebildeten Kurvenverläufe entsprechen den Werten, die aus der Anpassung der Meßpunkte an die, dem Zwei-Phasen-Modell zugrundeliegenden, Gleichungen erhalten wurden (s. 3.5.2). WT: Werte aus Derst, 1995.

Thermische Denaturierungsuntersuchungen wurden nur mit den Mutanten E283G, D90N und der Doppelmutante D90N/K162Y bei den pH-Werten 5.0, 7.0 und 9.0 unternommen. Als Substrat diente dabei L-Aspartat- β -hydroxamat. Die eingesetzte Enzymkonzentration richtete sich nach der Aktivität der Mutante, betrug jedoch in keinem Fall mehr als 0.3 mg/ml. In Abb. 4.9 sind exemplarisch die Denaturierungskurven der Doppelmutante D90N/K162Y abgebildet:

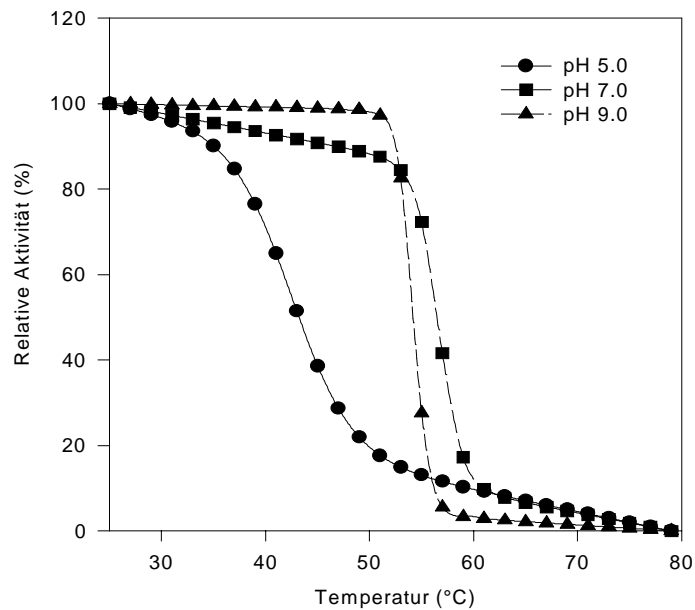


Abb. 4.9: Thermische Stabilität der Mutante D90N/K162Y bei verschiedenen pH-Werten.

In der folgenden Tabelle 4.2 sind alle Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen zusammengefaßt. Angegeben sind die Stabilitäten extrapoliert auf denaturantenfreie Lösung ($\Delta G_{(H_2O)}$), die Abhängigkeit der Stabilität von der Denaturantenkonzentration (m) sowie die Denaturierungstemperatur (T_m) bei den verschiedenen pH-Werten.

Die augenscheinlichsten Abweichungen von den Wildtyp-Werten ergaben sich bei den Doppelmutanten, die sämtlich in den Guanidin-HCl-Untersuchungen eine extrem verringerte Stabilität aufweisen. Das D90A/K162Y-Enzym erfuhr schon in denaturantenfreier Lösung eine Konformationsänderung und ist somit vollständig instabil. Die thermischen Stabilitätsuntersuchungen konnten nur mit der D90N/K162Y-Mutante durchgeführt werden, da die anderen Doppelmutanten keine meßbaren Aktivitäten besitzen. Für dieses Enzym zeigen sich deutliche Verringerungen der Denaturierungstemperaturen, die bei pH 9.0 und vor allem 5.0 stärker ausfallen als bei pH 7.0. Eine Zerstörung der Thr89-K162Y-D90-Triade führt somit zu einer sehr deutlichen Instabilität des Enzyms. Ob die fehlende Aktivität aller vier anderen Doppelmutanten auf eine wirkliche Störung des katalytischen Mechanismus und / oder diese Instabilität zurückzuführen ist, ist schwer zu entscheiden. Auf diese Fragen wird in der Diskussion noch näher eingegangen sein.

Wie bei den Aktivitätsmessungen so zeigen die D90-Mutanten auch bei den Stabilitätsuntersuchungen ein inhomogenes Bild. Die D90G-Mutante weist kaum Unterschiede zum WT auf, während die D90N-Mutante ein deutlich verringertes $\Delta G_{(H_2O)}$ besitzt. Interessanterweise ist T_m bei pH 5.0 niedriger als für WT, bei den beiden höheren pH-Werten jedoch nahezu gleich oder leicht erhöht. Die Einführung einer Valin-Gruppe führt sogar wie bei der D90A/K162Y-Mutante zu einem völligen Stabilitätsverlust. Hier ist, wie schon bei den Aktivitätsmessungen, auf den großen Raumbedarf des Valins hinzuweisen, der zu einer ähnlichen funktionellen Störung der Triaden-Struktur führen könnte wie die Einführung der Doppelmutationen.

Mutante	$\Delta G_{(H_2O)}$ [kJ/mol]	% von WT	m [kJ/mol/M]]	T_m		
				pH 5.0	pH 7.0	pH 9.0
WT*	53.3 \pm 1.3	100	51.6 \pm 1.4	58.4	63.0	66.3
D90G	51.1 \pm 1.8	96	53.2 \pm 1.9	--	--	--
D90N	46.7 \pm 3.0	88	59.9 \pm 3.8	52.3 \pm 0.3	62.8 \pm 0.3	67.5 \pm 0.01
D90V	0	0	0	n.m.	n.m.	n.m.
E283G	55.4 \pm 1.7	104	52.7 \pm 1.6	56.7 \pm 0.7	63.7 \pm 0.2	68.9 \pm 0.1
E283V	52.7 \pm 2.7	99	56.3 \pm 2.9	--	--	--
D90N/K162Y	6.3 \pm 0.7	12	14.8 \pm 1.3	42.5 \pm 1.3	56.6 \pm 0.1	54.2 \pm 0.1
D90A/K162Y	0	0	0	n.m.	n.m.	n.m.
D90E/K162Y	7.5 \pm 0.7	14	15.5 \pm 1.2	n.m.	n.m.	n.m.
T89A/K162Y	7.4 \pm 0.6	14	15.4 \pm 1.2	n.m.	n.m.	n.m.

Tab. 4.2: Chemische und thermische Stabilität der Mutanten. Die Werte wurden gemäß der in 3.5.2 angegebenen Auswertung ermittelt. Näheres siehe Text. n.m. = nicht meßbar; * = Werte aus Derst, 1995.

Der Austausch des Glutamats-283 gegen Valin und Glycin verändert hingegen die Stabilitätswerte nicht in signifikanter Weise.

4.2 Proton inventories und Untersuchungen zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Mutanten

Wie schon in der Einleitung erwähnt, kann die Reaktion der EcA2 in zwei Reaktionsschritte unterteilt werden. Zunächst erfolgt der Angriff des Enzym-Nukleophils unter Bildung des Acyl-Enzym-Komplexes, gefolgt vom Angriff des als zweites Nukleophil fungierenden Wassermoleküls unter Entstehung des Produkts Aspartat. Von besonderem Interesse wäre dabei zum einen die Unterteilung der Mutanten in solche, bei denen die Acylierung geschwindigkeitsbestimmend ist, und in eine andere Gruppe, welche die deacylierungsgehemmten Enzyme enthält. Zum anderen wäre zusätzlich von Bedeutung, wieviele Protonen dabei vollständig oder partiell verschoben werden. Eine Kombination dieser beiden Untersuchungen kann zur Identifizierung der für den jeweiligen Reaktionsschritt notwendigen funktionellen Gruppen und der hieran beteiligten Protonen führen. Um die Anzahl der bei der Reaktion beteiligten Protonen zu ermitteln, wurde die sogenannte „Proton-inventory“-Technik angewendet.

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden auf weitere, schon vorhandene Mutanten des katalytischen Zentrums erweitert. Die entsprechenden Enzyme wurden exprimiert und gereinigt wie in 3.2.1 geschildert.

4.2.1 Proton inventories

Proton inventory-Messungen beruhen auf der unterschiedlichen Geschwindigkeit von Reaktionen unter Protonen-Beteiligung in den Lösungsmitteln H_2O und D_2O sowie in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen dieser beiden. Das Einbringen des Enzyms und des Substrats in ein deuteriumhaltiges Medium verursacht an vielen Positionen der Substanzen einen H-/D-Austausch und führt zu einem kinetischen Isotopeneffekt, der auf den unterschiedlichen Aktivierungsenergien beim Isotopenübergang während der Reaktion basiert.

Wie unter 3.2.4.3 beschrieben, wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten in unterschiedlichen H_2O/D_2O -Mischungsverhältnissen mit Hilfe des gekoppelten Tests und des natürlichen Substrats Asparagin bestimmt. Im Bereich von 0 bis ca. 99% D_2O wurden je 10 - 12 Zwei- bis Vierfachbestimmungen vorgenommen. Die Messungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt, die eine gleichzeitige Vermessung von bis zu 48 Reaktionslösungen ermöglichten. Durch den Abschluß gegen die Umgebungsluft mittels UV-durchlässiger Klebefolie konnte auch für Messungen über einen längeren Zeitraum (bei inaktiveren Mutanten) ein konstantes D_2O/H_2O -Verhältnis

aufrechterhalten werden. Die Enzymlösungen wurden wie unter 3.2.4.3 beschrieben präpariert. Alle Reaktionen wurden fast gleichzeitig gestartet. Die Substratkonzentrationen betragen 2.5-5 mM und lagen somit bei den Messungen mit WT-Enzym und den Mutanten mit vergleichbarem K_m -Wert im Bereich von $\geq 50 \cdot K_m$. Dies entspricht einer mindestens 98%-igen Substratsättigung der Enzyme.

Trägt man die Reaktionsgeschwindigkeiten gegen den Deuteriumanteil auf, so läßt sich aus dem Verlauf der so gewonnenen Kurven die Anzahl der am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beteiligten Protonen erhalten (vgl. 3.2.4.3; Quinn & Sutton, 1991):

$V(n) = V_0 (1-n + n \cdot \Phi^\ddagger);$	$V(n)$ linear; Ein-Protonen-Katalyse
$V(n) = V_0 (1-n + n \cdot \Phi_1^\ddagger) (1-n + n \cdot \Phi_2^\ddagger);$	$V(n)$ = quadratisch; Zwei-Protonen-Kat.
$V(n) = V_0 \exp[q_T \cdot (\Phi^\ddagger - 1) \cdot n];$	$V(n)$ exponentiell, „Medium-Effekte“

n = Anteil an Deuterium in der Reaktionslösung

$V(n)$ = Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von n

q_T = Anzahl der beteiligten Protonen im Übergangszustand

Φ^\ddagger = Fraktionierungsfaktor für D im Übergangszustand

Die letzte der drei Gleichungen berücksichtigt mehrere an der Katalyse beteiligte Protonen der Lösungsmittelmoleküle oder des Proteins. Dabei kann es sich sowohl um eine größere Anzahl an Protonen handeln, deren Φ^\ddagger -Werte nur gering von 1 abweichen, als auch um wenige Protonen mit einem jeweils stärkeren Isotopeneffekt. Theoretisch wäre die zweite Gleichung auch auf drei oder mehr beteiligte Protonen erweiterbar, die erhaltenen Kurven zeigen aber so geringe Unterschiede, daß eine experimentelle Unterscheidung nicht möglich ist.

In den folgenden Abbildungen ist auf der y-Achse mit V_n/V_{D_2O} das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten in den binären H-/D-Mischungen zu der Reaktionsgeschwindigkeit bei einem Deuteriumanteil nahe 1 aufgetragen. Abbildung 4.10 zeigt die Messungen für das WT-Enzym bei pH 5.0 und 7.0.

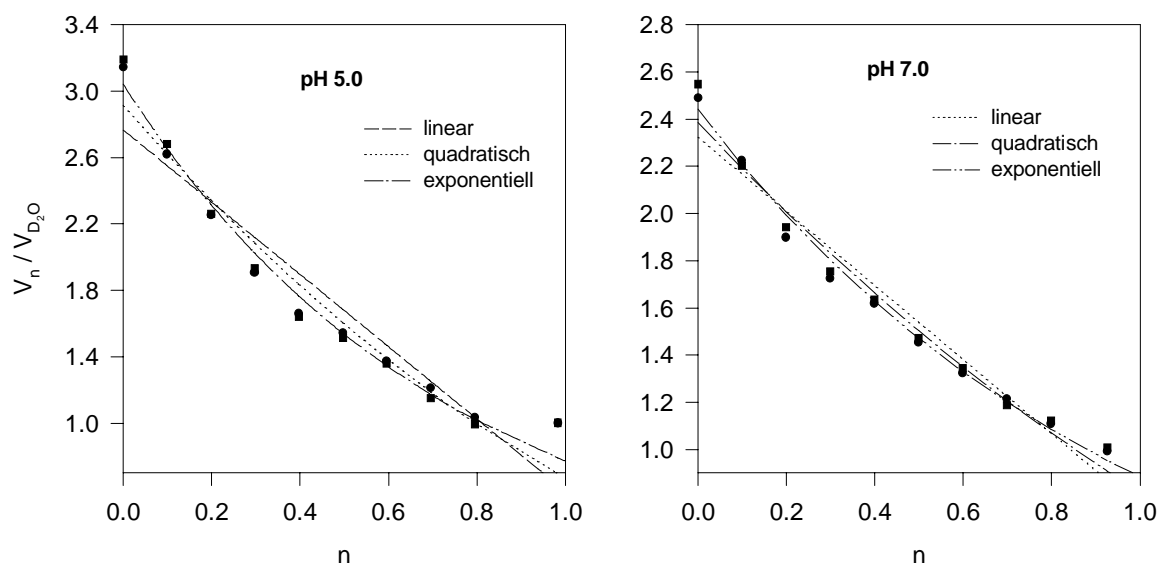


Abb. 4.10: Proton inventories des WT-Enzyms bei pH 5.0 und 7.0. Die Kurven entsprechen Anpassungen der Funktionen $V(n) = V_0(1-n + n\Phi^\#)$, $V(n) = V_0(1-n + n\Phi_1^\#)(1-n + n\Phi_2^\#)$ und $V(n) = V_0 \exp[q_T(\Phi^\# - 1) \cdot n]$ an die Meßpunkte. pH 5.0: $[E] = 3\mu\text{g/ml}$, $V_{\text{H}_2\text{O}} = 5.4 \text{ U/mg}$, $[S] = 5 \text{ mM}$ ($> 50 \cdot K_m$); pH 7.0: $[E] = 0.3\mu\text{g/ml}$, $V_{\text{H}_2\text{O}} = 46.6 \text{ U/mg}$, $[S] = 2.5 \text{ mM}$ ($> 50 \cdot K_m$).

Beim Vergleich der Gesamteffekte ($V_{\text{H}_2\text{O}}/V_{\text{D}_2\text{O}}$) muß berücksichtigt werden, daß der höchste Deuteriumanteil von Experiment zu Experiment durch die eingebrachten Enzymlösungen leicht variiert, und daß eine Verfälschung durch Meßfehler bei der Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten in H_2O und „reinem“ D_2O auftreten kann. In Tabelle 4.3 sind daher zusätzlich die über den besten Fit erhaltenen Gesamt-Isotopeneffekte aufgeführt.

Wie die Abbildungen zeigen, ergibt sich bei beiden pH-Werten die beste Übereinstimmung mit den experimentellen Werten bei Anwendung der exponentiellen Gleichung. Der Gesamteffekt ($V_{\text{H}}/V_{\text{D}}$) ist bei pH 5.0 deutlich höher als bei pH 7.0. Da die Stärke der Kurvenkrümmung die mechanistischen Informationen liefert, und diese Krümmung in der Nähe von $n = 0.5$ am ausgeprägtesten ist, konzentriert sich die von Albery (1975) aufgestellte quantitative Betrachtung auf das Verhältnis von $V_{\text{n}}/V_{\text{D}}$ bei einem Deuteriumanteil von 50%:

$$V_{\text{m}}/V_{\text{D}} = (1 - n_{\text{m}}) V_0/V_{\text{D}} + n_{\text{m}}$$

Ein-Protonen-Katalyse

$$V_{\text{m}}/V_{\text{D}} = [(1 - n_{\text{m}}) (V_0/V_{\text{D}})^{1/2} + n_{\text{m}}]^2$$

Zwei-Protonen-Katalyse

$$V_{\text{m}}/V_{\text{D}} = [V_0/V_{\text{D}}](1-n_{\text{m}})$$

„Medium-Effekte“

mit $V_{\text{m}}/V_{\text{D}} = V_{\text{n}}/V_{\text{D}}$ bei $n_{\text{m}} = n \approx 0.5$

In Tabelle 4.3 sind die ermittelten Werte des Wildtyps und der Mutanten zusammengefaßt.

Wie schon in der Einleitung kurz erwähnt, sind die Serin-Mutanten der Reste Threonin-12 und -89 je nach eingesetztem Substrat um ca. das 2.5- bis 10-fache inaktiver als das WT-Enzym.

Abbildung 4.11 zeigt die Proton inventory - Messungen dieser beiden Mutanten bei pH 7.0:

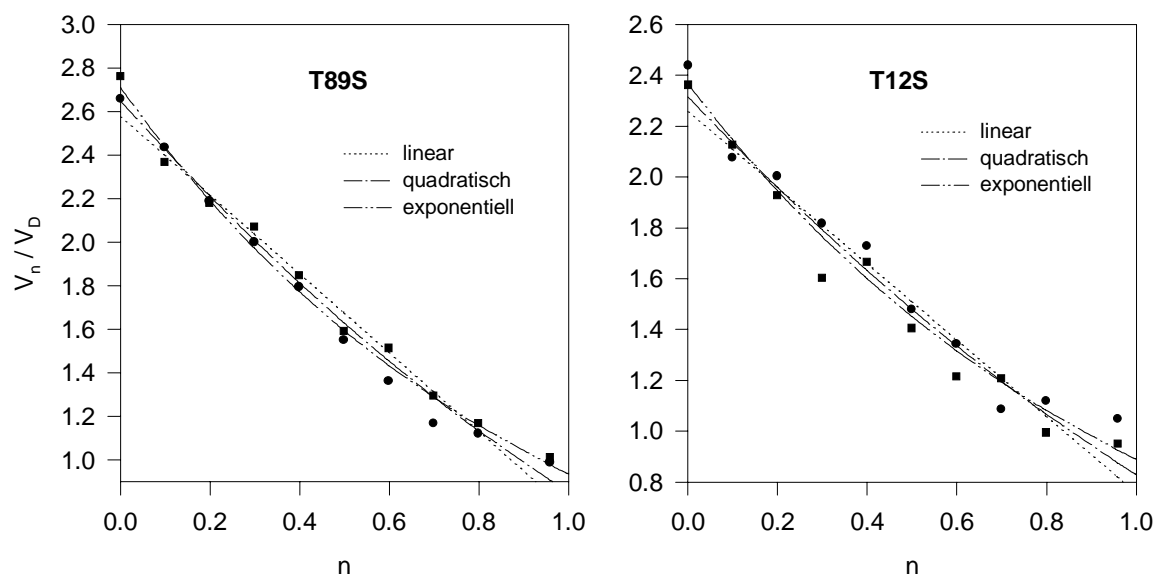


Abb. 4.11: Proton inventory-Messungen der Mutanten T89S und T12S bei pH 7.0. T89S: [E] = 15 $\mu\text{g/ml}$, [S] = 2.5 mM ($> 50 \cdot K_m$), $V_o = 16.9 \text{ U/mg}$; T12S: [E] = 7 $\mu\text{g/ml}$, [S] = 2.5 mM ($> 50 \cdot K_m$), $V_o = 15.4 \text{ U/mg}$. Zu den Kurven siehe Text bzw. Abb. 4.10.

Wie ersichtlich, verursacht der Austausch der Threonin-Reste gegen Serin trotz des Aktivitätsverlustes von ca. 70% keine signifikanten Unterschiede gegenüber den WT-Messungen. Von besonderem Interesse ist die Erweiterung der Messungen auf Mutanten mit stark verringerter Aktivität, da bei ihnen mit einem veränderten Reaktionsmechanismus und/oder einem Wechsel des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes gerechnet werden muß. Die Abbildungen 4.12 und 4.13 zeigen Proton inventories von Mutanten der Reste Threonin-12, Threonin-89 und Lysin-162, deren Aktivität nur 0.04% oder weniger des WT-Enzyms erreicht.

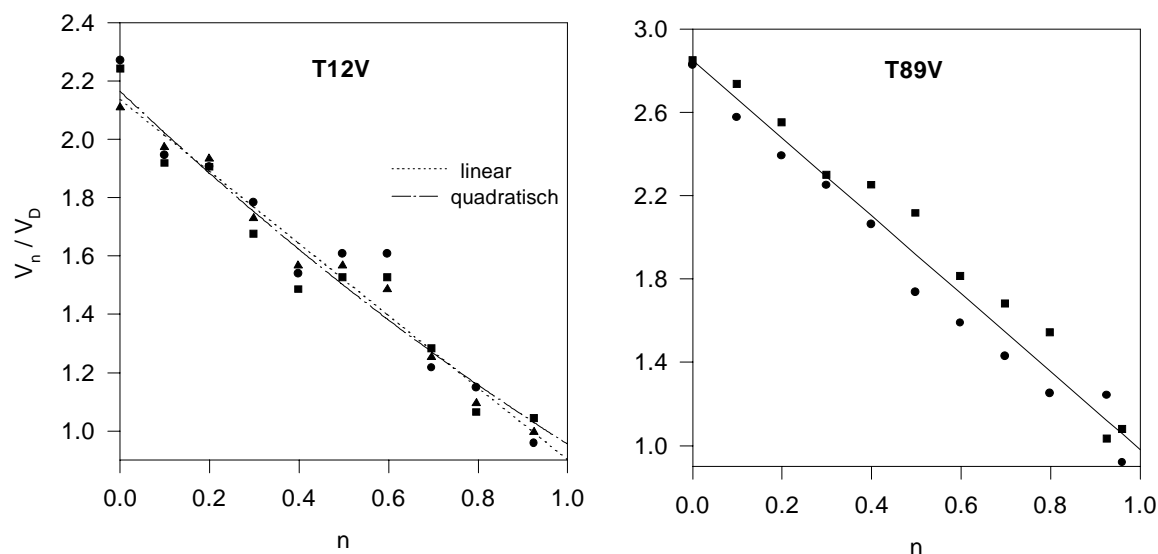


Abb. 4.12: Proton inventory-Messungen der Mutanten T12V bei pH 5.0 und T89V bei pH 7.0. T89V: [E] = 1.3 mg/ml, [S] = 5 mM, ($>50 \cdot K_m$), $V_o = 1.7$ mU/mg; T12V: [E] = 0.29 mg/ml, [S] = 5 mM ($>50 \cdot K_m$), $V_o = 10.4$ mU/mg. Zu den Kurven siehe Text.

Alle vier Meßreihen zeigen deutliche Unterschiede zu der WT-Messung. Bei den T89V-, K162H- und K162Y-Mutanten liegt eine eindeutig lineare Abhängigkeit vom Deuteriumanteil vor, die einer Ein-Protonen-Katalyse entspräche. Die korrespondierenden Messungen der beiden Lysin-Mutanten stehen dabei, trotz der sehr unterschiedlichen eingeführten Reste, in Einklang mit den beobachteten Übereinstimmungen der kinetischen Parameter und der pH-Abhängigkeiten (Aung, 1997). Das Ergebnis für das T12V-Enzym ist hingegen nicht eindeutig. Die Meßpunkte können sowohl gemäß einer Ein-, als auch einer Zwei-Protonen-Katalyse interpretiert werden. Der nach der Albery-Methode ermittelte V_m/V_D -Wert liegt ebenfalls zwischen den für diese beiden Fälle vorhergesagten Werten (vgl. Tab. 4.3). Auffallend ist der bei dieser Mutante geringere Gesamteffekt.

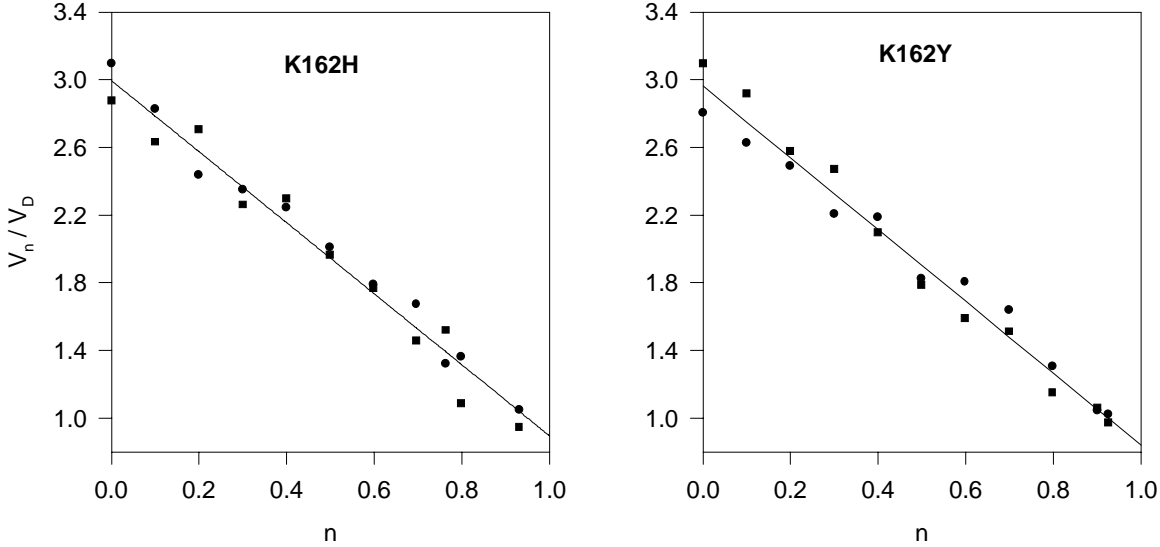


Abb. 4.13: Proton inventories der Mutanten K162H und K162Y bei pH 5.0. K162H: [E] = 0.17 mg/ml, [S] = 5 mM (>50·K_m), V_o = 13.9 mU/mg; K162Y: [E] = 0.35 mg/ml, [S] = 5 mM (>50·K_m), V_o = 16.5 mU/mg. Zu den Kurven siehe Text.

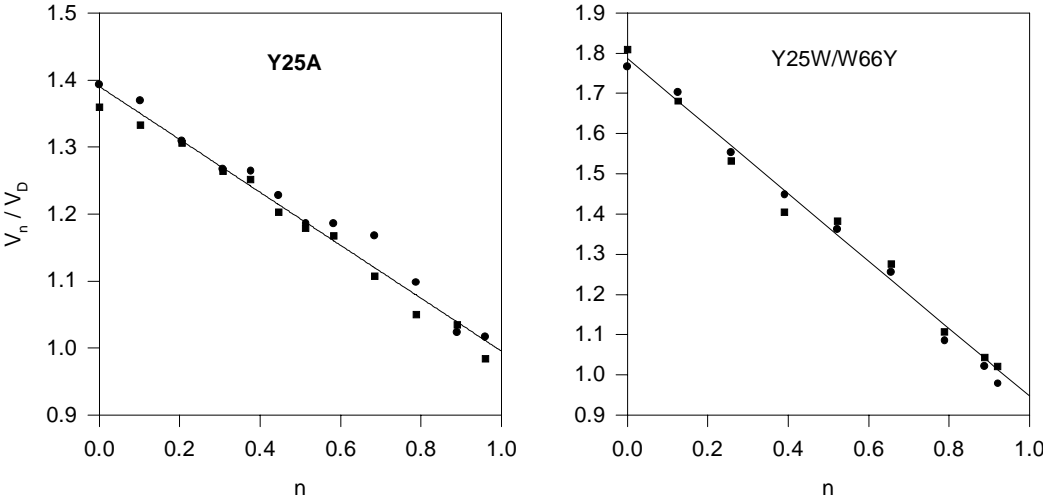


Abb. 4.14: Proton inventories der Mutanten Y25A und Y25W/W66Y. Y25A: [E] = 0.19 mg/ml, [S] = 2.5 mM (>50·K_m), V_o = 45.7 mU/mg. Y25W/W66Y: [E] = 0.1 mg/ml, [S] = 2.5 mM (>50·K_m), V_o = 0.16 U/mg.

Eine noch drastischere Veränderung ergibt sich beim Austausch des Tyrosin-25 gegen Alanin und bei der Doppelmutante Y25W/W66Y (Abb. 4.14). Die entsprechenden Proton inventory-Messungen ergeben eine lineare Abhängigkeit vom Deuteriumanteil bei einem extrem geringen Gesamteffekt von ca. 1.4 bzw 1.8. Die Aktivität dieser Enzyme liegt dabei mit ca. 45 mU/mg und 160 mU/mg höher als bei den obigen Mutanten. Dieses Ergebnis ist besonders interessant, da - wie schon in der Einleitung erwähnt - Hinweise dafür vorliegen, daß im Falle der Doppelmutante die Loop-Bewegung am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beteiligt ist. Der Austausch des Aspartats-90 und des Glutamats-283 hatte, wie schon erwähnt, unter anderem zum Ziel, zu überprüfen ob diese beiden Reste an der Abstraktion eines

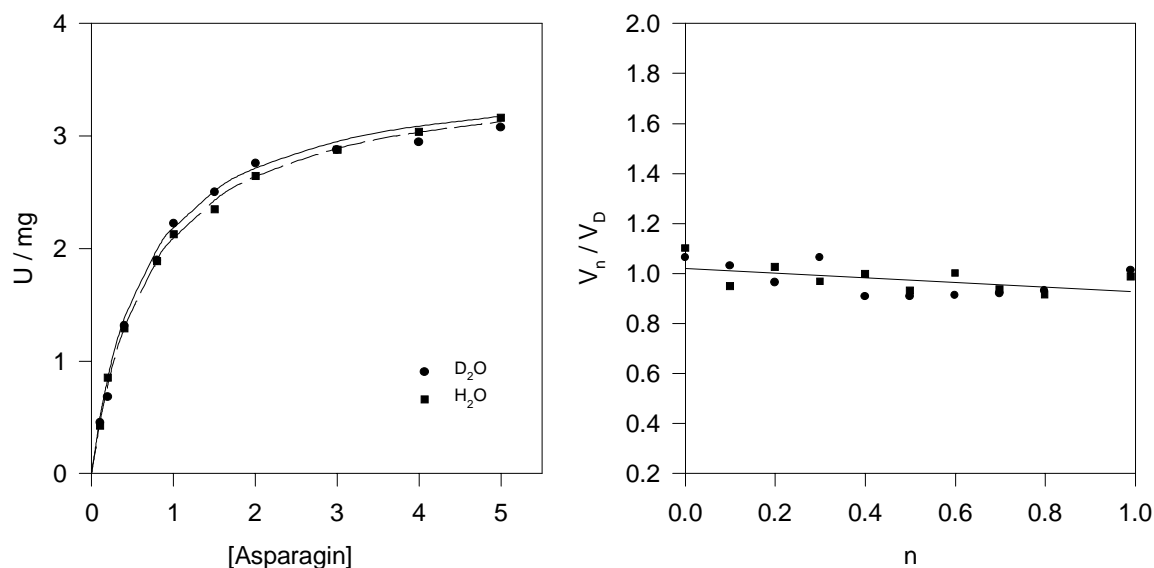


Abb. 4.15: Kinetik in H_2O und D_2O ($n = 0.93$) sowie Proton inventory-Messung der E283V-Mutante bei pH 7.0. Kinetik ausgewertet gemäß Michaelis-Menten; H_2O : $V = 3.6 \pm 0.1$ U/mg, $K_m = 0.71 \pm 0.03$ mM; D_2O : $V = 3.6 \pm 0.2$ U/mg; $K_m = 0.70 \pm 0.09$ mM. Proton inventory: $[E] = 3$ $\mu g/ml$, $[S] = 5$ mM (88%ige Sättigung des Enzyms).

Protons vom Nukleophil, sowohl bei der Acylierung als auch bei der Deacylierung, beteiligt sind. Träfe dies zu, so müßte sich, wenn es sich bei der Abstraktion um einen Teil des geschwindigkeitsbestimmenden Schritt handelte, eine Veränderung in den Deuterium-Messungen zeigen. Gegen diese Möglichkeit spricht allerdings die hohe Aktivität dieser Mutanten und die aus den pH-Profilen gewonnene Erkenntnis, daß ein protoniertes Aspartat-90 nicht zu einer signifikanten Verringerung der Enzymaktivität führt (vgl. 4.1.4.2). Mutationen an diesen Resten bewirken eine extreme Erhöhung des K_m -Wertes (vgl. 4.1.4.1). Wie schon beim WT-Enzym konnte aber bei

keinem der nachfolgend untersuchten Enzyme eine Änderung der Substrataffinität in deuteriumhaltigem Medium festgestellt werden (vgl. Tabelle 4.4). Die Abbildung 4.15 zeigt beispielhaft eine Kinetik in H_2O und D_2O sowie die Proton inventory-Messung der Mutante E283V bei pH 7.0. Der Darstellung ist zu entnehmen, daß kein Einfluß eines Deuterium-Einbaus auf die kinetischen Parameter festzustellen ist. Gleiches gilt für die D90G-, D90E- und E283G-Enzyme, deren Ergebnisse hier nicht im einzelnen abgebildet sind. Alle diese Mutanten weisen somit bei pH 7.0 keinen Isotopeneffekt auf, d.h., an dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der von ihnen katalysierten Reaktionen sind offenbar keine Protonenübergänge beteiligt. Ein anderer Verlauf ergibt sich bei den Messungen bei pH 5.0. Wie in Abbildung 4.16 wiederum am Beispiel der Mutante E283V gezeigt, ergibt sich ein der WT-Messung ähnliches Bild. Aus Tabelle 4.3 ist zu entnehmen, daß dies auch für die Mutanten D90E, D90G und E283G gilt.

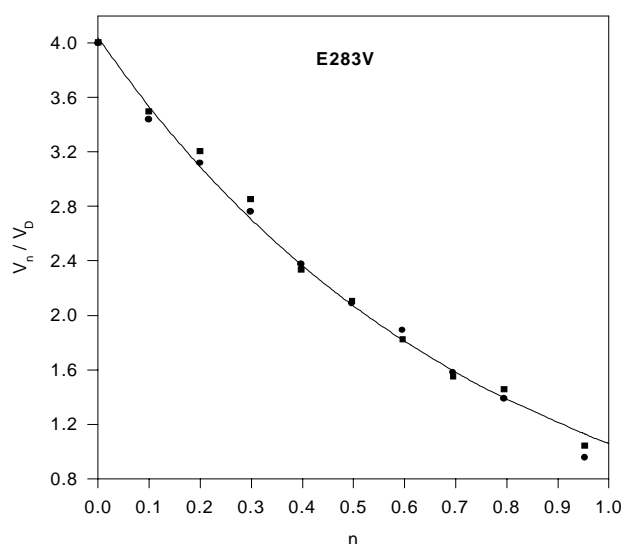


Abb.4.16: Proton inventory der Mutante E283V bei pH 5.0. $[\text{E}] = 0.040 \text{ mg/ml}$, $[\text{S}] = 2.5 \text{ mM}$ (ca. 60% Sättigung), $V_0 = 0.270 \text{ U/mg}$.

Bei diesem pH-Wert scheint ein dem Wildtyp analoger Reaktionsmechanismus vorzuliegen. Dies wäre ein weiterer Hinweis darauf, daß Aspartat-90 und Glutamat-283 nicht an einer Protonenverschiebung beteiligt sind. Die überraschenden Ergebnisse bei pH 7.0 weisen auf einen anderen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt hin.

In der Tabelle 4.3 sind alle Ergebnisse als Übersicht dargestellt. Die angegebene Anzahl der beteiligten Protonen ist eine Schlußfolgerung aus den Anpassungen der Kurven an die Meßpunkte und den nach Albery ermittelten V_m/V_D -Werten. Letztere hängen naturgemäß sehr stark von der Güte der hierfür verwendeten einzelnen Meßpunkte ab. Insgesamt stimmt die, aus den Abwei-

chungen der gemessenen von den vorhergesagten V_m/V_D -Beträgen erhaltene Protonenanzahl, gut mit der aus den Kurvenverläufen erhaltenen überein. Eine Ausnahme bildet die K162Y-Messung, bei der die Albery-Schlußfolgerung für eine Zwei-Protonen-Katalyse spricht. Dies ist aber, wie aus Abbildung 4.13 ersichtlich, auf die Abweichung der bei $n=0.5$ ermittelten Meßpunkte zurückzuführen.

Beim Vergleich der Gesamteffekte (V_H/V_D) ist, wie schon erwähnt, zu berücksichtigen, daß auch hier Abweichungen der bei $n=0$ und in „reinem“ D_2O ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten zu einer Verfälschung führen. Aus diesem Grund ist der aus dem besten Fit erhaltene Wert zusätzlich angegeben und stellt ein besseres Vergleichsmaß dar.

Enzym	pH	V_H/V_D gem. (n_D) V_H/V_D fit	gemessen V_m/V_D (n_m)	vorhergesagt V_m/V_D (Abweichung von gemessenen V_m/V_D)			Katalyse ¹	$K_m D_2O$ $K_m H_2O$ [mM]
				EP-Kat.	ZP-Kat.	MP-Kat.		
WT	5.0	3.17 ±0.02 _(0.925) 3.93 ±0.1	1.53 (+0.50)	2.08 (+0.55)	1.93 (+0.40)	1.78 (+0.25)	MP	0.13 ±0.02 0.12 ±0.01 ²
WT	7.0	2.52 ±0.03 _(0.926) 2.76 ±0.03	1.46 (0.50)	1.760 (+0.30)	1.67 (+0.21)	1.59 (+0.12)	MP	--
T12S	7.0	2.40 ±0.04 _(0.958) 2.67 ±0.06	1.44 (0.50)	1.70 (+0.26)	1.62 (+0.18)	1.55 (+0.11)	MP	--
T89S	7.0	2.71 ±0.05 _(0.959) 2.90 ±0.03	1.57 (0.50)	1.86 (+0.28)	1.75 (0.18)	1.65 (+0.07)	MP	--
T12V	5.0	2.21 ±0.10 _(0.925) 2.37 ±0.05	1.57 (0.50)	1.60 (+0.03)	1.54 (-0.02)	1.49 (-0.08)	EP o. ZP	--
T89V	7.0	2.84 ±0.01 _(0.960) 2.90 ±0.02	1.92 (0.50)	1.92 (+0.001)	1.80 (-0.12)	1.68 (-0.23)	EP	--
K162Y	5.0	2.95 ±0.15 _(0.925) 2.962±0.03	1.80 (0.50)	1.97 (+0.170)	1.85 (+0.04)	1.72 (-0.09)	EP	--
K162H	5.0	2.99 ±0.11 _(0.930) 3.34 ±0.04	1.99 (0.50)	1.99 (+0.005)	1.86 (-0.13)	1.73 (-0.26)	EP	--
Y25W/ W66Y	7.0	1.90 ±0.02 1.90 ±0.02	1.46 (0.52)	1.45 (+0.01)	1.41 (-0.05)	1.38 (-0.08)	EP	--
Y25A	7.0	1.38 ±0.02 _(0.960) 1.34 ±0.01	1.19 (0.51)	1.19 (+0.002)	1.18 (-0.005)	1.17 (-0.01)	EP	--
E283G	5.0	3.61 ±0.054 _(0.953) 3.96 ±0.13 ³	1.73 (0.50)	2.31 (+0.57)	2.10 (+0.37)	1.90 (+0.17)	MP	--
E283G	7.0	1 ⁴	1	--	--	--	OP	0.48 ±0.10 0.45 ±0.03
E283V	5.0	4.00 ±0.003 _(0.953) 3.81 ±0.06	2.10 (0.50)	2.50 (+0.40)	2.25 (+0.14)	2.00 (-0.10)	MP	--
E283V	7.0	1	1	--	--	--	OP	0.70 ±0.09 0.71 ± 0.03
D90G	5.0	4.35 ±0.12 _(0.960) 4.52 ±0.12 ⁵	2.05 (0.50)	2.67 (+0.62)	2.38 (+0.33)	2.09 (+0.03)	MP	--
D90G	7.0	1 ⁶	1	--	--	--	OP	--
D90E	5.0	4.16 ±0.11 _(0.920) 4.48 ±0.11 ⁷	2.10 (0.50)	2.58 (+0.48)	2.31 (+0.21)	2.04 (-0.06)	MP	22.9 ±9.8 25.1 ±4.6 ²
D90E	7.0	1 ⁸	1	--	--	--	OP	--

Tab. 4.3: Ergebnisse der Proton inventory-Messungen des WT und der Mutanten. ¹: Die Abkürzungen bedeuten: EP = Ein-Protonen-Katalyse, ZP = Zwei-Protonen-Katalyse, MP = Medium-Effekte/Multi-Protonen-Katalyse, OP = Keine Protonentransfers am ÜZ beteiligt. Auf die Anzahl der beteiligten Protonen wurde aus dem Verlauf der Kurven und dem V_m/V_D -Wert geschlossen; näheres siehe Text. ²: K_m -Wert bestimmt mit AHA als Substrat. Messung bei ca. ³: $3 \cdot K_m$, ⁴: $10 \cdot K_m$, ⁵: $0.7 \cdot K_m$, ⁶: $0.7 \cdot K_m$, ⁷: $0.2 \cdot K_m$, ⁸: $0.15 \cdot K_m$.

4.2.2 „Burst“-Messungen

Von besonderem Interesse für die Aufklärung des Reaktionsmechanismus der EcA2 waren Mutationen der beiden potentiellen Nukleophile Thr-89 und Thr-12. Die jeweilige Ersetzung der Threonine gegen Valin führte, wie schon mehrmals angesprochen, zu extrem niedriger Aktivität (ca. 0.002% der WT-Aktivität). In der Gruppe um Alexander Wlodawer gelang die Kristallisation der T89V-Mutante (Palm *et al.*, 1996). Die Lösung der Kristallstruktur ergab, daß sich im aktiven Zentrum dieses Enzyms ein Acyl-Rest befindet, der kovalent an das Sauerstoffatom von Threonin-12 gebunden ist (Abb. 4.17).

Die Reaktion bleibt gewissermaßen nach der Acylierung für einige Zeit „stecken“; bei dieser Mutante wäre damit die Deacylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Dies müßte sich kinetisch durch einen sogenannten Burst-Effekt untermauern lassen. Im vorliegenden Fall eines Ping-Pong-Mechanismus mit zwei Substraten (AHA und H₂O) und Produkten, sollte kurz nach dem Mischen der Reaktanden eine hohe Konzentration an Hydroxylamin festzustellen sein, dem bei der Acylierung freiwerdenden Produkt. Sie sollte in etwa der eingesetzten Konzentration an aktiven Zentren entsprechen. Das bei der Deacylierung

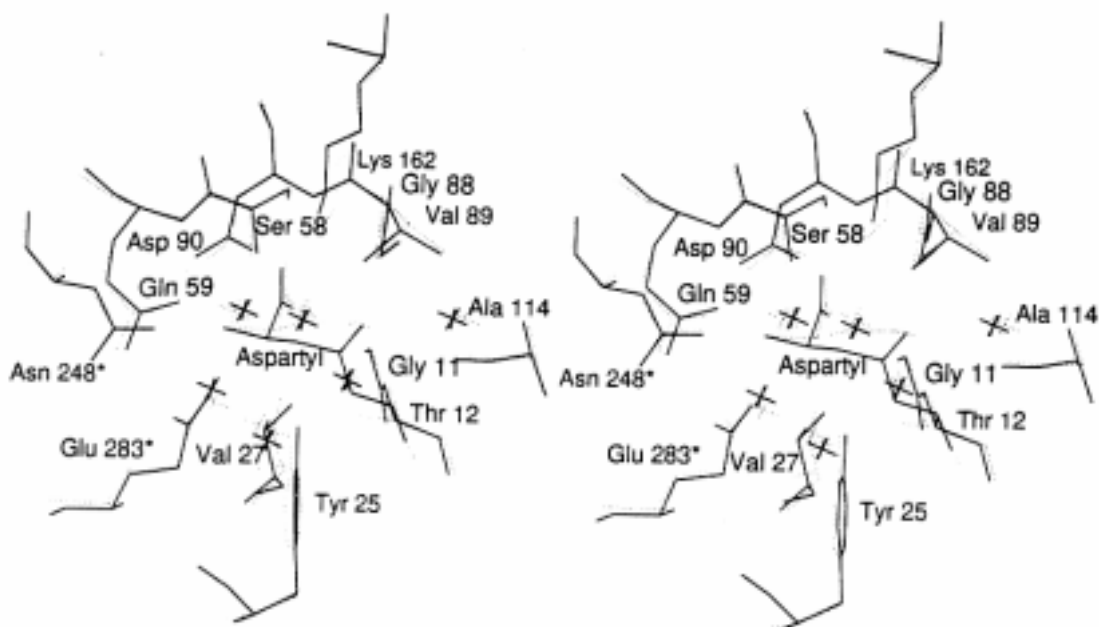


Abb. 4.17: Überlagerung der aktiven Zentren der T89V-Mutante (volle Linien) und des Wildtyp-Enzyms (unterbrochene Linien) nach Palm *et al.*, 1996. Die Kreuze repräsentieren Wassermoleküle.

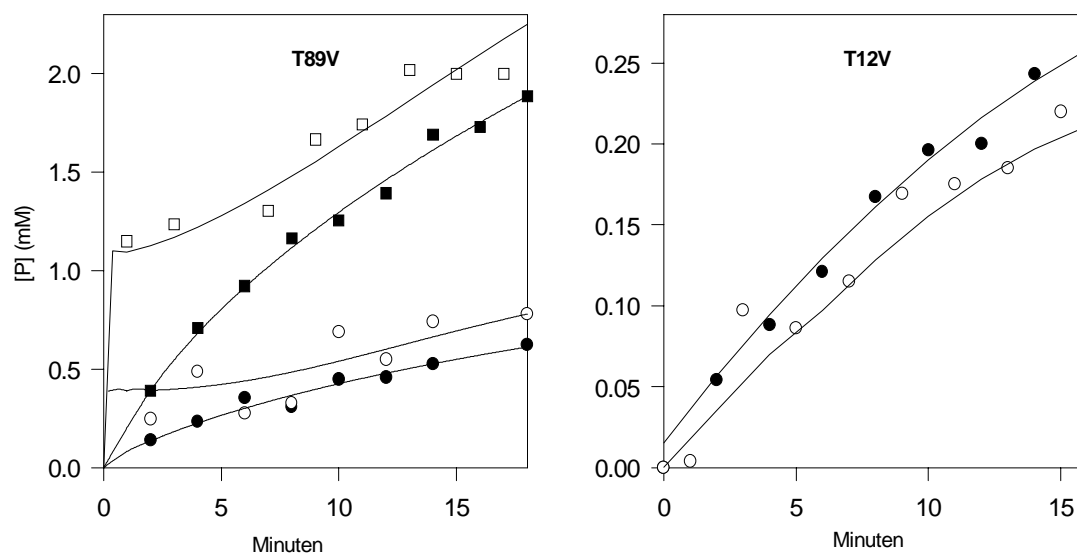
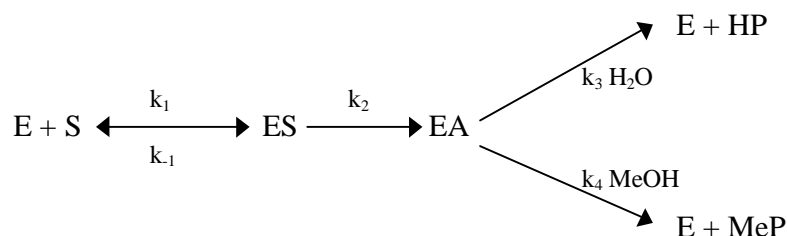


Abb. 4.18: Burst-Messungen der Mutanten T89V und T12V. Substrat: je 20 mM AHA. T89V: [E] = 0.087 und 0.28 mM (12 und 30 mg/ml); \square und \circ = Aspartat, \bullet und \bullet = Hydroxylamin. T12V: [E] = 0.18 mM (24.5 mg/ml); \circ = Aspartat, \bullet = Hydroxylamin.

entstehende Aspartat wird dann hingegen langsamer freigesetzt. Abbildung 4.18 zeigt eine entsprechende Messung für die Valin-Mutanten der beiden relevanten Threonine. Als Substrat wurde bei diesen Messungen AHA eingesetzt; der Nachweis des entstehenden Hydroxylamins und des Aspartats erfolgte nach 3.2.4.1 bzw. 3.2.4.4. Um aussagekräftige Werte zu erhalten, mußten extrem hohe Enzymkonzentrationen eingesetzt werden (T89V: 12 bzw. 30 mg/ml, T12V: 24,5 mg/ml). Die Abbildung zur T89V-Mutante zeigt das erwartete Bild: eine verzögerte Freisetzung des Aspartats; hingegen im Vergleich dazu eine zunächst schnellere Entstehung des Hydroxylamins. Etwa 10 Minuten nach dem Start der Reaktion gleichen sich die Umsätze einander an. Dies gilt für beide Enzymkonzentrationen. Auffällig ist die hohe Anfangskonzentration an Aspartat, die der eingesetzten Konzentration an aktiven Zentren entspricht (0.35 und 1.1 mM). Dies spricht dafür, daß der kovalent an das Enzym gebundene Acyl-Rest aus der Enzympräparation stammt (Palm *et al.*, 1996). Erst eine hohe Konzentration an Substrat führt zu einer Verdrängung dieses Restes. Der Verlauf der Kinetik läßt sich mit dem Programm KINSIM (Barshop *et al.*, 1983) simulieren. Man erhält unter den angewendeten Reaktionsbedingungen für die Geschwindigkeitskonstanten folgende Werte: $k_{\text{Acyl}} = 3.5 \cdot 10^{-3}$ und $k_{\text{Deacyl}} = 1.7 \cdot 10^{-3}$. Die T12V-Mutante zeigte hingegen keinen Burst-Effekt. Dieser hätte bei der eingesetzten Enzymkonzentration theoretisch bei ca. 0.70 mM liegen müssen.

4.2.3 Messungen in binären H₂O / Methanol Gemischen

Die folgenden kinetischen Messungen in methanolhaltigen Lösungen beruhen auf der Annahme, daß Methanol in Konkurrenz zu dem im zweiten Teil der Reaktion angreifenden Wasser treten kann:



Aufgrund der in der Regel höheren Nukleophilie des Methanols in wäßriger Lösung müßte bei Enzymen, bei denen die Deacylierung geschwindigkeitsbestimmend ist ($k_3 < k_2$), eine Zunahme von k_{cat} festzustellen sein.

Nicht vernachlässigt werden darf bei solchen Messungen eine mögliche Veränderung der Enzymkonformation durch das Methanol, die zu einer Verfälschung der erhaltenen Daten führen kann. Um dies auszuschließen wurde zunächst eine, den Stabilitätsuntersuchungen in Kap. 4.1.4.3

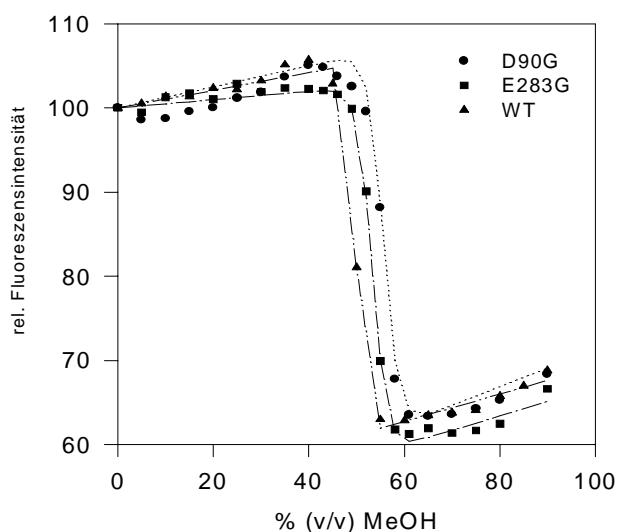


Abb. 4.19: Messung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom Methanolanteil für das WT-Enzym und die Mutanten D90G und E283G. 50 mM Tris-Puffer, pH 8.0, 25°C. Halbdenaturierungspunkte: WT = 49.9%, D90G = 55.6%, E283G = 53.3%.

analoge, fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Enzymkonformation bei steigendem Methanolanteil vorgenommen (Abb. 4.19). Die Untersuchungen zeigen, daß bei allen drei eingesetzten Enzymen erst oberhalb von 40% (v/v) Methanol (9.2 mol/L) eine Konformationsänderung eintritt, die dann schnell und einphasig verläuft. Die nachfolgenden Messungen wurden, dieses Ergebnis berücksichtigend, bis zu einem maximalen Methanolanteil von 20% (4.6 M) durchgeführt. Für das WT-Enzym sollte, da hier die Acylierung als geschwindigkeitsbestimmend postuliert wird, keine Zunahme der

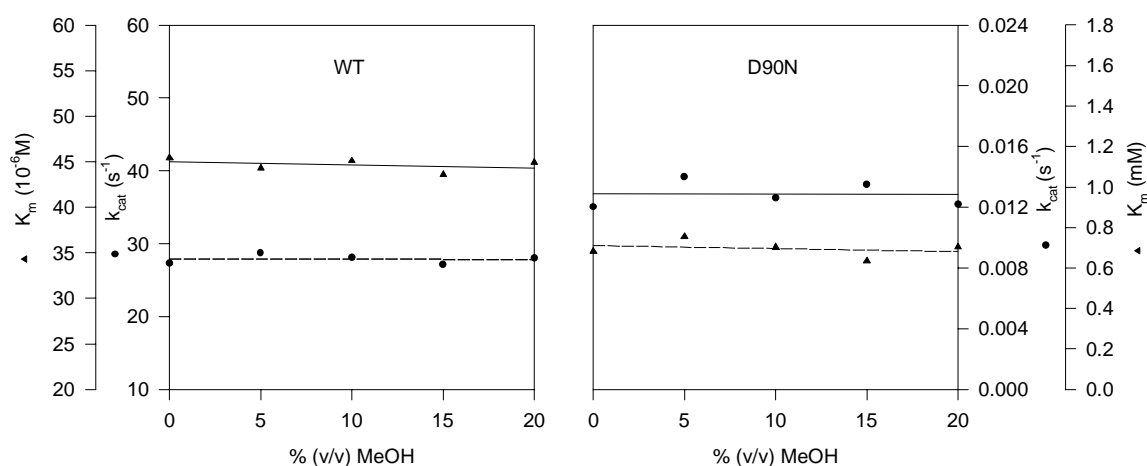


Abb. 4.20: K_m und k_{cat} in Abhängigkeit vom Methanolanteil beim WT-Enzym (Substrat: AHA) und der D90N-Mutante (Substrat: Asparagin).

Reaktionsgeschwindigkeit infolge Methanolyse festgestellt werden. Wie der Abbildung 4.20 zu entnehmen ist, findet diese Annahme eine experimentelle Bestätigung. Sowohl auf k_{cat} , als auch auf K_m hat das zugesetzte Methanol keinen Einfluß. Gleiches gilt für das D90N-Enzym. Analoge, hier nicht im einzelnen gezeigte Ergebnisse erhielt man mit den Mutanten T12V, T89V, K162Y und K162H. Ein anderes Bild ergab sich jedoch bei den entsprechenden Untersuchungen der D90G-, E283G- und E283V-Enzyme. Bei ihnen zeigt sich eine leichte, lineare Abnahme von k_{cat} , eine stärkere Verringerung von K_m und entsprechend in etwa eine Verdopplung von k_{cat}/K_m (Abb. 4.21) mit steigendem Methanolanteil. Gemäß 3.2.4.5 wurde zudem eine Detektion des bei der Methanolyse entstehenden Aspartat- β -methylesters mittels HPLC versucht. Weder mit dem WT-, noch mit dem D90G-Enzym konnte der Ester nachgewiesen werden. Für keine der untersuchten Mutanten ließ sich somit auf diesem Wege eine Änderung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes hin zur Deacylierung feststellen.

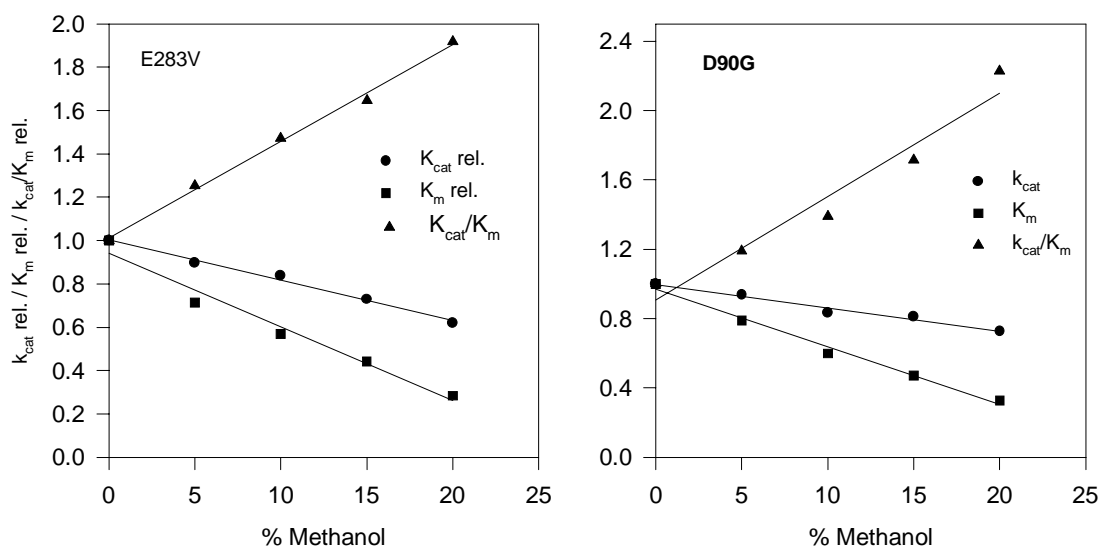


Abb. 4.21: Abhängigkeit der kinetischen Parameter der Mutanten E283V und D90G vom Methanolanteil. Als Substrat wurde Asparagin eingesetzt. Werte bei 0% MeOH: E283V: $k_{cat} = 1.99 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 0.70 \pm 0.03 \text{ mM}$; D90G: $k_{cat} = 0.49 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 16.99 \pm 3.46 \text{ mM}$.

4.2.4 Messungen mit L-Aspartat- β -methylamid

Kinetische Messungen mit dem L-Aspartat- β -methylamid und anderen Substratanalogen wurden schon früher vorgenommen, und aus den Ergebnissen schloß man auf die Acylierung als den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, da nur bei ihr eine Ersetzung der β -Gruppe durch andere Reste zu einer Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit führen kann (Röhm & Schneider, 1971). Entsprechend müßten Mutanten, bei denen die Deacylierung geschwindigkeitsbestimmend ist, keinen k_{cat} -Effekt zeigen, da bei ihnen die Abspaltung des β -Substituenten schneller als die Hydrolyse des Acylenzyms erfolgt. Das L-Aspartat- β -methylamid stellt in diesem Zusammenhang ein besonders geeignetes Substrat dar, da die Umsatzgeschwindigkeit mit ca. 1% des Asparagin-Umsatzes deutlich verringert, die Substratbindung aber kaum verändert ist ($K_m = 30 \mu\text{M}$). Das Methylamid wurde zunächst synthetisiert, gereinigt und die Güte der Präparation mittel $^1\text{H-NMR}$ überprüft. Gemäß der unter 3.2.4.5 beschriebenen Vorgehensweise wurde das bei der Reaktion entstehende L-Aspartat mittels HPLC bestimmt. Analog wurde mit dem natürlichen

Substrat Asparagin verfahren. Die Reaktionen wurden unter Substratsättigung durchgeführt. In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Mutante	pH	V_{rel} (in % des Wertes f. L-Asn)
WT	5.0	1.0 ± 0.2
WT	7.0	1.0 ± 0.1
T12V	5.0	< 5.0
D90E	5.0	0.2 ± 0.002
D90N	5.0	1.1 ± 0.3
T89V	5.0	<5.0
T89V	7.0	<5.0
K162H	5.0	3.0 ± 0.5
K162H	7.0	3.0 ± 0.4

Tab. 4.4: Umsatz an L-Aspartat- β -methylamid für WT und verschiedene Mutanten in % des L-Asparagin-Wertes.

Bei keiner der eingesetzten Mutanten ist eine signifikante Änderung des relativen Methylamid-Umsatzes im Vergleich zum WT-Enzym feststellbar. Dies ist insbesondere für die T89V-Mutante überraschend, bei der das Acyl-Enzym als Kristallstruktur erhalten und ein Burst-Effekt festgestellt wurde (vgl. 4.2.4, Palm *et al.*, 1996). Bei dieser Mutante und dem T12V-Enzym lag der Methylamid-Umsatz unterhalb der Nachweisgrenze, die 5% des Asparagin-Umsatzes betrug.

4.3 Molecular Modeling

Seit einiger Zeit gewinnt das Molecular Modeling auch zur Aufklärung von Enzymreaktionen an Bedeutung. In den achtziger Jahren wurden einige theoretische Untersuchungen zur Hydrolyse von Carbonylfunktionen durchgeführt. So beschrieb u. a. die Gruppe um Peter A. Kollman die energetischen Unterschiede eines nukleophilen Angriffs durch das Hydroxid- und Sulfhydryl-Ion auf Formaldehyd in der Gasphase und in Lösung (Weiner *et al.*, 1985; Howard & Kollman, 1988). Kollman untersuchte später mit Hilfe von Semiempirischen-MO-Rechnungen explizit die Reaktion der Serin-Proteasen auf der Grundlage der Kristallstruktur des Trypsins anhand ihres reduzierten katalytischen Zentrums (Daggett *et al.*, 1991). Semiempirische Rechnungen wurden in neuerer Zeit auch auf andere Enzymreaktionen angewandt, u. a. auf die Carboxypeptidase A (Alex & Clark, 1992), die Alkohol-Dehydrogenase (Olson *et al.*, 1996) und die Dipeptidyl-

Peptidase IV aus der Gruppe der Serin-Peptidasen (Brandt *et al.*, 1996). Gegenüber den *ab-initio*-Methoden bieten sie u. a. den Vorteil, eine geringere Rechenleistung zu benötigen; sie lassen sich somit auch auf größere Moleküle anwenden. Die semiempirische PM3-Methode erwies sich dabei insbesondere bei Reaktionen mit Protonenübertragungen als die Methode mit den besten Übereinstimmungen mit experimentellen Daten (Schröder *et al.*, 1991; Kallies & Mitzner, 1995). Dieses Verfahren wurde daher auch hier zur Simulation der Asparaginase-Reaktion verwendet. Die Gewinnung der dazu verwendeten Ausgangsstruktur erfolgte mit Hilfe des Amber-Kraftfeldes.

Als Basis der folgenden Rechnungen stand die Kristallstruktur der L-Asparaginase II aus *E.coli* mit gebundenem L-Aspartat in 2.3 Å-Auflösung zu Verfügung (Swain *et al.*, 1993).

4.3.1 Ermittlung der Ausgangsstruktur

Die Reste der L-Asparaginase II Struktur, die sich in einem Kugelradius von 20 Å um das C₂-Atom des Substrats herum befinden (einschließlich der Wasser-Moleküle) wurden der Struktur entnommen und in Hyper-Chem importiert. Das enthaltene L-Aspartat wurde in L-Asparagin umgewandelt und gemäß 3.3 erfolgte die Minimierung der erhaltenen Struktur mittels des in Hyper-Chem enthaltenen Amber-Kraftfelds. Dabei wurde zunächst nur das Substrat beweglich gehalten und mit All-Atom-Parametern minimiert, der Rest der Struktur blieb eingefroren. Im zweiten Schritt erfolgte eine All-Atom-Minimierung der Reste in einem Kugelradius von 9.5 Å um das C₂-Atom des Substrats herum. Die restlichen Gruppen blieben eingefroren (United-Atom-Parameter).

Aus der erhaltenen Struktur wurden alle Reste bis auf Threonin-12, Serin-58, Threonin-89, Aspartat-90, Lysin-162, Glutamat-283, Tyrosin-25 und das Substrat entfernt. Zehn Wassermoleküle in der Nähe des aktiven Zentrums sind in allen bekannten Asparaginase-Strukturen konserviert (Palm *et al.*, 1996). Fünf von diesen Molekülen sind in der Lage, alle wichtigen Reste des aktiven Zentrums über Wasserstoffbrücken miteinander zu verbinden. Die vier, dem Substrat am nächsten befindlichen, wurden belassen, die anderen entfernt (vgl. Abb. 4 22).

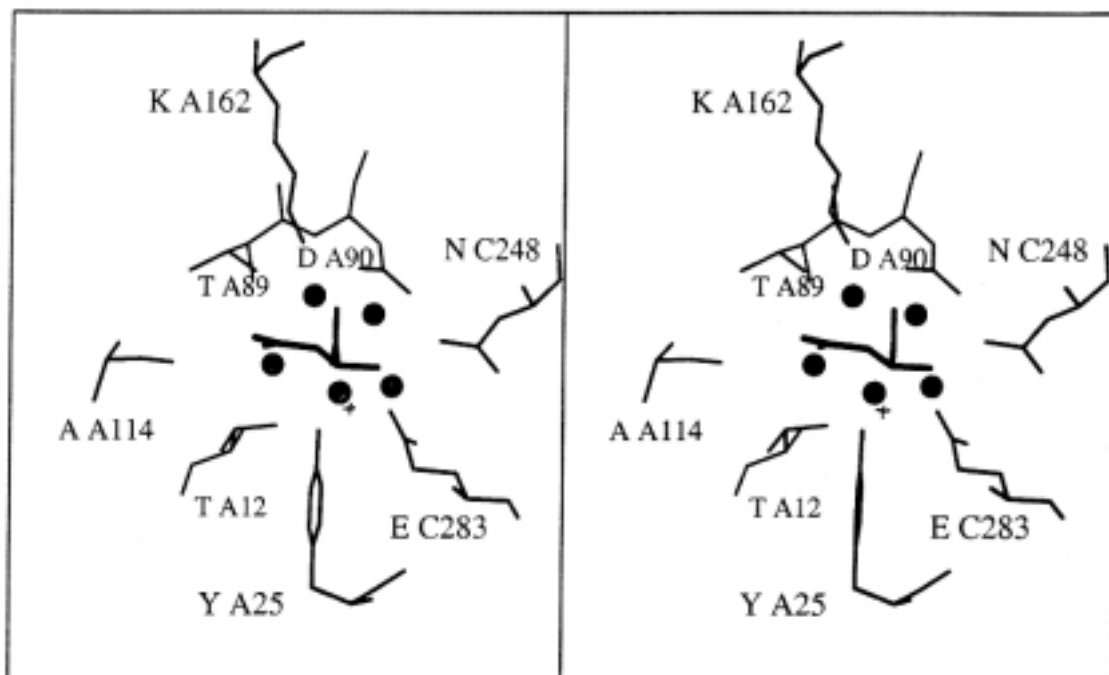


Abb. 4.22: Stereo-Bild des aktiven Zentrums der Eca2 mit gebundenem Aspartat und einem Ring von fünf konservierten Wassermolekülen (schwarze Punkte). Das Wassermolekül, das nicht mit in die Simulation des Reaktionsweges übernommen wurde, ist mit einem Kreuz markiert. Näheres siehe Text.

Da das im folgenden verwendete Programm (*Spartan-Plus*) bei semiempirischen Rechnungen nicht mehr als 100 Atome akzeptiert, mußten zudem die verbliebenen Reste, wie in der Abbildung 3.3 dargestellt, weiter reduziert werden. Der Austausch der Atome führt zu einer Reihe unnatürlicher Bindungslängen und -winkel, so daß nun zunächst gemäß 3.3 eine Geometrie-Optimierung allein dieser veränderten Positionen mittels PM3 vorgenommen wurde. Alle anderen Atome blieben eingefroren.

Bei den darauf folgenden Rechnungen wurden nachstehende Beobachtungen und Überlegungen berücksichtigt:

a) die Triade aus Thr-89, Lys-162 und Asp-90 ist durch starke Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Anhand einer Überlagerung der Strukturen der L-Asparaginase II, der *Pseudomonas* 7A Glutaminase-Asparaginase (PGA) und der Asparaginase aus *Erwinia* konnte zudem gezeigt werden, daß diese Reste ihre Konformation trotz unterschiedlicher Liganden (Substrat, Ionen und Wasser) nicht ändern; sie können somit als rigide angenommen werden (Jakob *et al.*, 1997). In den nun folgenden Rechnungen wurden daher einige Atome dieser Gruppen eingefroren (vgl. Abb. 4.24), um die Rechenzeit zu verringern.

b) Threonin-12 und Tyrosin-25 sind Bestandteile des flexiblen Loops und müssen somit als beweglich angesehen werden.

c) Threonin-12 und nicht Threonin-89 wird im folgenden als das Nukleophil angenommen. Darauf weisen die Kristallisation des Acyl-Enzyms bei der T89V-Mutante und die Burst-Messungen (vgl. 4.2.2; Palm *et al.*, 1996), die Beweglichkeit dieses Restes im Vergleich zum Threonin-89 (Jakob *et al.*, 1997) und die Orientierung der Sauerstoff-Atome der beiden Threonine hin. Diese Orientierung der Threonine im aktiven Zentrum bleibt auch nach der Geometrie-Optimierung mit Hilfe des Amber-Kraftfeldes und der PM3-Methode erhalten. Lediglich die Abstände der Sauerstoffatome zum C-Atom des Substrats ändern sich ein wenig (d_1 und d_9 in Tab. 4.12). Das Programm Spartan bietet die Möglichkeit, über *ab-initio*-Kalkulationen berechnete Orbitale graphisch darzustellen. Abbildung 4.23 zeigt die Orientierung der HOMO-Orbitale der Hydroxylfunktionen der Threonine. Die Darstellung wurde erhalten, indem eine 6-31G*-*ab-initio*-Berechnung der Threonin-Hydroxylgruppen (aus der Kristallstruktur nach Swain *et al.*, 1993) durchgeführt wurde. Die Threonine wurden hierzu jeweils in Methanol umgewandelt und die Atome während der Rechnung fixiert. In analoger Weise wurde von einem verkürzten Substrat ($\text{CH}_3\text{-CONH}_2$) das LUMO berechnet und ebenfalls mit abgebildet.

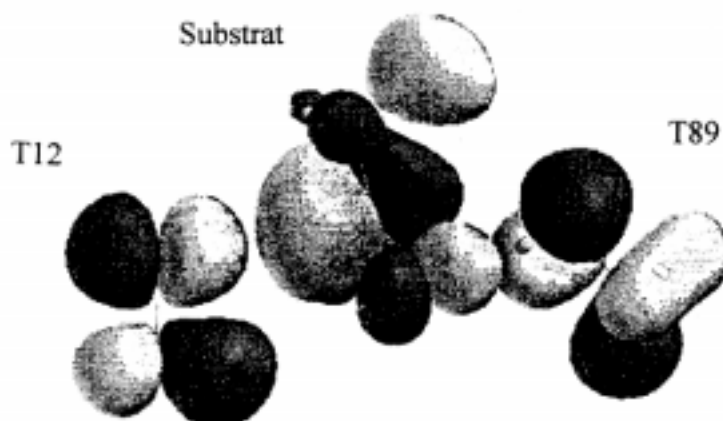


Abb. 4.23: Schematische Darstellung der HOMO-Orientierung der Hydroxylfunktionen der beiden Threonine und des LUMO des verkürzten Substrats. Näheres siehe Text.

Die Abbildung zeigt die wesentlich günstigere Ausrichtung des Thr-12-Sauerstoffatoms für den Angriff auf das Carbonyl-C-Atom des Substrats.

d) Die Mutageneseexperimente und die zugehörigen Kinetiken weisen nicht eindeutig auf einen Rest im aktiven Zentrum hin, der die Funktion einer Base bei der Abstraktion des Protons vom Nukleophil übernehmen könnte (vgl. auch Diskussion). Es muß daher die Möglichkeit der direkten Protonenübertragung auf die Abgangsgruppe Berücksichtigung finden.

Zur weiteren Verfeinerung des Modells erfolgte eine PM3-Minimierung mit freier Amid-Funktion des Substrats und freier Hydroxyl-Gruppe des Threonin-12, dem potentiellen Nukleophil (vgl. c). Auch in diesem Fall blieben alle anderen Atome eingefroren.

Der so erhaltene Abstand zwischen dem Threonin-12-Sauerstoffatom und dem Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrats wurde fixiert, die Atome selber wurden jedoch beweglich gehalten. Abschließend wurde das ganze System PM3-minimiert gemäß 3.3. Die erhaltene Struktur ist in Abbildung 4.24 dargestellt. Die bei den folgenden Rechnungen fixierten Atome sind als Punkte dargestellt.

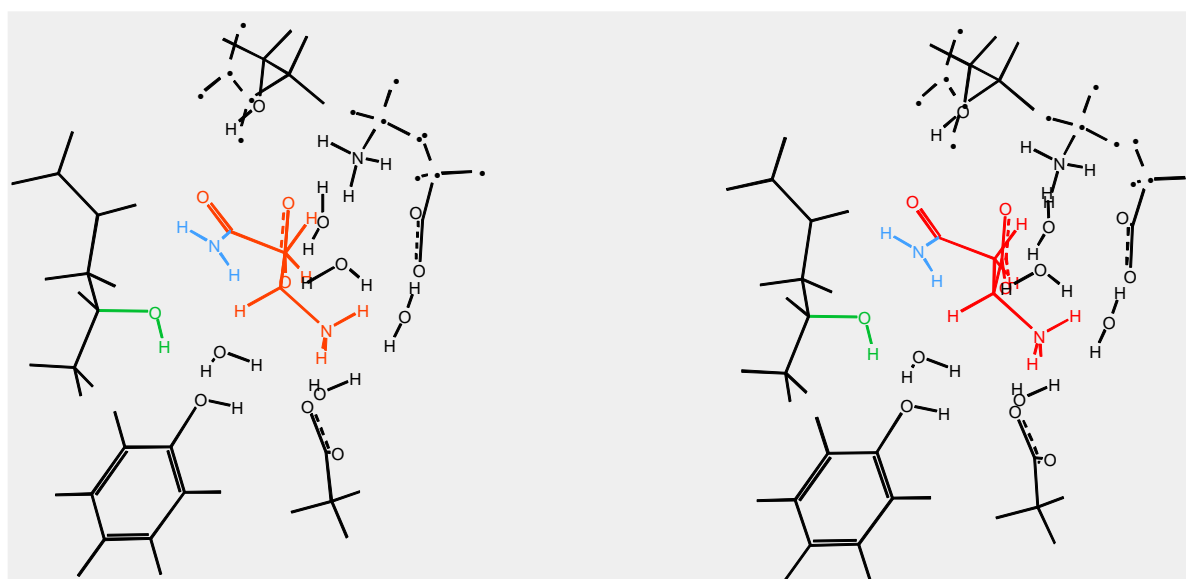


Abb. 4.24: Stereobild des reduzierten aktiven Zentrums. Ausgangsstruktur zur Simulation des Reaktionsweges. Näheres siehe Text. Grün: Threonin-12-OH-Gruppe, blau: Abgangsgruppe des Substrats, rot: restliches Substrat. Die während des gesamten Reaktionsweges fixierten Atome sind als Punkte dargestellt. Ladungen sind nicht mit eingezeichnet.

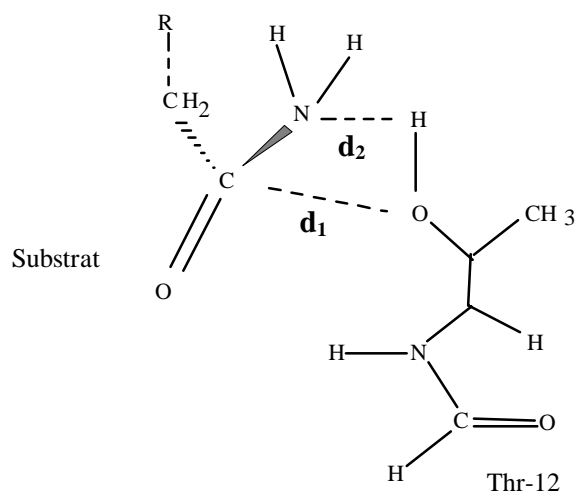
In Tabelle 4.12 werden einige Atomabstände der Struktur aus Abb. 4.24 mit denen aus der Kristallstruktur und der Amber-minimierten Struktur verglichen. Es ist zu erkennen, daß bei sämtlichen Abständen die Unterschiede relativ gering sind. Es wurde somit, trotz der relativ geringen Anzahl an fixierten Atomen, ein stabiles System erhalten. Dabei diente die Hauptketten-NH-Gruppe des Serin-58 - umgewandelt in ein H_2O (vgl. 3.3) - allein der Fixierung der α -Carboxylatgruppe des Substrats und der Begrenzung des Systems. Die Hauptketten-Stickstoffatome von Thr-89 und Thr-12 bilden Wasserstoffbrücken zum γ -O-Atom des Substrats aus und wurden daher in der Struktur belassen.

4.3.2 Simulation des Reaktionsweges

Das in Abb. 4.24 dargestellte System bildete den Ausgangspunkt der dann folgenden Rechnungen zur Simulation des Reaktionsweges. Dieser wurde in einzelne Reaktionsschritte aufgeteilt; beginnend mit der Acylierung unter Bildung des Acyl-Enzyms, gefolgt von der Aktivierung des Wassermoleküls und dem nukleophilen Angriff des Hydroxidions auf das Acyl-Enzym sowie schließlich der Auflösung des dabei entstehenden tetraedrischen Übergangszustandes unter Freisetzung des Produktes Aspartat. Zur Simulation der einzelnen Reaktionsschritte wurde die 'reaction coordinate' Methode angewendet (Dewar & Kirschner, 1971). Als Reaktionskoordinate dient dabei die Strecke zwischen den Atomen die miteinander reagieren sollen. Der Abstand der Reaktionspartner wird schrittweise verringert und die Energie des gesamten Systems dabei jeweils minimiert. In Abbildung 4.28 ist der gesamte simulierte Reaktionsweg zusammenfassend abgebildet, und die für jeden Reaktionsschritt aufzubringende potentielle Energie mit angegeben.

4.3.2.1 Acylierung

Gemäß den unter c und d dargestellten Überlegungen wurde Thr-12 als Nukleophil gewählt und das Proton der Hydroxylgruppe direkt auf die Abgangsgruppe übertragen. Somit wurde zum einen der Abstand zwischen dem Hydroxyl-Sauerstoffatom des Thr-12 und dem Carbonyl-Kohlenstoffatom, sowie zum anderen der Abstand zwischen dem Hydroxyl-Wasserstoffatom und dem Amid-Stickstoffatom schrittweise verringert. In Tabelle 4.5 sind die Energien, die bei der Geometrie-Optimierung gemäß 3.3 der einzelnen Strukturen erhalten wurden in kcal/mol angegeben. Die Ausgangsstruktur ($d_1 = 2.07$ u. $d_2 = 3.07$ Å, -898.2 kcal/mol) entspricht der in Abb. 4.24 dargestellten Struktur. Bei jeder Minimierung blieben die in dieser Abbildung markierten Atome eingefroren, alle anderen wurden beweglich gehalten.



d_1 [Å]	d_2 [Å]						
	3.07	2.60	2.30	1.90	1.50	1.20	1.0
2.70	-898.2	-896.9	-894.8	-893.0	-884.4	-863.4	-859.3
2.30	-893.4	-890.7	-890.3	-886.1	-881.2	-860.1	-858.2
1.80	-873.1	-870.2	-870.0	-869.2	-865.9	<u>-866.4</u>	-872.1
1.50	-853.7	-852.1	-845.4	-855.3	-846.1	-881.6	-892.2

Tab. 4.5: Energien in kcal/mol entlang des Reaktionsweges der Acylierung. Dabei wird ein Proton vom Nukleophil Thr-12 direkt auf die Abgangsgruppe übertragen. Der Reaktionsweg niedrigster Energie ist grau unterlegt - und der Übergangszustand zudem unterstrichen dargestellt. Näheres siehe Text.

In Tabelle 4.5 ist der Weg niedrigster Übergangsenergie grau unterlegt und der vermutliche Übergangszustand - der am wenigsten negative Wert - dieses Weges zudem unterstrichen dargestellt. Den Daten ist zu entnehmen, daß zunächst eine Annäherung des Protons bis auf 1.9 Å-Abstand an das Stickstoffatom vollzogen wird. Dieser Prozeß benötigt nur 5.2 kcal/mol an Energie. Es folgt eine Verringerung des C-O-Abstandes bis auf 2.3 Å. Daran schließt sich eine weitere Bewegung des Protons bis auf 1.5 Å an das N-Atom heran, gefolgt von einer simultanen Annäherung des Sauerstoffatoms an das Carbonyl-C-Atom und des Wasserstoffatoms an den Amid-Stickstoff. Alternativ könnte sich das Proton auch zuerst bis auf 1.5 Å dem Stickstoff nähern, das O-Atom verringert seinen Abstand zum C-Atom um 0.4 Å und es folgt dann analog die simultane Reaktion wie oben beschrieben. Die Energie der Übergangsstruktur ($d_1 = 1.8$, $d_2 = 1.2$ Å, -866.4 kcal/mol) liegt um 31.8 kcal/mol höher als die der Ausgangsstruktur. Der Übergangszustand ist in Abb. 4.25 dargestellt. Würde das Proton zuerst vollständig auf das N-Atom übertragen und erst dann das

Sauerstoffatom angreifen, wäre eine mit 40 kcal/mol deutlich höhere Energie aufzubringen. Gleiches gilt für den umgekehrten Fall, bei zuerst erfolgreicher Annäherung des O-Atoms und darauf die Übertragung des Protons (52.8 kcal/mol).

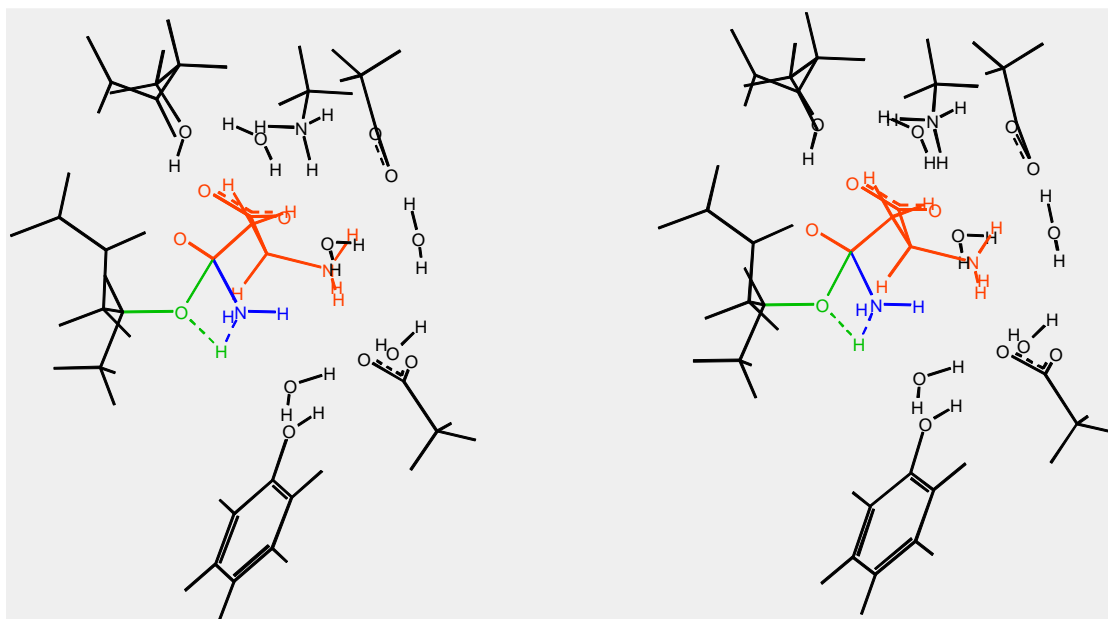


Abb. 4.25: Stereobild des Übergangszustandes der Acylierung ($d_1 = 1.8$, $d_2 = 1.2$ Å in Tab. 4.5). Grün: Thr-12-OH-Gruppe, blau: Abgangsgruppe des Substrats, rot: restliches Substrat. Es wurden die selben Atome wie in Abb. 4.24 fixiert. Näheres siehe Text. Ladungen sind nicht eingezeichnet.

In Tabelle 4.12 sind zum Vergleich einige Atomabstände der wichtigsten Strukturen aufgeführt. Ihr ist zu entnehmen, daß beim Übergangszustand und bei der Endstruktur dieses Reaktionsschrittes, dem Acyl-Enzym, der Abstand vom Hauptketten-N-H des Thr-12 zum Sauerstoffatom des Substrats stark zunimmt (die N-O-Entfernung vergrößert sich um ca. 2 Å). Im Übergangszustand nimmt die Amid-Gruppe eine annähernd tetraedrische Geometrie an (vgl. Abb. 4.25), die N-H-Gruppe verliert dadurch ihren Kontakt mit dem Sauerstoffatom und bildet statt dessen eine neue Wasserstoffbrücke mit dem α -Carboxylat des Substrats. Die Hauptketten-N-H-Gruppe des Thr-89 bildet ebenfalls keine Wasserstoffbrücke mehr mit dem O-Atom des Substrats aus (N-O-Entfernung um ca. 1 Å vergrößert), ihre Atome wurden jedoch bei der Geometrie-Optimierung fixiert und konnten daher auf die Struktur-Veränderungen nicht reagieren.

Die Endstruktur dieser Reaktion hat eine Energie von -892.2 kcal/mol. Sie scheint daher schwach endotherm zu sein. In der folgenden Tabelle 4.6 sind die Energien des Systems bei zunehmender Entfernung der Abgangsgruppe NH_3 vom entstandenen Ester angegeben. Dabei wurde zudem das System 'überarbeitet', d. h., die alten Bindungen (C-N und O-H) wurden vollständig gelöst und die neuen Bindungen ausgebildet (C-O und N-H).

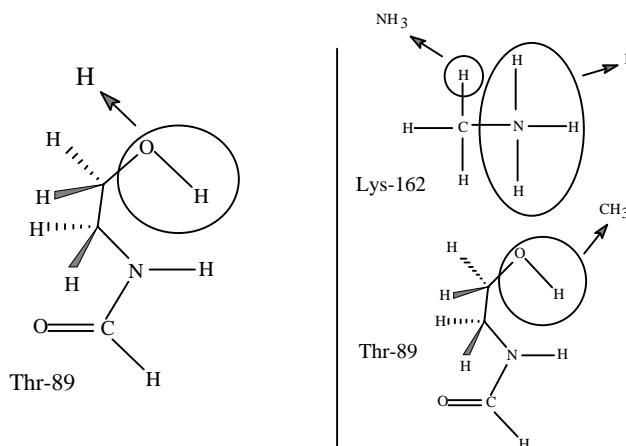
Abstand C \longleftrightarrow N (vom NH ₃) [Å]				
2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
-892.5	-896.7	-900.4	-901.5	-901.6

Tab. 4.6: Energien (in kcal/mol) des Systems bei zunehmendem Abstand der Abgangsgruppe NH₃ (vom N-Atom aus gemessen) zum C-Atom des entstandenen Esters. Näheres siehe Text.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, verringert sich die Energie mit zunehmendem Abstand des Ammoniak-Moleküls. Ab einer Entfernung von ca. 3.0 Å wird der Acylierungsschritt schwach exotherm.

Variationen des Acylierungsschrittes

Das verwendete System bietet die Möglichkeit, ausgewählte funktionelle Gruppen im aktiven Zentrum zu entfernen oder auszutauschen. Es kann dann der Einfluß dieser Veränderungen auf die bei dem jeweiligen Reaktionsschritt aufzubringende Aktivierungsenergie registriert werden. Um den Effekt der Reste Threonin-89 und Lysin-162 auf die Aktivierungsenergie des Acylierungsschrittes festzustellen, wurde zum einen die Hydroxylgruppe des Threonins entfernt (in ein Wasserstoffatom umgewandelt), zum anderen eine der Mutante T89V ähnliche Geometrie geschaffen. Diese Veränderungen wurden an der Ausgangs- und der Übergangsstruktur vorgenommen und die erhaltenen Systeme wurden in der bekannten Weise geometrieoptimiert. Tabelle 4.7 zeigt die vorgenommenen Veränderungen und die erhaltenen Energien.

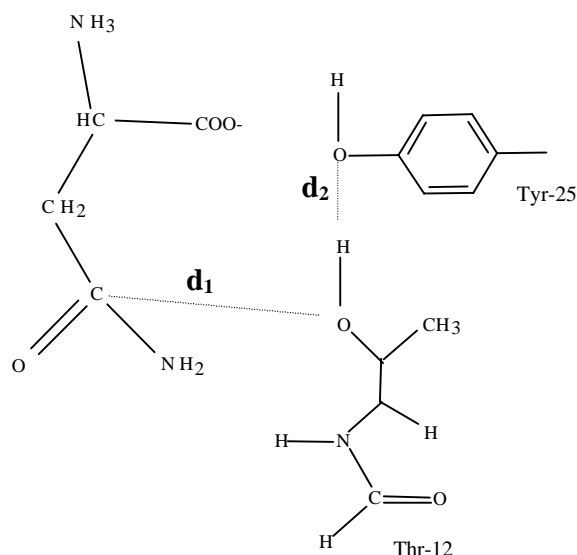


Ausgangsstruktur	-852.9	-835.5
Übergangszustand	-817.1	-800.3
ΔE ($\Delta\Delta E$ zum WT)	35.8 (+4.0)	35.2 (+3.4)

Tab. 4.7: Energien in kcal/mol der Ausgangsstruktur ($d_1 = 2.70$, $d_2 = 3.07$ Å) und des Übergangszustandes ($d_1 = 1.80$, $d_2 = 1.20$ Å) nach Modifikationen der Reste Threonin-89 und Lysin-162. Bei der linken Struktur wurde die Hydroxylgruppe des Threonins durch ein Wasserstoffatom ersetzt. Bei der rechten wurde sie durch eine Methylgruppe ersetzt und zusätzlich die NH_3 -Gruppe des Lysins auf eine andere Position 'verschoben' (in Anlehnung an die T89V-Kristallstruktur, vgl 4.2.2).

Die Entfernung der Hydroxylgruppe des Thr-89 verursacht eine Erhöhung der Übergangsenergie um 4.0 kcal/mol; die Veränderungen in Anlehnung an die T89V-Kristallstruktur erhöhen sie um 3.4 kcal/mol. Der erste Wert erklärt sich durch den Verlust der Wasserstoffbrücke zum O-Atom des Substrats. Der geringere zweite Wert erscheint überraschend, könnte aber durch den Wegfall der Abstoßung des positiv geladenen Lysins mit dem, im Übergangszustand positiv polarisierten, Stickstoff-Atom der Amid-Funktion verursacht werden.

In dieser Arbeit wurde schon mehrmals die Möglichkeit erwähnt, daß Thr-12, Tyr-25 und Glu-283 eine katalytische Triade bilden könnten. Obwohl u.a. die Mutageneseexperimente (vgl. 1.2, 4.2) dieser Überlegung stark widersprechen, wurde mittels PM3-Rechnungen auch der nukleophile Angriff des Thr-12 und die Übergabe des Protons an das Tyr-25 simuliert. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 4.8 wiedergegeben. Die Ausgangsstruktur entspricht derjenigen aus Tab. 4.5 u. Abb. 4.24. Der Weg niedrigster Energie ist auch in diesem Fall grau unterlegt. Der Übergangszustand hat eine Energie von -844.8 kcal/mol und zu seiner Überwindung muß dementsprechend 53.4 kcal/mol an Energie aufgebracht werden. Die Aktivierungsenergie liegt somit um 21.4 kcal/mol höher als bei der Protonenübergabe an die Abgangsgruppe.



d_1 [Å]	d_2 [Å]			
	1.83	1.40	1.20	1.0
2.7	-898.2	-880.5	-868.9	-852.8
2.3	-891.3	-877.5	-864.6	-849.5
1.8	-873.	-857.1	-844.8	-831.5
1.5	-852.6	-839.5	-828.5	-877.0

Tab. 4.8: Energien in kcal/mol entlang des Reaktionsweges der Acylierung. Dabei wird das Proton des Nucleophils Thr-12 auf das Tyr-25 übertragen. Näheres siehe Text. Der Weg niedrigster Energie ist grau unterlegt dargestellt.

4.3.2.2 Deacylierung

Aktivierung des Wassermoleküls und nukleophiler Angriff auf das Acyl-Enzym

Für die Deacylierung wird ein aktiviertes Wassermolekül benötigt. Es ist daher von Interesse, welches Wassermolekül als Nucleophil in Frage kommt, und welche Gruppe als Protonenakzeptor fungiert. Wie schon erwähnt, können fünf Wassermoleküle im aktiven Zentrum alle wichtigen katalytischen Gruppen im aktiven Zentrum über H-Brücken miteinander verbinden (vgl. Abb. 4.22), sie sind zudem in allen bekannten Asparaginase-Strukturen konserviert. Eines dieser Wassermoleküle, in der Nähe der Reste T89 und K162 plaziert, ist das wahrscheinliche Nucleophil. In der Kristallstruktur der Mutante T89V mit kovalent gebundenem Acyl-Enzym (vgl. Abb. 4.17) fehlt das H_2O an dieser Position. Diese Mutante ist bewiesenermaßen

acylierungsgehemmt (vgl. 4.2.2; Palm *et al.*, 1996). Für die Aktivierung des Wassers stellt sich das gleiche Problem wie für die Acylierung. Es gibt keinen signifikanten Hinweis auf einen Aminosäurerest im aktiven Zentrum, der als Base wirken könnte. Die Abgangsgruppe NH_3 ist jedoch eine schwache Base mit einem pK_a von 9.25. Es wurde daher eine Aktivierung des Wassermoleküls durch das Ammoniakmolekül simuliert.

Abbildung 4.26 zeigt die Endstruktur der Acylierungsreaktion mit dem Acyl-Enzym und der Abgangsgruppe NH_3 ; letztere wurde dabei frei beweglich gelassen. Das Wassermolekül mit dem direktesten Kontakt zum freien Elektronenpaar des Ammoniaks ist rosa gefärbt. Es befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum Lysin-162.

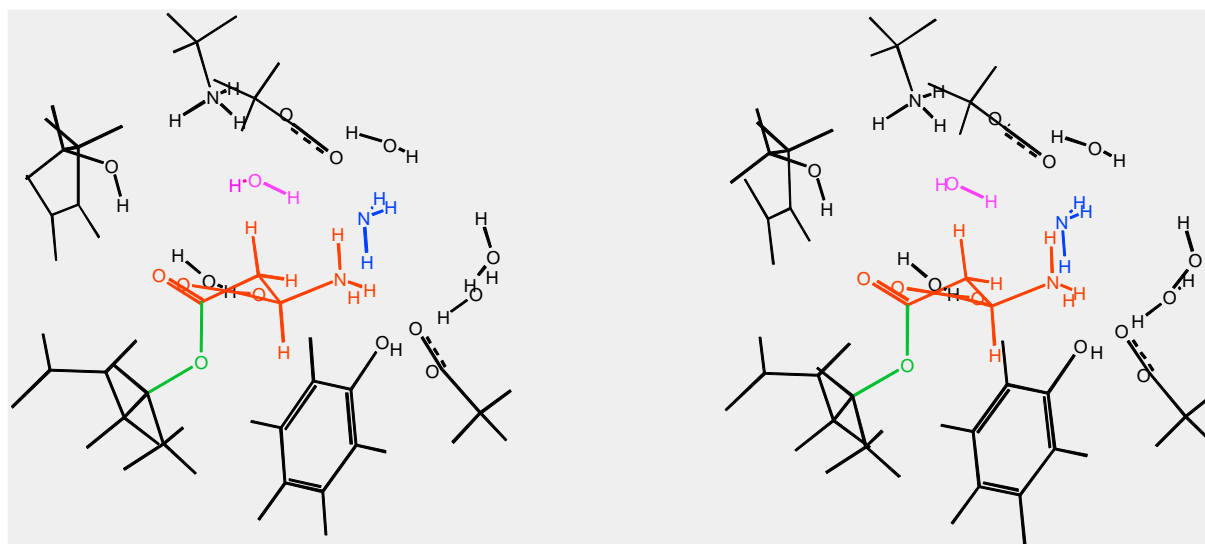
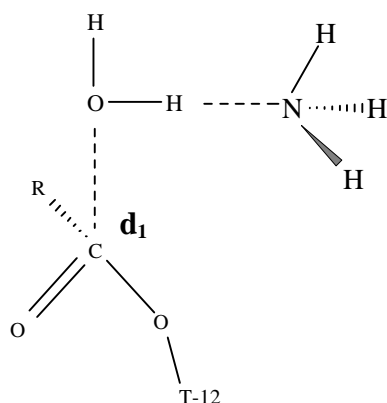


Abb. 4.26: Stereobild des aktiven Zentrums mit kovalent gebundenem Acyl-Enzym wie es durch die Simulation des Reaktionsweges erhalten wurde. Rosa: Wassermolekül, das bei der Deacylierung als Nukleophil fungiert; blau: NH_3 -Molekül, welches das Wassermolekül aktiviert, rot: der Teil des Acyl-Enzyms der vom Substrat stammt; grün: Teil des Acyl-Enzyms der vom Thr-12 stammt.

Die Geometrie-Optimierungen mittels PM3 wurden bei verschiedenen Abständen dieses H_2O -Moleküls vom Ester-C-Atom durchgeführt. Das Sauerstoffatom wurde dabei zusätzlich zu den anderen Atomen (s. Abb. 4.24) eingefroren, das Ammoniak-Molekül hingegen beweglich gehalten. Bei jedem dieser O-Atom-Abstände wurde nachfolgend das Wassermolekül in ein Hydroxid-Ion umgewandelt und das NH_3 in NH_4^+ . Diese Strukturen wurden auf analoger Weise einer Geometrie-Optimierung unterzogen. Tabelle 4.9 zeigt die auf diesem Wege erhaltenen Werte.



	d_1 [Å]					
	4.0	3.0	2.5	2.0	1.5	TET
H ₂ O/NH ₃	-902.8	-898.4	-893.7	-882.0	--	--
OH ⁻ /NH ₄ ⁺	-885.9	-882.6	-880.7	-877.3	-883.9	-884.3
ΔE [kcal/mol]	16.9	15.8	13.0	4.7	--	--

Tab. 4.9: Energien in kcal/mol bei der Übertragung eines Protons von einem Wassermolekül auf NH₃ und anschließendem Angriff des Hydroxidions auf das Acyl-Enzym. TET: Tetraedrischer Übergangszustand mit komplett ausgebildeter, neuer C-O-Bindung.

In Abbildung 4.27 ist die tetraedrische Endstruktur abgebildet.

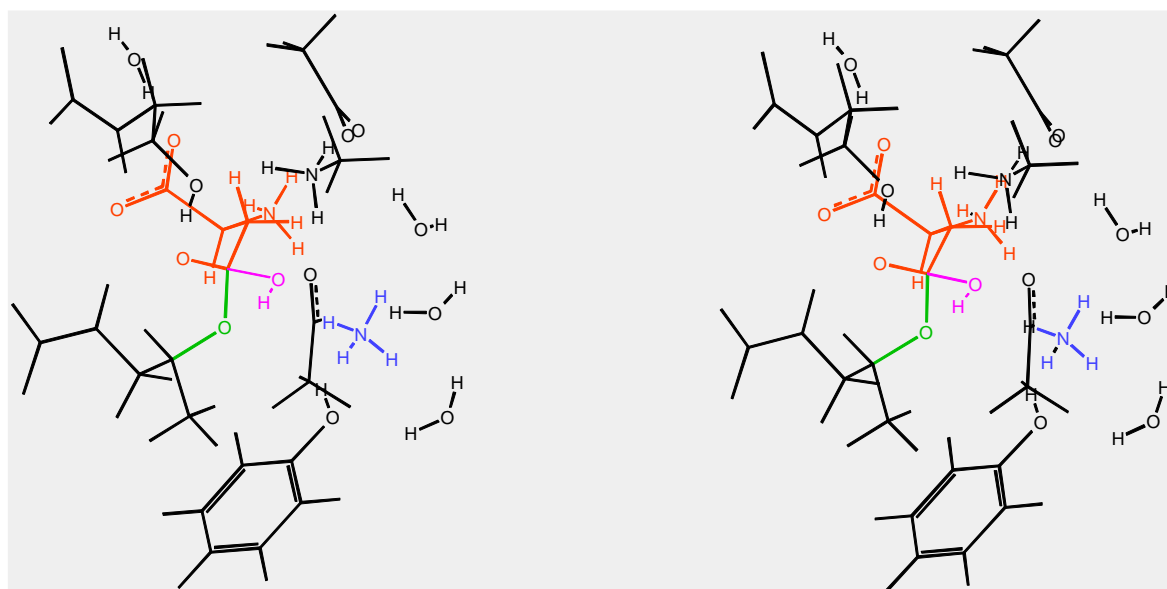


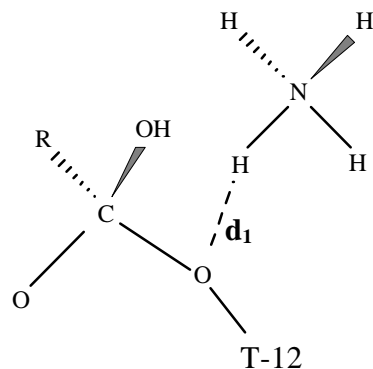
Abb.4.27: Stereobild des tetraedrischen Übergangszustandes nach Angriff des OH⁻-Ions auf das Acyl-Enzym. Es wurden die gleichen Atome wie in Abb. 4.24 fixiert. Blau: Ammoniumion, welches das Proton vom Wasser übernommen hat; rot: Teil der vom Substrat stammt; grün: Teil der vom Threonin-12 stammt, rosa: Teil der vom Hydroxidion stammt. Ladungen sind nicht mit eingezeichnet.

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, variieren die Energiewerte, die für den Protonenübergang auf das Ammoniak nötig sind, stark mit dem Abstand des Wassermoleküls vom C-Atom. Der sehr geringe Wert von 4.7 kcal/mol beim H₂O-Abstand von 2.0 Å, könnte durch die zunehmende positive Polarisierung des O-Atoms und die dadurch bedingte leichtere Abstrahlung des H-Atoms zu erklären sein. Bei der Beurteilung der Werte aus Tabelle 4.9 muß in Betracht gezogen werden, daß die PM3-Methode die Bildungsenergie des OH⁻-Ions falsch berechnet (experimentell: -33.2 kcal/mol; PM3: -17.5 kcal/mol; Kallies & Mitzner, 1995). Obwohl diese Unterschiede für die Gas-Phase ermittelt wurden und keine Wasserstoffbrücken Berücksichtigung fanden, kann die Reaktion als zu endotherm erscheinen. Desweiteren muß Beachtung finden, daß die Tendenz zur Protonenübergabe stark durch die Stabilisation der entstehenden Ionen beeinflusst wird. Im vorliegenden Fall würde die stark negative Ladung des Hydroxydions durch Wasserstoffbrücken zu zwei benachbarten, positiv geladener Ammoniumionen ausgeglichen. Die Stabilisierung der letztgenannten geschähe im Falle des Lysins zudem durch das Asp-90 und das Thr-89, im Falle der Abgangsgruppe durch die Wassermoleküle und das Tyr-25. Insbesondere bei der Abgangsgruppe stößt das verwendete System aber an seine Grenzen, da die Umgebung dieses Moleküls nur ungenügend wiedergegeben wird.

Bei der Annäherung des Hydroxidions nimmt die Energie kontinuierlich zu, mit einem Maximum bei einem OH⁻-Abstand von 2.0 Å (-877.3 kcal/mol). Die tetraedrische Endstruktur ist dann wieder energetisch günstiger (-884.3 kcal/mol). Auf diesen Aspekt wird in der Diskussion näher eingegangen.

Protonierung des tetraedrischen Übergangszustandes

Die Freisetzung des Produktes Aspartat muß über die Protonierung des tetraedrischen Übergangszustandes am Estersauerstoff-Atom des Thr-12 erfolgen. Wie aus Abb. 4.27 ersichtlich wird, nimmt das NH₄⁺-Ion die beste Position für diesen Protonenübergang ein. Der Abstand des Ammoniumionen-Protons zum Thr-12-O-Atom wurde schrittweise verringert und das System dabei jeweils geometrieoptimiert. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 4.10 zusammengefaßt.



d_1 [Å]			
2.4	2.0	1.5	Endstruktur
-884.3	-883.8	-877.7	-895.1

Tab. 4.10: Energien in kcal/mol beim Protonenübergang vom NH_4^+ auf das Thr-12-O-Atom des tetraedrischen Übergangszustandes. Endstruktur: neue O-H-Bindung voll ausgebildet, C-O(-T-12)-Abstand auf 2.92 Å vorgegeben. Näheres siehe Text.

Wie aus der Tabelle 4.10 ersichtlich, werden zur Protonierung des Sauerstoffatoms nur 6.6 kcal/mol benötigt. Bei der Annäherung des Protons vergrößerte sich der C-O(-Thr-12)-Abstand selbständig. Da bei den Resten Thr-12, Tyr-25 und Glu-283 keine Atome eingefroren wurden, entfernt sich das Threonin jedoch zu stark vom Substrat. Der C-O(-Thr-12)-Abstand wurde daher auf 2.92 Å eingestellt. Dieser Abstand wurde der Kristallstruktur mit gebundenem Aspartat entnommen (vgl. Tab. 4.12). Das NH_3 -Molekül wurde bei der Ermittlung der obigen Endstruktur im aktiven Zentrum belassen. Die Reaktion insgesamt ist exotherm.

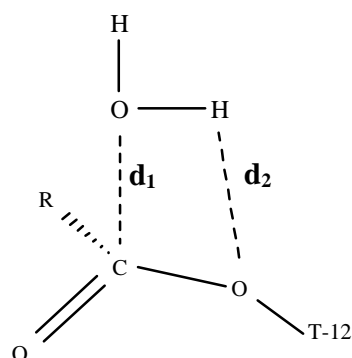
Variationen des Deacylierungsschrittes

Bei der tetraedrischen Struktur nach Angriff des OH^- -Ions bildet das Threonin-89 eine starke Protonenbrücke mit dem O-Atom des Substrats (O-O-Abstand 2.65 Å, Abb. 4.27). Um den Beitrag dieser Protonenbrücke zur Stabilisierung des tetraedrischen Übergangszustandes zu untersuchen, wurde, auf analoge Weise wie in Tabelle 4.7 angegeben, eine Deletion (Umwandlung in ein Proton) der Hydroxidgruppe des Threonins vorgenommen. Dies geschah bei einem Abstand des OH^- von 4.0 Å vom C-Atom und bei der voll ausgebildeten tetraedrischen Struktur. Die erhaltenen Energien betragen -840.3 und -830.9 kcal/mol. Die Energiedifferenz beträgt +9.4 kcal/mol

und liegt damit um 7.8 kcal/mol höher als im Falle des unveränderten Systems ($\Delta E = +1.6$ kcal/mol, Tab. 4.9).

Die Protonierung des tetraedrischen Übergangszustandes am Ester-O-Atom wurde mittels des im aktiven Zentrum verbliebenen Ammoniumions simuliert (Tab. 4.10). Das NH_4^+ -Molekül könnte jedoch auch - nach der vollständigen Ausbildung der tetraedrischen Struktur - aus dem aktiven Zentrum verdrängt werden, da es dann zu einer elektrostatischen Abstoßung mit dem Lysin-162 kommen kann. Die Protonierung des Ester-O-Atoms müßte dann durch ein Wassermolekül erfolgen. Gemäß dieser Überlegung wurde das Ammoniumion durch ein H_2O ersetzt, die erhaltene Struktur wurde geometrieoptimiert und dann wurde eine, wie in Tab. 4.10 dargestellte, Verringerung des O-H-Abstandes vorgenommen. Die erhaltenen Energien betragen -947.3 (O-H-Abstand 2.4 Å), -946.0 (O-H Abstand 2.0Å), -937.5 (1.5 Å) und -955.0 kcal/mol (Endstruktur). Die Aktivierungsenergie bei der Protonierung des tetraedrischen Übergangszustandes durch ein Wassermolekül beträgt demnach 9.8 kcal/mol und liegt damit um 3.2 kcal/mol höher als bei der Reaktion mit dem NH_4^+ -Ion.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Frage, wie es sich auswirkt, wenn das in Frage kommende Wassermolekül nicht aktiviert werden kann. Der Angriff auf das Acyl-Enzym müßte dann durch ein H_2O -Molekül erfolgen. Um diesen Weg nachzuvollziehen, wurde zunächst das NH_3 durch ein Wassermolekül ersetzt. Dann wurde schrittweise der Abstand zwischen dem O-Atom des analogen Wassers wie in Tabelle 4.9 und dem C-Atom des Esters verringert. Ab einem Abstand von 3.0 Å erfolgte zudem die Annäherung des H_2O -Protons an das Thr-12-Sauerstoffatom. Tabelle 4.11 faßt die erhaltenen Daten zusammen.

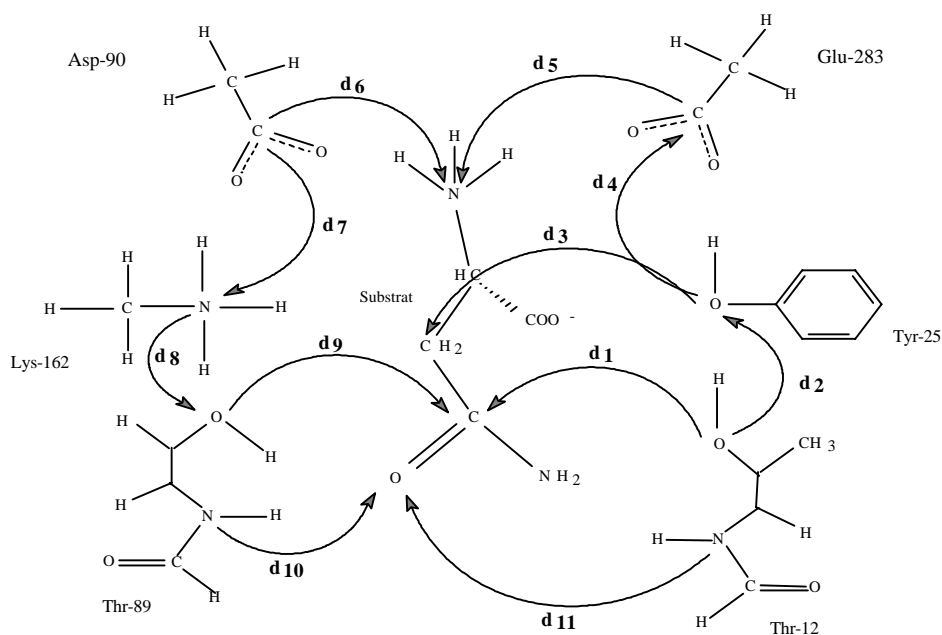


d_1 [Å]	-- ¹	d_2 [Å]				
		3.0	2.5	2.0	1.5	1.0
3.90	-961.0	--	--	--	--	--
3.0	-960.1	-956.4	-955.5	-948.8	-940.5	-897.1
2.5	-953.3	-953.2	-952.5	-944.6	-940.5	-900.9
2.0	-946.2	-945.4	-944.9	-941.0	<u>-933.9</u>	-901.3
1.5	-929.6	-929.4	-929.2	-929.0	-918.6	-948.1

Tab. 4.11: Deacylierung ohne vorherige Aktivierung des angreifenden Wassermoleküls. Letztgenanntes entspricht dem H₂O aus Tab. 4.9. Der Weg niedrigster Energie ist grau unterlegt, die Struktur höchster Energie auf diesem Weg zudem unterstrichen dargestellt. ¹ Abstand nicht fixiert.

Der Tabelle 4.11 ist zu entnehmen, daß die Annäherung der Reaktionspartner simultan verläuft, d. h., es erfolgt nicht zuerst eine vollständige Übergabe des Protons oder die Verringerung des C-O-Abstandes auf 1.5 Å. Bei der Struktur mit der höchsten Energie entlang des Reaktionsweges beträgt der C-O-Abstand 2.0 und der O-H-Abstand 1.5 Å. Die Energie, die zur Überwindung dieses Zustandes aufgebracht werden muß, beträgt 27.1 kcal/mol.

Tabelle 4.12 gibt einige Atomabstände in Å im aktiven Zentrum der wichtigsten ermittelten Strukturen an und vergleicht sie mit denen aus den Kristallstrukturen. Wie schon erwähnt, sind die Unterschiede zwischen der Kristallstruktur mit gebundenem Aspartat, der mittels des Amber-Kraftfeldes optimierten Struktur und der Ausgangsstruktur der PM3-Rechnungen recht gering. Die größte Differenz beträgt 0.51 Å.



	a	b	c	d	e	f	g	h	i
	Kristallstruktur	Amber-Struktur	PM3-Ausgangsstr.	ÜZ - 1	Acyl-Enzym	T89V-Kristallstr	TET - 2	Endstruktur o. NH ₃	Endstruktur m. NH ₃
d ₁	2.92	2.89	2.70	1.8	1.35	1.41	1.43	2.92	2.92
d ₂	2.97	2.96	2.76	4.06	4.68	2.84	3.83	2.79	2.75
d ₃	3.82	3.53	4.33	5.11	4.05	3.30	5.08	5.31	4.11
d ₄	3.60	3.30	3.49	3.44	3.52	3.74	3.48	3.64	3.63
d ₅	3.11	3.32	3.36	3.30	3.31	3.47	3.28	3.46	3.50
d ₆	3.60	3.46	3.69	3.72	3.64	3.10	3.57	3.67	3.86
d ₇	3.79	3.75	3.71	3.68	3.75	5.80	3.71	3.73	3.61
d ₈	2.58	2.68	2.82	2.78	2.77	4.65 ¹	2.73	2.76	2.81
d ₉	3.40	2.92	3.49	3.55	3.82	3.88 ¹	3.47	3.22	3.34
d ₁₀	2.56	2.79	2.84	3.81	3.62	3.07	3.30	3.32	2.77
d ₁₁	3.19	2.99	2.83	4.23	3.54	2.74	3.71	3.67	3.99

Tab. 4.12: Abstände in Å einiger Atome im aktiven Zentrum. a: Kristallstruktur gemäß Swain *et.al.* (1992) mit gebundenem Aspartat; b: Struktur die nach der Geometrie-Optimierung mittels Amber-Kraftfeld (Asparagin im aktiven Zentrum) erhalten wurde; c: Ausgangsstruktur der PM3-Rechnungen (vgl. Abb. 4.24); d: Übergangszustand der Acylierung, das Proton wird dabei direkt auf die Abgangsgruppe übertragen (vgl. Abb. 4.25); e: Endstruktur der Acylierung (vgl. Abb. 4.26); f: Kristallstruktur der T89V-Mutante (vgl. Abb. 4.17) mit kovalent gebundenem Acyl-Enzym; g: Tetraedrische Struktur nach Angriff des OH⁻Ions (vgl. Abb. 4.27); h: Endstruktur der Rechnungen nach Protonierung des tetraedrischen Übergangszustandes durch NH₄⁺ (NH₃ im aktiven Zentrum enthalten); i: wie h, jedoch NH₃ aus aktivem Zentrum entfernt ¹ T89V: hier nimmt das C-Atom des Valins die Position des Thr-O-Atoms ein.

Entlang des Reaktionsweges zeigt sich ein etwas anderes Bild. Nahezu unverändert bleiben die Abstände d₇ und d₈. Dies ist nicht verwunderlich, da bei den betreffenden Resten einige Atome

eingefroren wurden. Auffallend ist hingegen die Vergrößerung der Abstände d_2 und d_3 , die die Reste Thr-12 und Y-25 betreffen. Die zunehmende Entfernung des Threonins vom Tyrosin (d_2) während der Reaktion - insbesondere beim Acyl-Enzym - erscheint plausibel, da Thr-12 das angreifende Nukleophil ist und das Tyr-25 nicht in entsprechender Weise dem Threonin nachfolgen muß. Bemerkenswert ist jedoch, daß der entsprechende Abstand in der T89V-Kristallstruktur nahezu unverändert bleibt. Auch die Spanne zwischen dem Tyrosin und dem β -C-Atom des Substrats (d_3) vergrößert sich markant bei den beiden Übergangszuständen (d und g in Tab. 4.12) des simulierten Reaktionsweges und bei der Endstruktur mit NH_3 . Wird das Ammoniak entfernt 'normalisiert' sich das System jedoch in dieser Hinsicht. Dieser Effekt wird durch die Wasserstoffbrücken der sich entfernenden Abgangsgruppe NH_3 und des bei der Deacylierung entstehenden Ammoniumions mit dem Sauerstoffatom des Tyrosins verursacht. Auf den Wegfall der beiden Wasserstoffbrücken der Hauptketten-NH-Gruppen mit dem O-Atom des Substrats (d_{10} und d_{11}) wurde schon bei den einzelnen Reaktionsschritten eingegangen. Auch in diesem Fall ist beachtenswert, daß sie hingegen beim Acyl-Enzym der T89V-Mutante vorhanden sind.

Diese Beobachtung könnte eventuell auf einen prinzipiellen Mangel solcher Molekül-Orbitalrechnungen zurückzuführen sein. Bei ihnen finden naturgemäß Konformationsänderungen aufgrund von dynamischen Prozessen keine Berücksichtigung, sofern sie nicht durch manuelle Veränderung von Atomabständen simuliert werden. Auch auf diesen Aspekt wird in der Diskussion noch einzugehen sein.

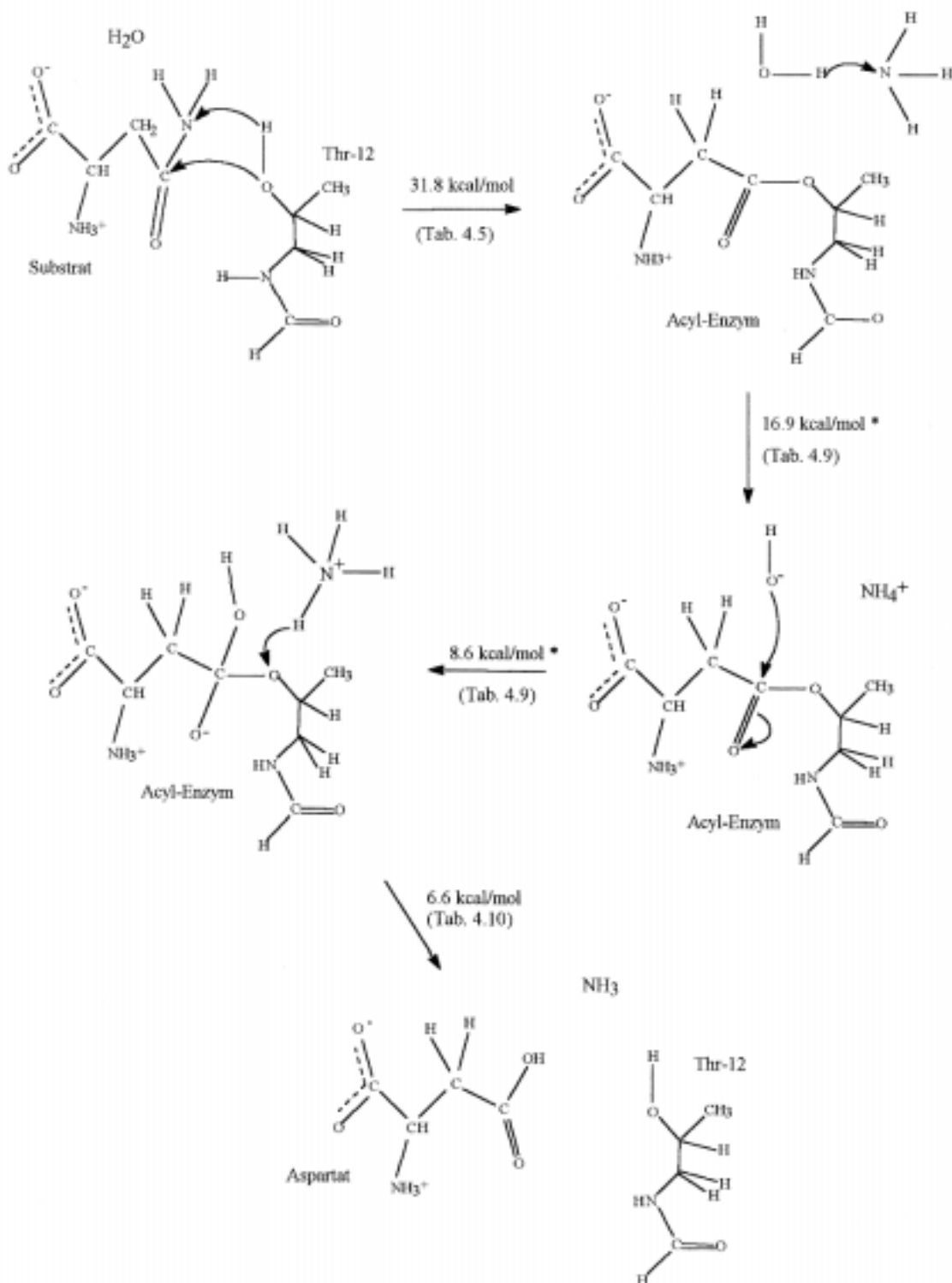


Abb. 4.28: Gesamter simulierter Reaktionsweg (ohne Variationen). Mit angegeben sind die Energien, die für die einzelnen Schritte aufgebracht werden müssen. Der Übersicht halber sind nur die direkt an den Reaktionen beteiligten Moleküle angegeben. * Werte aus Tabelle 4.9 wenn das Proton auf das NH₃ bei einem H₂O-Abstand von 4.0 Å übergeben wird.

5. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus der L-Asparaginase II aus *E. coli* beitragen. Dabei kamen sowohl umfangreiche kinetische Messungen an verschiedenen Mutanten der EcA2 zum Einsatz, als auch theoretische Berechnungen möglicher Reaktionswege. Die Resultate der eingesetzten Methoden werden im folgenden zunächst im einzelnen diskutiert und mit denen anderer Arbeiten über die EcA2 und mechanistisch verwandter Enzyme in Beziehung gesetzt. Wie schon in der Einleitung angedeutet, sind die Vorgänge während der enzymatischen Reaktion komplexer, als es die rein formale Betrachtung „auf dem Papier“ vermuten läßt. Jedes Ergebnis für sich liefert zum Verständnis der Enzymwirkung zumeist nur Indizien. Im letzten Teil der Diskussion werden die Resultate zusammenfassend behandelt und die daraus ermittelbaren Schlüsse über den Reaktionsmechanismus diskutiert.

5.1 Expression und Reinigung der EcA2-Mutanten

Die in dieser Arbeit erzeugten Mutanten konnten alle nach dem Standard-Protokoll (Harms *et al.*, 1991) exprimiert und gereinigt werden, welches schon seit längerer Zeit in der Arbeitsgruppe Anwendung findet. Auf eine ausführlichere Dokumentation der Reinigung wurde daher verzichtet. Nach der Chromatofokussierung (s. 4.1.3) besaßen alle Enzymproben einen Reinheitsgrad von mindestens 95%. Bei Enzymen mit sehr geringer Aktivität wurde generell eine Rechromatofokussierung durchgeführt. Zudem verglich man Messungen aus mehreren (mindestens zwei) Exprimierungen und Reinigungen auf Übereinstimmung der erhaltenen kinetischen Daten. Aus diesen Gründen erscheint es legitim, Verfälschungen der in dieser Arbeit dargelegten kinetischen Messungen durch Verunreinigungen der Enzymproben auszuschließen.

5.2 Substratumsatz und Substrataffinität der erzeugten EcA2-Mutanten

Ein Teil dieser Arbeit widmete sich der kinetischen Charakterisierung von Mutanten der Reste Aspartat-90, Glutamat-283 und von Doppelmутanten, die die Reste Aspartat-90, Threonin-89 und Lysin-162 betrafen. Sauren Resten im aktiven Zentrum verschiedener hydrolytisch wirksamer Enzyme wurde die Funktion eines direkten Protonenakzeptors oder die des Stabilisators eines positiv-geladenen Basen-Intermediats zugeschrieben (vgl. Einleitung). Auch für die vorliegende Reaktion wurden ähnliche Vermutungen aufgestellt (s. auch Abb. 5.1):

- einer der beiden Reste Aspartat-90 oder Glutamat-283 könnte als Protonenakzeptor entlang der jeweiligen Triaden Thr-89/Lys-162/Asp-90 bzw. Thr-12/Tyr-25/Glu-283 dienen, um bei der Acylierung die Reaktivität des entsprechenden Threonins zu erhöhen.
- es wäre auch eine H-Übertragung über die im aktiven Zentrum befindlichen Wassermoleküle vom Threonin-Nukleophil auf einen der beiden sauren Reste möglich.
- bei der Deacylierung ist eine Aktivierung des angreifenden Wassermoleküls durch das Aspartat oder Glutamat denkbar.

Aufgrund der Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten kinetischen Messungen mit den Mutanten E283V und E283G kann eine derartige Funktion des Glutamats mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Sowohl die Umwandlung von Glu-283 in eine voluminöse, hydrophobe Gruppe, als auch die vollständige Deletion der Seitenkette verursacht einen nur geringen Aktivitätsverlust von (vgl. Tab. 4.1) und eine nur marginale Veränderung der pH-Abhängigkeit der kinetischen Parameter (vgl. Abb. 6 und 7). Als ebenso unstrittig kann aber die Beteiligung des Glutamat-283 an der Substratbindung angesehen werden, da die eingeführten Mutationen je nach eingesetztem Substrat (Asn o. AHA) zu einer 10- bis 100-fachen Erhöhung des K_m -Wertes führen.

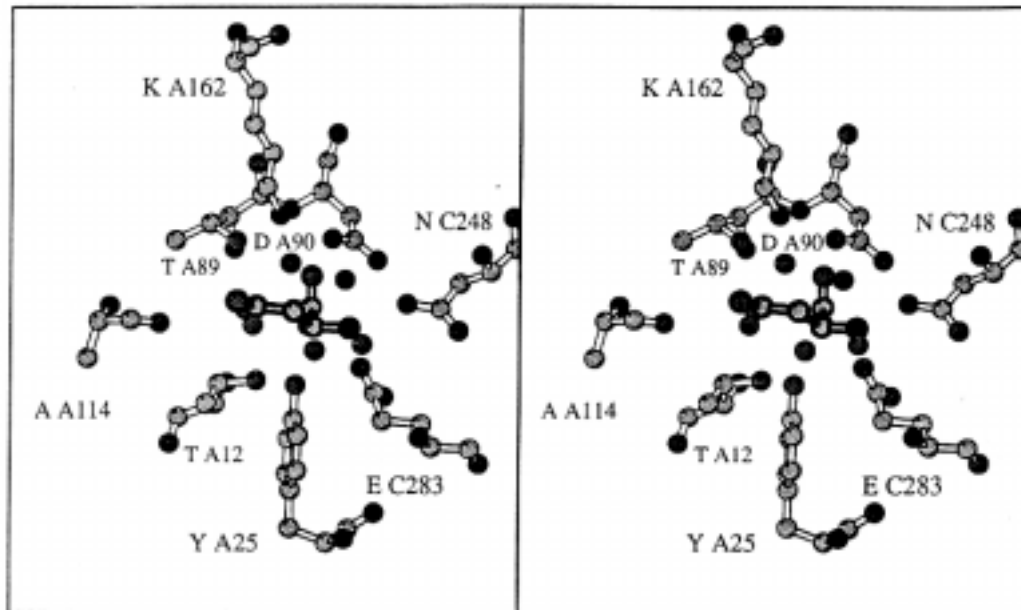


Abb. 5.1: Stereobild des aktiven Zentrums der Eca2 mit gebundenem Aspartat und fünf Wassermolekülen.

Im Falle der Aktivitäten der Aspartat-90-Mutanten zeigt sich eine Abstufung von der Umwandlung in ein Glycin (ca. 1% der Wildtyp-Aktivität), über Glutamin (0.1%), zum Valin (Aktivität nicht meßbar). Insbesondere das Ergebnis mit dem D90G-Enzym spricht auch hier gegen das Aspartat als Protonenakzeptor. Umfassende kinetische Untersuchungen der D90E-Mutante wurden in dieser Arbeitsgruppe schon früher durchgeführt (Aung, 1997). Der Austausch gegen ein Glutamat führte zu einer Umsatzgeschwindigkeit die ca. 10% des Wildtyp-Wertes beträgt und einem um etwa den Faktor 500 erhöhten K_m -Wert (vgl. Tab. 1.1). Die hohe Aktivität erscheint verständlich, da die funktionelle Gruppe erhalten bleibt und lediglich die Kohlenstoffkette um ein C-Atom verlängert wird. Die extrem verminderte Substrataffinität hingegen spricht für eine veränderte Orientierung der Carboxylatgruppe. Eine optimale Geometrie ist jedoch gerade bei Protonenübergängen von großer Bedeutung, so daß auch dieser Befund gegen eine Funktion des Aspartats als Protonenakzeptor im besonderen in der vermeintlichen „Triade“ T89/K162/D90 spricht.

Die Interpretation der Aktivitäten der Aspartat-Mutanten wird durch die direkte Nachbarschaft dieses Restes zum Lysin-162 erschwert. Diese Gruppe ist essentiell für die Katalyse (Aung, 1997). Je nach Art der Veränderung, die in der Nähe dieses Lysins vorgenommen wird, kann es zu sekundären Effekten kommen, d. h., eine verringerte Aktivität wird nicht durch den Austausch der Aspartat-Seitenkette an sich, sondern über die dadurch bedingte veränderte Orientierung des Lysins verursacht. Auch ein Einfluß auf die fünf im aktiven Zentrum befind-

lichen Wassermoleküle, die in allen bisher bekannten Asparaginase-Strukturen konserviert sind, kann zu einem Aktivitätsverlust führen. Ein solcher Effekt könnte die verminderte Aktivität der D90N- und besonders der D90V-Mutante - mit ihrem voluminösen und hydrophoben Rest - erklären. Im Falle der letzteren kann aber auch die durch die Mutation verursachte Instabilität des Enzyms eine Rolle spielen, auf welche im nächsten Kapitel einzugehen sein wird. Mutationen am Aspartat-90 führen durchweg zu höheren K_m -Werten als bei Veränderungen der E283-Seitenkette. Beide Gruppen wechselwirken mit der α -Amidgruppe des Substrats; das Aspartat bildet zudem eine Wasserstoffbrücke zum Asparagin-248, dem ebenfalls eine Rolle bei der Substratbindung zu kommt (Derst, 1995).

Die relativ hohe Aktivität der D90N/K162Y-Doppelmutante (ca. 2% der Wildtyp-Aktivität) spricht ebenfalls stark gegen einen Reaktionsmechanismus unter Beteiligung einer Protonenverschiebung entlang der Triade, zum anderen wirft sie aber auch neue Fragen auf. So führte jede bisher vorgenommene Mutation am Lysin-Rest allein - dies gilt auch für die Mutante K162Y - zu einem starkem Aktivitätsverlust (vgl. Tab. 1.1; Aung, 1997). Zum anderen waren alle anderen erzeugten Doppelmutanten (D90A-, D90E- und T89A/K162Y) fast völlig inaktiv. Beim letzten Punkt könnte aber wiederum die Stabilität - oder besser Instabilität - dieser Enzyme (s. 4.1.4.3) eine entscheidende Rolle spielen, auf die ebenfalls im folgenden Kapitel eingegangen wird.

Die ermittelten pH-Abhängigkeiten erbrachten deutliche Abweichungen vom Wildtyp-Verhalten. Die Interpretation der Kurven erfolgte mittels des in Abb. 5.2 gezeigten Modells (Segel, 1975). In dem von dem Modell beschriebenen System existieren drei ionische Formen des Enzyms:

eine Grundform mit n abstrahierbaren Protonen, eine Form mit einem zusätzlichen Proton

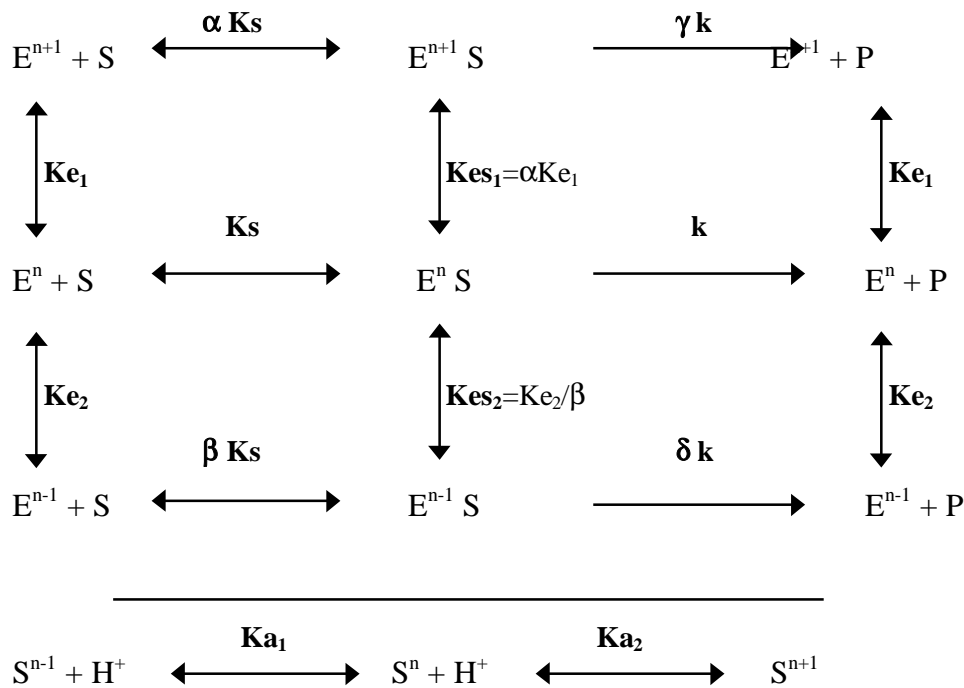


Abb. 5.2: Modell zur Simulation der pH-Abhängigkeiten nach Segel

(E^{n+1}) und eine dritte, mit einem Proton weniger (E^{n-1}). Alle drei Zustände des Enzyms können Substrat binden, werden als katalytisch aktiv angesehen und könnten somit zum Produkt führen. Die Faktoren α bzw. β geben die Änderung von K_m an, die bei einer Protonierung bzw. Deprotonierung des Enzyms auftritt, wohingegen γ und δ die entsprechenden Effekte auf die Katalyse wiedergeben. Für die meisten Enzyme sind die vertikalen Reaktionen, die die Addition oder Dissoziation des Protons darstellen, sehr schnell im Vergleich zum katalytischen Schritt und werden daher als im Gleichgewicht befindlich angenommen.

Die Bindung bzw. Dissoziation des Substrats kann im Vergleich zum katalytischen Schritt schneller oder langsamer sein. Als weitere Parameter gehen K_{a_1} und K_{a_2} , die Gleichgewichtskonstanten der Deprotonierung und Protonierung des Substrats in die Betrachtung mit ein.

Das System ist für eine automatische Anpassung an die Meßwerte zu komplex. Die Ermittlung der Parameter erfolgte daher durch manuelle, schrittweise Modifizierung ihrer Werte bis alle drei Kurven die bestmögliche Übereinstimmung mit den Meßpunkten aufwiesen. Die so erhaltenen Kurven sind in den jeweiligen Abbildungen 4.3 - 4.7 mit dargestellt.

Die Parameter, die sich durch die manuelle Anpassung der Kurven an die experimentellen Daten erhalten wurden, sind in Tabelle 5.1 zusammengefaßt. Zu beachten ist, daß sich die angegebenen kinetischen Parameter k_{cat} und K_m auf die E^n -Enzymform beziehen. Alle Variablen

gingen in die Auswertung mit ein, um die pH-Abhängigkeit sämtlicher Enzyme modellieren zu können.

Das WT-Enzym und die beiden Glutamat-Mutanten zeigen einen pK_{e1} -Wert von 6.7, das heißt in Abwesenheit des Substrats AHA besitzen alle diese Enzyme eine funktionelle Gruppe mit einem pK_a von 6.7, der von Aung (1997) dem Asp-90 zugeordnet wurde. Die pK_{es1} -Werte variieren hingegen etwas.

Bei den Aspartat-90-Mutanten und der Doppelmutante verschiebt sich der pK_{e1} -Wert um etwa 0.8 pH-Einheiten in den sauren Bereich; die entsprechende Veränderung von pK_{es1} fällt dagegen geringer aus. Dies bestätigt die schon erwähnte Vermutung, daß das Aspartat-90 allein, oder eine Gruppe aus mehreren Resten unter Beteiligung des Aspartats die Funktion, mit dem beim WT beobachteten pK_a von 6.7 ist. Der in Asp-90-Mutanten neu auftretende pK_{e1} -Wert um 5.9 könnte dann dem Glutamat-283 zuzuschreiben sein. α variiert bei allen Enzymen, jedoch nicht in sehr großem Maße. Im Falle des Wildtyps ist $\alpha = 2$, folgerichtig erhöht sich der K_m -Wert leicht ($1/K_m$ nimmt ab) bei einer Verringerung des pH von 7.5 auf 5.0. Analoges gilt für die Glutamat-Mutanten, bei denen die Abnahme der Substrataffinität noch ein wenig stärker ausfällt ($\alpha = 2.8$ bzw. 2.5). Den gegenteiligen Effekt zeigen die D90N/K162Y-, D90N- und D90G-Enzyme, deren nahezu unveränderte bzw. verbesserte Substrataffinität im sauren pH-Bereich durch α -Werte von 0.8, 0.56 und 0.3 widergespiegelt wird.

Die Protonierung der α -Carboxylat-Gruppe des Substrats sollte für die gemessenen pH-Profile keine Rolle spielen ($pK_{a1} = 2.5$). Die Abnahme der Substrataffinität im alkalischen Milieu bei allen Enzymen konnte demgegenüber durch einen pK_{a2} -Wert von 8.6 simuliert werden. Dies steht in Einklang mit früheren Untersuchungen (Herrmann *et al.*, 1974), nach denen eine positiv geladene α -Aminogruppe des Substrats mit diesem pK_a essentiell für die Substratbindung ist.

Enzym	pKe ₁	pKes ₁	pKa ₁ / pKa ₂	pKe ₂	pKes ₂	α	β	γ	δ	k (s ⁻¹)	K _m (μM)
WT	6.7	6.4	2.5 / 8.6	12	12	2	1	0.9	0	65	65
D90G	5.95	6.2	2.5 / 8.6	8.7	7.75	0.56	8.9	0.5	1	0.3	7700
D90N	5.95	6.5	2.5 / 8.6	9.8	8.7	0.3	12.6	0.3	1	0.013	3500
D90N/K162Y	5.9	6.0	2.5 / 8.6	9.0	7.65	0.8	22.4	0.5	1	0.6	8500
E283G	6.7	6.2	2.5 / 8.6	12	12	2.8	1	0.25	0	9.0	450
E283V	6.7	6.3	2.5 / 8.6	12	12	2.5	1	0.3	0	18	650

Tabelle 5.1: Parameter des Modells 5.1, die über die Anpassung der Kurven an die experimentellen Daten erhalten wurden. Bei allen Messungen wurde AHA als Substrat verwendet.

pKe₂ und pKes₂ gehen beim WT- und den Glutamat-Enzymen nicht in die Betrachtung mit ein; in ihrem Fall bindet die jeweilige deprotonierte Enzymform kein Substrat (pKe₂ und pKes₂ = 12) und bildet auch kein Produkt (δ = 0). Dementsprechend beträgt ihr β-Wert 1. Für die Aspartat-Mutanten hingegen ließ sich das Modell nur unter Berücksichtigung von pKe₂ und pKes₂ den experimentellen Daten anpassen. Bei diesen Enzymen ist die deprotonierte Form Eⁿ⁻¹ gleich aktiv wie Eⁿ (δ = 1). Schon im Ergebnisteil wurde bei den Aspartat- und der D90N/K162Y-Mutante die Zunahme von k_{cat} mit Erhöhung des pH-Wertes erwähnt. Je nach Mutante nimmt die Umsatzgeschwindigkeit bei einer Erhöhung des pH-Wertes von 5.0 auf 9.0 um das 2-4-fache zu. Eine solche k_{cat}-Zunahme in etwa gleicher Größenordnung konnte schon bei den Lysin-162-Mutanten festgestellt werden (Aung, 1997). Dieser Effekt könnte auf eine OH-Katalyse zurückzuführen sein, die hier durch δ = 1 simuliert wird. Das Hydroxydion kann dabei entweder bei der Acylierung direkt das Amid angreifen, indirekt die Nukleophilie des Threonins über eine Abstraktion des Protons erhöhen oder bei der Deacylierung den Ester des Acyl-Enzyms angreifen. Eine ähnliche Situation wurde im Falle von Subtilisin-Mutanten beschrieben, welchen das zentrale Histidin der katalytischen Triade fehlte (Carter & Wells, 1988). Bei einem solchen Effekt stößt das angewendete Modell aber an seine Grenzen und müßte eventuell erweitert werden.

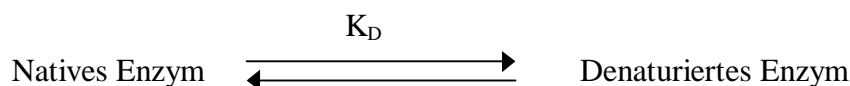
Die Erhöhung der Substrataffinität, die sich oberhalb von pH 7.5 zeigt, führt im Falle der D90G- und der Doppelmutante zu einer deutlichen Verringerung der pKe₂-Werte (8.7 bzw. 9.0). Diese Abnahme des K_m scheint im stärker alkalischen Milieu durch die zunehmende Deprotonierung der α-Aminogruppe kompensiert zu werden, denn oberhalb von ca. pH 8.6

nimmt K_m wieder zu. Das D90N-Enzym zeigt keine entsprechende Zunahme, jedoch eine zunächst konstant bleibende Substrataffinität, die ebenfalls oberhalb von pH 8.6 wieder abnimmt. In ihrem Fall fällt die Abnahme des pK_{e2} -Wertes geringer aus (9.8). Bei allen drei Enzymen ist der pK_{es2} -Wert um etwa eine Einheit geringer als der von pK_{e2} . Der demgemäß erhöhte β -Wert spiegelt die stärkere Affinität der deprotonierten Enzyme für das Substrat AHA wieder.

Für das WT-Enzym ist $\gamma = 0.9$, das bedeutet, die protonierte Form dieses Enzyms E^{n+1} hat nahezu die gleiche Aktivität wie E^n . Wird - wie oben argumentiert - dem Aspartat-90 der pK_{e1} -Wert von 6.7 zugeordnet, so müßte, wenn diesem Rest im Laufe der Katalyse eine Funktion als Protonenakzeptor zukäme, ein protoniertes Aspartat zu einem wesentlich stärkeren Aktivitätsverlust führen. Bei allen anderen hier untersuchten Mutanten ist γ kleiner, somit führt die Protonierung des Enzyms zu einem Aktivitätsverlust. Dieser Effekt ist aber recht gering.

5.3 Stabilitätsuntersuchungen

Bei den in Kapitel 4.1.4.3 dargestellten Untersuchungen zur chemischen Denaturierung wurde die Konformationsänderung bei steigendem Denaturantenanteil über die Fluoreszenzänderung des Tryptophans-66 verfolgt. Alle in dieser Arbeit erhaltenen Denaturierungskurven zeigten einen dem Ein-Phasen-Modell entsprechenden Verlauf.



Die Denaturierung verläuft somit ohne die Entstehung eines Zwischenproduktes. Den Daten der Tab. 4.3 ist zu entnehmen, daß die Glutamat-Mutanten und das D90G-Enzym nur geringe Unterschiede zum Wildtyp-Enzym zeigen. Das D90N-Enzym weist einen geringen Stabilitätsverlust auf, sämtliche Doppelmutanten sind extrem instabil (D90N-, D90E- u. T89A/K162Y) oder schon in Abwesenheit von Gu·HCl denaturiert (D90A/K162Y). Letzteres gilt auch für das D90V-Enzym. Ein deutlicher Verlust an Stabilität wurde schon bei Einführung der Mutationen K162C und K162Y beobachtet, höhere $\Delta G_{(H_2O)}$ -Werte als für das Wildtyp-Enzym wurden hingegen für die Mutanten D90E, T89A, K162H und T89V erhalten (Aung, 1997).

Denaturierungsprozesse können die Dissoziation des tetrameren Enzyms (Shifrin *et al.*, 1971) und die Entfaltung der Monomere oder einzelner Faltungsdomänen des Proteins sein. Abbil-

Abbildung 5.3 zeigt einen Vergleich der Halbdenaturierungstemperatur T_m mit $\Delta G(H_2O)$ für einige EcA2-Formen. Man kann erkennen, daß eine gute Korrelation zwischen diesen beiden Meßwerten besteht. Dies weist darauf hin, daß beide Methoden in etwa den gleichen Prozeß - die Dissoziation des tetrameren Enzyms und die Entfaltung der resultierenden Monomere - detektieren. Eine schon bei anderen Enzymen postulierte Konformationsänderung über Bindungsstellen des Denaturanten (Schellmann, 1987; Bowler *et al.*, 1994) erscheint hingegen aufgrund der Korrelation von T_m und $\Delta G(H_2O)$ als unwahrscheinlich.

Ein grundlegendes Problem der Denaturierung mittels eines Temperaturgradienten ist die Gleichgewichtseinstellung zwischen dem nativen und dem denaturierten Enzym. Im Gegensatz zur chemischen Denaturierung, bei der 3 h bis zum Erreichen dieser Gleichgewichtseinstellung inkubiert wird, erfolgte die thermische Denaturierung durch eine konstante Temperaturänderung von 1 °C/min. Denaturierungen bei konstanten Temperaturen erbrachten jedoch, daß bei längeren Inkubationen unterhalb von T_m bereits eine vollständige Inaktivierung des Enzyms eintreten kann (Derst, 1995).

Auffallend ist das Ergebnis der Doppelmutante D90N/K162Y, welches zeigt, daß ein extrem niedriger $\Delta G(H_2O)$ -Wert (6.3 kJ/mol) nicht automatisch ein sehr inaktives Enzym zu Folge hat. Bei ihr wurde zudem eine sehr niedrige T_m bei pH 5.0 ermittelt (42.5 °C), die die starke Aktivitätsabnahme dieses Enzyms im sauren Bereich erklären könnte (von pH 7.0 auf 5.0 nimmt die Aktivität um ca. das 20-fache ab). Andererseits sind die Enzyme D90E/K162Y und T89A/K162Y trotz vergleichbarem $\Delta G(H_2O)$ (ca. 7 kJ/mol) fast völlig inaktiv. Ein Aktivitätsverlust kann aber auf eine lokale Strukturänderung des Enzyms zurückzuführen sein, ohne daß sich dies in jedem Fall an einer entsprechenden globalen Konformationsänderung des Proteins feststellen ließe. Aus den geschilderten Gründen kann somit nicht ausgeschlossen werden, daß die Inaktivität dieser Doppelmutanten auf Instabilität und nicht auf eine entsprechend starke Störung des Reaktionsmechanismus zurückzuführen ist. Dies gilt noch verstärkt für die D90A/K162Y- und die D90V-Mutante bei denen eine Konformationsänderung schon in Abwesenheit von Gu·HCl festgestellt wurde.

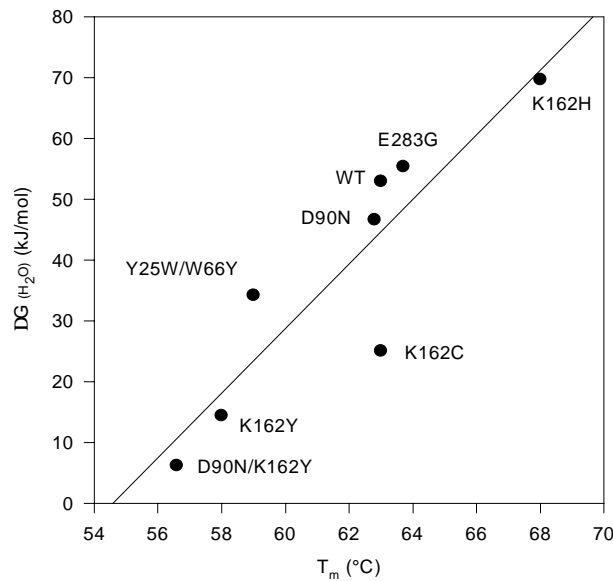


Abb. 5.3: Korrelation zwischen T_m und $\Delta G_{(H_2O)}$ für verschiedene EcA2-Mutanten. K162Y, K162C, K162H, Y25W/W66Y: Werte aus Aung, 1997.

Veränderungen an der T89/K162/D90-Triade führen somit wie bei den Aktivitätsmessungen zu keinem einheitlichen Bild. Mit Ausnahme des Austausches von Asp-90 gegen Valin zeigt aber keine der Einzelmutationen am Threonin oder Aspartat einen so starken Stabilitätsverlust wie er bei Veränderungen am Lysin auftritt. Die Triade spielt somit bei der Stabilisierung der Enzymkonformation eine Rolle, der entscheidende Rest scheint dabei das Lysin-162 zu sein (vgl. Abb. 5.3; Tab. 4.2; Aung, 1997). Diese Vermutung wird unterstützt durch die Ergebnisse der K162H-Mutante, deren höhere Stabilität durch die vom Histidin in beide Richtung ausgehenden Wasserstoffbrücken zum Aspartat-90 und Threonin-89 erklärt wurde. Das Histidin scheint dabei über einen pH-Bereich von 5.0 bis 8.0 positiv geladen zu sein (Aung, 1997). Die extreme Instabilität des D90V-Enzyms kann durch den schon im vorigen Kapitel angesprochenen Sekundäreffekt auf Lysin-162 verursacht werden.

5.4 Proton inventories

Die Proton inventory-Technik wurde und wird bei vielen Enzymen angewendet, bei denen Protonenübergänge am Reaktionsmechanismus beteiligt sind. Im Gegensatz zu Substrat-Isotopen-Effekten, die in der Regel die Auswirkung eines Isotopenaustausches an einer oder einigen wenigen Positionen des Substrats auf die Kinetik messen, sind Lösungsmittel-Isotopen-

Effekte globaler, da ein solcher Austausch an hunderten von Positionen stattfinden kann. Entsprechend kann man die am Übergangszustand beteiligten Protonen allein aus der Messung von Lösungsmittel-Isotopen-Effekten heraus nur schwer identifizieren. Die Methode kann aber in Kombination mit anderen Techniken - wie der gerichteten Mutagenese - wichtige Informationen zum Mechanismus einer Reaktion liefern.

In dieser Arbeit wurden Proton inventory-Messungen von verschiedenen Mutanten der wichtigsten im reaktiven Zentrum befindlichen Reste durchgeführt. Dies stellt aufgrund der stark unterschiedlichen Aktivitäten der Mutanten hohe Anforderungen an die Meßmethode. Der angewendete gekoppelte Test in Mikrotiterplatten (s. 3.2.4.4) bietet sehr gute Voraussetzungen. Der Luftabschluß mit Hilfe der UV-durchlässigen Folie gewährt ein konstantes H/D-Verhältnis auch über längere Meßzeiten hinweg. Ob zwischen Ein-, Zwei-, oder mehreren am Übergangszustand beteiligten Protonenübergängen aus dem Kurvenverlauf heraus unterschieden werden kann, hängt naturgemäß von der Genauigkeit der Messung ab. Je geringer der Gesamtisotopeneffekt, je höher muß die Präzision der Werte sein (Quinn & Sutton, 1991). Schowen (1978) ermittelte maximal erlaubte Abweichungen, die es gestatten, zwischen den linearen und polynomen Fällen zu unterscheiden. Bei einem Gesamtisotopeneffekt von 1.5 beträgt demnach die erlaubte Abweichung $\pm 1\%$ um zwischen ein und zwei am Übergangszustand beteiligten Protonen zu unterscheiden. Bei einem Gesamteffekt von 2.0 und 4.0 sollte ein Bereich von $\pm 2.8\%$ bzw. $\pm 9.9\%$ eingehalten werden. Bei den in dieser Arbeit gezeigten Messungen betrug die höchste Abweichung vom Mittelwert bei einem definierten n im Falle der T89V-Messung $\pm 10\%$ (bei $n = 0.798$, vgl. Abb. 4.12). Für die gesamte Messung lag diese Abweichung bei $\pm 5\%$, bei allen anderen Meßreihen jedoch unter 3% . Insgesamt war die Genauigkeit der Messungen - mit Ausnahme der T12V-Mutante - gut genug um selbst bei den sehr inaktiven Mutanten zuverlässige Daten zu erhalten, die es zusammen mit der Auswertung nach Albery (1975) gestatteten, zwischen einer Ein-, Zwei- oder Multiprotonenkatalyse zu unterscheiden. Dabei war von Vorteil, daß es die Durchführung der Reaktionen in Mikrotiterplatten erlaubte, Mehrfachbestimmungen der Umsatzgeschwindigkeiten bei mindestens neun verschiedenen Deuteriumanteilen durchzuführen und diese alle gleichzeitig zu starten. So konnte eine mögliche Veränderung der Enzymprobe oder der Deuteriumanteile der Reagentien verhindert werden, wie sie bei einzeln durchgeführten Messungen über einen längeren Zeitraum hätten auftreten können.

Der gemessene Lösungsmittel-Isotopeneffekt ist ein gewichteter Durchschnitt der Isotopeneffekte auf k_{cat} und $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$. Die Gewichtung ist abhängig vom Grad der Substratsättigung.

Soweit es der K_m -Wert der Enzyme zuließ, wurden die Messungen bei einer Substratkonzentration von $\geq 50 \cdot K_m$ durchgeführt, was einer Substratsättigung von mindestens 98% entspricht und einen möglichen Einfluß von k_{cat}/K_m auf den Isotopeneffekt gering hält. Zudem konnte bei keiner der ermittelten $^D K_m$ -Werte ein signifikanter Einfluß des D_2O auf K_m festgestellt werden (vgl. Tab. 4.3). Dies ist insbesondere bei den Glutamat-283 und Aspartat-90-Mutanten von Bedeutung, bei denen aufgrund ihres hohen K_m -Wertes keine entsprechende Sättigung hergestellt werden konnte.

Bei der Herleitung der für die Auswertung der Messungen eingesetzten Gleichungen wird eine wichtige Vereinfachung eingeführt: die Fraktionierungsfaktoren der Verbindungen im Ausgangsstadium (Reaktanden) liegen nahe eins und haben somit keinen Einfluß auf die Isotopeneffekte (siehe 3.2.4.3). Für die Seitenketten der Reste im aktiven Zentrum der EcA2 ist diese Annahme korrekt; die Φ^R -Werte ihrer funktionellen Gruppen ($R-NL_3^+$, RCOOL, R-OL und Ar-OL) sind bekannt und zeigen alle nur geringe Abweichungen vom Wert 1 (Quinn & Sutton, 1991; Schowen & Schowen, 1982).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse der Proton inventory-Messungen verschiedener EcA2-Enzyme erbrachten eine Vielzahl von Effekten.

Die Ergebnisse mit dem WT-Enzym, der T12S- und T89S-Mutante, sowie der E283V-, E283G-, D90G- und D90E-Mutante bei pH 5.0 zeigen einen Kurvenverlauf, der sich am besten durch die exponentielle Gleichung wiedergeben läßt. Auch bei der Auswertung nach Albery (1975) ergibt sich die größte Übereinstimmung mit dem für diesen Fall theoretisch vorhergesagten Wert. Ein solcher Verlauf spricht für die Beteiligung einer Reorganisation von Lösungsmittel- oder Proteinstruktur-Protonen während des katalytischen Schrittes. Dabei handelt es sich um eine größere Anzahl an Protonen, deren Fraktionierungsfaktor-Werte im Übergangszustand weniger stark von eins abweichen, als es z. B. bei komplett transferierten Protonen der Fall ist, deren Umgebung sich während des katalytischen Schrittes stärker ändert. Natürlich ist aber auch eine zusätzliche Beteiligung solcher 'konventionellen' Protonenbewegungen am Erreichen des Übergangszustandes möglich.

Quinn *et al.* (1980) führten schon vor längerer Zeit Proton inventory-Messungen an verschiedenen Amidohydrolasen durch, darunter auch EcA2 aus *E.coli*. Ihre mit einer anderen Nachweismethode nur vom WT-Enzym bei pH 7.12 durchgeführte Messung zeigt gute Übereinstimmung mit dem hier bei pH 7.0 vorgenommenen Experiment. Der von Quinn *et al.* (1980) ermittelte Gesamteffekt liegt mit 2.93 ein wenig höher, und der V_m/V_D -Wert lag zwischen dem für eine Zwei- und dem einer Multiprotonenkatalyse mit Solvatations-Effekten vorhergesagten

Wert, mit Tendenz zum letzteren. Die Autoren schlossen dementsprechend ebenfalls auf eine Multiprotonen-Katalyse mit möglicherweise zwei oder mehr stark beteiligten Protonen (in Anlehnung an den damals postulierten Mechanismus der Serin-Proteasen) und mehreren anderen H-Atomen, die über Lösungsmittelmoleküle oder Strukturänderungen des Proteins am Übergangszustand beteiligt sind.

Welche Protonen-Transfers der 'konventionellen', auf Säure-Base-Reaktionen beruhenden Art könnten beim Wildtyp-Enzym und den anderen oben genannten Fällen am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (Acylierung) beteiligt sein?

a) Eine Protonen-Verschiebung entlang einer katalytischen Triade von zwei oder mehr Protonen. Ein solcher Mechanismus ist für die EcA2 aufgrund der schon mehrmals in dieser Arbeit angesprochenen Gründe (u. a. sind weder Asp-90 noch Glu-283 als Protonenakzeptor denkbar, siehe 5.2) auszuschließen und wird auch bei mechanistisch verwandten Enzymen angezweifelt (vgl. 1.3).

b) Eine Protonenübergabe vom Nukleophil auf eine Base oder direkt auf die Abgangsgruppe des Substrats wie es beim Molecular Modeling simuliert wurde (s. 4.3.2.1). Ein solcher Protonentransfer ist unbedingt nötig um die Nukleophilie des Threonins zu erhöhen und würde, wäre er Teil des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes, einen primären Isotopeneffekt zwischen 2 und 10 ($^Dk/^Hk$) erzeugen.

c) Eine Stabilisierung des tetraedrischen Übergangszustandes durch Wasserstoffbrücken. Hierfür kämen die Hauptketten-NH-Gruppen der beiden Threonine und die Hydroxylgruppe des Threonins-89 in Betracht (Palm *et al.*, 1996). Die Amplitude solcher Protonenbewegungen fällt nicht mit der Reaktionskoordinate zusammen, sie könnten jedoch sekundäre Isotopeneffekte von 1.5 bis 3.0 pro H-Brücke erzeugen (Quinn & Sutton, 1991). Die Mehrprotonenkatalyse durch Serin-Proteasen wurde in diesem Sinne durch starke H-Brücken bei der „Oxyanion hole“-Stabilisierung interpretiert (Scholten *et al.*, 1988). Chang *et al.* (1996) stellten jedoch eine Subtilisin-Mutante (N155G) her, bei der die stärkere von zweien solcher H-Brücken wegfällt. Dennoch konnte keine Veränderung der Proton inventories festgestellt werden, und die Autoren postulierten dann nur einen wirklichen Protonenübergang (bei der Aktivierung des Nukleophils Serin) und schrieben die Kurvenbeugung den schon erwähnten Multiprotonen-Effekten zu. Zudem ist das grundlegende Problem dieser Annahme, daß ein sekundärer Isotopeneffekt dieser Art nur bei relativ geringem pK_a -Unterschied zwischen Donor und Akzeptor auftreten kann, da nur dann eine extrem starke Wasserstoffbrücke - eine sogenannte „low-barrier hydrogen bond“ (LBHB) - entsteht, die einen deutlich

von 1 verschiedenen Fraktionierungsfaktor bewirkt (Cleland & Kreevoy, 1994; Cleland, 1992; Frey *et al.*, 1994). Der Unterschied zwischen dem pK_a einer Peptid-NH-Gruppe (~ 17) und dem Sauerstoff eines tetraedrischen Übergangszustandes ($pK_a < 10$ der konjugierten Säure) ist dafür zu groß. Dennoch kann eine solche H-Brücke unter den speziellen Umständen eines aktiven Zentrums - u.a. Wasserausschluß und die Möglichkeit konformativer Änderungen die eine pK_a -Angleichung verursachen könnten - nicht generell ausgeschlossen werden.

Die in b und c diskutierten Protonenverschiebungen können höchstwahrscheinlich nicht allein zu exponentiellen Proton inventories führen. Wie schon erwähnt, ist hierfür (zusätzlich) eine größere Anzahl an Protonen nötig, deren $\Phi^\#$ -Werte in geringerem Maße von eins abweichen. In einem so komplexen System wie einer enzymatischen Reaktion kann dies natürlich hunderte von Positionen betreffen. Prinzipiell gibt es folgende Möglichkeiten:

1) Es treten Konformationsänderungen des Proteins während des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes auf. Ein solcher Effekt kann sehr viele Protonen in den unterschiedlichsten Bereichen des Enzyms betreffen. Bekannt ist jedoch, daß das wahrscheinliche Nucleophil Threonin-12 Teil des beweglichen Loops ist, der sich nach der Substratbindung über dem katalytischen Zentrum schließt (vgl. 1.2.2, Abb. 1.2). Möglicherweise spielt eine Loop-Bewegung nicht nur eine Rolle beim Abschluß des aktiven Zentrums gegen das umliegende Lösungsmittel, sondern auch bei der Annäherung des Threonin-Sauerstoffatoms an die umzusetzende Amid-Funktion des Substrats im Verlauf der Acylierungsreaktion. Hierauf wird später noch eingegangen.

2) Reorganisationen von Protonen des Lösungsmittels. Dies kann Wassermoleküle betreffen, die an den unter a geschilderten Konformationsänderungen beteiligt sind und sich nicht direkt im katalytischen Zentrum befinden. Möglich ist aber z. B. auch eine Beteiligung der fünf Wassermoleküle, die alle wichtigen Reste im aktiven Zentrum miteinander verbinden (s.Abb. 4.22).

Bei den Messungen bei pH 5.0 des Wildtyp-Enzyms und der Glutamat- und Aspartat- Mutanten zeigte sich ein deutlich höherer Gesamtisotopeneffekt (ca. 3.9-4.5 je nach Enzym) als bei der Wildtyp-Messung bei pH 7.0 (ca. 2.8, vgl. Tab. 4.3). Ein solcher Effekt könnte durch Protonierungen von Gruppen entstehen die an den unter 1 und 2 geschilderten Prozessen beteiligt sind.

Die in Abb. 4.11 dargestellten Ergebnisse der Proton inventory-Messungen der T12S- und T89S-Mutante zeigen keine signifikante Änderung gegenüber dem Wildtyp-Enzym. Dies steht

Enzyme. Ihr k_{cat} -Wert ist etwa um den Faktor 10 - 100 geringer als der der anderen Mutanten dieser Reihe und somit scheint in ihrem Fall wiederum ein anderer geschwindigkeitsbestimmender Schritt vorzuliegen.

Bei den im folgenden behandelten Enzymen zeigten die Proton inventories einen linearen - oder im Falle der T12V-Mutante einen eventuell quadratischen - Verlauf (Abb. 4.12-4.14). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Fällen kann dann gemäß der Gleichung $V(n) = V_0 (1 - n + n \Phi^\ddagger)$ der Wert von Φ^\ddagger des einzigen beteiligten Protons bestimmt werden (reziproker Wert des Gesamtisotopeneffektes). Die Werte sind in Tabelle 5.2 angegeben. Die zu erwartenden Fraktionierungsfaktor-Werte bei Protonentransfers während einer enzymatischen Reaktion wurden schon vor längerer Zeit diskutiert. Der Φ^\ddagger -Wert einer Wasserstoffbrücke, die an der

Mutante	T89V	K162H	K162Y	T12V	Y25A	Y25W/W66Y
Φ^\ddagger	0.34 ± 0.008	0.30 ± 0.004	0.33 ± 0.002	0.42 ± 0.03	0.75 ± 0.01	0.53 ± 0.02

Tab. 5.2: Übergangszustands-Fraktionierungsfaktor-Werte für einige EcA2-Mutanten. Bei der T12V-Mutante ist nur der über einen linearen Fit erhaltene Wert angegeben.

Stabilisierung des Übergangszustandes beteiligt ist (sekundärer Isotopeneffekt) fällt in der Regel in einen Bereich von 0.3 - 0.6, Protonen deren Bewegung entlang der Reaktionskoordinate verläuft (primärer Isotopeneffekt) erzeugen Werte zwischen 0.1 und 0.5 (Vankatasubban & Schowen, 1984; Quinn & Sutton, 1991). Die große Überlappung zwischen diesen beiden Bereichen erlaubt in vielen Fällen keine Zuordnung zu einer der beiden Gruppen.

Dies gilt im vorliegenden Fall u. a. auch für das T89V-Enzym und die Lysin-Mutanten. Bei ihnen wurden aber sehr ähnliche Φ^\ddagger -Werte erhalten, was auf einen kongruenten katalytischen Schritt hinweist. Da bei der T89V-Mutante die Deacylierung geschwindigkeitsbestimmend ist (s. 4.2.2; 5.1), müßte dies folgerichtig auch für die Lysin-Mutanten gelten und in diesen Fällen wäre im obigen Schema k_4 der limitierende Schritt der Katalyse. Alle drei Enzyme sind extrem inaktiv, so daß eine wirkungsvolle Aktivierung des angreifenden Wassermoleküls unwahrscheinlich erscheint und die Hydrolyse durch ein intaktes H_2O -Molekül erfolgen könnte, wie es in Kapitel 4.3.2.2 simuliert wurde (Tab. 4.11). Am Übergangszustand wäre in diesem Fall ein kompletter Protonentransfer beteiligt, der einen primären Isotopeneffekt erzeugen würde. Die bei diesen Mutanten ermittelten Φ^\ddagger -Werte sprechen in der Tat eher für einen solchen Fall, da ihre Fraktionierungsfaktoren an der Grenze des Bereichs liegen, der für stabi-

lisierende Protonenbrücken angegeben wird. Eine solche Interpretation der Werte ist derzeit aber spekulativ.

Bei den Mutationen, die die Reste auf der anderen Seite des Substrats betreffen - T12V, Y25A und Y25W/W66Y - wurden wesentlich geringere Isotopeneffekte (und damit höhere Φ^\ddagger -Werte) erhalten. Für die Doppelmutante gibt es, wie schon erwähnt (s. 1.2.2), starke Hinweise darauf, daß das Schließen des Loops zumindest einen Teil des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes darstellt (Aung, 1997). Die mit Hilfe der Stopped-Flow-Technik ermittelten Werte der Geschwindigkeitskonstanten k_1 - k_6 erbrachten einen in etwa gleich großen Wert für k_2 (Loop-Schließen) und k_3 (Acylierung). Beide Tyrosin-Mutanten sind recht aktiv (ca. 0.1 bis 0.4% der Wildtyp-Aktivität) - was gegen eine starke Störung des chemischen Reaktionsschrittes spricht - und ihr K_m -Wert ist nicht erhöht, d. h., die Substratbindung kann ebenfalls nicht geschwindigkeitslimitierend sein. Die Tatsache, daß auch in ihrem Fall lineare Proton inventories erhalten wurden könnte dann darauf hinweisen, daß die Mehrprotonenkatalyse der Wildtyp-Reaktion durch Reorganisationen von Protonen verursacht wird, die Teil des Loops sind oder mit ihm in Kontakt stehen und solch eine Reorganisation bei diesen beiden Mutanten verhindert wird. Der detektierte alleinige Protonentransfer kann durch eine stabilisierende H-Brücke oder die Übertragung des Threonin-12-Protons direkt auf die Abgangsgruppe verursacht werden. Der zweite Fall müßte theoretisch einen höheren - da primären - Isotopeneffekt (niedrigere Φ^\ddagger -Werte) zu Folge haben als sie bei der Y25A- und Y25W/W66Y-Mutante gemessen wurden. Dieser kann aber mit Hilfe der „mechanischen“ Unterstützung durch die Loop-Bewegung bei der Annäherung des H-Atoms an das Amid-Stickstoffatom des Substrats verringert werden. Eine Beteiligung eines „induced fit“ am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wurde schon im Fall der Acetylcholinesterase (Rosenberry, 1975; Quinn & Swanson, 1984) postuliert. Dieser „induced fit“ ist dabei weder pH- noch Lösungsmittel-Isotopen-sensitiv. Auch bei der Ribonuclease ist eine Konformationsänderung am Übergangszustand beteiligt, und es ergab sich eine nichtlineare Proton inventory-Messung mit einem Gesamteffekt von 4.8, die zunächst mit drei beteiligten Protonen erklärt wurde (Wang *et al.*, 1975). Später konnte gezeigt werden, daß diese Messung auch mittels eines exponentiellen Fits interpretiert werden kann (Venkatasubban & Schowen, 1984).

Das Threonin-12 bildet eine Wasserstoffbrücke mit Tyrosin-25, und bei der T12V-Messung könnte aufgrund des voluminösen Valins, und da dieser Rest ebenfalls Teil des Loops ist in ähnlicher Weise wie bei den Tyrosin-Mutanten diskutiert werden. Threonin-12 ist aber zugleich das angreifende Nukleophil. Zudem ist die Mutante extrem inaktiv, was auf eine starke

Störung des chemischen Teils der Reaktion hindeutet und ihr Isotopeneffekt ist bedeutend höher (Tab. 4.3 u. 5.2). Eine Interpretation des Ergebnisses wird durch die Tatsache erschwert, daß aufgrund der Qualität der Messung nicht definitiv zwischen einer linearen und quadra-tischen Deuterium-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit unterschieden werden kann. Geht man nur von einem beteiligten Proton aus, so könnte eine Hydrolyse ohne Nukleophil-Aktivierung vorliegen; wie schon bei der T89V- und den Lysin-Mutanten beschrieben. Der im Vergleich zu diesen geringere Gesamteffekt wäre dann vermutlich darauf zurückzuführen, daß das Substrat und nicht das Acyl-Enzym umgesetzt wird. Weitere Untersuchungen mit der T12A-Mutante könnten aber zu besser interpretierbaren Ergebnissen führen, da ihre etwas höhere Aktivität die Messungen erleichtert.

5.5 Untersuchungen zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Mutanten

Wie schon in Kapitel 4.2 geschildert, wäre es von Vorteil, deutliche Hinweise auf den limitierenden Schritt der Reaktionen der einzelnen EcA2-Enzyme zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde das substatanaloge L-Aspartat- β -methyramid eingesetzt, außerdem wurden Reaktionen in binären Wasser/Methanol-Gemischen sowie Burst-Messungen durchgeführt.

5.5.1 „Burst“-Messungen

Der in Abbildung 4.18 gezeigte „Burst“-Effekt der T89V-Mutante tritt bei Enzymen, deren Reaktion gemäß einem ‘Ping-Pong’-Mechanismus verläuft, nur dann auf, wenn die Spaltung des kovalenten Intermediats langsamer verläuft als seine Bildung. Er ist somit ein eindeutiger Beweis dafür, daß bei dieser Mutante die Deacylierung geschwindigkeitsbestimmend ist. Der Nachteil der hier vorgenommenen „Burst“-Messungen liegt in dem großen zeitlichen und methodischen Aufwand der nötig ist, um aussagekräftige Daten zu erhalten. Zudem ist eine sehr große Enzymmenge für eine Meßreihe nötig (ca. 5 - 8 mg).

Signifikant für einen „Burst“ ist die zunächst sehr hohe Entstehungsrate des ersten Produktes (im vorliegenden Fall Hydroxylamin) und die verzögerte Freisetzung des zweiten Produktes (hier: Aspartat). Extrapoliert man im Falle des Hydroxylamins die lineare Steady-State-Phase auf die Ordinate zur Zeit $t = 0$, so müßte man bei Substratsättigung die Konzentration der an dem Prozeß beteiligten aktiven Zentren erhalten. Dies ist bei der T89V-Mutante der Fall; bei vier aktiven Zentren pro Molekül beträgt der theoretisch zu erwartende Burst-Effekt 0.35 und

1.1 mM. Die hohe Anfangskonzentration an Aspartat, die ebenfalls der Konzentration an eingesetzten aktiven Zentren beträgt, kann durch schon in der Enzympräparation enthaltenes Aspartat erklärt werden. Aspartat ist ein kompetitiver Inhibitor der Asparaginase, und Jayaram *et al.* (1986) beschrieben, daß kommerziell aus *E.coli* isoliertes Enzym bis zu 3.2 Moleküle Aspartat pro Tetramer enthält, die nur durch längere Dialyse im leicht alkalischen Milieu entfernt werden können. Das vorliegende Ergebnis spricht dafür, daß die T89V-Mutante Aspartat noch sehr viel stärker bindet, womöglich in kovalenter Form wie es in der Kristallstruktur erhalten wurde (Abb. 4.17). Eine Entfernung durch Dialyse ist nicht möglich, das gebundene Aspartat wird hingegen durch das Substrat aus dem aktiven Zentrum verdrängt. Wie aus der Kristallstruktur ersichtlich, nimmt das eingeführte Valin in etwa die Position des Threonins ein und die Ammonium-Gruppe des Lysins entfernt sich vom aktiven Zentrum. Es ergeben sich einige bedeutende Konsequenzen aus diesen Veränderungen, die Einfluß auf die Geschwindigkeit der Deacylierungsreaktion nehmen können. Zum einen wird die Annäherung des für die Deacylierung nötigen Wassermoleküls durch die nun hydrophobere Umgebung der umzusetzenden Ester-Funktion des Acyl-Enzyms erschwert, und die Stabilisierung des tetraedrischen Übergangszustandes wird verringert. Zum anderen wird die elektrostatische Abstoßung zwischen den Ammonium-Gruppen des Lysins und des Substrats reduziert, die zur Freisetzung des Substrats beiträgt.

5.5.2 Messungen in H₂O / Methanol-Gemischen

Tritt Methanol bei der Deacylierung in Konkurrenz zum Wasser, so müßte, wenn die Deacylierung geschwindigkeitsbestimmend ist, aufgrund der höheren Nukleophilie des Methanols, eine Zunahme von k_{cat} festzustellen sein (vgl. Kap. 4.2.4). Diese verläuft im einfachsten Fall gemäß der Gleichung $k_{\text{cat}} = k_3[\text{H}_2\text{O}] + k_4[\text{MeOH}]$, d. h. linear bei zunehmender Methanolkonzentration.

Eine derartige Zunahme der Umsatzgeschwindigkeit konnte jedoch bei keiner der hier untersuchten Mutanten festgestellt werden. Unveränderte k_{cat} und K_{m} -Werte wurden beim Wildtyp und den D90N-, T12V-, T89V-, K162H- und K162Y-Enzymen erhalten. Eine leichte Abnahme von k_{cat} und eine deutlichere Verringerung des K_{m} wurde bei den Mutanten E283G, E283V und D90G beobachtet.

Ein unveränderter k_{cat} -Wert bedeutet jedoch nicht unbedingt, daß die Acylierung geschwindigkeitsbestimmend ist, da bei der Beurteilung der Messungen folgendes berücksichtigt werden muß:

- die Zugabe von Methanol kann zu einer konformativen Änderung des Enzyms führen, die Einfluß auf Substratbindung und Substratumsatz ausüben kann. Die vorgenommenen fluorimetrischen Messungen zeigen einen solchen Effekt jedoch erst ab einer Methanolkonzentration, die deutlich höher liegt als die, bis zu der die kinetischen Messungen durchgeführt wurden (vgl. Abb. 4.19).
- Methanol hat im Vergleich zu Wasser einen anderen (größeren) Raumbedarf, eine andere Ladungsverteilung und eine verringerte Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken. Eine naheliegende Konsequenz daraus wäre, daß das Methanol überhaupt nicht, oder nicht an einem geeigneten Ort im aktiven Zentrum plaziert ist, der einen Angriff auf das Acyl-Enzym gestattet. Dafür spricht, daß der bei der Methanolyse entstehende Ester nicht nachzuweisen war und es könnte erklären, warum insbesondere beim T89V-Enzym keine k_{cat} -Zunahme gemessen wurde, obwohl die Reaktion dieser Mutante auf der Stufe des Acyl-Enzyms „stecken“ bleibt (vgl. 4.2.2).

Da der Ester nicht nachgewiesen werden konnte, könnte aber auch daran liegen, daß er selbst von der EcA2 umgesetzt wird ($k_{\text{cat}} = 13\%$ des L-Asn-Umsatzes; Röhm & Schneider, 1971). Der K_m -Wert für den L-Asparaginsäure- β -methylester ist allerdings extrem hoch (14 mM). Eine Erhöhung des Substratumsatzes bei gleichzeitiger Detektion des jeweiligen Esters erhielt man im Falle von Trypsin (Compton, 1986) und der β -Lactamase aus *Enterobacter cloacae* P99 (Page *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996). Im letzten Fall war der Effekt auf k_{cat} abhängig vom Substrat. Je nach Art des eingesetzten Substrats war k_{cat} erhöht oder blieb konstant. Andere Autoren beschrieben zwar eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei der β -Lactamase aus *Staphylococcus aureus*, der entsprechende Ester konnte aber nicht nachgewiesen werden (Viriden *et al.*, 1990). Sowohl beim Trypsin als auch bei der Lactamase aus *Staphylococcus* wurde zudem eine Zunahme von K_m mit steigendem Methanolanteil gemessen. Dieses Resultat ergab sich bei den meisten untersuchten Enzymreaktionen in Gegenwart eines organischen Kosolvents und wurde auf hydrophobe Wechselwirkungen im aktiven Zentrum zwischen Enzym, Kosolvent und Substrat zurückgeführt (Fink & Cartwright, 1981). Im Gegensatz dazu konnte bei den EcA2-Enzymen keine derartige K_m -Zunahme festgestellt werden, vielmehr zeigten die Glutamat-Mutanten und das D90G-Enzym eine Abnahme von K_m mit steigendem Methanolanteil und das, obwohl in diesen Fällen geladene Seitenketten gegen ungeladene, hydrophobe Reste ausgetauscht wurden. Eine Interpretation dieser Auswirkung des Methanols auf die Substratbindung ist schwierig, denkbar sind jedoch folgende Effekte:

- Vor der Substratbindung sind die Reaktionspartner solvatisiert. Dieser Solvathülle werden sie durch die optimale Bindung des Substrats an das Enzym entzogen. Methanol führt, aufgrund seiner oben genannten Unterschiede zum Wasser, zu einer Schwächung der Solvatisierung, die aber bei intakter Enzym-Substratbindung nicht ins Gewicht fallen muß. Bei den relevanten EcA2-Mutanten ist die Substratbindungsstelle bedeutend gestört, die leichtere „Verfügbarkeit“ der Reaktionspartner kann dann eine Verringerung des K_m -Wertes verursachen. Gegen diese Überlegung spricht, daß bei der D90N-Mutante keine K_m -Verringerung mit steigendem Methanolanteil beobachtet wurde, obwohl auch sie eine deutlich schlechtere Substratbindung aufweist.
- Das Methanol bindet im aktiven Zentrum in der Art, daß es bei den oben genannten Mutanten zu einer verbesserten Substratbindung kommt. Denkbar wäre z. B. eine dadurch verringerte elektrostatische Abstoßung zwischen der α -Ammonium-Gruppe des Substrats und dem Lysin-162. Auf eine solche Abstoßung wurde aufgrund der geringeren K_m -Werte von K162-Mutanten geschlossen, bei denen eine ungeladene oder hydrophobe Seitenkette eingeführt wurde (Aung, 1997). Diese Abstoßung fällt bei den Glu-283- und Asp-90-Mutanten verstärkt ins Gewicht, da daß Aspartat und Glutamat u. a. die positiven Ladungen neutralisieren. Die Bindung des Methanols kann zudem zu der bei diesen Mutanten beobachteten Abnahme von k_{cat} führen, indem eine Störung z. B. von Protonenübergängen (Pocker & Yanjic, 1987), der Orientierung der Wassermoleküle oder von für die Katalyse nötigen konformativen Änderungen eintritt.

5.5.3 Messungen mit L-Aspartat- β -methylamid

Ein veränderter β -Substituent am L-Asparagin sollte theoretisch nur dann zu einer Änderung der Umsatzgeschwindigkeit führen, wenn die Acylierung geschwindigkeitsbestimmend ist, da nach diesem Reaktionsschritt der Substituent abgespalten ist und die nachfolgende Hydrolyse des Acyl-Enzyms für alle diese Substrate gleich ist (vgl. 4.2.5). Wie aus Tabelle 4.4 ersichtlich, konnte bei keiner der untersuchten Mutanten eine deutliche Angleichung der k_{cat} -Werte für den Umsatz von L-Asparagin und L-Aspartat- β -methylamid festgestellt werden. Dies spricht dafür, daß bei allen diesen Enzymen die Acylierung geschwindigkeitsbestimmend ist. Wie schon bei den Messungen mit Methanol als Kosolvent müssen aber auch hier bei der Beurteilung der Ergebnisse einige Überlegungen Berücksichtigung finden:

- Die Verringerung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit beim Einsatz von L-Aspartat- β -methylamid gegenüber L-Asparagin ist mit ca. 90-95% (vgl. Tab. 4.4) relativ hoch und

kann eine Verschiebung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes hin zur Deacylierung überdecken. So wurde mittels der „Burst“-Messungen (siehe 4.2.2, 5.5.1) bei der T89V-Mutante ein $k_{\text{Acyl.}}/k_{\text{Deacyl.}}$ -Verhältnis von 2:1 bestimmt; die Deacylierung verläuft in diesem Fall bei Substratsättigung somit nur um etwa die Hälfte langsamer als die Acylierung.

- Eine Einführung von Mutationen insbesondere in der Nähe der umzusetzenden Substratgruppe kann zu einer veränderten Orientierung derselben führen, die die Ergebnisse verfälscht. In der T89V-Mutante nimmt beispielsweise eine voluminöse CH_3 -Gruppe die Position des Sauerstoffs ein (Palm *et al.*, 1996) und könnte einen Einfluß auf die ebenfalls sehr voluminöse $-\text{NH}-\text{CH}_3$ -Funktion des L-Aspartat- β -methylamids ausüben. Beim Einsatz des natürlichen Substrats L-Asparagin wäre dann bei diesem Enzym womöglich die Deacylierung und beim Einsatz des Methylamids die Acylierung geschwindigkeitsbestimmend.
- Die Annahme, daß ein β -Methylamid-Substituent nur einen Effekt auf die Acylierung ausüben kann, ist natürlich nur dann korrekt, wenn die Abgangsgruppe im weiteren Verlauf der Reaktion keine Rolle mehr spielt. Dies kann nicht ausgeschlossen werden. Die Abgangsgruppe kann z. B. bei der Deacylierung die Rolle eines Protonenakzeptors übernehmen (vgl. 4.3.2.2), und das beim Substratanalogen frei werdende Methylamin könnte aufgrund seiner voluminösen, hydrophoben CH_3 -Gruppe die Verteilung der Wassermoleküle stören oder auf andere Art und Weise die Vorgänge bei der Deacylierung hemmen.

5.6 Molecular Modeling

In den letzten Jahren gewann als weiterer „Baustein“ der bei der Lösung der vielen offenen Fragen zum Reaktionsmechanismus von Enzymen helfen könnte, die rechnergestützte Simulation von Reaktionen zunehmend an Bedeutung. Da es sich um rein theoretische Berechnungen handelt, die je nach angewendetem Modell mehr oder weniger starke Vereinfachungen beinhalten, ist die Interpretation eines Reaktionsmechanismus allein auf Basis solcher Kalkulationen fragwürdig. In Abstimmung mit kinetischen Daten können aber wertvolle Hinweise erhalten werden. Ein Problem bei der Simulation enzymatischer Reaktionen ist der komplexe

Aufbau aktiver Zentren. Durch die schnelle Rechnerentwicklung in den letzten Jahren sind aber zunehmend auch Berechnungen an größeren Systemen - wie im vorliegenden Fall – möglich.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Kalkulationen des Reaktionsmechanismus der EcA2 beruhten u. a. auf folgenden wichtigen Voraussetzungen:

- 1) Es stand eine Kristallstruktur mit gebundenem Aspartat in 2.3Å-Auflösung zu Verfügung (Swain *et al.*, 1993). Die Reste im aktiven Zentrum dieser Struktur sind über Mutageneseexperimente hinsichtlich ihrer Bedeutung für den Substratumsatz und -bindung charakterisiert, und die wichtigsten von ihnen konnten ausgewählt werden.
- 2) Durch den Vergleich mit Kristallstrukturen anderer Asparaginasen und der T89V-Mutante konnten konservierte Wassermoleküle identifiziert werden (Palm *et al.*, 1996), und einige von ihnen wurden in die Kalkulation mit einbezogen.
- 3) Um die Anzahl der beteiligten Atome zu verringern mußten die Seitenketten der Aminosäuren zwar verkürzt werden, eine signifikante Veränderung der chemischen Eigenschaften (z.B. des pKa-Wertes) der funktionellen Gruppen resultiert daraus jedoch nicht.
- 4) Wie schon im Ergebnisteil erwähnt, erbrachte die PM3-Methode bei Reaktionen mit Protonenübertragungen gute Übereinstimmungen mit experimentellen Daten (Kallies & Mitzner, 1995).

Natürlich müssen auch viele Einschränkungen gemacht werden, die bei der Beurteilung der Berechnungen Berücksichtigung finden sollten; dazu zählen u. a.:

- a) Trotz der relativ vielen übernommenen Reste handelt es sich um ein stark reduziertes System. Die weitere chemische Umgebung des aktiven Zentrums und damit der an der Rechnung beteiligten Gruppen ist nicht vorhanden. Diese kann jedoch einen bedeutenden Einfluß (z. B. über Wasserstoffbrücken) u. a. auf die chemischen Eigenschaften der Reste nehmen. Ebenso ist die „globalere“ elektrostatische Struktur des aktiven Zentrums stark gestört, die ein wichtiger Faktor in einer enzymatischen Katalyse sein kann.
- b) Das gesamte strukturelle Gerüst des Enzyms fehlt. Zusammen mit den im ersten Punkt geschilderten Effekten kann dadurch eine Gruppe eine Beweglichkeit erlangen, die ihr im kompletten Enzym nicht zu Verfügung steht.
- c) Die Fixierung einiger Atome hatte zwei Gründe. Zum einen wurde dadurch die Rechenzeit verkürzt, zum anderen verhinderte sie ein „Auseinanderdriften“ einiger Gruppen des Systems im Laufe der Simulation, was aus den unter a und b geschilderten Gründen auftreten kann. Obwohl die schon im Ergebnisteil geschilderten Überlegungen (s. 4.3.1) ge-

gen eine signifikante Bewegung der T89/K162/D90-Triade im Laufe der Katalyse sprechen, kann die Fixierung einiger Atome dieser Reste zu Fehlinterpretationen führen.

Bei der Ermittlung der Ausgangsstruktur für die Simulation des Reaktionsweges wurde zunächst, nach der Umwandlung von L-Aspartat in L-Asparagin, eine Amber-Minimierung durchgeführt (s. 4.3.1). Wie aus Tabelle 4.13 ersichtlich, traten keine großen Änderungen der Atomabstände im aktiven Zentrum auf. Das gleiche gilt für die anschließend mit dem reduzierten System vorgenommene PM3-Minimierung. Wird L-Asparagin statt L-Aspartat gebunden, führt dies somit nicht zu einer signifikanten Strukturänderung im aktiven Zentrum. Wie schon im Ergebnisteil erwähnt, ist von Bedeutung, daß trotz der relativ geringen Anzahl an fixierten Atomen ein stabiles System erhalten wurde. Vor allem mußten keine Fixierungen an den Tyrosin-25- und Threonin-12-Gruppen vorgenommen werden, die Teil des beweglichen Loops sind.

Acylierung

Die Überlegungen, die dazu führten von einer Protonenübergabe direkt an die Abgangsgruppe auszugehen, wurden in dieser Arbeit schon ausführlich dargelegt und sollen hier nicht noch einmal aufgegriffen werden.

Bei der so simulierten Reaktion handelt es sich um den Angriff eines neutralen Nucleophils auf eine Carbonylfunktion. Die Werte aus Tabelle 4.5 zeigen, daß die Annäherung des Sauerstoffs und des Protons an die Amid-Funktion simultan verläuft, der Übergangszustand ist ein Ring aus vier Atomen (s. Abb. 4.25). Theoretische Berechnungen mittels *ab initio*-Methoden von Reaktionen der neutralen Nucleophile H_2O , MeOH und NH_3 mit Formaldehyd im Vakuum wurden schon früher durchgeführt (Williams *et al.*, 1983; Williams *et al.*, 1985; Williams, 1987). Abbildung 5.4 zeigt in schematischer Form einen Vergleich des Übergangszustandes der Acylierungsreaktion mit den berechneten aktivierten Komplexen, die für die Nucleophile H_2O und NH_3 beim Angriff auf Formaldehyd erhalten wurden. In allen Fällen erhielt man einen ähnlichen, ringförmigen Übergangszustand aus vier Atomen. Die Bindungslängen und -winkel variieren natürlich aufgrund der unterschiedlichen Nucleophile und Protonenakzeptoren von Struktur zu Struktur mehr oder weniger stark, die Bindungsbildung und Protonenübergabe verläuft aber bei allen Systemen konzertiert.

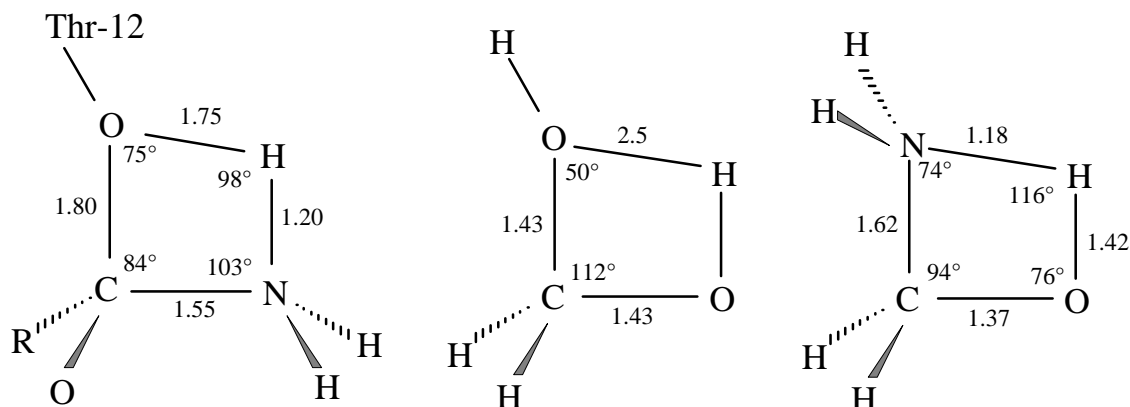


Abb. 5.4: Schematische Darstellung des Übergangszustandes der Acylierungsreaktion (links, diese Arbeit), des Übergangszustandes beim Angriff von H_2O auf Formaldehyd (Mitte; nach Williams *et al.*, 1983) und des Übergangszustandes beim Angriff von NH_3 auf Formaldehyd (rechts; nach Williams, 1987). Bindungslängen in Å, Winkel in Grad.

Wie den Atomabstands-Werten der Tabelle 4.12 zu entnehmen ist, fanden auf dem Weg zu dem Acylierungs-Übergangszustand einige Veränderungen am System statt. Der Tyrosin-25-Rest hat sich ein wenig vom Substrat wegbewegt (d_3 in Tabelle 4.12 vergrößert sich leicht). Dies ist auf den Wegfall der Wasserstoffbrücke zum Threonin-12 zurückzuführen. Das Tyrosin hält im weiteren Verlauf der Reaktion Kontakt zum NH_3 bzw. NH_4^+ und bewegt sich dementsprechend mit. Diese Bewegung führt aber nur zu einer maximalen Positions-Veränderung der Tyr-OH-Gruppe von ca. 1 Å. Die H-Brücke zum Glutamat-283 bleibt weiter bestehen (d_4 ist nahezu unverändert). Die gravierendsten Veränderungen betreffen die Hauptketten-NH-Gruppe von Threonin-89 und besonders von Threonin-12. In beiden Fällen geht die Wasserstoffbrücke zum Sauerstoffatom des Substrats verloren. Bei der Threonin-89-Gruppe wird dies wohl durch die Fixierung der Hauptketten-Atome verursacht (s. Abb. 4.24), so daß sie nicht der Bewegung des Substrat-O-Atoms bei der Ausbildung des annähernd tetraedrischen Übergangszustandes folgen können. Wie schon im Ergebnisteil geschildert, bildet die Thr-12-NH-Gruppe eine neue Wasserstoffbrücke zum α -Carboxylat des Substrats aus. Diese bleibt auch beim weiteren Verlauf der Reaktion bestehen, was vermutlich nicht den realen Gegebenheiten entspricht, da beim Acyl-Enzym der T89V-Kristallstruktur eine H-Brücke zum γ -Sauerstoffatom des Substrats vorliegt. Der Kontakt zum α -Carboxylat könnte aber ein kurzfristiger Bestandteil eines dynamischen Prozesses sein um den Übergangszustand zu erreichen. Die Rückkehr der Hauptketten-Atome des Thr-89 zum Ausgangspunkt konnte vom hier verwendeten System dann vermutlich nicht mehr nachvollzogen werden. Um derartige Effekte zu simulieren, müßten zusätzlich Moleküldynamik-Rechnungen durchgeführt werden.

Die ermittelte Aktivierungsenergie der Acylierung betrug 31.8 kcal/mol und war damit die deutlich höchste des gesamten Reaktionsweges; sie ist somit auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Simulation. Bei der PM3-Kalkulation der Serin-Proteasen-Reaktion mit einem Amid-Substrat wurde für die Acylierung ein ähnlich hoher Wert bestimmt (31.5 kcal/mol; Daggett *et al.*, 1991), dabei wurde das Proton jedoch auf das benachbarte Histidin übertragen. Eine entsprechende Übergabe auf das Tyrosin-25 wurde analog simuliert, die erhaltene Übergangs-Energie ist aber deutlich höher (53.4 kcal/mol, Tab. 4.8).

Zur Überwindung der Aktivierungsenergie von 31.8 kcal/mol sind folgende Wege denkbar: (1) das Enzym verursacht eine Geometrieänderung des Substrats die die Reaktion erleichtert, (2) nach der Substratbindung findet eine Konformationsänderung im Enzym statt, die zu einer höheren Reaktivität führt und (3) das aktive Zentrum ist elektrostatisch komplementär zum Übergangszustand. Für die erste Möglichkeit gibt es im Falle der EcA2 keinerlei Hinweise. Die umzusetzende Amid-Funktion scheint keinen Einflüssen ausgesetzt zu sein, die eine nicht planare Geometrie und damit eine größere Reaktivität zu Folge hätten. Für die zweite Möglichkeit gibt es hingegen starke Hinweise bezüglich der Loop-Bewegung, auf die schon eingegangen wurde (vgl. Kap. 5.4). Der dritte Punkt betreffe die Stabilisierung des negativ geladenen γ -Sauerstoffatoms des Substrats („Oxyanion hole“). In der Tat erhöht eine Deletion der Wasserstoffbrücke vom Threonin-89 zum O-Atom die Aktivierungsenergie um 4 kcal/mol (vgl. Tab. 4.7). Ein in etwa gleich großer Beitrag wäre dann von einer intakten H-Brücke von der Hauptketten-NH-Gruppe aus zu erwarten. Gleiches gilt für ein konserviertes Wassermolekül, welches Kontakt zur „Oxyanion hole“ hat (Palm *et al.*, 1996) und in dem reduzierten System keine Berücksichtigung fand.

Deacylierung

Die Gründe, die zur Simulation des - zur Aktivierung des Wassermoleküls nötigen -Protonentransfers auf das Ammoniak führten sind die gleichen wie bei der Acylierung. Die Postulierung dieses Reaktionsschrittes wirft die Frage auf, ob auch das bei der Umsetzung von L-Aspartat- β -hydroxamat frei werdende Hydroxylamin als Base fungieren kann ($pK_a = 5.8$ gegenüber 9.25 des NH_3). Dies ist sicherlich nicht unstrittig. Jedoch wird auch dem Histidin ($pK_a = 6.5$) eine Rolle als Base zugeschrieben. Zudem ist eine Säure-Base-Reaktion natürlich von der chemischen Umgebung abhängig. Die Basizität des NH_3 und des NH_2OH kann durch die Wasserstoffbrücken zu den Gruppen Asp-90, Glu-283 und Tyrosin-25 erhöht werden. Das positiv geladene Lysin verstärkt hingegen die Acidität des Wassermoleküls. In Tabelle 4.9

wurden die für den Protonenübergang nötigen Energien bei unterschiedlichen H₂O-Abständen angegeben. Bei welchem Abstand dieser stattfindet, kann nicht sicher entschieden werden. Wichtig ist, daß durch die beiden Ammoniumionen eine Stabilisierung des Hydroxidions eintritt. Wurde das NH₄⁺-Molekül entfernt, fand die zu erwartende Protonenübergabe vom Lysin auf das OH⁻-Ion und damit eine Inaktivierung statt, die auch durch H-Brücken von den anderen Wassermolekülen aus nicht verhindert werden konnte. Die Simulation dieses Reaktionsschrittes könnte somit ein Hinweis auf eine wichtige Funktion des positiv geladenen Lysins liefern: Es positioniert das für die Deacylierung nötige Wassermolekül, erhöht seine Acidität und stabilisiert das entstehende OH⁻. Auf eine möglicherweise leichte Verfälschung der Werte durch die unkorrekte Berechnung der OH⁻-Bildungsenergie wurde schon im Ergebnisteil hingewiesen. Sie könnte die zur Aktivierung des Wassermoleküls nötige Reaktion noch etwas zu endotherm erscheinen lassen.

Die Werte der Tabelle 4.9 zeigen, daß nicht die beim anschließenden Angriff des Hydroxid-Ions entstehende tetraedrische Struktur, sondern ein OH⁻-Abstand zum C-Atom von 2.0 Å die höchste Energie verursacht. Ein solcher Effekt beim Angriff eines Nucleophils auf eine Carbonylfunktion in Lösung wurde schon bei *ab-initio*-Simulationen der Reaktion eines Hydroxid-Ions mit Formaldehyd (Madura & Jorgensen, 1986) und mit Formamid (Weiner *et. al.*, 1985) beschrieben. Auch in diesen Fällen lag das Maximum der Energie bei einem Abstand des Nucleophils vom Elektrophil von ca. 2.0 Å. Diese Tatsache wurde u. a. mit dem Verlust an Solvationsenergie beim Übergang vom kleinen Ion hoher Ladungsdichte zum größeren, diffusen Anion der Übergangsstruktur erklärt. Auch im vorliegenden Fall dürfte die Annäherung des OH⁻ bis auf 2.0 Å an das C-Atom des Acyl-Enzyms zu einem Verlust an durch die Ammoniumionen eingebrachte Stabilisierungsenergie führen.

Bei dem tetraedrischen Übergangszustand der Deacylierung spielt eine Stabilisierung der „Oxyanionhole“ durch Wasserstoffbrücken eine größere Rolle als bei der Acylierung, da die Deletion der Threonin-89-Seitenkette eine Energieerhöhung um 7.8 kcal/mol verursachte. Dies ist nicht verwunderlich, da sich bei dieser Struktur das Nucleophil komplett bis auf ca. 1.5 Å annähert, was zu einer stärker negativen Polarisierung des Sauerstoffatoms führt. Im Falle der schon erwähnten Simulation der Serin-Protease-Reaktion destabilisierte die Entfernung zweier an der Oxyanionhole beteiligter Wassermoleküle die Struktur um 13-14 kcal/mol. Auch bei der Deacylierung kann somit die Ausbildung weiterer H-Brücken zum Sauerstoff - wie bei der Acylierung beschrieben - zu einer weiteren Stabilisierung der Struktur führen.

Das Ende der Reaktion bildet die Protonierung des tetraedrischen Übergangszustandes. Nach den durchgeführten Berechnungen geschieht dies eher durch das Ammoniumion als durch ein Wassermolekül. Voraussetzung ist dabei, daß das NH_4^+ nicht vorher u. a. aufgrund der elektrostatischen Abstoßung mit dem Lysin aus dem aktiven Zentrum entfernt wird.

Die in Tabelle 4.12 dargestellte alternative Deacylierung ohne vorherige Aktivierung des H_2O -Moleküls benötigt eine wesentlich höhere Aktivierungsenergie von 27.1 kcal/mol. Diese ist aber nicht so hoch, als das eine derartige Reaktion im Falle von sehr inaktiven, deacylierungsdefizienten Mutanten wie der T89V oder eventuell der Lysin-Mutanten nicht doch stattfinden und ihre Restaktivitäten erklären könnte.

5.7 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Immer noch sind viele Fragen zur Wirkungsweise der L-Asparaginase II ungeklärt. Auf die vollständige Aufstellung eines Reaktionsmechanismus wird hier daher verzichtet, obwohl der im Molecular Modeling Teil durchgeführte Simulationsweg eine Grundlage darstellen könnte. Im folgenden sollen die möglichen Eigenschaften der wichtigsten Reste im aktiven Zentrum noch einmal kurz dargelegt werden.

Glutamat-283: Diesem Rest kommt mit Sicherheit keine Rolle beim Substratumsatz, wohl aber bei der Substratbindung zu (vgl. Kap. 4.1.4 u. 5.2).

Aspartat-90: Im Prinzip könnte hier das Gleiche gelten. Stärkere Aktivitätsverluste einiger Mutanten können durch Sekundäreffekte auf das benachbarte Lysin verursacht werden. Dennoch ist eine Bedeutung bei der Orientierung des Lysins und der Verringerung seiner positiven Ladung denkbar, um eine Inaktivierung des bei der Deacylierung angreifenden OH zu verhindern (vgl. Kap. 4.3.2.2). Der bei einigen Mutanten des Glutamats und Aspartats postulierte geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Substratbindung (s. 5.4) sollte über Pre-steady-state-Messungen nachgewiesen werden.

Tyrosin-25: Eine direkte Beteiligung dieses Restes an der chemischen Umsetzung ist aufgrund der hohen Aktivitäten der Mutanten sehr unwahrscheinlich. Vermutlich hilft das Tyrosin über eine H-Brücke bei der optimalen Ausrichtung des Nukleophils Threonin-12. Von Bedeutung ist dieser Rest für die Loop-Bewegung (Aung, 1997; Kap. 5.4) und damit eventuell auch für die Zusammenführung der Reaktionspartner.

Wichtig wäre eine Ausweitung des Molecular Modeling auf moleküldynamische Kalkulationen, mit denen eine über das einfache Schließen hinausgehende Bewegung des Loops untersucht werden könnte.

Threonin-12: Ist höchstwahrscheinlich das Nukleophil bei der Acylierung.

Threonin-89: Diesem Rest kommt eine Rolle bei der Stabilisierung sowohl des Übergangszustandes der Acylierung, als auch der Deacylierung zu (s. Kap. 4.3.2 u. 5.6).

Weitere Untersuchungen z. B. des Isotopeneffektes der aktiveren T89A-Mutante wären von Bedeutung, da sich das Interesse bisher auf die Valin-Mutante konzentrierte (nicht zuletzt wegen der Kristallstruktur). Bei ihr ist jedoch Lysin-162 sehr stark mit betroffen (s. Abb. 4.17), so daß nicht genau zwischen Effekten unterschieden werden kann, die durch das fehlende Threonin oder die veränderte Position des Lysins hervorgerufen werden.

Lysin-162: Ist höchstwahrscheinlich über die ganze Reaktion hinweg positiv geladen. Zwar wurde schon ein Lysin-Rest mit einem pK_a von 6.5 postuliert (Doa-pin *et al.*, 1991), dieser aber in hydrophober Umgebung wie sie in der EcA2 nicht vorliegt. Zudem ist die Umsatzgeschwindigkeit der EcA2 bis hinunter zu pH 5.0 konstant (s. Abb. 4.3). Die Proton inventories der Lysin-Mutanten (s. 4.2.1 u. 5.4) und die PM3-Rechnungen (s. 4.3.2 u. 5.6) weisen auf eine Funktion bei der Deacylierung hin. Daß bei den Lysin-Mutanten mittels der Messungen in MeOH/H₂O-Gemischen und mit dem L-Aspartat- β -methylamid als Substrat keine Verschiebung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes hin zur Deacylierung nachgewiesen werden konnte (vgl. 4.2.3 u. 4.2.4), könnte auf die in Kapitel 5.5.2 u. 5.5.3 diskutierten Gründe zurückzuführen sein.

Eine Ausweitung der PM3-Berechnungen auf die Substrate AHA und L-Aspartat- β -methylamid wäre sinnvoll, um zu überprüfen, ob sich die kinetischen Daten auf diese Weise nachvollziehen lassen. Mit Hilfe von Amber-Minimierungen könnten zudem weitere Mutationen simuliert und ihr Einfluß auf die Aktivierungsenergien der einzelnen Reaktionsschritte untersucht werden.

Ein weitere wichtige Frage wäre die nach einem möglichen Tunnel-Effekt beim Transfer des Thr-12-H-Atoms. Bell (1980) gibt experimentelle Vorgehensweisen an, die zur Erkennung eines Tunnel-Effektes führen können. Ein wichtiger Bestandteil dieser Methode sind – methodisch sehr anspruchsvolle - (Deuterium- und evtl. Tritium-) Isotopenmessungen über einen großen Temperaturbereich.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die weitere Charakterisierung des Katalysemechanismus der L-Asparaginase II (EcA2) aus *E. coli*.

- 1) Mit Hilfe der gerichteten Mutagenese wurde die Rolle der im aktiven Zentrum lokalisierten Reste Asp-90 und Glu-283 im einzelnen untersucht. Auf der Grundlage dieser Experimente kann eine Beteiligung von Glu-283 am Substratumsatz ausgeschlossen werden, an der Substratbindung ist Glu-283 dagegen entscheidend beteiligt. Die kinetische Analyse von Mutanten des Asp-90 lieferte uneinheitliche Ergebnisse. In Übereinstimmung mit früheren Befunden zeigen die Daten aber, daß Asp-90 nicht als Protonenakzeptor während der Katalyse in Frage kommt.
- 2) Doppelmutanten, bei denen die Reste Asp-90 und Lys-162 bzw. Thr-89 und Lys-162 ausgetauscht wurden, zeigten alle starke Stabilitätsverluste. Dies stützt die Vorstellung, daß die 'Triade' Asp-90/Lys-162/Thr-89 eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des aktiven Zentrums spielt; der entscheidende Rest ist dabei offenbar Lys-162.
- 3) Die Untersuchung von Lösungsmittel-Isotopeneffekten ('proton inventories') ergab, daß im Falle des Wildtypenzym eine sog. Multiprotonenkatalyse vorliegt, die möglicherweise auf eine Konformationsänderung während der Katalyse zurückgeht. Ergebnisse mit Mutanten von Tyr-25 lassen vermuten, daß dabei das Schließen eines beweglichen Loops über dem aktiven Zentrum von Bedeutung ist. Bestimmte Mutanten mit Austausch der Reste Asp-90 bzw. Glu-283 zeigten so gut wie keinen D₂O-Isotopeneffekt. Möglicherweise führen diese Mutationen zu einem anderen Reaktionsmechanismus. Die Proton inventories weisen weiter darauf hin, daß Thr-89 und Lys-162 für den Deacylierungsschritt wichtig sind.
- 4) Beim Wildtyp-Enzym ist eindeutig die Acylierung geschwindigkeitsbestimmend. Dies gilt nicht für die Mutante T89V, bei der in Bezug auf das erste Produkt Hydroxylamin ein „Burst“-Effekt auftritt. In Übereinstimmung damit steht die Tatsache, daß in der Kristallstruktur dieser Mutante ein kovalent an Thr-12 gebundener Acylrest gefunden wurde. Weitere Experimente mit binären Methanol/Wasser-Gemischen und mit dem Substratanalogen L-Asparaginsäure-β-methylamid ergaben für keine der untersuchten Mutanten Hinweise für eine Verschiebung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes hin zur Deacylierung.

- 5) Mit Hilfe von Simulationen auf der Basis des 'Amber'-Kraftfeldes und der semiempirischen PM3-Methode wurden mögliche Katalysewege auch theoretisch untersucht. Die Rechnungen stützen einen Mechanismus, bei dem während der Acylierung ein Proton vom Thr-12, dem angreifenden Nukleophil, direkt an die Abgangsgruppe (NH_3) übergeben wird. Ein Transfer dieses Protons auf das benachbarte Tyr-25 erscheint dagegen unwahrscheinlich. Weiter zeigten die Simulationen, daß das bei der Deacylierung angreifende Wassermolekül möglicherweise nicht von einem Rest des Enzyms, sondern vom freigesetzten NH_3 aktiviert wird. Die Reste Thr-89 und Lys-162 scheinen aufgrund der Berechnungen vor allem die Hydrolyse des Acylenzyms zu unterstützen.

7. Literaturverzeichnis

Adediram, S. A.; Deraniyagala, S. A.; Yang, Xu; Pratt, R. F.,
Biochemistry 35, **1996**, 3604 - 3613

Albery W. J.
Solvent Isotope Effekts, In: Protein Transfer Reactions
(Calgin & Gould, ed.) Chapman and Hall, London **1975**, 263-315

Alex, A.; Clark, T.,
J. Comput. Chem. 13, **1992**, 704 - 717

Aung, H. P.,
Dissertation Universität Marburg **1997**

Baggert, U.; Röhm, K. H.,
Biochem. Biophys. Acta. 999, **1989**, 36 - 41

Barshop, B. A.; Wrenn, R. F.; Frieden, C.,
Anal. Biochem. 130, **1983**, 134 - 145

Becktel, W. J.; Schellmann, J. A.,
Biopolymers 26, **1987**, 1859 - 1877

Bell, R. P.,
The Tunnel Effekt in Chemistry, Chapman and Hall, London **1980**

Boccola, M,
Diplomarbeit Universität Marburg , **1997**

Bowler, B. E.; Dong, A.; Caughey, W. S.,
Biochemistry 33, **1994**, 2402 - 2408

Bradford, M. M.,
Anal. Biochem. 72, **1976**, 248 - 254

Brandt, W.; Ludwig, O.; Thondorf, I.; Barth, A.,
Eur. J. Biochem 236, **1996**, 109 - 114

Brannigan, J. A.; Dodson, G.; Duggleby, H. J.; Moody, P. C. E.; Smith, J. L.; Tomchick, D. R.;
Murzin, A. G.,
Nature 378, **1995**, 415 - 420

Broome, J. C.,
Nature 191, **1961**, 1114 - 1115

- Campbell, H. A.; Mashburn, L. T.; Boyes, E. A.; Old, L. J.,
Biochemistry 6, **1967**, 721 - 730
- Carter, P.; Wells, J. A.,
Nature 332, **1988**, 564 - 568
- Cedar, H.; Schwartz, J. H.,
J. Bacteriol. 96, **1968**, 2043 - 2048
- Cedar, H.; Schwartz, J. H.,
J. Biol. Chem. 242, **1967**, 3753 - 3755
- Chang, T. K.; Chiang, Y.; Guo, H. -X.; Krege, A. J.; Mathew, L.; Powell, M. F.; Wells, J. A.,
J. Am. Chem. Soc. 118, **1996**, 8802 - 8807
- Chesney, R. H.,
FEMS Microbiol. Lett. 17, **1983**, 161 - 162
- Citri, N.; Kitron, N.; Zyk, N.,
Biochemistry 11, **1972**, 2110 - 2116
- Cleland, W. W.,
Biochemistry 31, **1992**, 317 - 319
- Cleland, W. W.; Kreevoy, M. M.,
Science 264, **1994**, 1887 - 1890
- Compton, P. D.; Coll, R. J.; Fink, A. L.,
J. Biol. Chem. 261, **1986**
- Corey, D. R.; Craik, C. S.,
J. Am. Chem. Soc. 114, **1992**, 1784-1790
- Daggett, V.; Schröder, S.; Kollmann, P. A.,
J. Am. Chem. Soc. 113, **1991**, 8926 - 8935
- Dao-pin, S.; Anderson, D. E.; Baase, W. A.; Dahlquist, F. W.; Matthews, B. W.,
Biochemistry 30, **1991**, 11521-11529
- Derst, C.,
Dissertation, Universität Marburg **1995**
- Derst, C.; Henseling, J.; Röhm, K. H.,
Protein Eng. 5, **1992**, 785 - 789

- Derst, C.; Wehner, A.; Specht, V.; Röhm, K. H.,
Eur. J. Biochem. 224, **1994**, 533 - 540
- Devar, M. S. J.; Kirschner, S.,
J. Am. Chem. Soc. 93, **1971**, 4290 - 4294
- Duggleby, H. J.; Tolley, S. P. Hill, C. P.; Dodson B. J.; Dodson, G; Moodey, P. C.,
Nature 373, **1995**, 264-8
- Ehrman, M.; Cedar, H.; Schwartz, J. H.,
J. Biol. Chem. 246, **1971**, 88 - 94
- Epp, O.; Steigemann, W.; Formanek, H.; Huber, R.,
Eur. J. Biochem. 20, **1971**, 432 - 437
- Fink, A. L.; Cartwright, S. J.,
CRC Crit. Rev. Biochem. 11, **1981**, 145-207
- Frey, P. A.; Whitt, S. A.; Tobin, J. B.,
Science 264, **1994**, 1927 - 1930
- Glasoe, P. K.; Long, F. A.,
J. Phys. Chem. 64, **1960**, 188
- Haley, E. E.; Fischer, F. A.; Welch, A. D.,
Chancer Res. 21, **1961**, 532 - 536
- Harms, E.; Wehner, A.; Jennings, M. P.; Pugh, K. J.; Beacham, I. R.; Röhm, K. H.,
Protein Expr. Purifn. 2, **1991a**, 55 - 58
- Harms, E; Wehner, A.; Aung, H. P.; Röhm, K. H.,
FEBS Lett. 285, **1991b**, 55-58
- Hermann, V.; Röhm, K. H.; Schneider, F.,
FEBS Lett. 39, **1974**, 214 - 217
- Herrmann, V.; Röhm, K. H.; Schneider, F.,
FEBS Lett. 39, **1974**, 214 - 217
- Holcenberg, J. S.; Ericsson, L.; Roberts, L.,
Biochemistry 17, **1978**, 411 - 417
- Horowitz, B.; Meister, A.,
J. Biol. Chem. 247, **1972**, 6708 - 6719

- Howard, A. C.; Kollmann, P. A.,
J. Am. Chem. Soc. 110, **1988**, 7195 - 7200
- Howard, J. B.; Carpenter, F. H.,
J. Biol. Chem. 247, **1972**, 1020 - 1030
- Jaenicke, R.,
Prog. Biophys. molec. Biol. 49, **1987**, 117 - 237
- Jakob, C. G.; Lewinski, K.; LaCount, M. W.; Roberts, J.; Lebioda, L.,
Biochemistry 36, **1997**, 923 - 931
- Jayaram, N. H.; Cooney, D. A.; Huang, C. Y.,
J. Enzyme Inhibition. 1, **1986**, 151 - 161
- Jennings, M. P.; Beacham, I. R.,
J. Bacteriol. 172, **1990**, 1491 - 1498
- Jerlström, P. G.; Bezjak, D. A.; Jennings, M. P.; Beacham, I. R.,
Gene 78, **1989**, 37 - 46
- Jerlström, P. G.; Liu, J.; Beacham, I. R.,
FEMS Microbiol. Lett. 41, **1987**, 127 - 130
- Kafkewitz, D; Bendich, A,
Experientia 40, **1984**, 1173-7
- Kallies, B.; Mitzner, R.,
J. Mol. Model 1, **1995**, 68 - 78
- Keiler, K. C.; Sauer, R. T.,
J. Biol. Chem. 270, **1995**, 28864 - 28868
- Kidd, J. G.,
J. Exp. Med. 98, **1953**, 565 - 582
- Laemmli, U. K.,
Nature 227, **1979**, 680 - 685
- Liao, D. I.,
Biochemistry 31, **1992**, 9796-9812
- Löwe, J; Stock, D; Jup, B; Zwickl, P.; Baumeister, W.; Huber, R.,
Science 268 (5210), **1995**, 533-9

- Madura, J. D.; Jorgensen, W. L.,
J. Am. Chem. Soc. 108, **1996**, 2517 - 2527
- Maita, T.; Matsuda, G.,
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, **1980**, 105 - 117
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J.,
Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York **1982**
- Meng, G. Z.; Hao, F. X.; Quian, S. J.; He, Z. X. (Ed.),
in: Molecular architecture of proteins and enzymes, New York **1983**, 135 - 139
- Meng, G. Z.; Mao, F. X.; Quian, S. J.; He, Z. X.,
in: *Molecular Architecture of Proteins and Enzymes*, 135 - 154, New York **1985**
- Miller, M.; Mohana Rao, J. K.; Wlodawer, A.; Gribskov, M. R.,
FEBS Lett. 328, **1993**, 275 - 279
- Nishimura, Y.; Makino, H.; Takenaka, O.; Inada, Y.,
Biochem. Biophys. Acta. 227, **1971**, 171 - 179
- Ollenschläger, G.; Roth, E.; Linkesch, W.; Jansen, S.; Simmel, A.; Mödder, B.,
Eur. J. Clin. Investigation 18, **1988**, 512 - 516
- Olson, L. P.; Luo, J.; Almarsson, Ö.; Bruice, T. C.,
Biochemistry 35, **1996**, 9782 - 9791
- Pace, C. N.; Shirley, B. A.; Thompson, J. A.,
Measuring the conformational stability of a protein, In: *Protein Structure, a practical approach* (Creighton, T. E., ed) **1989**, IRL Press, Oxford, 311-330
- Paetzel, M.; Dalbey, R. E.,
TIBS 22, **1997**, 28 - 31
- Page, M. I., Vilanova, B.; Layland, N. J.,
J. Am. Chem. Soc. 117, **1995**, 12092-12095
- Palm, G. J.; Lubkowski, J.; Derst, C.; Schleper, S.; Röhm, K. H.; Wlodawer, A.,
FEBS Lett. 390, **1996**, 211 - 216
- Perona, J. J.; Craik, C. S.,
Protein Sci. 4, **1995**, 337 - 360
- Peterson, R. G.; Richards, F. F.; Handschumacher, R. E.,
J. Biol. Chem. 252, **1977**, 2072 - 2076

- Pocker, Y.; Yanjic, N.,
Biochemistry 26, **1987**, 2597-2606
- Prager, M. D.; Bachynsky, Y. N.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, **1968**, 43 - 47
- Quinn, D. M.; Sutton, L. D.,
Theoretical basis and mechanistic utility of solvent isotope effects. In: Enzyme mechanisms from isotope effects (Cook, P. F. ed.), CRC Press, Boca Raton **1991**, 73 - 126
- Quinn, D. M.; Swanson, M. L.,
J. Am. Chem. Soc. 106, **1984**, 1883
- Quinn, D. M.; Venkatasubban, K. S.; Kise, M.; Schowen, R. L.,
J. Am. Chem. Soc. 102, **1980**, 5365 - 5369
- Rahil, J.; Pratt, R. F.,
Biochemistry 33, **1994**, 116 - 125
- Röhm, K. H.; Schneider, F.,
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, **1971**, 1739 - 1743
- Röhm, K. H.; Schneider, F.,
Physiol. Chem. 352, **1971**, 1739 - 1743
- Röhm, K. H.; van Etten, R. L.,
Arch. Biochem. Biophys. 244, **1986**, 128 - 136
- Rosenberry, T. L.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, **1975**, 3834 - 3838
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, **1977**, 5463 - 5467
- Schellmann, J. A.,
Biopolymers 26, **1987**, 549
- Scholten, J. D.; Hogg, J. L.; Raushel, F. M.,
J. Am. Chem. Soc. 110, **1988**, 8246 - 8247
- Schowen, K. B. J.,
Solvent hydrogen isotope effects, in Transition States of Biochemical Processes, (Gandour & Schowen, ed.), Plenum Press New York, **1978**, Kap. 6
- Schowen, K. B.; Schowen, R. L.,
Methods Enzymol., 87, **1982**, 551-606

- Segel, I. H.,
Effects of pH and temperature. In: Enzyme kinetics and behavior and analysis of rapid equilibrium and steady - state enzyme systems, New York **1975**, 884 - 924
- Shifrin, S.; Luborsky, S. W.; Grochowski, B. J.,
J. Biol. Chem. 246, **1971**, 7708 - 7714
- Shirley, B. A.,
Protein conformational stability estimates from urea, guanidine hydrochloride, and thermal denaturation curves. In: Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A, Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation (Ahern, T. J.; Manning, M. C., ed.), New York **1992**, 167 - 194
- Slilaty, S. N.; Little, J. W.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, **1987**, 3987-3991
- Specht, V.,
Diplomarbeit Universität Marburg **1994**
- Stewart, J. J. P. J.,
J. Comput. Chem. 10, **1989**, 209-220
- Strynadka, N. C. J.; Adachi, H.; Jensen, S. E.; Johns; K.; Sielecki, D. L.; Betzel, C.; Sutoh, K.; James, M. N. G.,
Nature 359, **1992**, 700 - 705
- Swain, A. L.; Jaskolski, M.; Housset, D.; Mohana Rao, J. K.; Wlodawer, A.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, **1993**, 1474 - 1478
- Tabor, S.; Richardson, C. C.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, **1987**, 4767 - 4771
- Tschantz, W. R., Sung, M.; Delgado-Partin, V. M.; Dalbey, R. E.,
J. Biol. Chem. 268, **1993**, 27349-27354
- Venkatasubban, K. S.; Schowen, R. L.,
Crit. Rev. Biochem. 17, **1984**, 1
- Vernet, T.; Tessier, D. C.; Chatellier, J.; Plouffe, C.; Lee, T. S.; Thomas, D. Y.; Storer, A. C.; Menard, R.,
J. Biol. Chem. 270, **1995**, 16645 - 16652
- Vijayakumar, S.; Ravishanker, G.; Pratt, R. F.; Beveridge, D. L.,
J. Am. Chem. Soc. 117, **1995**, 1722 - 1730
- Virden, R.; Tan, A. K.; Fink, A. L.,
Biochemistry 29, **1990**, 145 - 153

Wang, M. -S.; Gandour, R. D.; Haslam, J. L.; Schowen, R. L.,
Bioorg. Chem. 4, **1975**, 392-403

Wehner, A.,
Dissertation Universität Marburg **1993**

Wehner, A.; Harms, E.; Jennings, M. P.; Beacham, I. R.; Derst, C. Bast, P.; Röhm, K. H.,
Eur. J. Biochem. 208, **1992**, 475 - 480

Wei, Y,
Nat. Struct. Biol. 2, **1995**, 218-223

Weiner, S. J.; Kollmann, P. A.; Case, D. A.; Singh, U. C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Profeta, S. Jr.;
Weiner, P. J.
J. Am. Chem. Soc. 106, **1984**, 765-784

Weiner, S. J.; Singh, C.; Kollmann, P. A.,
J. Am. Chem. Soc. 107, **1985**, 2219 - 2229

Williams, I. H.,
J. Am. Chem. Soc. 109, **1987**, 6299-6307

Williams, I. H.; Spangler, D.; Femec D. A.; Maggiora, G. M., Schowen, R. L.,
J. Am. Chem. Soc. 105, **1983**, 31

Williams, I. H.; Spangler, D.; Maggiora, G. M., Schowen, R. L.,
J. Am. Chem. Soc. 107, **1985**, 7717

Willis, R. C.; Woolfolk, C. R.,
J. Bacteriol. 118, **1974**, 231 - 241

Xu, Y.; Soto, G.; Hirsch, K. R.; Pratt, R. F.,
Biochemistry 35, **1996**, 3595 - 3603

Zhou, G. W.; Guo, J.; Huang, W.; Fletterick, R. J.; Scanlan, T. S.,
Science 237, **1994**, 909-913

8. Abkürzungsverzeichnis

a. bidest	Bidestilliertes Wasser
α - ³⁵ S-dATP	Desoxyadenosin-5' (α -thio)-triphosphat
Abb	Abbildung
a. dest	Einfachdestilliertes Wasser
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	L-Asparaginsäure- β -hydroxamat
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CHES	2-[N-Cyclohexylamino]ethansulfonsäure
ddNTP	Didesoxyribonukleotide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
D ₂ O	Deuteriumoxid
DON	6-Diazo-4-oxonorleucin
DONV	5-Diazo-4-oxonorvalin
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	Schnelle Flüssigkeits Chromatographie
GuHCl	Guanidin Hydrochlorid
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-hydroxy]propansulfonsäure
I	Intensität
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
Kap	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani

MES	2-[N-Morpholino]-ethansulfonsäure
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
NADH	Nicotinamid-adeninukleotid (reduziert)
NMR	Kernspinresonanz
OD	Optische Dichte
p.a.	per analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	Einzelstrang-DNA
Tab	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TFB	Transformationspuffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp

Zudem wurden die üblichen Ein- und Dreibuchstabencodes der Aminosäuren, sowie der Einbuchstabencode für Nukleotide verwendet.

9. Danksagung

Herrn Prof. K. H. Röhm, unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit entstand, danke ich für die interessante Themenstellung und die immerwährende Unterstützung.

Allen Mitgliedern des 3. Stockwerkes danke ich für das sehr gute Miteinander und den Spaß den wir auch bei der Arbeit hatten.

Bei Herrn J. Henseling möchte ich mich für die Unterstützung bei zahlreichen Aktivitätsmessungen bedanken.

Meinen Eltern möchte ich sehr herzlich für ihre moralische und finanzielle Unterstützung während des Studiums danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Barbara