



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Chemie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters

Zum Katalysemechanismus der humanen Blutgruppe B Galactosyltransferase

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Nora Sindhuwinata
aus Düsseldorf

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christian G. Hübner

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26.03.2012

Meinen Eltern, meinem Bruder
und Marcus

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	XIII
Abstract	XV
1 Einleitung	1
1.1 Glycobiologie.....	1
1.2 Glycosyltransferasen	2
1.2.1 Katalysierte Reaktionen	2
1.2.2 Klassifikation und Strukturen.....	3
1.2.3 Katalysemechanismen	4
1.2.4 Bedeutung von Glycosyltransferaseinhibitoren	7
1.3 Humane Blutgruppen A und B Glycosyltransferasen	8
1.3.1 Das AB0-Histo-Blutgruppensystem.....	8
1.3.2 Strukturelle Eigenschaften	10
1.3.3 Ligandenbindung	13
1.3.4 Enzymatische Hydrolyse von UDP-Galactose	14
1.4 Zielsetzung.....	16
2 Materialien und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Gebrauchsmaterialien	21
2.1.3 Säulenmaterialien	22
2.1.4 Geräte	22
2.1.5 Plasmid.....	23
2.1.6 Bakterienstamm	24
2.2 Proteinsynthese	24
2.2.1 Kulturmedien	24
2.2.2 Anlegen von Glycerinkulturen	26
2.2.3 Synthese von unmarkierter GTB	26
2.2.4 Synthese von isotopenmarkierter GTB.....	26
2.3 Proteinreinigung	27
2.3.1 Reinigungspuffer	27
2.3.2 Zellaufschluss.....	27
2.3.3 Ionenaustauschchromatographie mit SP-Sepharose	27

2.3.4	Affinitätschromatographie mit UDP-Hexanolamin-Sepharose	28
2.3.5	Dialyse	29
2.4	Proteinanalytik	30
2.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	30
2.4.2	Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford	31
2.4.3	Spektroskopische Proteinbestimmung	31
2.4.4	Aktivitätstest	31
2.5	Ligandenbindung	33
2.6	Isotherme Titrationskalorimetrie	34
2.6.1	Grundlagen der ITC	34
2.6.2	ITC-Experimente	36
2.7	Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie	38
2.7.1	Grundlagen der SPR-Spektroskopie	38
2.7.2	SPR-Experimente	40
2.8	Enzymkinetik	42
2.8.1	Grundlagen der Enzymkinetik	42
2.8.2	Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse von UDP-Galactose	44
2.9	NMR-Spektroskopie	47
2.9.1	Theoretische Grundlagen der NMR-Spektroskopie	47
	1D-NMR-Spektroskopie und spektrale Parameter	48
	Das HSQC-Experiment	49
	Die TROSY-Technik	49
	Tripelresonanzexperimente	50
	STD-NMR-Spektroskopie	51
2.9.2	NMR-Experimente mit UDP-6-biotinyl-Gal	52
2.9.3	Bestimmung von K_D -Werten mittels STD-NMR-Spektroskopie	53
2.9.4	Protein-NMR-Experimente mit der GTB	54
	Kontrolle der GTB und Ermittlung experimenteller Bedingungen	54
	Zuordnungsexperimente	56
3	Ergebnisse	59
3.1	Enzymatische Hydrolyse von UDP-Galactose	59
3.1.1	Präparation der GTB	59
3.1.2	Radiochemische Assays	60
	Etablierung des Protokolls	60
	Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Hydrolyse	62
	Bestimmung enzymkinetischer Konstanten	63
3.2	Charakterisierung der Ligandenbindung an die GTB	66
3.2.1	Präparation der GTB	66
3.2.2	Isotherme Titrationskalorimetrie	67
3.2.3	Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie	71
3.2.4	STD-NMR-Spektroskopie	77
3.3	Protein-NMR-Spektroskopie	77

3.3.1	Präparation der GTB	78
3.3.2	Ermittlung geeigneter experimenteller Bedingungen	84
3.3.3	Aufnahme und Auswertung von Spektren für die Signalzuordnung	87
4	Diskussion	93
4.1	Präparation von unmarkierter GTB	93
4.2	Enzymatische Hydrolyse von UDP-Galactose.....	94
4.3	Charakterisierung der Ligandenbindung.....	97
4.4	Protein-NMR-Spektroskopie.....	106
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	110
5	Literaturverzeichnis	113
6	Anhang	127
	Publikationen	143
	Danksagung	147

Abkürzungsverzeichnis

3DD	α -L-Fucp-(1,2)- β -D-(3-desoxy)-Galp-(1,O)-(CH ₂) ₇ CH ₃
α -1,3-GalT	α -1,3-Galactosyltransferase
β -ME	β -Mercaptoethanol
A	Aktivität
A_{260} , A_{280}	Absorption bei 260 nm bzw. 280 nm
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
BGG	Bovines Gammaglobulin
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Bovines Serumalbumin
CAZy	<i>engl.</i> Carbohydrate-Active Enzymes
CIL	Cambridge Isotope Laboratories
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
dpm	<i>engl.</i> disintegrations per minute, Zerfälle pro Minute
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fc	<i>engl.</i> flow cell, Flusszelle
FID	<i>engl.</i> free induction decay, freier Induktionszerfall
FT	Fouriertransformation
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
Gal-1,2-P	Galactose-1,2-Cyclophosphat
GalNAc	N-Acetyl-D-Galactosamin
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GT	Glycosyltransferase
GTA	humane α -1,3-N-Acetylgalactosaminyltransferase, humane Blutgruppe A Glycosyltransferase
GTB	humane α -1,3-Galactosyltransferase, humane Blutgruppe B Glycosyltransferase, humane Blutgruppe B Galactosyltransferase
H-Dis	H-Disaccharid, α -L-Fucp-(1,2)- β -D-Galp-
H-Dis-octyl	α -L-Fucp-(1,2)- β -D-Galp-(1,O)-(CH ₂) ₇ CH ₃
HS-PEG-COOH	α -Thio- ω -carboxy-poly(ethylenglycol)
HSQC	<i>engl.</i> heteronuclear single quantum correlation
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid

ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
Lb	Linienverbreiterungsfaktor
LB	Luria-Bertani
LgtC	Lipopolysaccharyl- α -1,4-Galactosyltransferase C
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NA	NeutrAvidin [®]
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>engl.</i> nuclear magnetic resonance, kernmagnetische Resonanz
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OtsA	Trehalose-6-Phosphat-Synthase
P	Phosphateinheit
ppm	<i>engl.</i> parts per million, Teile pro Million
rpm	<i>engl.</i> rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RU	<i>engl.</i> resonance units, Resonanzeinheiten
SA	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
S _N 1	unimolekulare nucleophile Substitution
S _N 2	bimolekulare nucleophile Substitution
S _N i	innere nucleophile Substitution
SP	Sulfopropyl-
SPR	<i>engl.</i> surface plasmon resonance, Oberflächen-Plasmonen-Resonanz
STD	Sättigungstransfer-Differenz
STD-AF	STD-Amplifikationsfaktor
SV	Säulenvolumen, Säulenvolumina
TB	<i>engl.</i> Terrific Broth
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	<i>engl.</i> transverse relaxation-optimized spectroscopy
TSP-d ₄	3-(Trimethylsilyl)-1-propionsäure-2,2,3,3-d ₄
u	uniform markiert
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDP-6-biotinyl-Gal	UDP-6-biotin- ϵ -amidocaproylhydrazino- α -D-Galactose
UDP-Gal	UDP- α -D-Galactose
UDP-GalNAc	UDP- <i>N</i> -Acetyl- α -D-Galactosamin
UDP-Glc	UDP- α -D-Glucose
UDP-Hex	UDP-Hexanolamin-Sepharose
UMP	Uridin-5'-monophosphat
VA	Volumenaktivität

Aminosäuren

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

Zusammenfassung

Glycosyltransferasen (GTs) sind an der Biosynthese von Oligosacchariden, Polysacchariden und Glycokonjugaten beteiligt. Diese Biomoleküle erfüllen essentielle Funktionen, die von der Strukturgebung über Energiespeicherung bis zur Signaltransduktion reichen. GTs kommen in allen lebenden Organismen vor und ihre Gene machen etwa 1-2 % eines Genoms aus. Dies hebt die große Bedeutung dieser Enzyme hervor. Sie katalysieren spezifisch den Transfer einer Zuckereinheit von einem aktivierten Donorzucker auf einen Akzeptor, wobei die Reaktion unter Inversion oder Retention der Konfiguration an dem glycosidischen Kohlenstoffatom stattfinden kann. Während der Mechanismus invertierender GTs weitestgehend aufgeklärt ist, ist der konfigurationserhaltender GTs immer noch unbekannt. Kristallstrukturen zeigen, dass es zwei flexible Schleifen gibt, die bei der Substratbindung Konformationsänderungen durchlaufen. Dies kann als Wechsel von einem offenen in einen geschlossenen Zustand angesehen werden. Über die Dynamik der GTs im freien und gebundenen Zustand ist jedoch kaum etwas bekannt. Es ist daher von großem Interesse, neue Erkenntnisse zu der Funktionsweise von GTs zu gewinnen. Die Zugänglichkeit von GTs ist aufgrund ihrer häufigen Membranständigkeit nicht einfach. Obwohl mittlerweile viele Tausend Gene bekannt sind, die für GTs codieren, sind nur knapp hundert Strukturen aufgeklärt. Die humane Blutgruppe B Galactosyltransferase (GTB) gehört zu der geringen Anzahl humaner GTs, deren Struktur bekannt ist. Sie katalysiert den Transfer einer Galactoseeinheit von UDP- α -D-Galactose (UDP-Gal) auf das H-Antigen und damit den letzten Schritt der Synthese des Blutgruppe B-Antigens. Die Reaktion verläuft konfigurationserhaltend und benötigt ein bivalentes Kation, Mn^{2+} oder Mg^{2+} . Die Verfügbarkeit rekombinanter, in *E. coli* exprimierbarer Gene, macht die GTB für systematische Studien zugänglich. Sie kann daher auch als Modell für konfigurationserhaltende GTs angesehen werden.

Aus vorangehenden Untersuchungen ist bekannt, dass GTB in Abwesenheit eines Akzeptorsubstrats die Hydrolyse von UDP-Gal zu UDP und α -D-Gal katalysiert. Diese Reaktion verläuft wie die Transferreaktion konfigurationserhaltend und bietet damit die Möglichkeit, bisher unbekannte und durch die natürliche Transferreaktion nicht erschließbare Aspekte des Katalysemechanismus zu untersuchen. Eine frühere Studie zeigte, dass sich die Hydrolysereaktion durch ein Akzeptoranalogue, das zwar wie der Akzeptor gebunden wird, aber nicht als solcher fungiert, beschleunigen lässt. Diesem Befund wurde im ersten Teil der Arbeit mit der Bestimmung enzymkinetischer Konstanten nachgegangen, wofür die Etablierung eines radiochemischen Assays notwendig war. Die Studien wurden sowohl mit Mn^{2+} als auch mit Mg^{2+} durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Beschleunigung der Hydrolysereaktion durch das Akzeptoranalogue von einer reduzierten Michaelis-Konstante (K_M) resultierte und es keinen signifikanten Einfluss auf die maximale Umsatzrate (k_{kat}) gab. Die K_M -Werte, die in Gegenwart von Mn^{2+} ermittelt wurden, lagen bei ebenfalls gleichbleibendem k_{kat} etwa eine Größenordnung unter denen, die mit Mg^{2+} bestimmt wurden. Ergebnisse aus dem zweiten Teil dieser Arbeit zeigten, dass bei der Substratbindung an die GTB positive kooperative Effekte auftreten. Die Anwesenheit des einen Substrats erhöht die Affinität des zweiten. Diese Resultate sind

konsistent mit den aus den Kristallstrukturen bekannten Konformationsänderungen. Mit der Einnahme der geschlossenen Konformation konnte die Ausbildung zusätzlicher Wechselwirkungen beobachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte kalorimetrische Untersuchungen ergaben, dass die Substratbindung mit negativen (günstigen) Enthalpieänderungen und positiven (ungünstigen) Entropieänderungen erfolgt. Diese Art von Veränderungen könnten auf die Ausbildung einer rigideren und kompakteren Proteinstruktur bei Ligandenbindung zurückzuführen sein. Es lässt sich auf einen generellen Mechanismus schließen, mit dem GTs eine gezielte Auswahl ihrer Substrate treffen können.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Ligandenbindung an die GTB. Sie wurde durch die Ermittlung von Affinitätskonstanten und thermodynamischen Parametern näher charakterisiert. Die Bestimmung fand mittels isothermer Titrationskalorimetrie, Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie und STD-NMR-Spektroskopie statt. Neben den bereits erwähnten kooperativen Effekten konnte gezeigt werden, dass die Donorbindung in Gegenwart von Mn^{2+} wesentlich affiner ist, als in Gegenwart von Mg^{2+} . Die Dissoziationskonstanten liegen übereinstimmend mit den K_M -Werten der Hydrolysereaktion mit Mn^{2+} im mikromolaren Bereich, während sie mit Mg^{2+} im millimolaren Bereich liegen. Die Detektion eines Unterschieds ist nicht unerwartet, da die Phosphatreste das bivalente Kation im aktiven Zentrum koordinieren. Die Bindung des Akzeptorsubstrats wird nicht messbar durch das bivalente Kation beeinflusst. Die mit den genannten Methoden bestimmten Konstanten zeigten untereinander und auch mit den mittlerweile veröffentlichten Daten aus massenspektrometrischen Bindungsstudien eine gute Übereinstimmung. Mit den ermittelten Rahmenbedingungen steht nun ein Methodenspektrum für weitere Studien der Liganden- und Inhibitorbindung an GTB und weitere GTs zur Verfügung.

Dynamische Prozesse sind maßgeblich für die Funktionsweise von Enzymen verantwortlich. Eine geeignete Methode für ihre Untersuchung ist die NMR-Spektroskopie, mit der in atomarer Auflösung und über eine Zeitskala von Pikosekunden bis Sekunden Bewegungen erfasst werden können. Sie bietet darüber hinaus die Möglichkeit, Protein-Ligand-Wechselwirkungen von der Proteinseite aus zu betrachten und damit Einblicke in den Katalysemechanismus zu gewähren. Für diese biomolekularen NMR-Techniken ist eine zumindest partielle Zuordnung der Proteinresonanzen zu den entsprechenden Aminosäureresten sowie eine gezielte Präparation isotoopenmarkierter GTB erforderlich. Der dritte Teil dieser Arbeit widmet sich daher der Herstellung isotoopenmarkierter GTB-Proben und der Aufnahme erster Protein-NMR-Spektren. Es wurden zunächst uniform ^{15}N -, uniform ^2H , ^{15}N - und uniform ^2H , ^{13}C , ^{15}N -markierte GTB hergestellt. Nach der Ermittlung geeigneter experimenteller Bedingungen, konnten Tripelresonanzexperimente zur Signalzuordnung durchgeführt werden. Aufgrund dem für NMR-Verhältnisse mit 69 kDa recht großen GTB-Dimer waren Sensitivität und Auflösung der Spektren nicht derart, dass mit ihnen allein eine Signalzuordnung vorgenommen werden konnte, wie es gewöhnlich bei kleineren Proteinen unter 20-30 kDa der Fall ist. Es werden zusätzliche experimentelle Strategien für die Signalzuordnung benötigt, wie die selektive Isotoopenmarkierung und die Verwendung paramagnetischer Relaxationsverstärker. Ihre Anwendung wurde erprobt und weitere Möglichkeiten wurden diskutiert.

Abstract

Glycosyltransferases (GTs) are involved in the biosynthesis of oligosaccharides, polysaccharides and glycoconjugates. These biomolecules have essential functions ranging from structural roles and energy storage to signal transduction. GTs are present in all living organisms and are encoded by 1-2 % of the genes of each genome, which further emphasizes the importance of this class of enzymes. They catalyze the specific transfer of a sugar moiety from an activated donor sugar to an acceptor either with retention or inversion of the configuration of the anomeric center of the donor sugar. While the catalytic mechanism of inverting GTs is mainly understood, the mechanism of retaining GTs is still a matter of debate. Crystal structures revealed two flexible loops, which undergo conformational changes from an open to a closed conformation upon substrate binding. In addition to these static structures nearly nothing is known about the dynamics of GTs in the free and bound state. Therefore, it is of great interest to gain further insights into the mode of action of GTs.

Because GTs are often membrane-bound they are usually not easily accessible. This can be seen by the fact that although several thousand genes are known that encode GTs, only about hundred structures are solved to date. The human blood group B galactosyltransferase (GTB) is one of very few human GTs with a known structure. GTB is a retaining GT and catalyzes the last step in the formation of blood group B antigens by transferring galactose from UDP- α -D-galactose (UDP-Gal) to an H antigen acceptor. A bivalent cation, Mn^{2+} or Mg^{2+} , is required for enzymatic activity. As the synthesis of a recombinant and soluble form of GTB is possible in *E. coli*, GTB is accessible for systematic studies. This enzyme could be seen as a model for retaining GTs.

It is known from earlier studies that GTB catalyzes the hydrolysis of UDP-Gal to UDP and α -D-Gal in the absence of an acceptor substrate, also with retention of the configuration of the anomeric center of the donor sugar. This reaction offers the opportunity to gain insights into so far unknown aspects of the catalytic mechanism that are not accessible by analyzing the normal transfer reaction. Previous experiments showed that binding of an acceptor analog accelerates enzymatic hydrolysis. This acceptor analog binds in the same fashion as the natural acceptor, but is not able to function as an acceptor due to the lack of the essential hydroxyl group at the C3 position of the galactose moiety. In the first part of this thesis the influence of the acceptor analog on enzymatic hydrolysis was quantitatively analyzed by determining enzyme kinetic constants. For this purpose it was necessary to establish a radiochemical assay. Studies were performed with Mn^{2+} and Mg^{2+} , respectively. It could be shown that the observed acceleration of enzymatic hydrolysis was caused by the presence of the acceptor analog, which led to lower Michaelis constants (K_M) whereas no significant influence on the turnover numbers (k_{kat}) could be detected. K_M values determined in the presence of Mn^{2+} were about one order of magnitude lower than those determined with Mg^{2+} . k_{kat} values were in the same range again. Results from the second part of this thesis demonstrated positive cooperative effects occurring during substrate binding to GTB. The presence of one substrate enhances the affinity for the second sub-

strate. This is in agreement with conformational changes known from the crystal structures. In the closed conformation additional interactions between enzyme and substrates were observed. Isothermal titration calorimetry experiments showed that substrate binding results in negative (favorable) enthalpy changes and positive (unfavorable) entropy changes. This observation can be explained by the formation of a more rigid and compact protein structure upon ligand binding and may be a general feature of substrate binding to GTs.

The second part of this thesis deals with ligand binding to GTB that was further characterized by determining affinity constants and thermodynamic parameters. For this purpose isothermal titration calorimetry, surface plasmon resonance spectroscopy and STD-NMR spectroscopy have been applied. In addition to the described cooperative effects it could be shown that donor binding is much stronger in the presence of Mn^{2+} than in the presence of Mg^{2+} . In accordance with the K_M values of the enzymatic hydrolysis reaction, dissociation constants are in the micromolar range with Mn^{2+} and in the millimolar range with Mg^{2+} . The detection of a difference is not unexpected as the phosphate moieties of the donor substrate coordinate the bivalent cation in the active site. An influence of the bivalent cation on acceptor binding could not be detected. Dissociation constants determined with the different methods were in good agreement with each other and with values that have been determined by others with mass spectrometry during the course of these studies. With the conditions identified in this work there is now an array of methods available to study ligand and inhibitor binding to GTB and other GTs.

Dynamic processes are mainly responsible for the function of enzymes. NMR spectroscopy provides the opportunity to study dynamics over a wide range of timescales from picoseconds to seconds at atomic resolution. Additionally, it is possible to identify ligand binding sites using protein NMR experiments. In combination, such techniques can give insights into protein dynamics during catalysis. This would greatly enhance the understanding of the GT mechanism. For such protein-based NMR techniques at least a partial assignment of the protein resonances is required. Therefore, preparation of isotopically labeled GTB is needed. In the third part of this thesis the synthesis of isotopically labeled GTB and the first protein NMR spectra are described. Initially, uniformly ^{15}N -, 2H , ^{15}N - and 2H , ^{13}C , ^{15}N -labeled GTB samples were prepared. After determination of suitable experimental conditions triple resonance spectra were recorded for resonance assignment. As the 69 kDa GTB dimer is a very large protein for NMR spectroscopy, sensitivity and resolution of the spectra did not allow straightforward assignment as this is usually possible for smaller proteins with molecular weights below 20-30 kDa. This study clearly showed that protein assignment will require additional experimental strategies such as selective isotope labeling or paramagnetic relaxation enhancement. Therefore, a number of key-experiments were performed to show the feasibility of these approaches.

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit „Zum Katalysemechanismus der humanen Blutgruppe B Galactosyltransferase“ liefert wesentliche neue Erkenntnisse zu der Funktionsweise der humanen Blutgruppe B Galactosyltransferase (GTB) und bereitet den Weg für zukünftige Untersuchungen hin zu der Aufklärung des Katalysemechanismus dieser Klasse von Enzymen.

Die Darlegung erfolgt in vier Kapiteln. Einleitend wird die Bedeutung der GTB in den biologischen Gesamtzusammenhang gebracht und der Stand der Forschung dargestellt. Das einleitende Kapitel schließt mit der Zielsetzung. Das zweite Kapitel „Materialien und Methoden“ besteht aus Erläuterungen der verwendeten Methoden und den Angaben der zugehörigen experimentellen Bedingungen. Im dritten Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchung von kooperativen Effekten bei der Ligandenbindung und Katalyse, der Ermittlung thermodynamischer Parameter und zuletzt der Protein-NMR-Spektroskopie der GTB gezeigt und erläutert. Die Ergebnisse werden im vierten Kapitel diskutiert, in dem abschließend ein Ausblick auf fortführende Projekte gegeben wird.

1.1 Glycobiologie

Die Glycobiologie befasst sich im weitesten Sinn mit der Rolle von Zuckern in biologischen Systemen. Sie beschäftigt sich mit der Struktur, der Chemie, der Biosynthese und der Funktion von Zuckerstrukturen, den Glycanen, und ihren Konjugaten sowie mit den Proteinen, die sie erkennen, auf- oder abbauen [1]. Kohlenhydrate stellen neben Proteinen, Nucleinsäuren und Lipiden eine der Hauptklassen der Biomoleküle dar. Die große Anzahl an natürlich vorkommenden Monosacchariden und die Möglichkeit unterschiedliche glycosidische Bindungen zwischen ihnen auszubilden führt zu einer enormen Vielfalt an Oligo- und Polysacchariden. Glycane kommen sowohl als separate Einheiten als auch in sogenannten Glykokonjugaten vor, in denen sie kovalent an weitere Biomoleküle, z. B. Proteine oder Lipide, gebunden sind [2]. Wie ihre Strukturen sind die biologischen Funktionen von Glycanen sehr divers und reichen von nicht-essentiellen hin zu lebenswichtigen Aufgaben. Auch können sie unterschiedliche Funktionen in unterschiedlichen Zellen und Entwicklungsstadien besitzen, sodass eine Vorhersage ihrer Aufgabe äußerst schwierig und in vielen Fällen noch nicht bekannt ist. Einige generelle Funktionen lassen sich dennoch benennen. Glycane kommen in allen lebenden Organismen vor. Sie sind unter anderem wichtige strukturgebende Faktoren für Zellen und Zellverbände und übernehmen sowohl bei eukaryotischen als auch bei prokaryotischen Zellen eine Schutzfunktion. Glycane sind am Energiestoffwechsel beteiligt, beeinflussen Stabilität und Struktur der Glykokonjugate und spielen eine zentrale Rolle bei molekularen und zellulären Interaktionen [3]. Veränderte Glycanmuster finden sich bei der Entstehung und Progression von Krankheiten wie Krebserkrankungen wieder [1,4]. Darüber hinaus stellen Glycane Epitope dar, die sowohl für die Modulation der Immunantwort als auch für die Suszeptibilität und Resistenz gegenüber Pathogenen wichtig sind [1,5,6]. Die meist sehr komplexe Struktur der Kohlenhydrate wird nicht

durch eine Matrize bestimmt wie bei Proteinen und Nucleinsäuren, sondern durch die Substrat- und Reaktionsspezifität einer großen Anzahl individueller Enzyme. Unter ihnen befinden sich Glycosidasen und Glycosyltransferasen (GTs) sowie eine Reihe weiterer Glycan-modifizierender Enzyme.

1.2 Glycosyltransferasen

Obwohl man sich der Bedeutung der Kohlenhydrate für die unterschiedlichsten biologischen Funktionen bewusst ist, war lange Zeit sehr wenig über die mechanistischen Details der GTs bekannt. Erst durch rekombinante DNA-Technologien konnten die Probleme der geringen Verfügbarkeit und Stabilität weitestgehend überwunden werden, wodurch sich die Forschung an GTs enorm weiterentwickelt hat [7]. Jedoch sind GTs im Vergleich zu den z.B. sehr gut beschriebenen Proteasen und Proteinkinasen immer noch wesentlich schlechter charakterisiert.

1.2.1 Katalysierte Reaktionen

GTs katalysieren den Transfer eines Monosaccharids von einem aktivierten Donorzucker auf einen Akzeptor (Abbildung 1.1). Am häufigsten werden mit etwa 90 % Nucleotidzucker als aktivierte Zucker verwendet, man findet aber auch Dolicholphosphatmonosaccharide und unsubstituierte Phosphatzucker [8]. Die ebenfalls zu den GTs gehörenden Oligosaccharyltransferasen übertragen ganze Oligosaccharideinheiten von einem Dolicholphosphat oder Undecaprenylpyrophosphat auf einen Akzeptor [9,10]. Als Akzeptorsubstrate fungieren Mono- oder Oligosaccharide, Glycokonjugate, Lipide, Proteine, DNA oder weitere kleine organische Moleküle [1]. Bei Proteinen unterscheidet man die Bindung von Glycanen an Amidgruppen von Asparaginresten, die N-Glycosylierung, von der Bindung an Hydroxylgruppen von Serin- und Threoninresten, der O-Glycosylierung.

GTs sind in der Regel spezifisch für ihr Donor- und Akzeptorsubstrat und bilden nur eine bestimmte Verknüpfung aus. Sie arbeiten regio- und stereospezifisch. Durch den sukzessiven Einsatz mehrerer GTs kann so eine Vielzahl unterschiedlicher Glycanstrukturen bzw. Glycokonjugate entstehen.

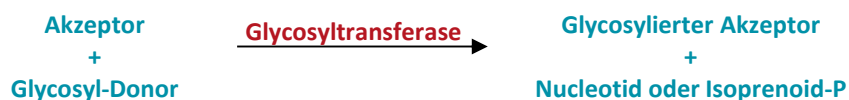


Abbildung 1.1: Allgemeine Darstellung einer Glycosylierungsreaktion. Als Glycosyl-Donoren dienen unter anderem CMP-*N*-Acetylneuraminsäure, GDP-Fucose, GDP-Mannose, UDP-Glucose, UDP-Galactose, UDP-Xylose, UDP-*N*-Acetylglucosamin, UDP-*N*-Acetylgalactosamin, UDP-Glucuronsäure, Dolichol-P-Glucose, Dolichol-P-Mannose, Dolichol-P-P-(Glucose₃-Mannose₉-*N*-Acetylgalactosamin₂) oder Undecaprenyl-P-P-*N*-Acetylmuraminsäure-pentapeptid-*N*-Acetylgalactosamin [1].

1.2.2 Klassifikation und Strukturen

Waren es vor vier Jahren noch ca. 33.000, so sind bis heute über 80.000 offene Leseraster von GTs identifiziert worden, die nach der Primärstruktur ihres Genprodukts in 91 Familien eingeteilt werden (CAZy database; Stand Dezember 2011) [11-13]. Sie machen etwa 1-2 % eines jeweiligen Genoms aus [1], was die große Bedeutung dieser Enzymfamilie zusätzlich unterstreicht. Trotz der großen Sequenzdiversität zeigen die 113 bisher ermittelten Strukturen bis auf wenige Ausnahmen (CAZy, [14]) drei grundsätzliche Faltungsmuster, die GT-A, GT-B und GT-C genannt werden (CAZy database; Stand Dezember 2011) [15-18]. Auch für viele uncharakterisierte GTs wird eine dieser Faltungsmuster vorhergesagt [16]. GTs vom GT-A Faltungstyp besitzen zwei nah beieinander liegende Rossmann-ähnliche Faltungen, typische Nucleotidbindungsstellen, die aus einer charakteristischen Anordnung von α -Helices und β -Faltblättern bestehen (Abbildung 1.2). Durch die kompakte Anordnung ergibt sich nur eine Domäne, jedoch sind die Bindungsstellen von Donor und Akzeptor klar voneinander getrennt. Die meisten GT-A Enzyme haben ein konserviertes DXD-Motiv (Asp-X-Asp), welches ein für die Donorbindung notwendiges zweiwertiges Kation koordiniert [16,19]. GTs vom GT-B Faltungstyp besitzen ebenfalls zwei Rossmann-ähnliche Faltungen, die aber flexibler miteinander verbunden sind (Abbildung 1.2). Zwischen den beiden Domänen liegt eine Spalte, in der sich das aktive Zentrum befindet. GT-B Enzyme sind unabhängig von Metallionen. Der dritte Faltungstyp GT-C wurde zunächst nur auf Basis von Sequenzanalysen vorhergesagt [18]. Mittlerweile wurden jedoch Strukturen aufgeklärt, die die Existenz dieser Faltung zeigen [20,21]. Enzyme vom GT-C-Faltungstyp sind in der Plasma- oder ER-Membran lokalisiert, besitzen mehrere Transmembranhelices und verwenden hauptsächlich Lipidphosphatzucker als Donorsubstrate [16]. In eukaryotischen Zellen sind viele GTs im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi lokalisiert und dort an der Glycosylierung von Zelloberflächenmolekülen und sekretorischen Molekülen beteiligt. Darüber hinaus kommen GTs im Cytoplasma, an der Plasmamembran und sogar im Zellkern vor [1,22].

Bis auf wenige Ausnahmen besitzen alle golgiständigen GTs den gleichen Aufbau (Abbildung 1.3) [1,7]. Sie gehören zu den Typ II Transmembranproteinen und bestehen aus einem kurzen N-terminalen cytoplasmatischen Schwanz, einer Transmembrandomäne gefolgt von einer

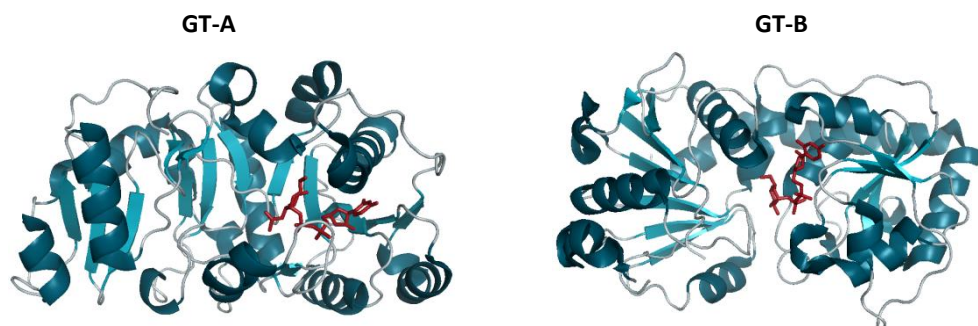


Abbildung 1.2: Grundsätzliche Faltungsmuster von GTs. Gezeigt sind katalytische GT-Domänen mit den Faltungsmustern GT-A und GT-B am Beispiel der β -1,2-*N*-Acetylglucosaminyltransferase I aus Kaninchen (GT-A; PDB ID: 1foa) und der β -Glucosyltransferase aus T4-Phagen (GT-B; PDB ID: 1j39) (nach: [1]). Gebundene Nucleotidzucker sind rot dargestellt.

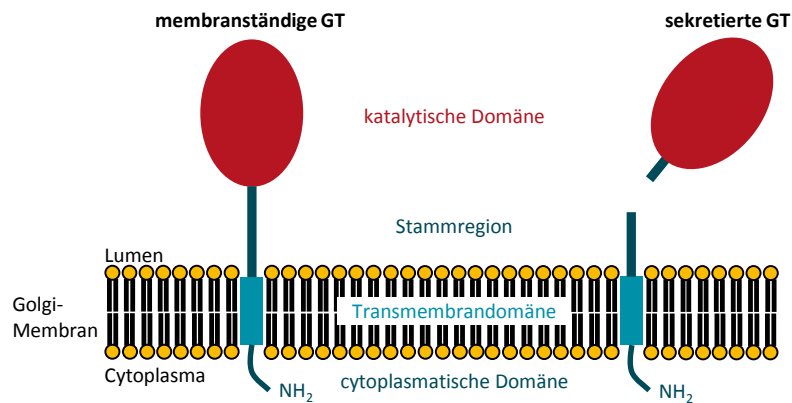


Abbildung 1.3: Typischer Aufbau einer golgiständigen GT.

Stammregion und einer großen C-terminalen katalytischen Domäne, die in das Golgilumen ragt. Lösliche Formen dieser GTs sind in Sekreten und Körperflüssigkeiten wie Milch oder Serum zu finden. Sie sind durch proteolytische Spaltung im Bereich der Stammregion aus den membranständigen GTs entstanden.

1.2.3 Katalysemechanismen

GTs übertragen ihren Donorzucker entweder unter Erhalt oder unter Umkehr der Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom (Abbildung 1.4). Man unterscheidet danach zwischen invertierenden und konfigurationserhaltenden GTs [23]. Diese Einteilung ist gänzlich unabhängig von dem gegebenen Faltungstyp (s. 1.2.2). Es wurden sowohl invertierende als auch konfigurationserhaltende GTs mit GT-A-Faltung bzw. GT-B-Faltung identifiziert [12].

Der Mechanismus invertierender GTs ist gut untersucht [16]. Wie auch bei invertierenden Glycosidasen läuft die Reaktion ähnlich einer einstufigen bimolekularen nucleophilen Substitution (S_N2) ab (Abbildung 1.5). Die entsprechende Hydroxylgruppe des Akzeptors greift das anomere Kohlenstoffatom des Donors nucleophil von der einen Seite an, während sich die Abgangsgruppe des aktivierten Zuckers auf der entgegengesetzten Seite befindet. Eine bestimmte Sei-

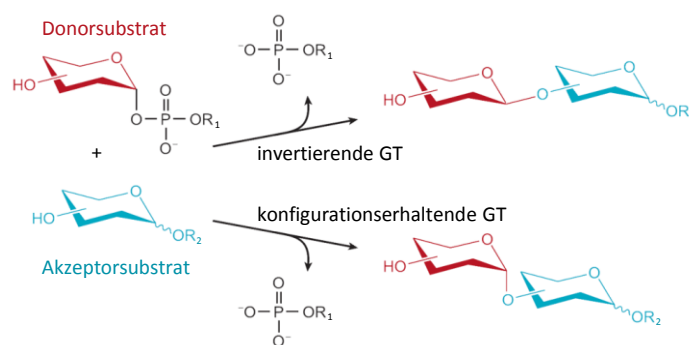


Abbildung 1.4: Glycosylierungsreaktionen von invertierenden und konfigurationserhaltenden GTs. R_1 und R_2 sind Reste von Donor- bzw. Akzeptorsubstrat. (nach [16])

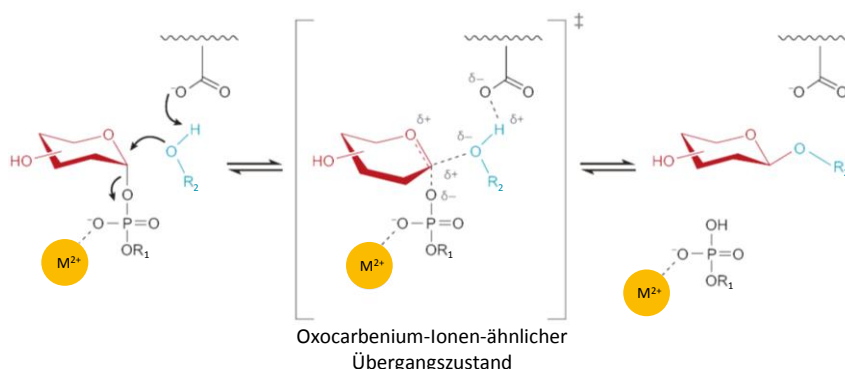


Abbildung 1.5: Katalysemechanismus invertierender GTs. Die Reaktion läuft S_N2 -ähnlich über einen Oxocarbenium-Ionen-ähnlichen Übergangszustand ab. Gezeigt ist ein Beispiel einer metallionenabhängigen GT. R_1 und R_2 sind Reste von Donor- bzw. Akzeptorsubstrat. (nach [16])

tenkette im aktiven Zentrum der GT fungiert dabei als katalytische Base, die das Nucleophil deprotoniert. Ein divalentes Kation oder ein weiterer Aminosäurerest stabilisiert als Lewis-Säure die Abgangsgruppe.

Der Katalysemechanismus konfigurationserhaltender GTs ist wesentlich schlechter charakterisiert und bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Diskutiert werden ein doppelter S_N2 -Mechanismus und ein S_Ni -ähnlicher Mechanismus (Abbildung 1.6) [16]. Bei einer doppelten Substitution greift in einem ersten Schritt eine nucleophile Seitenkette des Enzyms das anomere Kohlenstoffatom des Donorzuckers an und bildet ein Glycosyl-Enzym-Intermediat. In einem zweiten Schritt greift der Akzeptor das Intermediat an und es wird ein Produkt freigesetzt, das an dem übertragenen anomeren Kohlenstoffatom die gleiche Konfiguration wie das Substrat besitzt (Abbildung 1.6 A). Bei einem S_Ni -Mechanismus (innere nucleophile Substitution) finden der nucleophile Angriff der Hydroxylgruppe des Akzeptors auf das anomere Kohlenstoffatom des Donors und der Bindungsbruch zu der Abgangsgruppe auf der gleichen Seite des Zuckerrings statt. Diese Reaktion könnte konzertiert oder schrittweise über ein extrem kurzlebiges Intermediat ablaufen (Abbildung 1.6 B, C) [24].

Erkenntnisse aus den Untersuchungen von Glycosidasen legen eine doppelte Substitutionsreaktion nahe [25]. Bei einigen GTs, wie der bovinen α -1,3-Galactosyltransferase (α -1,3-GalT) oder den humanen Blutgruppen-GTs, wurden geeignete funktionelle Gruppen in den aktiven Zentren identifiziert, die als Nucleophil dienen könnten [26,27]. Studien mittels Massenspektrometrie (MS) [28], „chemical rescue“ [29] und theoretischen Berechnungen [30] geben ebenfalls Hinweise auf die Bildung eines Glycosyl-Enzym-Intermediats. Die MS-Untersuchungen von Soya et al. gehören neben ähnlichen Experimenten von Lairson et al. [31] zu den wenigen, bei denen sogar direkt ein Zwischenprodukt nachgewiesen wurde. Dem entgegen steht, dass die Experimente mit Mutanten durchgeführt wurden und bisher kein einziges Zwischenprodukt mit einem Wildtyp detektiert wurde. Gründe hierfür könnten sowohl unpassende Methoden oder aber ein fehlendes nachweisbares Intermediat sein. Auch eine endgültige Identifikation eines katalytischen Nucleophils ist bisher ausgeblieben [16]. Im Gegensatz zu den konfigurationserhaltenden Glycosidasen, wurden bei den GTs keine konservierten Struktur motive gefunden.

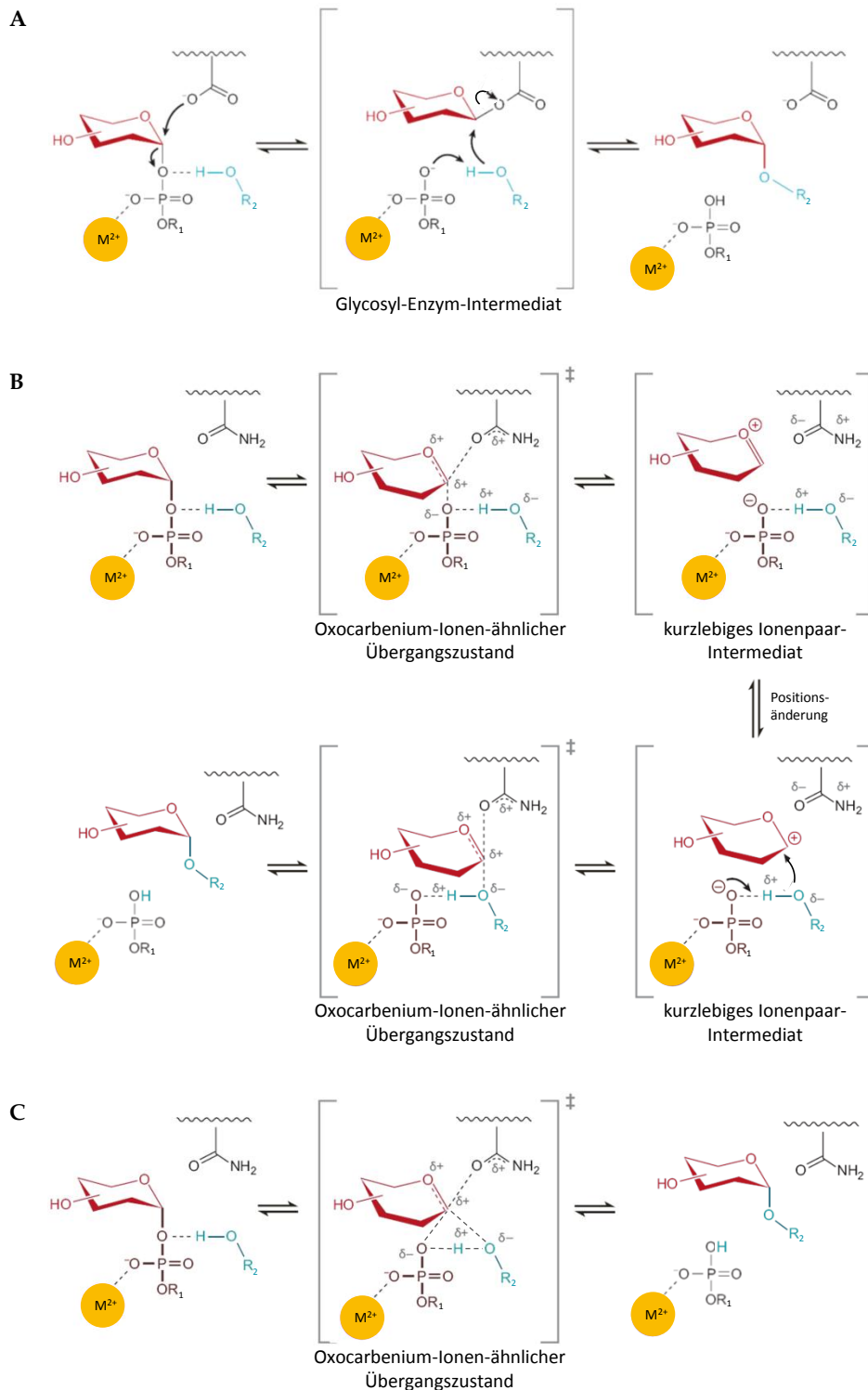


Abbildung 1.6: Mögliche Katalysiemechanismen konfigurationserhaltender GTs. Gezeigt ist ein Beispiel einer metallionenabhängigen GT. R_1 und R_2 sind Reste von Donor- bzw. Akzeptorsubstrat. **(A)** Doppelter S_N2 -Mechanismus, bei dem durch zweifache Inversion die Konfiguration des anomeren Kohlenstoffatoms erhalten bleibt. **(B), (C)** Zwei vorgeschlagene S_Ni -ähnliche Mechanismen. Die Reaktion könnte schrittweise über ein sehr kurzlebiges Ionenpaarintermediat ablaufen oder konzertiert. (nach [16,31])

Vor allem aus diesem Grund wurde als Alternative der seltene S_Ni -ähnliche Mechanismus [32,33] vorgeschlagen [16,34]. Theoretische Berechnungen am Beispiel der Lipopolysaccharyl- α -1,4-Galactosyltransferase C (LgtC) zeigten die Plausibilität dieses Vorschlags [35]. Unterstützt wird das Vorliegen eines S_Ni -ähnlichen Mechanismus unter anderem durch die Kristallstruktur der LgtC [34] und durch Ergebnisse aus Untersuchungen weiterer GTs wie der Trehalose-Phosphorylase [36] oder der Trehalose-6-Phosphat-Synthase (OtsA) [24,37,38]. Insbesondere die neuesten Erkenntnisse aus verschiedenen Experimenten und Berechnungen mit der OtsA liefern starke Hinweise auf einen Mechanismus mit Vorderseitenangriff.

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse kann der Mechanismus konfigurationserhaltender GTs nicht als geklärt angesehen werden. Ein S_Ni -ähnlicher Mechanismus, konzertiert oder schrittweise, ist wahrscheinlich, jedoch bisher nur für wenige Enzyme untersucht. Dass eventuell andere GTs einen S_N2 -ähnlichen Mechanismus besitzen ist nicht auszuschließen. Es wäre ebenso denkbar, dass Mechanismen vorliegen, die sowohl S_N2 als auch S_Ni bzw. S_N1 -Charakter haben [16]. Der schrittweise S_Ni -Mechanismus ist z. B. eine besondere Form des S_N1 -Mechanismus mit einem extrem kurzlebigen Intermediat.

1.2.4 Bedeutung von Glycosyltransferaseinhibitoren

Wie in den vorangehenden Abschnitten beschrieben, haben Glycane und GTs eine sehr große Bedeutung bei sämtlichen biologischen Prozessen. Ihre Funktionen sind jedoch häufig nicht im Detail bekannt. Ein Ansatz zur Untersuchung von Glycosylierungen und deren Rolle in Zellen, Geweben oder Organismen stellt der Einsatz von GT-Inhibitoren bzw. GT-Modulatoren dar. GT-Mutationen oder das Abschalten von GT-Genen sind in vielen Fällen letal. Darüber hinaus sind spezifische Inhibitoren sowohl für therapeutische Anwendungen [39] als auch bei der Produktion von Glycokonjugaten mit speziellen Glycosylierungsmustern [40] von Interesse.

Bisher konnten trotz zahlreicher Bemühungen nur wenige Inhibitoren für GTs entwickelt werden und noch weniger hochspezifische Inhibitoren sind bekannt [41,42]. Substratanaloga stellen den überwiegenden Teil der Inhibitoren dar. Sie besetzen entweder die Donor- oder die Akzeptorbindungsstelle. Dabei ist die Spezifität bei Akzeptorsubstratanaloga höher als bei Donorsubstratanaloga, die Affinität meist geringer. Donorsubstratanaloga können ganze GT-Klassen, z. B. Galactosyltransferasen, blockieren. Sofern die entdeckten bzw. synthetisierten Moleküle überhaupt eine Bindung zeigten, lag die Affinität meist bestenfalls im Bereich des natürlichen K_M -Wertes. Die Entwicklung neuer Ansätze ist demnach erforderlich. Bisubstratanaloga, die beide Substratbindungsstellen belegen, könnten neben einer höheren Spezifität auch eine bessere Bindungsaffinität aufweisen [43]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wird das Enzym in einer katalytisch inaktiven Konformation blockiert [44]. Während die meisten Inhibitoren an das Enzym im Grundzustand binden, sind die Entwicklung von Übergangszustandsanaloga und Inhibitoren von katalytisch wichtigen Konformationsänderungen weitere vielversprechende Ansätze [45]. Das Screening von Bibliotheken kleiner Moleküle ist eine Möglichkeit neue Leitstrukturen für das Design von Inhibitoren zu identifizieren und in Bezug auf GTs bereits angewendet worden [46-48]

Entscheidend für ein zielgerichtetes Inhibitor-Design sind umfangreiche Kenntnisse über das Zielenzym. Neben der Strukturaufklärung wird ein besseres Verständnis des katalytischen Me-

chanismus, der Kinetik und Thermodynamik der Ligandenbindung sowie der Konformationsdynamik zu einer erfolgreicherer Entwicklung von GT-Inhibitoren führen.

1.3 Humane Blutgruppen A und B Glycosyltransferasen

Die große Bedeutung von Glycanen sowie die noch nicht vollständig geklärte Funktionsweise machen GTs zu einem sehr wichtigen und interessanten Forschungsgebiet. Auch die mit der Katalysereaktion in Zusammenhang stehenden Konformationsänderungen sind weitestgehend unbekannt. In dieser Arbeit wird die humane Blutgruppe B Galactosyltransferase behandelt, eine konfigurationserhaltende GT. Sie gehört zu einer der wenigen humanen GTs, deren Struktur bekannt ist. Die Verfügbarkeit rekombinanter, in *E. coli* exprimierbarer Gene machen dieses spezielle Enzym für systematische Studien zugänglich. Die meisten humanen GTs können (noch) nicht rekombinant hergestellt werden. Die humane Blutgruppe B Galactosyltransferase dient daher auch als Modell für konfigurationserhaltende GTs und wird nun im Folgenden näher beschrieben.

1.3.1 Das AB0-Histo-Blutgruppensystem

Das AB0-Histo-Blutgruppensystem gehört zu den wichtigsten Blutgruppensystemen der Transfusionsmedizin. Das erstmals 1901 von Karl Landsteiner beschriebene und ein Jahr später von von Decastello und Sturli erweiterte System umfasst die vier Blutgruppen A, B, 0 (Null) und AB [49,50]. Hierzu gehören weitere Subgruppen, die auf diesen Haupttypen basieren [51]. Die Blutgruppenantigene werden auf der Oberfläche von roten Blutkörperchen exprimiert, aber auch auf vielen weiteren Zellen verschiedener Epithelien. Darüber hinaus sind einige Gewebetypen in der Lage, die Blutgruppenderminanten zu sezernieren, sodass sie auch in Körperflüssigkeiten zu finden sind [1,52]. Individuen besitzen jeweils Antikörper in ihren Seren, die gegen die fehlenden Blutgruppenantigene gerichtet sind. Diejenigen mit Blutgruppe A haben anti-B-Antikörper, mit Blutgruppe B anti-A-Antikörper, mit Blutgruppe AB keine und mit Blutgruppe 0 sowohl anti-A als auch anti-B-Antikörper.

Mit der Identifizierung von Oligosacchariden als Determinanten des AB0-Systems wurde auch die Grundlage zur Charakterisierung der an der Biosynthese beteiligten GTs gelegt [53,54]. Die Blutgruppen A und B Glycosyltransferasen (GTA bzw. GTB für die humanen GTs) sind für die Synthese der A- und B-Antigene verantwortlich [55,56]. GTA und GTB sind auf dem AB0-Genlocus kodiert und verhalten sich kodominant zueinander. Sind beide Gene vorhanden, so werden sowohl A- als auch B-Antigene synthetisiert und es entsteht Blutgruppe AB. Personen mit der Blutgruppe 0 besitzen zwei defekte Allele, die durch Deletion oder Punktmutation aus den AB0-Genen entstanden sind [57].

Das H-Antigen bildet das Grundgerüst der Histo-Blutgruppenantigene. Individuen, die nur das H-Antigen bilden, haben Blutgruppe 0. Es besteht aus dem terminalen Disaccharid α -L-Fucp-(1,2)- β -D-Galp, das auch als H-Disaccharid (H-Dis) bezeichnet wird, und ist mit Glycolipiden oder Glycoproteinen verknüpft. Es werden fünf grundlegende H-Antigenstrukturen unterschieden (s. Abbildung 1.7) [58].

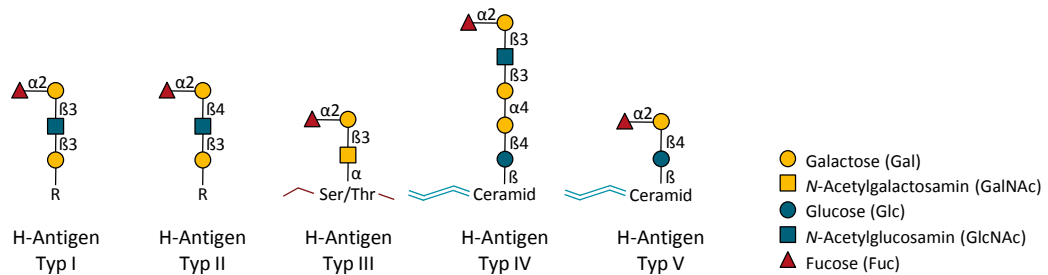


Abbildung 1.7: H-Antigene vom Typ I - V. R steht für ein N- oder O-Glycan oder ein Glycolipid. (nach [1,58])

Die Enzyme GTA und GTB katalysieren den Transfer eines zusätzlichen Monosaccharids auf die Galactoseeinheit des H-Antigens und zwar unter Erhalt der Konfiguration an dem anomeren Kohlenstoffatom des Donorzuckers (Abbildung 1.8). Die GTA ist eine α -1,3-*N*-Acetylgalactosaminyltransferase (α -1,3-GalNAcT) und bildet das A-Antigen durch Übertragung des *N*-Acetyl-D-Galactosamins (GalNAc) von dem aktivierten Zucker UDP-*N*-Acetyl- α -D-Galactosamin (UDP-GalNAc). Die GTB, eine α -1,3-Galactosyltransferase, synthetisiert das B-Antigen durch den Transfer der Galactoseeinheit von UDP- α -D-Galactose (UDP-Gal) auf das H-Antigen. GTA und GTB sind hochspezifisch für die katalysierte α -1,3-Verknüpfung und in Bezug auf das Akzeptorsubstrat. Das H-Dis stellt dabei die kleinste Akzeptoreinheit dar. Für kinetische Studien steht das H-Dis mit einem Octylrest am reduzierenden Ende (H-Dis-octyl) zur

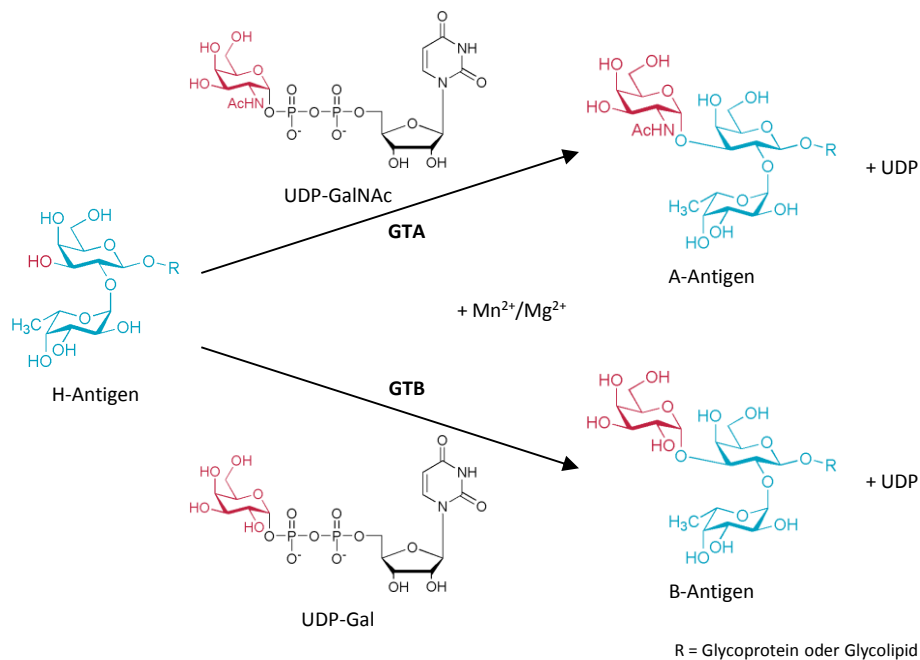


Abbildung 1.8: Bildung der Blutgruppen A- und B-Antigene durch GTA bzw. GTB. Die Anwesenheit eines divalenten Kations, Mn^{2+} oder Mg^{2+} , ist für die Katalysereaktion essentiell.

Verfügung, das leicht gereinigt werden kann (Abbildung 1.12) [59,60]. In Bezug auf das Donor-substrat konnten ganz geringe Kreuzreaktivitäten zwischen beiden Enzymen festgestellt werden wie auch sehr geringe Übertragungsraten für die entsprechenden Glucosederivate [61,62]. Da GTA und GTB zu den konfigurationserhaltenden GTs gehören, ist ihr Mechanismus bisher nicht geklärt (s. 1.2.3). Zwar wurde ein mögliches Nucleophil (Glu 303 [27]) identifiziert, ein Intermediat konnte bisher aber nur mit einer Cysteinmutante (Glu 303 Cys) detektiert werden [28].

Die Kenntnisse über das AB0-Blutgruppensystem sind extrem wichtig bei Bluttransfusionen und Transplantationen. Die weitere Bedeutung der Blutgruppenantigene ist hingegen nicht ganz klar. Das Fehlen jeglicher Determinanten (keine Expression des H-Antigens) zeigt keine phänotypischen Auswirkungen. Es wurden jedoch veränderte Expressionslevel bei der Pathogenese, z. B. bei Krebs oder kardiovaskulären Erkrankungen, entdeckt. Auch die Suszeptibilität für Infektionserreger kann je nach Blutgruppe unterschiedlich sein, sodass die Möglichkeit zum Aufbau von Herdenimmunitäten besteht [63]. Das AB0-System ist nicht auf Menschen begrenzt, sondern auch in anderen Organismen zu finden [51].

1.3.2 Strukturelle Eigenschaften

GTA und GTB sind membranständige und im Golgi lokalisierte GTs (s. 1.2.2 und Abbildung 1.3). Sie bestehen aus 354 Aminosäureresten und haben ein Molekulargewicht von ca. 41 kDa. Wie andere GTs sind sie auch in löslicher Form in Körperflüssigkeiten auffindbar und in dieser Form enzymatisch aktiv [7]. Für systematische Studien stehen seit Mitte der 90er Jahre rekombinante Gene zur Verfügung, deren Produkte nur noch die lösliche Domäne besitzen, welche sich aus Teilen der Stammregion und der katalytischen Domäne zusammensetzt. Die etwa 35 kDa großen Enzyme sind in *E. coli* in ausreichender Menge synthetisierbar (ca. 95 mg pro Liter Kultur) und verhalten sich bezüglich Substratspezifität und Kinetik vergleichbar mit den löslichen Formen von GTA und GTB, die aus humanen Seren isoliert wurden [64-66].

Mittels Massenspektrometrie wurde gezeigt, dass GTA und GTB in wässriger neutraler Lösung und mindestens im Temperaturbereich von 15-60 °C als Homodimere vorliegen [67]. Monomere konnten erst bei einem pH $\leq$ 3,7 detektiert werden. Die beiden Einheiten sind nicht kovalent miteinander verbunden und die Substratbindungsstellen eines Homodimers sind äquivalent [68]. Darüber hinaus zeigten auch Kristallstrukturen der Blutgruppen GTs das Vorliegen von Dimeren (Abbildung 1.9 A) [69,70]. Die Eigenschaft der Oligomerisierung (Homo- und Heterooligomerisierung) ist für GTs nicht ungewöhnlich [71]. Es wird unter anderem vermutet, dass GTs auf diese Weise im Golgi verbleiben [72], aber auch ihre Effizienz und Präzision erhöht werden [73]. Es wäre demnach durchaus möglich, dass die Dimerisierung von GTA und GTB nicht nur bei der rekombinanten löslichen Domäne vorkommt, sondern auch im Golgi und dort eine physiologische Funktion hat.

2002 wurden die ersten Röntgenstrukturen der rekombinanten GTA und GTB veröffentlicht [27]. Sie gehören zu den Metallionen-abhängigen GTs vom GT-A-Faltungstyp (s. 1.2.2). Die jeweilige katalytische Domäne besteht aus zwei Hälften, in deren Mitte das aktive Zentrum liegt. Die Hälften sind durch eine interne Schleife miteinander verbunden, die in den damaligen Kris-

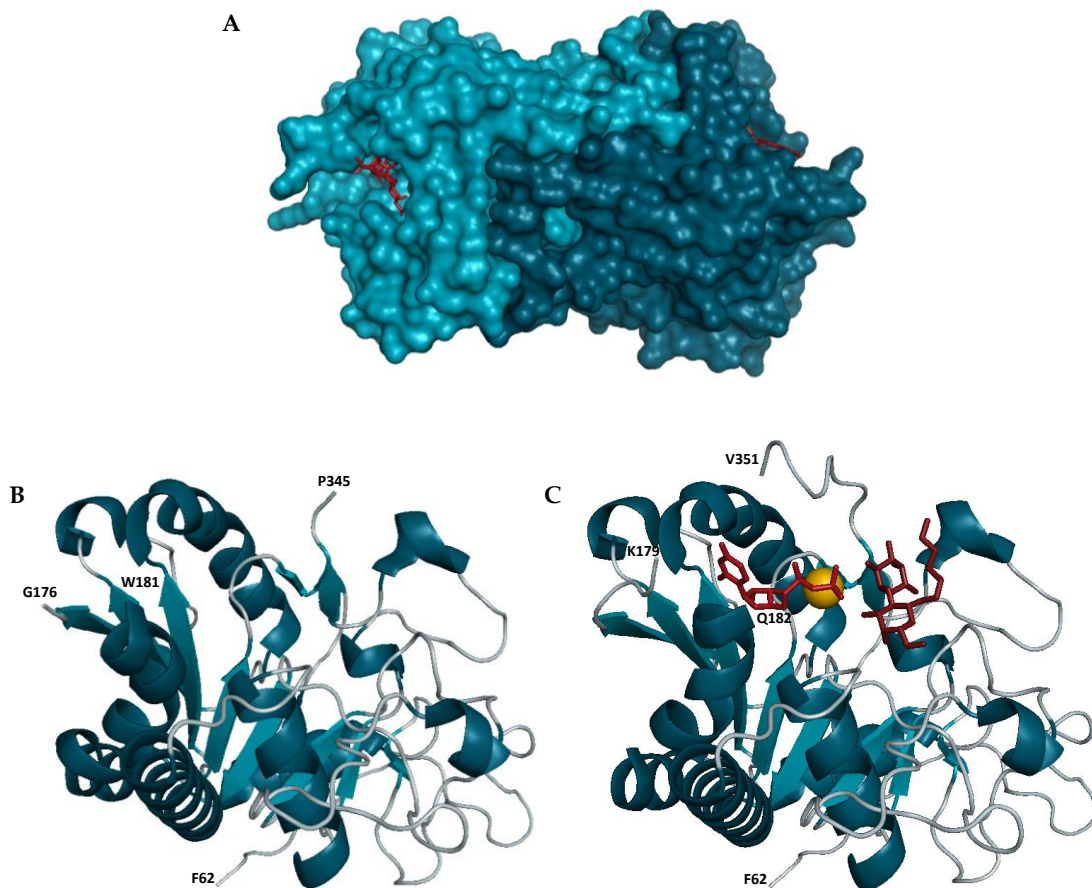


Abbildung 1.9: Kristallstrukturen der GTB. Dargestellt sind jeweils die löslichen Domänen. Die Liganden UDP und H-Dis-octyl sind rot dargestellt, Mn^{2+} gelb. **(A)** GTB-Dimer (PDB ID: 2RJ8), **(B)** GTB-Monomer ohne Liganden (PDB ID: 2RIT) und **(C)** GTB-Monomer mit UDP und H-Dis-octyl (PDB ID: 2RJ8).

tallstrukturen ebenso wenig aufgelöst werden konnte wie die letzten zehn Aminosäurereste des C-Terminus. Während die N-terminale Hälfte für die Bindung des Donorsubstrats verantwortlich ist, ist die C-terminale Hälfte an der Erkennung des H-Antigens beteiligt. Das konservierte DXD-Motiv (hier: $D^{211}V^{212}D^{213}$) im aktiven Zentrum koordiniert ein bivalentes Kation, Mn^{2+} oder Mg^{2+} , welches für die Bindung von UDP-GalNAc bzw. UDP-Gal und eine effiziente Katalyse essentiell ist. Abbildung 1.9 zeigt 2008 veröffentlichte Kristallstrukturen der GTB ohne und mit gebundenen Liganden.

Obwohl GTA und GTB verschiedene Donorsubstrate verwenden, unterscheiden sie sich nur in vier von insgesamt 354 Aminosäuren (GTA/GTB: Arg/Gly 176, Gly/Ser 235, Leu/Met 266 und Gly/Ala 268) [57]. Diese Tatsache macht sie insbesondere für die Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen interessant. Seit 2002 wurden zahlreiche weitere Kristallstrukturen gelöst, die zu einem besseren Verständnis des katalytischen Mechanismus und der Funktion der vier kritischen Aminosäuren von GTA und GTB geführt haben [65,69,70,74,75]. Unter Berücksichtigung von umfangreichen kinetischen Studien konnten die Aminosäuren Leu/Met 266 und Gly/Ala 268 als wichtig für die Donorbindung identifiziert werden [27,76], während Gly/Ser 235

und Leu/Met 266 einen Einfluss auf die Akzeptorbindung haben [77]. Die Rolle der vier bei GTA und GTB unterschiedlichen Aminosäurereste wurde unter anderem mit Hilfe von Hybriden und Mutanten beider Enzyme untersucht. Die Hybride werden je nach Identität der vier kritischen Aminosäurereste benannt. GTA wird als AAAA und GTB als BBBB bezeichnet. Dabei steht jeder Buchstabe für einen kritischen Aminosäurerest in aufsteigender Reihenfolge. BAAA ist danach eine GTA-Mutante, bei der Arg 176 gegen ein Gly ausgetauscht ist.

Die Funktion des Aminosäurerests Arg/Gly 176 wurde erst 2008 durch Alfaro et al. beschrieben [70]. Sie veröffentlichten Strukturen von GTB, ABBB und AABB, in denen sowohl die interne Schleife, die etwa von Rest 176 bis 195 reicht, als auch die letzten neun C-terminalen Reste aufgelöst werden konnten. Die Enzyme zeigten in diesen Bereichen eindeutige Konformationsänderungen während der Substratbindung. Insgesamt wurden drei Zustände beobachtet: ein offener, ein halbgeschlossener und ein geschlossener Zustand (s. Abbildung 1.10). Ohne gebundene Liganden sowie mit gebundenem Akzeptorsubstrat H-Dis-octyl befanden sich die Enzyme in einer offenen Konformation. Zwei α -Helices bildeten die interne Schleife und die flexible C-terminale Schleife lag ungeordnet vor und war nicht aufgelöst. Bei Bindung von UDP bewegte sich die interne Schleife in Richtung des aktiven Zentrums und bildete Wechselwirkungen mit UDP aus. Die zwei Helices verbanden sich dabei zu einer und es entstand die halbgeschlossene Konformation. Waren sowohl UDP als auch H-Dis-octyl gebunden, befanden sich die Enzyme im geschlossenen Zustand. Zusätzlich zu der internen Schleife war auch die C-terminale Schleife geordnet und lag ebenfalls über dem aktiven Zentrum. Sie bildete Kontakte mit Donor- und Akzeptorsubstrat sowie mit der internen Schleife aus. Erst solch eine Anordnung soll eine effiziente Katalyse ermöglichen.

Der Rest Arg/Gly 176 befindet sich am Rand der internen Schleife. Die Mutante BAAA zeigte gegenüber der GTA bei ähnlichen K_M -Werten einen deutlich schnelleren Substratumsatz [76]. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf eine höhere Flexibilität der internen Schleife durch das Gly 176, die konsistent in allen Kristallstrukturen zu beobachten war [70]. Daraus resultieren möglicherweise eine schnellere Produktfreisetzung sowie ein schnellerer Substrataustausch.

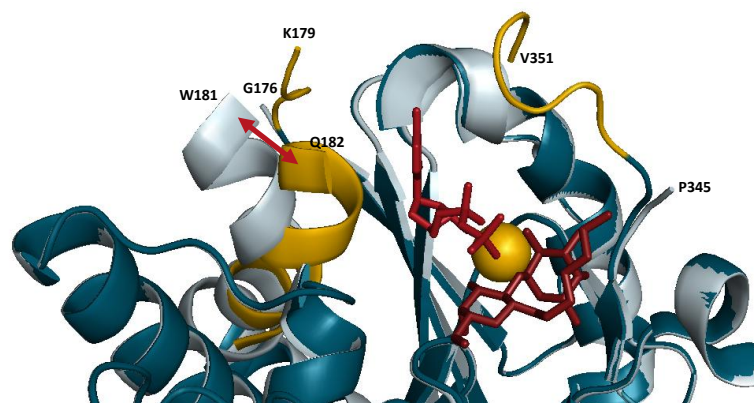


Abbildung 1.10: GTB in offener (grau) und geschlossener (blau) Konformation. UDP und H-Dis-octyl sind rot, Mn^{2+} sowie interne und C-terminale Schleife der geschlossenen Konformation sind gelb dargestellt. In der offenen Konformation sind die Reste 177-180 nicht aufgelöst, in der geschlossenen die Reste 180-181. Eine Bewegung in Richtung des aktiven Zentrums ist dennoch deutlich erkennbar (roter Pfeil). (PDB IDs: 2RIT, 2RJ8)

Die Bedeutung von flexiblen Schleifen für die katalytische Reaktion wurde auch für andere GTs beschrieben [78], unter anderem für die α -1,3-GalT, die gegenüber GTA bzw. GTB die größte sequentielle und strukturelle Ähnlichkeit zeigt [79]. Kristallstrukturen zeigen gemittelte Zustände und Beweglichkeiten sind daraus nur über Ordnungsgrade abschätzbar. Die Ergebnisse legen jedoch nahe, dass die (Konformations-)Dynamik der GTs, wie bei vielen anderen Enzymen, eine entscheidende Rolle bei der Katalyse spielt und ihre Aufklärung wichtige Erkenntnisse über die Funktionsweise dieser Enzyme liefern wird.

1.3.3 Ligandenbindung

Wie oben beschrieben sind GTA und GTB hoch spezifisch für ihre Substrate und unterlaufen induziert durch die Ligandenbindung Konformationsänderungen. Bisherige Erkenntnisse lassen annehmen, dass die Donorbindung der Akzeptorbindung vorangeht [70,78,80,81]. Kinetische Daten zur Bindung der einzelnen Substrate wurden durch quantitative Auswertung von STD-NMR-Experimenten (s. 2.9.1) gewonnen mit Dissoziationsraten von über 100 Hz für den Akzeptor und ca. 10 Hz für den Donor [81]. Obwohl auch die Thermodynamik der Ligandenbindung zum Verständnis des Katalysemechanismus beitragen kann, sind allgemein für GTs nur einige wenige Studien bekannt [82-86].

Ein fragmentbasierter NMR-spektroskopischer Ansatz identifizierte Uracil als kleinste Einheit des Donorsubstrats UDP-Gal, die von der GTB erkannt wird [87]. Uracil, UMP und UDP werden ebenfalls mit ansteigender Affinität und gleichen Bindungssepitopen wie UDP-Gal gebunden. Die UDP-Einheit sorgt maßgeblich für die Affinität von UDP-Gal an die GTB, während die Galactoseeinheit die Spezifität hervorruft. UDP-Gal wird in einer rückgefalteten Konformation gebunden, die ohne Enzym NMR-spektroskopisch nicht detektierbar ist [81]. GTB bindet UDP-Glc in gleicher Weise wie UDP-Gal, setzt diese jedoch nur in sehr geringem Maße um [62,81,87]. Die Ursache ist nicht geklärt, liegt aber vermutlich in den Bewegungen und Wechselwirkungen der flexiblen Schleifen begründet [70]. Etwas klarer stellt sich die Diskriminierung zwischen UDP-Gal und UDP-GalNAc dar. Die GTA besitzt an der Stelle 266 einen Leucinrest, der kleiner als der bei der GTB vorhandene Methioninrest ist und somit eine bessere Aufnahme des größeren GalNAc ermöglicht [27]. Während die Affinität von UDP-GalNAc an die GTB dadurch verringert wird, resultiert der Ausschluss von UDP-Gal durch die GTA wahrscheinlich ebenfalls aus verhinderten korrekten Anordnungen von Enzym und Substrat.

Die Bindungskonstanten von Mg^{2+} und Mn^{2+} an GTA und GTB sind nicht bekannt, sollten aber nach ersten massenspektrometrischen Untersuchungen im millimolaren Bereich liegen [88]. STD-NMR-Experimente, die in der Lage sind schwache Bindungen (mM) zu detektieren, zeigten auch in Abwesenheit der bivalenten Kationen eine Bindung von UDP-Gal an die GTB, jedoch nur von der UDP-Einheit und vermutlich in einer anderen Konformation [81].

Das Akzeptorsubstrat H-Dis-octyl wird in der in Lösung dominierenden Konformation gebunden [81]. Kristallstrukturen sowie STD-NMR-Experimente der GTB mit H-Dis-octyl zeigten eine Dominanz des Galactoserests bei der Bindung [75,89]. Aus kinetischen Studien ist allerdings bekannt, dass auch der Fucoserest wichtig für eine effiziente Reaktion ist [75]. In der geschlossenen Konformation, das heißt nur in Anwesenheit des Donors, werden zwei zusätzliche Was-

serstoffbrückenbindungen zwischen der Fucoseeinheit und dem C-terminalen Loop ausgebildet sowie eine essentielle Interaktion mit dem Donorsubstrat [70].

1.3.4 Enzymatische Hydrolyse von UDP-Galactose

In Abwesenheit eines Akzeptorsubstrats katalysiert die GTB die Hydrolyse von UDP-Gal zu UDP und α -D-Gal (Abbildung 1.11) [27,90,91]. Die Reaktion erfolgt wie die natürliche Transferreaktion konfigurationserhaltend [92]. β -D-Gal entsteht erst anschließend infolge von Mutarotation. Diese enzymatische Hydrolyse kann auch als Transferreaktion angesehen werden, bei der Wasser als unspezifischer Akzeptor dient, und bietet damit eine Möglichkeit, bisher unbekannte und durch die natürliche Transferreaktion nicht erschließbare Aspekte des Katalysemechanismus der GTB zu untersuchen. Zudem verläuft die Hydrolysereaktion wesentlich langsamer als die Transferreaktion.

In der vorangegangenen Masterarbeit [92] wurde der Einfluss eines Akzeptoranalogs, des α -L-Fucp-(1,2)- β -D-(3-desoxy)-Galp-(1,O)-(CH₂)₇CH₃ (3DD) (Abbildung 1.12), auf die enzymatische Hydrolyse mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe am C3 der Galactose fungiert 3DD nicht als Akzeptorsubstrat. 3DD ist ein bekannter kompetitiver Inhibitor der GTB [59] und bindet in derselben Konformation wie das H-Dis-octyl [74].

In Anwesenheit des bivalenten Kations Mg²⁺ (Mn²⁺ kann aufgrund seines Paramagnetismus nicht für NMR-Experimente verwendet werden) konnte eine bis zu zweifache Beschleunigung der enzymatischen Hydrolyse von UDP-Gal durch das 3DD beobachtet werden (Abbildung 1.13 A und Tabelle 1.1). Dabei verstärkte sich der Einfluss mit zunehmender 3DD-Konzentration. Diese Ergebnisse weisen auf einen kooperativen Effekt hin, der durch das 3DD verursacht wurde. Vermutlich bewirkt die Bindung des Akzeptoranalogs, dass die GTB eine günstigere

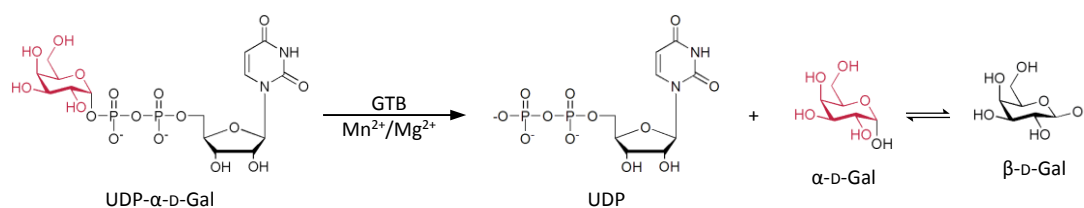


Abbildung 1.11: Hydrolyse von UDP-Gal katalysiert durch die GTB. Die Reaktion findet unter Erhalt der Konfiguration an dem anomeren Zentrum von α -D-Gal statt. β -D-Gal entsteht anschließend durch Mutarotation. Die Anwesenheit eines bivalenten Kations, Mn²⁺ oder Mg²⁺, ist für die Reaktion essentiell.

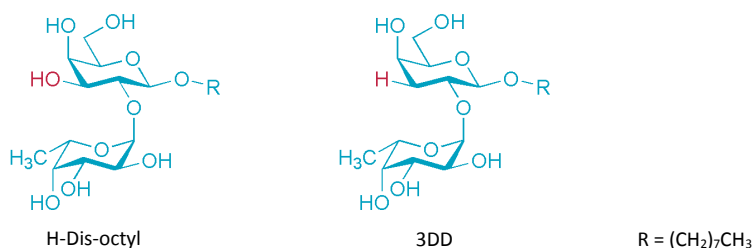


Abbildung 1.12: H-Dis-octyl und Akzeptoranalogen 3DD.

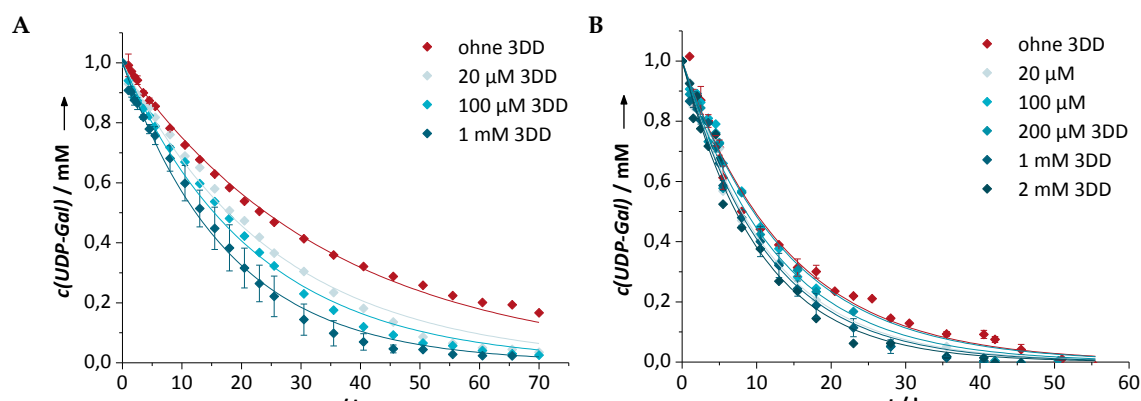


Abbildung 1.13: Zeit-Umsatz-Kurven zur Analyse der GTB-katalysierten Hydrolyse von UDP-Gal bei 298 K. Die Proben enthielten zu Beginn der Reaktion 1 mM UDP-Gal, 26 μM GTB, 0-2 mM 3DD in 50 mM Bis-Tris- d_{19} , pH 6,7, 10 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, 1 mM $\beta\text{-ME-d}_6$ und 20 μM TSP- d_4 . $c(\text{UDP-Gal})$ wurde anhand des NMR-Signals des anomeren Protons der Galactoseeinheit von UDP-Gal bestimmt. Die normierten Werte sind gegen die Inkubationszeit aufgetragen und mit der Funktion $c(\text{UDP-Gal}) = \exp(-k_{\text{app}} \cdot t)$ angepasst. Messungen ohne und mit 1 mM 3DD wurden in Doppelbestimmung, alle anderen in Einfachbestimmung durchgeführt. **(A)** Saubere Proben und **(B)** Proben mit Spuren von Mn^{2+} .

Konformation, wie z. B. die für die Transferreaktion wichtige geschlossene Konformation, einnimmt. Enthielten die Proben zusätzlich Spuren von Mn^{2+} , die über die GTB-Reinigung und unzureichenden Pufferaustausch eingetragen wurden, war der Effekt der Beschleunigung nur noch sehr schwach zu erkennen (Abbildung 1.13 B und Tabelle 1.1). Die Hydrolysereaktionen verliefen in Gegenwart von Mn^{2+} schneller als in Gegenwart von Mg^{2+} , so wie es auch bei der natürlichen Transferreaktion beobachtet wird.

Neben der enzymatischen Hydrolyse läuft in Anwesenheit von bivalenten Kationen immer auch die wesentlich langsamere chemische Zersetzung von UDP-Gal zu UMP und Galactose-1,2-Cyclophosphat (Gal-1,2-P) ab (Abbildung 1.14) [93]. Analog zu der enzymatischen Hydrolyse wurden die Halbwertszeiten von UDP-Gal während dieser Reaktion bei 298 K bestimmt [94]. Sie liegen bei etwa 40 Tagen mit 10 mM MgCl_2 und bei über 100 Tagen mit 100 μM MnCl_2 .

Tabelle 1.1: Apparente Ratenkonstanten k_{app} und Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der GTB-katalysierten Hydrolyse von UDP-Gal in An- und Abwesenheit des 3DD. Reaktionsbedingungen s. Legende der Abbildung 1.13. Da die exponentielle Zerfallsfunktion nur bedingt die eigentliche, wesentlich kompliziertere Reaktion abbildet, geben die Werte nur einen Trend wieder. Saubere Proben A und Proben B mit Spuren von Mn^{2+} .

	Proben A		Proben B	
	$k_{\text{app}} / \text{h}^{-1}$	$t_{1/2} / \text{h}$	$k_{\text{app}} / \text{h}^{-1}$	$t_{1/2} / \text{h}$
ohne 3DD	$0,029 \pm 0,0004$	24,3	$0,062 \pm 0,001$	11,1
20 μM 3DD	$0,040 \pm 0,001$	17,5	$0,075 \pm 0,003$	9,2
100 μM 3DD	$0,045 \pm 0,001$	15,5	$0,061 \pm 0,003$	11,3
200 μM 3DD			$0,070 \pm 0,003$	9,9
1 mM 3DD	$0,056 \pm 0,002$	12,4	$0,077 \pm 0,002$	9,1
2 mM 3DD			$0,083 \pm 0,004$	8,4

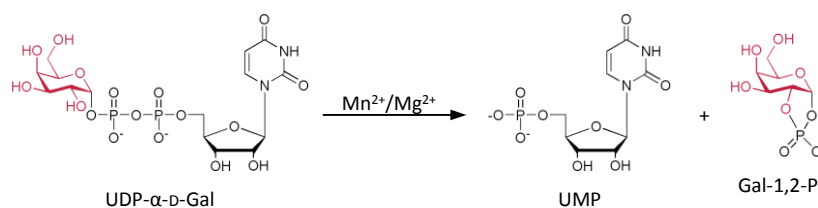


Abbildung 1.14: Chemische Zersetzung von UDP-Gal.

1.4 Zielsetzung

Aus den vorangehenden Darstellungen erschließt sich die enorme Bedeutung, die die Kenntnis der molekularen Funktionsweise von Glycosyltransferasen für das Verständnis biologischer Prozesse und für die Entwicklung von Therapeutika hat. Aber auch die Schwierigkeiten auf dem Weg dorthin sind erkennbar geworden. Obwohl mittlerweile viele Tausend Gene bekannt sind, die für GTs codieren, sind nur knapp hundert Strukturen von GTs aufgeklärt. Das häufig membranständige Vorliegen erschwert ihre Zugänglichkeit und es ist oft nicht einfach, die katalysierte Reaktion zu identifizieren.

Die humane Blutgruppe B Galactosyltransferase gehört zu der kleinen Anzahl GTs und der noch geringeren Anzahl humaner GTs, deren Struktur aufgeklärt ist. Die Möglichkeit die lösliche Domäne der GTB rekombinant und im hohen Milligramm-Maßstab in *E. coli* herzustellen, macht sie für umfangreiche Studien zugänglich. Sie kann unter anderem als Modell für die konfigurationserhaltenden GTs dienen, deren Reaktionsmechanismus immer noch ungeklärt ist.

Die Arbeit ist im Wesentlichen in drei Abschnitte unterteilt. Zunächst werden die unter 1.3.4 beschriebenen Ergebnisse zum Einfluss der Akzeptoranalogsbindung auf die enzymatische Hydrolyse des Donorsubstrats UDP-Gal aufgegriffen. Die Hydrolysereaktion ermöglicht durch den Einsatz von Wasser als kleinstem möglichem Akzeptor die direkte Untersuchung des Einflusses der Akzeptorbindung auf den katalytischen Prozess. Dieser Aspekt kann durch die normale Transferreaktion nicht erschlossen werden und wird neue Erkenntnisse zu der Glycosyltransferreaktion liefern. Daher wird die enzymatische Hydrolyse durch die Bestimmung enzymkinetischer Konstanten quantifiziert, wofür unter anderem die Etablierung eines radiochemischen Assays bedeutsam ist. Da nicht geklärt ist, welches bivalente Kation das physiologische ist, werden sowohl Mn^{2+} als auch Mg^{2+} bei den Studien berücksichtigt.

Im zweiten Abschnitt wird die Ligandenbindung an die GTB durch die Ermittlung von Affinitätskonstanten und thermodynamischen Parametern näher charakterisiert. Wie unter 1.3.3 geschildert, gibt es nur wenige thermodynamische Studien mit GTs. Die Kenntnis der bindungsrelevanten Größen bildet jedoch mit die Grundlage für das Verständnis der Funktionsweise dieser Enzyme. Für die GTB sind bisher nur wenige Bindungskonstanten mit SPR-Spektroskopie und STD-NMR-Spektroskopie zuverlässig bestimmt worden. Es handelte sich um Studien zur

Akzeptorbindung, die im Institut für Chemie durchgeführt wurden. Publiizierte Werte für das Donorsubstrat und Fragmente des Donors resultieren aus kompetitiven STD-NMR-Experimenten und basieren auf dem K_M -Wert der Glycosylierungsreaktion. Es gibt aber auch die Möglichkeit, Bindungskonstanten mittels STD-NMR-Spektroskopie direkt zu ermitteln. Diese Studien ergänzen die nachfolgend genannten. Klassische Methoden zur Bestimmung von Bindungsparametern sind die Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) und die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC), die auch hier zum Einsatz kommen werden. Dr. E. Munoz (Institut für Chemie) leistete bereits umfangreiche Vorarbeiten für SPR-spektroskopische Untersuchungen der GTB, die Entwicklung eines Standardprotokolls stand jedoch noch aus. Darüber hinaus gab es widersprüchliche Ergebnisse, je nachdem ob GTB immobilisiert wurde oder sich in der mobilen Phase befand, die vor der weiteren Verwendung dieser Methode für andere Fragestellungen geklärt werden müssen. Die ITC gibt neben Informationen über die Bindungsaffinität auch Aufschluss über Enthalpie und Entropie der Wechselwirkung und wird für die Analyse von Ligandenbindungen an die GTB etabliert und eingesetzt. In Zusammenhang mit dem ersten Abschnitt stehen Untersuchungen zur gegenseitigen Beeinflussung von Donor- und Akzeptorbindung im Vordergrund. Aber auch die Rolle der Identität des bivalenten Kations wird untersucht. Die Ermittlung von Bindungskonstanten weiterer Liganden wie Substratanaloga und Substratfragmente werden ebenfalls Gegenstand dieses Abschnitts sein.

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie können dynamische Prozesse in atomarer Auflösung und über eine Zeitskala von Pikosekunden bis Sekunden erfasst werden [95]. Für die Aufklärung der bisher nicht bekannten Konformationsdynamik von GTs stellt sie daher eine geeignete Methode dar. Darüber hinaus eröffnet sie die Möglichkeit, Protein-Ligand-Wechselwirkungen von der Proteinseite aus zu betrachten und damit Einblicke in den Katalysemechanismus zu geben. Für die genannten biomolekularen NMR-Techniken ist es unerlässlich, die Proteinresonanzen zumindest teilweise und in den entscheidenden Bereichen den entsprechenden Aminosäureresten zuzuordnen. Dies ist im Fall der als Dimer vorliegenden und damit 69 kDa großen GTB nicht trivial. Durch die Größe des Proteins kommt es zu sehr vielen Signalen, starken Signalüberlappungen und Intensitätsverlusten in den Spektren. Eine gezielte Probenpräparation in Form von uniformer und selektiver Isotopenmarkierung (^2H , ^{15}N und/oder ^{13}C) der GTB ist in jeder Hinsicht zwingend erforderlich.

Der dritte und letzte Abschnitt dieser Arbeit widmet sich der Herstellung isotopenmarkierter GTB-Proben für die NMR-Spektroskopie. GTB lässt sich in Vollmedium gut synthetisieren und uniform ^2H , ^{15}N -markierte GTB-Proben sind ebenfalls schon erfolgreich präpariert worden. Jedoch waren die Ausbeuten in den notwendigen Minimalmedien schlechter als im Vollmedium. Für spezielle Zuordnungsexperimente, die Tripelresonanzexperimente, muss uniform ^2H , ^{13}C , ^{15}N -markierte GTB in ausreichender Qualität und Menge hergestellt werden. Da die Zuordnung der NMR-Signale durch selektive Aminosäuremarkierung vereinfacht werden kann, ist auch die Synthese solcher GTB-Proben Thema dieses Abschnitts. Weiterhin werden die Ermittlung geeigneter Bedingungen für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen sowie die Auswertung der NMR-Spektren dargestellt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurde Reinstwasser verwendet, das mit dem SG-Reinstwassersystem RS 90-4/UF oder Ultra Clear hergestellt wurde. In Tabelle 2.1 sind alle weiteren verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Hersteller
2-Propanol	Merck, Roth
3DD	Prof. Dr. O. Hindsgaul, Kopenhagen, Dänemark/ W. Hellebrandt (Institut für Chemie)
β -Mercaptoethanol, 2-Mercaptoethanol	Sigma
β -Mercaptoethanol- d_6 (98 % D)	CIL, Euriso-Top
Amine Coupling Kit: NHS-coupling solution, EDC-coupling solution, 1 M Ethanolamine-HCl pH 8,5	Biacore
Ammoniumchlorid ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, 99 % ^{15}N)	CIL
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	ICN Biomedicals, Merck
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin Natriumsalz	Gerbu
Bis-Tris	Fluka
Bis-Tris- d_{19} (98 % D)	CIL, Euriso-Top
BME Vitaminlösung (100 x)	Sigma
Bovines Serumalbumin, Fraktion V, pH 7	Serva
Bradford-Reagenz Bio-Rad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	ICN Biomedicals, Merck
Casamino-säuren, Caseinhydrolysat	Merck
Cholinchlorid	Fluka
D-Biotin (Vitamin B ₇ , Vitamin H)	Sigma
Deuteriumoxid (D_2O) 100 % (99,97 % D)	Euriso-Top
Deuteriumoxid (D_2O) 99,85 %	Euriso-Top
Deuteriumoxid (D_2O) 99,9 %	Euriso-Top
D-(+)-Glucose	Merck
D-Glucose (98 % $u\text{-}^{13}\text{C}_6$, 98 % 1,2,3,4,5,6 D_7)	Euriso-Top
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck
D-Pantothen-säure Hemicalciumsalz (Vitamin B ₅)	Sigma
DTT	Gerbu
Eco <i>E. coli</i> OD3 DN	Silantes

2 Materialien und Methoden

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Roth
Ethanol, vergällt	Büfa Chemikalien
Folsäure (Vitamin B ₉ , Vitamin B ₁₁ , Vitamin M)	Sigma
GelCode® Blue Stain Reagent	Pierce
Glycerin	Roth
Glycin	Merck, Sigma
Harnstoff	GERBU
H-Dis-octyl	W. Hellebrandt (Institut für Chemie)
Hefeextrakt SERVAbacter®	Serva
IPTG	Gerbu
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Roth
L-Lysin Hydrochlorid (95-99 % α- ¹⁵ N)	Euriso-Top
L-Methionin (95-99 % ¹⁵ N)	CIL
L-Valin (97 % D, 97 % ¹⁵ N)	CIL
L-Valin (98 % ¹⁵ N)	CIL
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ · 6 H ₂ O)	Merck, Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ · 7 H ₂ O)	Merck
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat (MnCl ₂ · 4 H ₂ O)	Merck
Methanol	Büfa Chemikalien
MOPS	Gerbu
myo-Inositol	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumazid (NaN ₃)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Merck, Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
NeutrAvidin®	Pierce
Nicotinamid	Sigma
Pepton (aus Casein, tryptisch verdaut)	Roth
Proteaseinhibitortabletten, cOmplete, EDTA-free	Roche Diagnostics
Proteinstandard Bovines Gammaglobulin	Pierce
Proteinstandard SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range	Bio-Rad
Pyridoxalhydrochlorid	Sigma
Riboflavin (Vitamin B ₂)	Sigma
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid:Bis-Acrylamid 37,5:1)	Roth
SDS	Serva, Sigma
Szinti Mix Aquasafe 800	Zinsser Analytik
TEMED	Sigma
Thiamin-Hydrochlorid (Vitamin B ₁ Hydrochlorid)	Sigma
Tris	Merck, Roth
Trypton (aus Casein, pankreatisch verdaut)	MP Biomedicals, Roth
TSP Natriumsalz	Aldrich
TSP-d ₄ Natriumsalz (98 % D)	Aldrich
UDP-6-biotinyl-Gal	Prof. Dr. L. Elling, Aachen

UDP Dinatriumsalz	Sigma
UDP-u- ¹⁴ C- α -D-Galactose Lithiumsalz	Amersham Biosciences
UDP- α -D-Galactose Dinatriumsalz	Prof. Dr. B. Ernst, Basel, Schweiz
UDP- α -D-Glucose	Sigma
Uridin	Sigma
Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin)	Sigma

2.1.2 Gebrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verwendete Gebrauchsmaterialien.

Name	Hersteller
Dialysekassetten, Slide-A-Lyzer, 10 kDa	Thermo Scientific
Dialyseschlauch, SnakeSkin® Pleated, 10 kDa	Thermo Scientific
Filtereinheit, Steritop™-GP, 500 ml, 0,22 µm	Millipore
Filterpapier Durapore Membran, PVDF, 0,45 µm	Millipore
Kanülen, steril	B/Braun
Kryoröhrchen, CryoTubes™, 1,8 ml	nunc
Küvetten, Einmal-Viereck-	Sarstedt
Mikrotestplatten, 96 Vertiefungen, flach	Roth
Mini-Säulen, 5 ml	Sigma
NMR-Röhrchen, 3 mm für Bruker Match™ System	hilgenberg
NMR-Röhrchen, 5 mm für Bruker Match™ System	hilgenberg
NMR-Röhrchen, 5 mm Shigemi für D ₂ O, Bruker	Shigemi
NMR-Röhrchen, 5 mm Single-Use Tubes	Kontes
Papier, 0,34 µm	Whatman
pH-Universalindikatorpapier	Merck
Pipetten, Einweg-, steril	Sarstedt, TPP
Pipettenspitzen, epT.I.P.S.	Eppendorf
Pipettenspitzen, MultiFlex, rund, 0,5-200 µl	peqlab
Reagiergefäße, 1,5 ml, SafeSeal oder Easy Cap	Sarstedt
Reagiergefäße, 2 ml, SafeSeal	Sarstedt
Röhren 13 ml mit Zweistufen-Belüftungsstopfen, PP	Sarstedt
Röhren 13 ml, PS	Sarstedt
Röhren mit konischem Boden und Schraubverschluss, 15 ml und 50 ml, PP	Sarstedt
Röhren mit Schraubverschluss, 5 ml, PP	Sarstedt
Sensor Chip CM5	Biacore, GE Healthcare
Sensor Chip SA	Biacore, GE Healthcare
Sep-Pak® Vac RC (100 mg) C18-Cartridges	Waters
Spritzen, steril	B/Braun, BD
Spritzenfilter, Millex®-GV, steril, PVDF, 0,22 µm	Millipore
Spritzenfilter, Rotilabo®, steril, CME, 0,22 µm	Carl Roth
Spritzenfilter, Rotilabo®, unsteril, CME, 0,8 µm	Carl Roth
Szintillationsflaschen mit Deckel, PE, 20 ml	PerkinElmer
Zentrifugen-Filtereinheit, Amicon® Ultra-4, 10 kDa	Millipore
Zentrifugen-Filtereinheit, Vivaspin 15R, 10 kDa	sartorius stedim biotech

2.1.3 Säulenmaterialien

Tabelle 2.3: Verwendete Säulenmaterialien.

Material	Hersteller
AG® 1-X8 Resin (acetate, 200-400 dry mesh)	Bio-Rad
SP Sepharose™ Fast Flow (FF)	GE Healthcare
UDP-Hexanolamin-Sepharose	Prof. Dr. M. M. Palcic, Kopenha- gen, Dänemark/ W. Helle- brandt (Institut für Chemie)

2.1.4 Geräte

Tabelle 2.4: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
ÄKTA purifier 10: CU-905, Frac-950, Mixer M-925, Monitor UV-900, Monitor pH/C-900, Pump P-903, Valve INV-907, Valve PV-908	GE Healthcare
Autoklav 3850 ELV	tuttnauer Systec
Autoklav Laboklav MSV 55	SHP Steriltechnik AG
Biacore 3000	Biacore
Detektor Uvicord SII	Pharmacia Biotech
Flüssigkeitsszintillationszähler Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter	Wallac
Fraktionssammler SuperFrac™	Pharmacia Biotech
French Press Cell Disrupter: French-Pressure Cell Press, French Pressure Cell 40K, Rapid Fill Kit	Thermo IEC
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD plus	Christ
Gefriertrocknungsanlage BETA A	Christ
Geltrockner Model 543	Bio-Rad
Glasfritte P3	
Glasfritte P4	
Inkubator innova 4330 Refridgerated Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
Inkubator Orbital Shaker Model 420	Forma Scientific
Isothermes Titrationskalorimeter VP-ITC	MicroCal, GE Healthcare
MRX Microplate Reader	Dynex Technologies
NMR-Spektrometer Bruker Avance DRX-500/AVIII-500 mit TCI-Kryoprobenkopf (Lübeck)	Bruker
NMR-Spektrometer Bruker Avance II 600 mit TCI- Kryoprobenkopf (Frankfurt)	Bruker
NMR-Spektrometer Bruker Avance I 700 mit TXI- Kryoprobenkopf (Hamburg)	Bruker
NMR-Spektrometer Bruker Avance I 700 mit TXI- Kryoprobenkopf (Frankfurt)	Bruker
NMR-Spektrometer Bruker Avance I 800 mit TXI- Kryoprobenkopf (Frankfurt)	Bruker
NMR-Spektrometer Bruker Avance III 950 mit TCI- Kryoprobenkopf (Frankfurt)	Bruker

Orbitalschüttler IKA KS 125 basic	IKA Labortechnik
pH-Meter pH 330	WTW
Pipetten Eppendorf Reference	Eppendorf
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf
Pipettierhilfe Pipetus® akku	Hirschmann Laborgeräte
Pumpe Econo Pump	Bio-Rad
Reinstwassersystem RS 90-4/UF	SG Wasseraufbereitung und Re- generierstation GmbH
Reinstwassersystem Ultra Clear	SG Wasseraufbereitung und Re- generierstation GmbH
Säule XK 16/20 + Adapter	Pharmacia Biotech
Säule XK 26/40 + Adapter	Pharmacia Biotech
Säulen Econo-Column® + Flow Adaptor	Bio-Rad
Schreiber Rec 112, Rec 102	Pharmacia Biotech
SDS-PAGE-Zubehör Mini-PROTEAN® 3	Bio-Rad
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	peqlab
Spektralphotometer V550 UV/VIS	Jasco
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermomixer Thermostat 5320	Eppendorf
Vakuum-Controller B161	Büchi
Vakuumkammer BAKER spe-12G	J. T. Baker
Vakuumpumpe Duo 5	Pfeiffer Vakuum
Waage Adventurer™	Ohaus
Waage KERN GJ 610-2M	Kern
Waage Mikrowaage MC 210 S	Sartorius
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge 5810	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Scientific
Zentrifuge MiniSpin®	Eppendorf
Zentrifuge Optima™ LE-80K	Beckmann Coulter
Zentrifuge Sorvall RC 5B Plus, Rotor GS3, Rotor SA 600	Du Pont

2.1.5 Plasmid

Für die Synthese der sogenannten -10 GTB wurde das Plasmid pCWΔlac verwendet, in das Marcus et al. das entsprechende Gen für die -10 GTB klonierten (s. Abbildung 2.1) [65]. Diese Gensequenz wird von den Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* und *HindIII* flankiert und besteht aus von *E. coli* bevorzugten Codons [64]. Sie codiert die Aminosäuren 64-354 der natürlich vorkommenden, membranständigen GTB und liefert ein um den cytosolischen N-Terminus, die Transmembranregion und um zehn weitere Aminosäuren der Stammregion verkürztes Produkt. Durch die Klonierung besitzt die -10 GTB am N-Terminus zusätzlich die Aminosäuren M-A-I-G-E-F-M.

Da in dieser Arbeit ausschließlich mit der -10 GTB gearbeitet wurde, wird sie nachfolgend nur noch als „GTB“ bezeichnet.

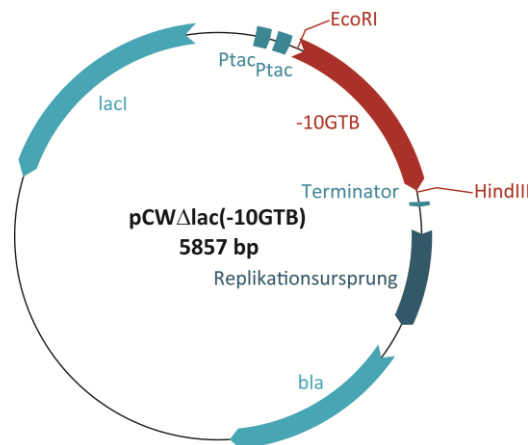


Abbildung 2.1: Plasmidkarte von pCWΔlac mit dem Gen für die -10 GTB als Insert. LacI codiert das Repressorprotein LacI, das durch IPTG inhibiert werden kann. Der zugehörige Promotor ist Ptac, der aus der -35-Region des trp-Promotors und der -10-Region des lac-Promotors besteht. Das bla-Gen codiert die β -Lactamase, die dem Wirt Ampicillinresistenz verleiht.

2.1.6 Bakterienstamm

Als Expressionsstamm wurde der *E. coli* K12 Stamm BL21 von Novagen verwendet (Genotyp: *F^{ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm}* [96]). Diese Zellen wurden mit dem Plasmid pCWΔlac(-10 GTB) transformiert und ein ausgewählter Klon als Glycerinkultur bei -80 °C gelagert [92].

2.2 Proteinsynthese

Alle Arbeiten mit Bakterienkulturen wurden steril an einer Bunsenbrennerflamme durchgeführt. Glasgeräte wurden bei 134 °C für 15 min und Kunststoffmaterialien bei 134 °C für 15 min oder bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Die S1-Abfälle wurden für 20 min bei 121 °C oder für 15 min bei 134 °C inaktiviert.

2.2.1 Kulturmedien

Die Kulturmedien wurden wie in Tabelle 2.5 und Tabelle 2.6 beschrieben angesetzt. Das TB-Medium wurde von Dr. H. Peters (Institut für Chemie) speziell für die GTB-Synthese optimiert. Für die Herstellung D₂O-haltiger Salzlösungen (99,85 % oder 99,9 % D) wurden die Substanzen in D₂O gelöst, lyophilisiert und erneut in D₂O gelöst. Die 100fache Vitaminlösung in D₂O wurde ebenfalls selber angesetzt und enthielt 0,01 mg/ml Riboflavin, je 0,1 mg/ml D-Biotin, Cholinchlorid, Folsäure, Nicotinamid, D-Pantothensäure, Pyridoxalhydrochlorid, Thiaminhydrochlorid und Vitamin B₁₂, 0,2 mg/ml myo-Inositol und 8,5 mg/ml NaCl. Für Medien mit H₂O wurde die kommerziell erhältliche BME Vitaminlösung (100 x) verwendet. Hitzeempfindliche Substanzen und Lösungen mit D₂O wurden mit einem 0,22 μ m Filter steril filtriert, alle weiteren Lösungen wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Tabelle 2.5: Verwendete Vollmedien. Angegeben ist jeweils die Zusammensetzung für 1 l.

Medium	Zusammensetzung	
Luria-Bertani (LB)-Medium (pH 7)	10 g	Trypton/Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	ad 1000 ml	H ₂ O
Terrific Broth (TB)-Medium (optimiert für GTB-Synthese)	12 g	Trypton/Pepton
	24 g	Hefeextrakt
	4 ml	Glycerin
	6 g	Na ₂ HPO ₄
	3 g	KH ₂ PO ₄
	1 g	NH ₄ Cl
	0,5 g	NaCl
	ad 1000 ml	H ₂ O
direkt vor der Verwendung Zusatz folgender steriler Lösungen:		
	1 ml	1 M MgSO ₄
	1 ml	0,1 M CaCl ₂
	0,5 ml	10 mg/ml Thiamin
	10 ml	20 % Glucose
	20 ml	20 % Casamino-säuren
	1 ml	100 mg/ml Amp

Tabelle 2.6: Verwendete Minimalmedien. Angegeben sind die Zusammensetzungen für je 250 ml Minimalmedium, verwendet für vier unterschiedliche Markierungsmuster. Pro Ansatz einer Synthese selektiv ¹⁵N-markierter GTB wurde jeweils nur eine der unten in der Tabelle aufgelisteten Aminosäuren eingesetzt.

Zusammensetzung	u- ¹⁵ N	u- ² H, ¹⁵ N	u- ² H, ¹³ C, ¹⁵ N	u- ² H, sel. ¹⁵ N
H ₂ O	214 ml			
D ₂ O (99,85 %/ 99,9 %)		164 ml	211 ml	239 ml
Eco <i>E. coli</i> OD3 DN		50 ml		
Na ₂ HPO ₄	1,5 g	1,5 g	1,5 g	1,5 g
KH ₂ PO ₄	0,75 g	0,75 g	0,75 g	0,75 g
NaCl	0,125 g	0,125 g	0,125 g	0,125 g
NH ₄ Cl				0,25 g
1 % ¹⁵ NH ₄ Cl	25 ml			
1 % ¹⁵ ND ₄ Cl		25 ml	25 ml	
1 M MgCl ₂	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
0,1 M CaCl ₂	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
1 M MgSO ₄	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
20 % Glucose	5 ml	5 ml		5 ml
10 % u- ² H, ¹³ C-Glucose			10 ml	
50 % Glycerin	2 ml	2 ml		2 ml
20 mg/ml Thiamin	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
100 x Vitaminlösung	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
100 mg/ml Amp	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
α- ¹⁵ N-L-Lysin				125 mg
¹⁵ N- L-Methionin				57,5 mg
¹⁵ N- L-Valin bzw. ² H, ¹⁵ N- L-Valin				57,5 mg

2.2.2 Anlegen von Glycerinkulturen

Für die Lagerung der mit dem Plasmid pCWΔlac(-10 GTB) transformierten *E. coli* BL21 wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Amp mit dem entsprechenden Klon angeimpft und bei 37 °C und 230 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur mit 1 ml sterilem 80 %igen Glycerin versetzt, zu je 1 ml in 1,8 ml Kryoröhrchen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Synthese von unmarkierter GTB

Die Herstellung von unmarkierter GTB wurde in Schüttelkolben mit Schikanen durchgeführt, die maximal zu einem Viertel mit TB-Medium (s. Tabelle 2.5) befüllt waren. Das Bakterienwachstum wurde durch Messung der OD₆₀₀ verfolgt, wofür 100 µl Kultur mit 900 µl TB-Medium verdünnt wurden. Als Leerwert diente TB-Medium.

Für die Vorkultur wurden 50 ml TB-Medium mit dem entsprechenden GTB-Klon aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 230 rpm inkubiert. Mit dieser Kultur wurde eine Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 30 °C und 230 rpm wachsen gelassen. Die Expression des -10 GTB-Gens wurde bei einer OD₆₀₀ von 1 mit 1 mM IPTG induziert und die Inkubation für 20-24 h fortgeführt. Dabei wurde der pH-Wert mit pH-Indikatorpapier kontrolliert und bei Bedarf mit 10 M steriler Natronlauge auf pH 7 eingestellt. Die Zellen wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei 4225 x g und 4 °C geerntet und bei -20 °C eingefroren.

2.2.4 Synthese von isotopenmarkierter GTB

Die Synthese von isotopenmarkierter GTB erfolgte nach der Methode von Marley et al. [97], bei der zunächst eine gewisse Zellmasse in Vollmedium erzeugt und erst anschließend in Minimalmedium die Synthese des rekombinanten Proteins induziert wird. Wenn nicht im Folgenden anders beschrieben, galten dabei die unter 2.2.3 erläuterten Bedingungen. Es wurde zunächst eine 50 ml Vorkultur in TB-Medium angesetzt und inkubiert. Mit dieser wurde eine Starterkultur in TB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 230 rpm inkubiert. Die angestrebte OD₆₀₀ der Starterkultur richtete sich nach den Volumina von Starter- und anschließender Hauptkultur. Die Hauptkultur in Minimalmedium wurde stets mit einer OD₆₀₀ von 4 angesetzt, sodass z. B. für das Ansetzen einer 250 ml Hauptkultur, 1 l Starterkultur mit einer OD₆₀₀ von 1 oder 250 ml Starterkultur mit einer OD₆₀₀ von 4 benötigt wurden. Um die Bakterienkultur von Vollmedium auf Minimalmedium umzusetzen, wurden die Zellen durch Zentrifugation in sterilen Zentrifugenbechern bei 6000 x g und 8 °C für 15 min abgetrennt, in einer Lösung mit 6 g/l Na₂HPO₄, 3 g/l KH₂PO₄ und 0,5 g/l NaCl in H₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Für die Herstellung deuterierter GTB wurden Resuspension und anschließende Zentrifugation mit D₂O-haltiger Lösung wiederholt. Das Bakterienpellet wurde in dem jeweiligen Minimalmedium (s. Tabelle 2.6) resuspendiert und in Schüttelkolben mit Schikanen überführt, sodass diese zu maximal einem Achtel befüllt waren. Die Kulturen für die entsprechenden Isotopenmarkierungen der GTB hatten folgende Volumina: uniform-¹⁵N (u-¹⁵N) 1 l, u-²H,¹⁵N 500 ml,

$u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N 250 ml, $u\text{-}^2\text{H}$, $\alpha\text{-}^{15}\text{N}$ -Lys 500 ml, $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -Met 500 ml, $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -Val 500 ml und $u\text{-}^2\text{H}$, $^2\text{H}^{15}\text{N}$ -Val 250 ml. Zum Abbau noch unmarkierter Metabolite wurde 1-2 h bei 37 °C und 230 rpm inkubiert, bevor mit 1 mM IPTG induziert wurde. Nach 3,5-7,5 h wurde die Temperatur auf 30 °C reduziert und nochmal 1 mM IPTG sowie 100 µg/ml Amp hinzugegeben. Der pH-Wert wurde bei Bedarf mit steriler 8 M NaOD auf pH 7 korrigiert. Die Zellen wurden nach 16-17 h Kultivierung bei selektiver Markierung bzw. nach 18-20 h Kultivierung bei uniformer Markierung wie o. a. geerntet und bei -20 °C eingefroren.

2.3 Proteinreinigung

Das verwendete Reinigungsschema basiert auf einem Protokoll, das Seto et al. für die GTB-Reinigung entwickelten [62]. Nach dem Zellaufschluss (s. 2.3.2) wurde das Enzym mittels Ionenaustauschchromatographie mit SP-Sepharose FF (s. 2.3.3) und anschließender Affinitätschromatographie mit UDP-Hexanolamin-Sepharose (s. 2.3.4) gereinigt. Die Säulenchromatographien wurden entweder mit Hilfe einer einfachen Peristaltikpumpe (Econo Pump) mit angeschlossenem UV-Detektor, Schreiber und Fraktionssammler oder mit einem ÄKTA-System durchgeführt. Alle Reinigungsschritte fanden mit gekühlten Puffern bei 4 °C oder auf Eis statt.

2.3.1 Reinigungspuffer

Die Reinigungspuffer wurden mit H_2O angesetzt und DTT erst kurz vor Gebrauch zugegeben (s. Tabelle 2.7). Für die Proteinreinigung mit dem ÄKTA-System wurden die Puffer mit einem 0,45 µm Filter filtriert und entgast.

2.3.2 Zellaufschluss

Das Zellpellet wurde aufgetaut und in Resuspensionspuffer (s. Tabelle 2.7) resuspendiert (ca. 50 ml pro 10 g Pellet). Die Zellen wurden mit einer French Press bei einem Druck von 19.200 psi aufgeschlossen. Dabei wurde die Zellsuspension zweimal durch die Presse gegeben. Die Zellfragmente wurden durch 1 h Zentrifugation bei 110.000 x g und 4 °C abgetrennt und der Überstand mittels Säulenchromatographie gereinigt. Vor dem Einsatz in das ÄKTA-System wurde der Überstand mit einem 0,8 µm Filter filtriert.

2.3.3 Ionenaustauschchromatographie mit SP-Sepharose

Die erste Stufe der GTB-Reinigung bestand aus einer Kationenaustauschchromatographie mit SP-Sepharose FF als starkem Kationenaustauscher. Da die GTB einen theoretischen pI von 8,27 besitzt, lag sie bei dem pH-Wert der Puffer von 6,9 (s. 2.3.1) positiv geladen vor und band an die negativ geladenen Sulfopropylgruppen der Sepharosematrix. Nach Herunterwaschen negativ geladener Moleküle konnte die Elution mit einem Puffer erhöhter Salzkonzentration erfolgen.

Für das Zelllysate aus 1 l Kultur wurden etwa 150 ml SP-Sepharose FF eingesetzt und in eine

Tabelle 2.7: Verwendete Reinigungspuffer. Der pH-Wert der Puffer betrug 6,7 bei 25 °C (6,9 bei 4 °C).

Puffer	Zusammensetzung	
Resuspensionspuffer	50 mM	MOPS
	1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	1 Tablette	Proteaseinhibitor/ 50 ml Puffer
SP-Sepharose-Waschpuffer (SP-Waschpuffer)	50 mM	MOPS
	1 mM	DTT
SP-Sepharose-Elutionspuffer (SP-Elutionspuffer)	50 mM	MOPS
	500 mM	NaCl
	1 mM	DTT
UDP-Hexanolamin-Sepharose-Waschpuffer (UDP-Hex-Waschpuffer)	50 mM	MOPS
	500 mM	NaCl
	5 mM	MnCl ₂
	1 mM	DTT
UDP-Hexanolamin-Sepharose- Elutionspuffer (UDP-Hex-Elutionspuffer)	50 mM	MOPS
	500 mM	NaCl
	5 mM	MnCl ₂
	8 mM	UDP
	1 mM	DTT

Säule für das entsprechende System gepackt. Die im Folgenden angegebenen Flussraten beziehen sich auf die Peristaltikpumpe, bei Verwendung des ÄKTA-Systems betrug die Flussrate durchgehend 1 ml/min. Der Ionenaustauscher wurde mit 2-3 Säulenvolumina (SV) SP-Waschpuffer mit einer Flussrate von 1-6 ml/min äquilibriert bevor das Zelllysate einmal mit 5-6 ml/min und weitere drei- bis viermal mit 0,2-0,5 ml/min geladen wurde. Anschließend wurde so lange mit SP-Waschpuffer bei 2-6 ml/min gewaschen bis die Extinktion des Durchflusses bei 280 nm eine konstante Basislinie zeigte. Die Elution mit SP-Elutionspuffer erfolgte mit 5-6 ml/min in Fraktionen von ca. 7-9 ml ebenfalls bis zu einer konstanten Basislinie. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mit Hilfe der Extinktion bei 280 nm und eines qualitativen Bradford-Tests (s. 2.4.2) ermittelt und vereinigt.

Zur Regeneration wurde die SP-Sepharose FF in eine Glasfritte gefüllt und mit je 3 SV der folgenden Lösungen in angegebener Reihenfolge behandelt: H₂O, 8 M Harnstoff, H₂O, 2 M NaCl, H₂O, 1 M NaOH, H₂O bis pH 7, 30 % 2-Propanol, H₂O und 30 % Ethanol. Für die Lagerung bei 4 °C entweder in 20-30 % Ethanol oder in 50 mM MOPS mit 0,05 % NaN₃ (pH 6,9 bei 4 °C) wurde die Säule meistens wieder gepackt.

2.3.4 Affinitätschromatographie mit UDP-Hexanolamin-Sepharose

In der zweiten Stufe der GTB-Reinigung wurden alle übrigen im SP-Sepharose-Eluat noch vorhandenen Biomoleküle entfernt. Die GTB band hierbei an einen ihrer Liganden, UDP, das über Hexanolamin an Sepharose gebunden war. Nach dem Waschen der Säule konnte die GTB mit

UDP eluiert werden. Die verwendeten Puffer sind unter 2.3.1 aufgeführt.

Es wurde eine Säule des entsprechenden Systems mit etwa 15-20 ml UDP-Hexanolamin-Sepharose (UDP-Hex) gepackt und mit 2-3 SV UDP-Hex-Waschpuffer bei einer Flussrate von 0,5 ml/min äquilibriert. Diese und die im Folgenden angegebenen Flussraten beziehen sich auf die Peristaltikpumpe, bei dem ÄKTA-System betrug die Flussrate durchgehend 0,4 ml/min. Die vereinigten Fraktionen des SP-Sepharose-Eluats wurden mit 5 mM MnCl_2 versetzt und bei 0,1-1 ml/min auf die Säule geladen. Nach dem Waschen mit UDP-Hex-Waschpuffer bei 0,1-1 ml/min bis zu einer konstanten Extinktion bei 280 nm wurde die GTB mit UDP-Hex-Elutionspuffer bei 1 ml/min eluiert. Das Eluat wurde in 3-5 ml großen Fraktionen so lange aufgefangen, bis kein Protein mehr von der Säule kam. Die GTB-haltigen Fraktionen wurden mittels eines qualitativen Bradford-Test (s. 2.4.2) ermittelt und vereinigt.

Die Regeneration der UDP-Hex fand in der Säule bei einer Flussrate von ca. 0,5 ml/min mit 10-20 SV folgender Lösungen statt: H_2O , 8 M Harnstoff, H_2O und 20 % Ethanol. Erfolgte die Lagerung bei 4 °C nicht in 20 % Ethanol, wurde die Säule nochmal mit H_2O und anschließend mit 50 mM MOPS, 0,05 % NaN_3 (pH 6,9 bei 4 °C) gewaschen.

2.3.5 Dialyse

Das durch die Affinitätschromatographie in die GTB-Lösung gelangte UDP musste vor dem Einsatz in Experimente entfernt werden. Dies wurde durch Dialyse gegen den in Tabelle 2.8 aufgeführten GTB-Dialysepuffer erreicht. Die GTB-Lösung wurde in einen Dialyseschlauch oder Slide-A-Lyzer mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa gefüllt und zwei- bis dreimal für 24 h gegen 4-5 l GTB-Dialysepuffer dialysiert. Die meisten isotoopenmarkierten GTB-Proben sollten direkt für NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Verfügung stehen und wurden daher nach Zugabe von 8 mM EDTA zur Komplexierung des Mn^{2+} für dreimal 24 h gegen 1-4 l Mg^{2+} -haltigen Phosphatpuffer (s. Tabelle 2.8) dialysiert, ohne vorherige Dialyse gegen GTB-Dialysepuffer. Im Anschluss wurde die GTB-Lösung mit einem 0,22 μm Filter filtriert und bei 4-8 °C gelagert. Der Erfolg der Dialyse wurde mit einem NanoDrop Spektralphotometer überprüft (s. 2.4.3).

Tabelle 2.8: Verwendete Dialysepuffer in H_2O . Der pH-Wert der Puffer betrug 6,7 bei 25 °C.

Puffer	Zusammensetzung	
GTB-Dialysepuffer	50 mM	MOPS
	100 mM	NaCl
	5 mM	MnCl_2
	1 mM	DTT
GTB-Phosphatpuffer	25 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$
	5 mM	MgCl_2
	1 mM	β -ME

2.4 Proteinanalytik

Um den Erfolg der Reinigung und die Qualität der GTB zu kontrollieren, wurden Reinheit, Konzentration und Aktivität der jeweiligen Präparationen überprüft. Die Reinheit wurde grob mit einer SDS-PAGE (s. 2.4.1) gezeigt und die Konzentration sowohl mit dem Bradford-Test als auch mit einem NanoDrop Spektralphotometer bestimmt (s. 2.4.2 und 2.4.3). Die Enzymaktivität wurde mit einem radiochemischen Assay ermittelt (s. 2.4.4).

2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE, mit der Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können, wurde verwendet, um grobe Verunreinigungen (> 1-2 %) der GTB-Probe mit anderen Proteinen auszuschließen. Es wurde ein 12 %iges Polyacrylamid-Trenngel mit einem 6 %igen Sammelgel nach dem Lämmli-System eingesetzt (s. Tabelle 2.9) [98]. Die Proben wurden mit reduzierendem bzw. nicht-reduzierendem Probenpuffer (s. Tabelle 2.10) versetzt und für 15 min bei 85 °C denaturiert. Je nach Proteinkonzentration wurden 5-10 µl der Proben zusammen mit 5-10 µl eines Proteinstandards (6,5-200 kDa, Bio-Rad) auf das Gel aufgetragen. Als Elektrodenpuffer diente eine Lösung aus 6 g/l Tris, 28,8 g/l Glycin und 1 g/l SDS. Die Auftrennung der anionischen Protein-SDS-Komplexe erfolgte bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel und bei 130 V im Trenngel. Das Gel wurde anschließend dreimal für etwa 15 min mit H₂O gewaschen, mindestens 1 h mit dem GelCode® Blue Stain Reagent (Coomassie-Farbstoff) gefärbt und mit H₂O wieder entfärbt. Zur Dokumentation wurde das Gel im Gelrockner für 45 min bei 80 °C auf Whatman-Papier getrocknet und eingescannt.

Tabelle 2.9: SDS-Polyacrylamid-Gele. Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 2 Gelen. Die Zugabe von TEMED erfolgte zuletzt, da es die Polymerisation startet.

	Trenngel (12 %)	Sammelgel (6 %)
Rotiphorese® Gel 30	4 ml	1 ml
1,5 M Tris, pH 6,8		1,25 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml	
H ₂ O	3,2 ml	2,58 ml
10 % SDS	100 µl	50 µl
87 % Glycerin	200 µl	100 µl
20 % Ammoniumpersulfat	50 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Tabelle 2.10: 2 x Probenpuffer für SDS-PAGE.

	reduzierend	nicht-reduzierend
Glycerin	1,2 ml	1,2 ml
1,5 M Tris, pH 6,8	1,2 ml	1,2 ml
10 % SDS	3 ml	3 ml
β-ME	0,5 ml	
Bromphenolblau	10 mg	10 mg
Harnstoff	3 g	3 g
H ₂ O	ad 10 ml	ad 10 ml

2.4.2 Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf der Wechselwirkung des Farbstoffes Coomassie-Brilliantblau G-250 mit Proteinen [99]. Durch die Bindung des Farbstoffes vorwiegend an aromatische und basische Aminosäuren, speziell an Arginine, verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm [100]. Mit dem bloßen Auge ist ein Farbumschlag von rotbraun nach blau erkennbar.

Bei einem qualitativen Bradford-Test wurden 20 µl Probe mit 200 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate) in einer Mikrottestplatte gemischt und die Färbung mit dem Auge beobachtet.

Für den quantitativen Bradford-Test zur Bestimmung der GTB-Konzentration wurde Bovines Gammaglobulin in Konzentrationen von 100, 200, 300, 400 und 500 µg/ml als Proteinstandard eingesetzt. Die Probe wurde so verdünnt, dass ihre Konzentration im Bereich der Standards lag. Je 10 µl Puffer (Leerwert), Standard und Probe wurden mindestens in Doppelbestimmung mit 200 µl Bradford-Reagenz in einer Mikrottestplatte gemischt, für 15 min inkubiert und anschließend die Extinktion bei 630 nm mit einem Mikroplattenleser gegen den Leerwert gemessen (ein Filter für 595 nm war nicht vorhanden). Die GTB-Konzentration wurde mit Hilfe der Standardgeraden ermittelt.

2.4.3 Spektroskopische Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration kann durch Messung der Extinktion bei 280 nm ermittelt werden. Die Methode beruht darauf, dass Tryptophan und Tyrosin und in geringem Maße Cystin Licht dieser Wellenlänge absorbieren. Für die Berechnung der Proteinkonzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($A = \varepsilon \cdot c \cdot d$ mit A = Absorption, ε = molarer Absorptionskoeffizient in l/(mol · cm), c = Konzentration in mol/l und d = Schichtdicke in cm) wird der molare Absorptionskoeffizient ε bei 280 nm benötigt. Alternativ kann auch der Massenabsorptionskoeffizient ε^* in l/(g · cm) eingesetzt werden, sodass die Konzentration in g/l erhalten wird. Für die GTB kann ε^* mit 10 l/(g · cm) abgeschätzt werden [92].

Die Extinktionen der unverdünnten Proben wurden mindestens in Dreifachbestimmung mit einem NanoDrop Spektralphotometer gemessen. Das Probenvolumen betrug 1,5-2 µl und als Leerwert diente der entsprechende Puffer.

Zusätzlich zu der Proteinkonzentration wurden die Proben mit dem NanoDrop auch auf Verunreinigungen mit Nucleinsäuren bzw. Nucleotiden, hier vorwiegend UDP aus der Reinigung, geprüft. Zu erkennen sind diese an ihrer charakteristischen Absorption bei 260 nm. Ein Verhältnis A_{260}/A_{280} kleiner 0,6 deutet auf eine ausreichend reine Proteinprobe hin [101].

2.4.4 Aktivitätstest

Die GTB-Aktivität wurde nach einem von Palcic et al. entwickelten radiochemischen Assay bestimmt [60]. Hierbei wird die durch die GTB katalysierte Synthese des B-Trisaccharids beobachtet. Uniform ^{14}C -markierte Galactose wird von dem Donor UDP-Gal auf den Akzeptor H-Disoctyl übertragen, der über seinen hydrophoben Octyl-Rest in wässriger Umgebung an eine C18-

Reversed-Phase-Säule (Sep-Pak® Vac RC C18 Cartridge) bindet. Nach Herunterwaschen des nicht umgesetzten Donors wird mit Methanol eluiert und das Produkt mittels Flüssigkeitsszintillationszählung gemessen.

Die GTB-Proben wurden mit 1 x A/B-Puffer (s. Tabelle 2.11) auf ca. 5-8 nM verdünnt, sodass innerhalb der Inkubationszeit weniger als 10 % des Donors umgesetzt wurden. Wird diese Grenze überschritten, ist aufgrund der Substratverknappung keine Linearität mehr zwischen Inkubationszeit und Produktbildung gewährleistet; die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt ab und die Messung ist nicht mehr aussagekräftig. 4 µl der verdünnten Probe wurden mit 1 µl 10 x A/B-Puffer und 5 µl der Donor/Akzeptor-Lösung versetzt (s. Tabelle 2.11), gut gemischt und 2 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Nach einer Inkubationszeit von exakt 10 min oder 15 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 170 µl eiskaltem H₂O gestoppt. Die C18-Reversed-Phase-Säule, angeschlossen an eine Vakuumpumpe, wurde dreimal mit 2 ml Methanol gewaschen und zweimal mit 2 ml H₂O äquilibriert. Die Säule wurde anschließend mit dem Reaktionsansatz beladen und trocken gesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit 2 ml H₂O wurden die gebundenen Di- und Trisaccharide mit dreimal 2 ml Methanol in Szintillationsflaschen eluiert, mit 6 ml Szintillationsflüssigkeit (Aquasafe 800) versetzt und gut gemischt. Die Radioaktivität des gebildeten Produkts wurde in Zerfällen pro Minute (dpm) zweimal für je 1 min mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

Aus der gemessenen Aktivität der Probe (A_{Probe} in dpm) wurde unter Berücksichtigung der maximalen Aktivität der Donor/Akzeptor-Lösung (A_{max} in dpm), der Aktivität einer Probe ohne GTB (A_{Leerwert} in dpm), der Stoffmenge UDP-Gal ($n_{\text{UDP-Gal}}$ in µmol), des eingesetzten Volumens der Proteinlösung (0,004 ml/Verdünnungsfaktor = V_{Protein}) und der Inkubationszeit (t in min) die Volumenaktivität (VA in U/ml) berechnet:

$$VA = \frac{(A_{\text{Probe}} - A_{\text{Leerwert}}) \cdot n_{\text{UDP-Gal}}}{(A_{\text{max}} - A_{\text{Leerwert}}) \cdot V_{\text{Protein}} \cdot t} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Eine Unit (U) ist dabei definiert als der Umsatz von 1 µmol Substrat pro min. Aus der VA wurde durch Einbeziehung der Proteinkonzentration die spezifische Enzymaktivität in U/mg bestimmt.

Tabelle 2.11: Puffer und Stammlösung für den Aktivitätstest. Die Konzentrationen von Donor und Akzeptor lagen im Reaktionsansatz beim 9,9 bzw. 5,6fachen K_M [65], sodass die ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit nahe v_{max} lag. Das radioaktive UDP-Gal stammte aus zwei Chargen mit gleicher Volumenaktivität aber unterschiedlicher Konzentration.

		Zusammensetzung
10 x A/B-Puffer	500 mM	MOPS (pH 7)
	200 mM	MnCl ₂
	10 mg/ml	BSA
Donor/Akzeptor-Lösung	992 µM / 4,96 nmol	H-Dis-octyl
	532 µM / 2,66 nmol	UDP-Gal
	786 Bq	UDP-u- ¹⁴ C-Gal
	Charge 1: 13 µM / 0,065 nmol	
	Charge 2: 15 µM / 0,075 nmol	

2.5 Ligandenbindung

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die GTB 1:1 Bindungen mit Liganden eingeht, wobei die Dimerisierung des Proteins die Bindungsstellen nicht beeinflusst [67,68,102].

Allgemein kann die 1:1 Bindung eines Liganden L an einen Rezeptor R durch folgende Reaktion ausgedrückt werden:



Die zeitliche Veränderung der Komplexkonzentration $[RL]$ wird dabei beschrieben mit:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{on} \cdot [R] \cdot [L] - k_{off} \cdot [RL] \quad (\text{Gl. 2.3})$$

mit: k_{on} Assoziationsrate in $\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$
 k_{off} Dissoziationsrate in s^{-1}
 $[L]$ Konzentration des freien Liganden in M
 $[R]$ Konzentration des freien Rezeptors in M

Unter Gleichgewichtsbedingungen liegen keine zeitabhängigen Konzentrationsänderungen vor, d. h. $d[RL]/dt$ ist 0, wobei das System stets dynamisch bleibt. Nach dem Massenwirkungsgesetz folgt für verdünnte Lösungen:

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

K_D ist die Dissoziationskonstante der Bindung und wird in M angegeben. Ihr Reziprok wird als Assoziationskonstante K_A bezeichnet. Für die Bestimmung von K_D werden demnach $[R]$, $[L]$ und $[RL]$ benötigt, die wie folgt dargestellt werden können:

$$[R] = [R]_0 - [RL] \quad (\text{Gl. 2.5})$$

$$[L] = [L]_0 - [RL] \quad (\text{Gl. 2.6})$$

mit: $[L]_0$ Gesamtkonzentration des Liganden in M
 $[R]_0$ Gesamtkonzentration des Rezeptors in M

Einsetzen von (Gl. 2.5) in (Gl. 2.4) liefert nach Umformung:

$$[RL] = \frac{[R]_0 \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad (\text{Gl. 2.7})$$

Diese Gleichung wird nach ihrem Urheber auch Langmuir-Gleichung genannt [103].

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden der Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie (s. 2.7) und STD-NMR-Spektroskopie (s. 2.9) ermöglichen es, die Konzentration $[RL]$, die gleich der Konzentration des gebundenen Rezeptors bzw. des gebundenen Liganden ist, expe-

rimentell mit den SPR-Antworten in RU (*engl.* response units) bzw. dem *STD-AF* (STD-Amplifikationsfaktor) zu korrelieren. Die maximal mögliche Belegung des Rezeptors spiegelt sich in den Werten $RU_{\max}$ und $STD-AF_{\max}$ wider. Man erhält nach (Gl. 2.7) die Gleichungen:

$$RU = \frac{RU_{\max} \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad (\text{Gl. 2.8})$$

$$STD-AF = \frac{STD-AF_{\max} \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

Unter der Voraussetzung, dass der Ligand in einem sehr großen Überschuss zu dem Rezeptor vorliegt und damit der Anteil des gebundenen Liganden die Gesamtkonzentration des Liganden kaum verändert ($[L] \gg [RL]$), kann für $[L]$ das bekannte $[L]_0$ eingesetzt werden. Die Anpassung von (Gl. 2.8) bzw. (Gl. 2.9) an die bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen erhobenen Messwerte liefert dann den K_D -Wert.

Die Gleichgewichtskonstante K_D steht über die freie Bindungsenergie ΔG in Zusammenhang mit der Bindungsenthalpie ΔH und der Entropie ΔS :

$$\Delta G = RT \ln K_D \quad (\text{Gl. 2.10})$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (\text{Gl. 2.11})$$

mit: ΔG freie Bindungsenergie in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
 ΔH Bindungsenthalpie in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
 ΔS Entropie $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
 R allgemeine Gaskonstante in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
 T Temperatur in K

ΔH und ΔS liefern Informationen über die treibenden Kräfte einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung und lassen sich mit der isothermen Titrationskalorimetrie ermitteln (s. 2.6).

2.6 Isotherme Titrationskalorimetrie

2.6.1 Grundlagen der ITC

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) bietet die Möglichkeit, in einem Experiment Bindungsaffinität und Bindungsenthalpie und damit auch indirekt die Entropie zu bestimmen. Sie gilt als Goldstandard für die Messung von Bindungsenergien [104].

Ein isothermes Titrationskalorimeter besteht aus zwei identischen Zellen, einer Referenz- und einer Probenzelle, die sich in einer adiabatischen Hülle befinden [105]. Durch die Hülle ist eine konstante Umgebungstemperatur gewährleistet. Die Referenzzelle wird mit dem entsprechenden Puffer oder H_2O befüllt und die Probenzelle mit der Messlösung, die meist den Rezeptor enthält. Der Referenzzelle wird während des Experiments kontinuierlich eine konstante Referenzleistung zugeführt, sodass sie sich ganz langsam erwärmt. Das Kalorimeter misst den Tem-

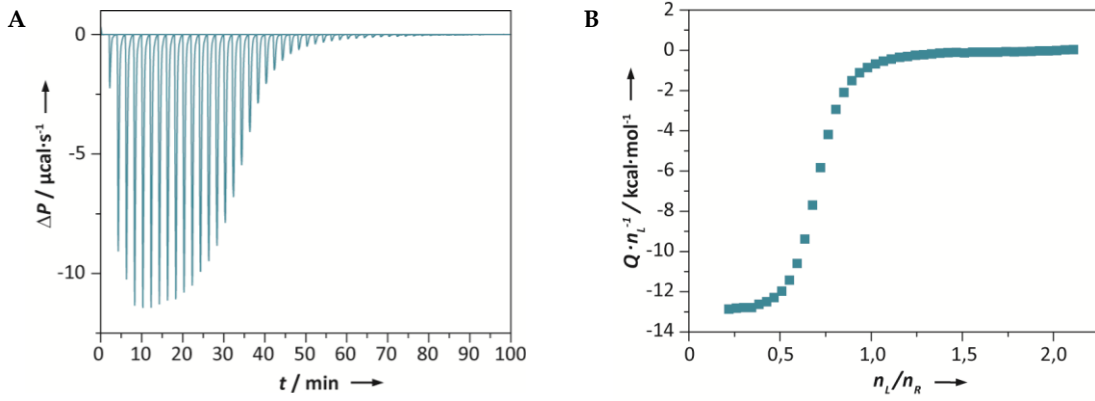


Abbildung 2.2: Beispiel einer ITC-Messung. (A) Rohdaten und (B) differenzielle ITC-Bindungsisotherme. Hierbei ist die integrierte Heizleistung Q dividiert durch die injizierte Stoffmenge des Liganden n_L aufgetragen gegen das molare Verhältnis von Ligand zu Rezeptor. Die Differenz zwischen dem oberen und unteren Plateau ist ΔH , der Wendepunkt zeigt die Stöchiometrie n an und die Steigung der Kurve am Wendepunkt reflektiert den K_A -Wert.

peraturunterschied (ΔT) zwischen den beiden Zellen und hält ihn durch Regulierung der Probenzellenheizung während der gesamten Messung konstant. Die Lösung mit dem Bindungspartner wird aus einer automatischen Spritze, die gleichzeitig als Rührer fungiert, schrittweise in die Probenzelle injiziert. Durch die Bindungsreaktion kommt es bei endothermen Reaktionen zu einer Wärmeaufnahme, bei exothermen Reaktionen zu einer Wärmeabgabe, die über die Probenzellenheizung kompensiert werden. Die Differenz der Heizleistungen für Referenz- und Probenzelle (ΔP) wird zeitabhängig aufgezeichnet (s. Abbildung 2.2). Ihr Integral stellt die entsprechend aufgenommene oder abgegebene Wärmemenge Q dar und wird für die Auswertung durch die bereits injizierte Stoffmenge des Liganden dividiert und gegen das molare Ligand:Rezeptor-Verhältnis aufgetragen. Titriert wird etwa bis zu einem 2fachen Ligandenüberschuss, wobei der Abstand zwischen den Injektionen so groß gewählt werden muss, dass sich das Gleichgewicht einstellen und die Kurve wieder zur Basislinie zurückkehren kann.

Neben dem Bindungsereignis können Temperaturveränderungen auch durch die Injektion an sich, durch Temperaturunterschiede zwischen Probenzelle und Spritze oder durch Verdünnungseffekte auftreten. Kontrollmessungen bestehen daher aus Injektionen von Puffer in Puffer und, befindet sich der Rezeptor in der Probenzelle, aus Injektionen von Puffer in die Rezeptorlösung und von der Ligandenlösung in Puffer. Da der Ligand während eines Bindungsexperiments wesentlich stärker verdünnt wird als der Rezeptor, stellt letztgenannte Leerwertbestimmung die wichtigere dar.

Nach Subtraktion der Leerwerte (genauere Angaben unter 2.6.2) lassen sich K_D (aus K_A) und ΔH durch Anpassung folgender Gleichungen an die differenzielle Bindungsisotherme bestimmen [106-108]:

$$Q = \frac{n[R]_0 \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{[L]_0}{n[R]_0} + \frac{1}{nK_A[R]_0} - \sqrt{\left(1 + \frac{[L]_0}{n[R]_0} + \frac{1}{nK_A[R]_0} \right)^2 - \frac{4[L]_0}{n[R]_0}} \right] \quad (\text{Gl. 2.12})$$

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad (\text{Gl. 2.13})$$

- mit: $[L]_0$ Gesamtkonzentration des Liganden in M
 $[R]_0$ Gesamtkonzentration des Rezeptors in M
 V_0 aktives Probenzellvolumen
 n Anzahl identischer Bindungsstellen pro Molekül
 i laufende Nummer der Injektion

Dabei gilt allgemein für die Wärmemenge Q :

$$Q = n[R]_0 \Delta H V_0 \frac{[RL]}{[R]_0} \quad (\text{Gl. 2.14})$$

Man erhält (Gl. 2.12) durch Einsetzen von (Gl. 2.5) und (Gl. 2.6) in (Gl. 2.4), Auflösen nach $[RL]$ und Einsetzen in (Gl. 2.14). Im Fall von n Rezeptorbindungsstellen wird $[R]_0$ mit n multipliziert. Es ist zu berücksichtigen, dass sich $[L]_0$ und $[R]_0$ im aktiven Zellvolumen bei jeder Injektion ändern und dementsprechend neu berechnet werden müssen.

2.6.2 ITC-Experimente

Die kalorimetrischen Experimente wurden mit einem VP-ITC der Firma MicroCal durchgeführt, wobei GTB in der Probenzelle und der jeweilige Ligand in der Spritze vorgelegt wurden. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 2.12 aufgeführt.

Die GTB wurde mit Zentrifugen-Filtereinheiten konzentriert. Gleichzeitig wurde auch der erste Pufferaustausch durchgeführt. Die Zentrifugationen fanden bei 4 °C und 3220 x g statt. Für Messungen mit Mg^{2+} wurden zuvor 10 mM EDTA zugegeben, um das im GTB-Dialysepuffer

Tabelle 2.12: Puffer für ITC-Messungen. Die ersten Messungen wurden bei pH 7 (25 °C) durchgeführt, anschließend bei pH 6,7 (25 °C), da alle weiteren Experimente in dieser Arbeit bei pH 6,7 durchgeführt wurden. Um Präzipitationen zu vermeiden, wurde außerdem β -ME hinzugegeben. Kontrollexperimente zeigten, dass das Reduktionsmittel keine Veränderung der Basislinie hervorrief. Nähere Angaben sind bei den Darstellungen der entsprechenden Messungen zu finden (3.2.2).

Puffer	Zusammensetzung	
MOPS/-	50 mM	MOPS
	100 mM	NaCl
	± 1 mM	β -ME
MOPS/ Mg^{2+}	50 mM	MOPS
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl_2
	1 mM	β -ME
MOPS/ Mn^{2+}	50 mM	MOPS
	100 mM	NaCl
	5 mM	MnCl_2
	± 1 mM	β -ME

vorhandene Mn^{2+} zu komplexieren. Anschließend wurde die GTB-Lösung in Dialysekassetten dialysiert. Für die Messungen ist es sehr bedeutsam, dass alle Lösungen in Puffer einer Charge vorliegen, da es andernfalls durch die Mischung der Puffer zu unerwünschten Wärmeeffekten kommen kann. Nach dem Pufferaustausch wurden Konzentration (2.4.2), Aktivität (2.4.4) und der A_{260}/A_{280} (s. 2.4.3) der GTB kontrolliert.

Eine Orientierung für die einzusetzende Proteinkonzentration liefert der von Wiseman et al. eingeführte C-Faktor mit $C = [R]/K_D$ [106]. Der C-Faktor sollte für eine zuverlässige Bestimmung der thermodynamischen Parameter Werte zwischen 1 und 1000, idealerweise zwischen 10 und 50 annehmen.

Abhängig von dem K_D -Wert wurden 200-430 μM GTB eingesetzt. Zum Befüllen der 1,4589 ml großen Zelle wurden ca. 1,8 ml Proteinlösung benötigt, d.h. pro Messung zwischen 12,4 mg und 26,8 mg GTB. Die Ligandenkonzentrationen wurden so gewählt, dass das finale molare Ligand:Protein-Verhältnis bei etwa 2 lag. Details sind in den Legenden zu Abbildung 3.9 und Abbildung A 4 bis Abbildung A 7 zu finden. Die Lösungen wurden vor der Messung temperiert und entgast, die Probenzelle gesäubert und vollständig entleert und die Referenzzelle vor der ersten Messung mit H_2O gefüllt. Die Messparameter wurden wie in Tabelle 2.13 angegeben eingestellt.

Die gemessenen Daten wurden mit einer ITC-Routine für das Programm Origin 7 ausgewertet. Für die Bestimmung der Leerwerte wurden Puffer in Puffer und Ligand in Puffer injiziert. Die Puffer-in-Puffer-Injektionen zeigten nur sehr kleine unsystematische Abweichungen in der Heizleistung und mussten für die Auswertung nicht weiter berücksichtigt werden (s. 3.2.2 und Abbildung 3.8). Mittels linearer Regression wurde eine Gerade an die durch Ligandenverdünung hervorgerufenen Wärmemengen angepasst, die anschließend von den Messwerten des eigentlichen Bindungsexperiments subtrahiert wurde. Mit Hilfe der Software wurden K_D , ΔH , n und ΔS wie unter 2.6.1 beschrieben berechnet. Hierbei wurden auch die sich ändernden GTB- und Ligandenkonzentrationen berücksichtigt. Obwohl für die GTB eine 1:1-Bindung bekannt ist, wurde der Stöchiometriefaktor n als Variable behandelt. Sein Wert zeigt die tatsächlich aktiven Bindungsstellen. Eine Abweichung von 1 kommt vor allem durch nicht exakt bestimmbare Konzentrationen von aktivem Protein zustande.

Tabelle 2.13: Parameter für ITC-Messungen.

Parameter	Einstellung
Temperatur	25 °C
Rührgeschwindigkeit	307 rpm
Referenzleistung	10 $\mu\text{cal/s}$ oder 20 $\mu\text{cal/s}$
Wartezeit vor der Messung	180 s
Anzahl Injektionen	40 oder 49
Injektionsvolumina	1. Injektion: 2 μl alle weiteren Injektionen: 5 μl oder 6 μl
Abstand zwischen den Injektionen	120 s
Filterperiode pro Datenpunkt	2 s

2.7 Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie

2.7.1 Grundlagen der SPR-Spektroskopie

Die Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie (SPR, *engl.* surface plasmon resonance) ist eine Methode zur Untersuchung von biomolekularen Wechselwirkungen [109-111]. Ein Bindungspartner, der sogenannte Ligand, wird hierbei auf einer Oberfläche immobilisiert und mit dem anderen in Lösung vorliegenden Bindungspartner, dem Analyten, in Kontakt gebracht.

Ein gewöhnlicher SPR-Biosensor besteht aus einem Glasprisma (optisch dichtes Medium) das an eine mit Flüssigkeit durchströmte Flusszelle (Fc; optisch dünnes Medium) grenzt. Getrennt werden beide durch einen dünnen Metallfilm, der meist aus Gold besteht und häufig zusätzlich mit einer Matrix beschichtet ist (Abbildung 2.3). Die Goldoberfläche wird über das Prisma mit monochromatischem p-polarisiertem Licht bestrahlt und zwar unter Winkeln, bei denen Totalreflexion stattfindet. Durch die Totalreflexion entsteht ein sogenanntes evaneszentes Feld, das exponentiell mit dem Abstand zur Oberfläche abnimmt. In Bezug auf den Sensorchip bedeutet das, dass es nur etwa 300 nm in die Flusszelle hinein wirkt. Ist die Resonanzbedingung erfüllt, können sogenannte Oberflächenplasmonen angeregt werden. Oberflächenplasmonen sind Wellen von oszillierenden Oberflächenladungsdichten, die sich auf der Metalloberfläche bewegen. Durch die Interaktion wird das reflektierte Licht unter einem bestimmten Winkel, dem Resonanzwinkel, geschwächt und es kann mit einer Photozelle ein Intensitätsminimum detektiert werden (Abbildung 2.4).

Der Resonanzwinkel ist unter anderem abhängig von der Temperatur, der Metallschicht, der Wellenlänge des einfallenden Lichts und den Brechungsindizes vom Prisma und der Lösung, die sich in unmittelbarer Nähe (s. o.) der Metallschicht befindet. Werden Erstgenannte konstant gehalten, spiegelt der Resonanzwinkel nur noch den Brechungsindex der Lösung wider. Bei Bindung eines Analyten an einen auf der Oberfläche immobilisierten Liganden ändert sich der Brechungsindex und somit auch der Resonanzwinkel. Die Position des Intensitätsminimums, der SPR-Effekt, wird zeitabhängig in Resonanzeinheiten (RU, *engl.* resonance units) aufgezeichnet und als sogenanntes Sensorgramm angezeigt (s. Abbildung 2.5). Eine Änderung um 1 RU

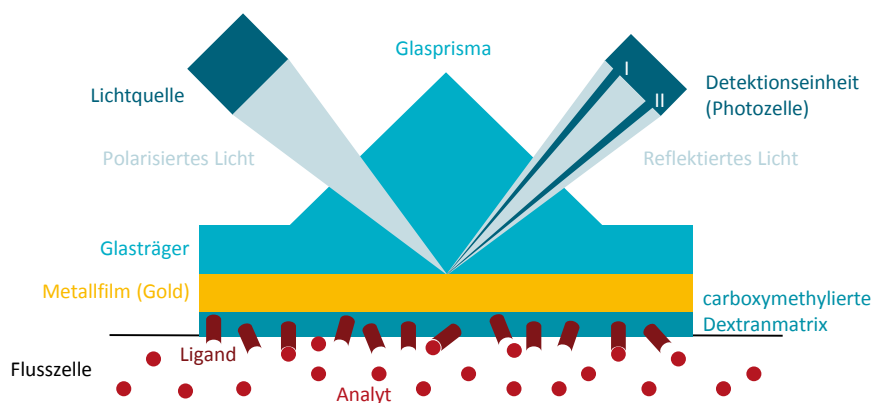


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau eines SPR-Biosensors. Der SPR-Effekt verhält sich abhängig vom Brechungsindex der unmittelbar an den Metallfilm grenzenden Umgebung. Bei Bindung eines Analyten verändert sich der SPR-Winkel, hier von I nach II. (nach [109])

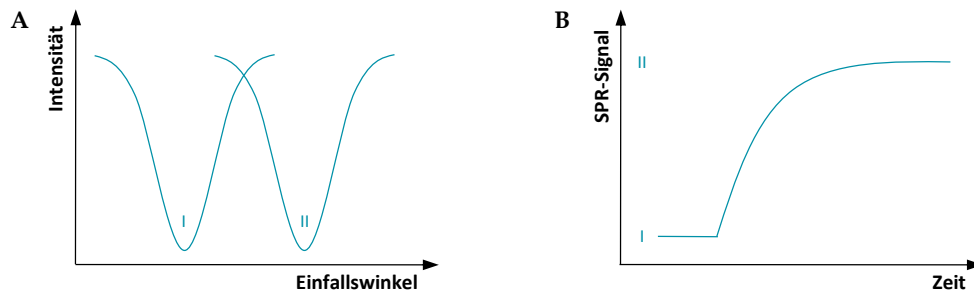


Abbildung 2.4: (A) Intensität des reflektierten Lichts in Abhängigkeit vom Einfallswinkel. Bei Veränderung des Brechungsindex in unmittelbarer Nähe der Chipoberfläche ändert sich die Position des Intensitätsminimums, hier von I nach II. (B) Sensorgramm. Detektion der Intensitätsminimumsposition in Abhängigkeit von der Zeit.

entspricht ungefähr einer Massenzunahme bzw. -abnahme auf der Sensoroberfläche von 1 pg/mm^2 . Um unspezifische Effekte, wie z. B. unspezifische Bindungen und konzentrationsabhängige Effekte, von den Bindungsereignissen trennen zu können, wird eine Referenzzelle eingerichtet, deren Signal von dem der Messzelle subtrahiert wird.

In dieser Arbeit wurde als SPR-System das Biacore 3000 eingesetzt. Das Gerät bietet die Möglichkeit bis zu vier Flusszellen gleichzeitig zu verwenden. Es besteht ein permanenter Lösungsfluss, der nacheinander die Flusszellen durchströmt. Ist der Ligand bereits immobilisiert, fließt Laufpuffer durch die Zellen und in dem Sensorgramm wird die Basislinie angezeigt. Bei Injektion eines Bindungspartners steigt das SPR-Signal an und erreicht bei ausreichend langer Injektion ein Plateau; das System steht im (Fließ-)Gleichgewicht. Anschließend wird wieder auf Laufpuffer umgeschaltet und das SPR-Signal sinkt wieder ab. Je nach System ist noch die Injektion einer Regenerationslösung notwendig, damit der Chip frei vom Analyten ist und das Signal wieder zur Basislinie zurückkehrt.

Werden die im Gleichgewicht gemessenen RU gegen die jeweiligen Konzentrationen des Analyten aufgetragen, erhält man eine Bindungsisotherme. Aus dieser lässt sich durch Anpassung der (Gl. 2.8) der K_D -Wert ermitteln.

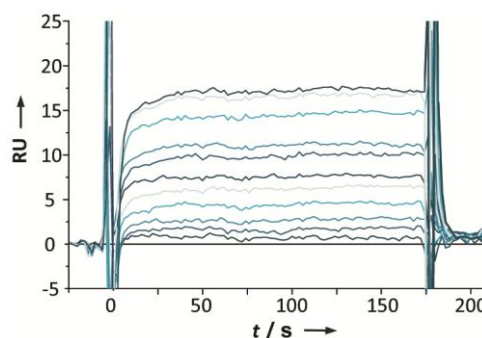


Abbildung 2.5: Beispiel eines Sensorgramms. Dargestellt sind die Differenzen zwischen Mess- und Referenzzelle aufgezeichnet bei unterschiedlichen Konzentrationen.

2.7.2 SPR-Experimente

Die SPR-Experimente wurden mit einem Biacore 3000 Instrument bei 25 °C und in den in Tabelle 2.14 angegebenen Puffern durchgeführt.

Der GTB-Dialysepuffer der GTB-Proben wurde mit Zentrifugen-Filtereinheiten bei 4 °C und 3220 x g gegen einen SPR-Puffer ausgetauscht. Beim Wechsel zu Mg^{2+} -haltigem Puffer wurden vorher 10 mM EDTA zugegeben, um das im GTB-Dialysepuffer vorhandene Mn^{2+} zu komplexieren. Nach dem Pufferaustausch wurden Konzentration (2.4.2), Aktivität (2.4.4) und der A_{260}/A_{280} (s. 2.4.3) der GTB kontrolliert. UDP-Gal, 3DD und D-Biotin wurden ebenfalls in diesen Puffern gelöst, UDP-6-biotinyl-Gal in H_2O und NeutrAvidin® (NA) in 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 4. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch mit einem 0,22 μm Filter fitriert.

Tabelle 2.14: Puffer für SPR-Messungen. Die Puffer hatten einen pH-Wert von 6,7 bei 25 °C und wurden vor Gebrauch mit einem 0,22 μm Filter filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Puffer	Zusammensetzung	
MOPS/-	50 mM	MOPS
	100 mM	NaCl
MOPS/ Mg^{2+}	50 mM	MOPS
	100 mM	NaCl
	5 mM	$MgCl_2$
MOPS/ Mn^{2+}	50 mM	MOPS
	100 mM	NaCl
	5 mM	$MnCl_2$

Es wurden zwei verschiedene experimentelle Anordnungen verwendet. Bei der einen wurde GTB auf dem Sensorchip immobilisiert, bei der anderen das Substratanalogon UDP-6-biotinyl-Gal (Abbildung 2.6).

Als Träger für die GTB diene ein CM5-Chip. Bei diesem Chip befindet sich carboxymethyliertes Dextran als Matrix auf der Goldoberfläche. Nach dem Einsetzen wurde der Chip dreimal für ca. 6 min mit Puffer gewaschen (Priming) und anschließend mit 70 % Glycerin normalisiert. Der Chip, genauer die Carboxylgruppen wurden bei einer Flussrate von 5 $\mu l/min$ mit einer 1:1 Mischung aus 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) für 7 min aktiviert (Reagenzien aus Amine Coupling Kit von Biacore). Bei Zugabe der GTB reagierten die entstandenen N-Hydroxysuccinimidester mit primären Aminogruppen auf

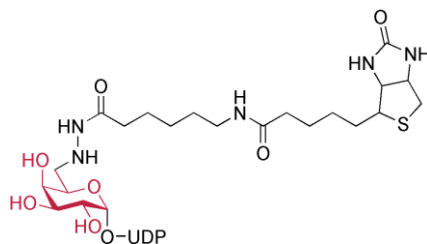


Abbildung 2.6: UDP-6-biotinyl-Gal (UDP-6-biotin- ϵ -amidocaproylhydrazino- α -D-Galactose).

der Oberfläche des Proteins (γ -Aminogruppen von Lysinen oder dem N-Terminus) unter Bildung von kovalenten Bindungen. Die Belegungsdichten betrugen 2563-4109 RU (s. Tabelle 2.15). Zur Deaktivierung der noch vorhandenen aktiven Ester wurde 1 M Ethanolaminhydrochlorid für 7 min bei gleicher Flussrate über die Zelle geleitet. Die Referenzzellen wurden nach dem gleichen Verfahren eingerichtet. Sie bestanden entweder aus einer leeren Flusszelle, die nur aktiviert und deaktiviert wurde, oder waren mit 3654-4048 RU NeutrAvidin® belegt (ähnlich der GTB-Belegungsdichten). Es wurden 10-12 Verdünnungen von UDP-Gal mit Konzentrationen zwischen 5 μ M und 2 mM in MOPS/Mn²⁺ und von 70 μ M bis 8 mM in MOPS/Mg²⁺ vorbereitet. Die Analytlösungen wurden für 3 min bei einer Flussrate von 10 μ l/min injiziert. Zwischen den Injektionen wurde 10 min bei 10 μ l/min mit Laufpuffer gewaschen. Pufferinjektionen zur Kontrolle und zur möglichen Korrektur der Messwerte wurden zwischen den UDP-Gal-Injektionen durchgeführt.

Für die Immobilisierung von UDP-6-biotinyl-Gal wurde ein Streptavidin (SA)-Chip verwendet, ein Goldchip mit carboxymethyliertem Dextran, an das bereits Streptavidin gebunden war. Als Laufpuffer wurde MOPS/- verwendet, um einer Zersetzung des UDP-6-biotinyl-Gal durch die Anwesenheit bivalenter Kationen vorzubeugen. Priming und Normalisierung wurden wie oben beschrieben durchgeführt, dazwischen wurde zusätzlich bei 5 μ l/min dreimal 1 min mit 1 M NaCl/ 50 mM NaOH gespült. Die möglicherweise noch freien Carboxylfunktionen wurden in Amide umgewandelt, indem bei 5 μ l/min fünfmal für 7 min mit EDC/NHS aktiviert und für 7 min mit Ethanolaminhydrochlorid deaktiviert wurde. Anschließend wurden die Oberflächen bei einer Flussrate von 5 μ l/min mit UDP-6-biotinyl-Gal gesättigt, das zu Belegungsdichten von 355-403 RU führte (s. Tabelle 2.15). Bei dieser Art der Immobilisierung wird die sehr starke, nahezu irreversible Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Biotin ausgenutzt. Die Referenzzelle wurde dementsprechend mit D-Biotin gesättigt, resultierend in Belegungsdichten um 100 RU. Die Zugabe von D-Biotin zu den belegten Messzellen ergab keine Änderung der Belegungsdichten, was zusätzlich die bereits vollständige Sättigung zeigte. Es wurden 10 verschiedene Konzentrationen von 20 nM bis 5 μ M bzw. von 75 nM bis 50 μ M GTB in MOPS/Mn²⁺-Puffer angesetzt und bei Flussraten von 30 μ l/min für 3 min injiziert. Messungen mit Akzeptoranalogue enthielten 2,5 mM 3DD entsprechend einer Belegung der GTB von über 95 % bei einem angenommenen K_D -Wert von 110 μ M. Zwischen den Analytinjektionen wurde 5 min mit MOPS/Mn²⁺ gewaschen, dreimal 1 min mit 1 M NaCl in MOPS/Mn²⁺-Puffer regeneriert und weitere 3 min mit Laufpuffer gewaschen.

Die Experimente wurden mindestens in Doppelbestimmung durchgeführt und mit den Programmen BIAevaluation 3.2 und Origin 7 wie unter 2.7.1 beschrieben ausgewertet.

Tabelle 2.15: Verwendete SPR-Chips. Angegeben sind die Chiparten und die Belegungen der jeweiligen Flusszellen (Fc).

Chip	A - CM5	B - CM5	C - SA
Fc 1	leer	leer	105 RU D-Biotin
Fc 2	2563 RU GTB/Mn ²⁺	3969 RU GTB/Mg ²⁺	355 RU UDP-6-biotinyl-Gal
Fc 3	3654 RU NA	4048 RU NA	99 RU D-Biotin
Fc 4	4109 RU GTB/Mg ²⁺	3854 RU GTB/Mg ²⁺	403 RU UDP-6-biotinyl-Gal

Puffereffekte wurden wenn notwendig von den SPR-Effekten des Analyten subtrahiert. Die maximal möglichen Antworten $RU_{\max, \text{theor.}}$ wurden nach (Gl. 2.15) aus den Molekulargewichten der Bindungspartner (M in $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), der Anzahl Bindungsstellen n und der Belegungsdichte in RU_{imm} berechnet.

$$RU_{\max, \text{theor.}} = \frac{M(\text{Analyt})}{M(\text{Ligand})} \cdot n \cdot RU_{\text{imm}} \quad (\text{Gl. 2.15})$$

2.8 Enzymkinetik

In der vorliegenden Arbeit wird die GTB-katalysierte Hydrolyse des Donorsubstrats UDP-Gal analysiert. H_2O ist bei dieser Reaktion neben UDP-Gal das zweite Substrat. Da H_2O in wässriger Lösung in sehr großem Überschuss vorliegt und dessen Konzentration während des Umsatzes als konstant angenommen werden kann, ist die Hydrolyse eine Reaktion (pseudo) 1. Ordnung. In den beiden folgenden Kapiteln werden die Kinetik dieser Reaktion näher erläutert und die Experimente zur Ermittlung der kinetischen Parameter beschrieben.

2.8.1 Grundlagen der Enzymkinetik

Das einfachste Modell einer enzymkatalysierten Reaktion nimmt die irreversible Umsetzung eines Substrats S zu einem Produkt P an (Gl. 2.16) [112,113]. Das Substrat bindet mit der Geschwindigkeitskonstanten k_1 unter Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes (ES) an das Enzym E . ES kann dann entweder mit k_{-1} wieder in E und S zerfallen oder S wird mit k_2 zu dem Produkt P umgesetzt und ebenfalls freigesetzt. Ob ein oder mehrere Produkte entstehen, ist bei diesem von Michaelis und Menten entwickelten Modell nicht relevant.



Der zeitliche Verlauf der Produktbildung ist in Abbildung 2.7 A dargestellt. Er lässt sich grob in drei Phasen einteilen. Zu Beginn der Reaktion steigt die Produktbildungsrate an. Die Konzentrationen an freiem Enzym und Substrat nehmen ab während die des ES -Komplexes und des Produkts zunehmen. Diese erste Phase dauert meist weniger als eine Sekunde und ist schwer zu untersuchen. Es schließt sich eine Phase an, in der die Rate der Produktbildung konstant und der Kurvenverlauf daher linear ist. Dabei ändert sich die Konzentration des ES -Komplexes mit der Zeit nicht; es herrschen Fließgleichgewichtsbedingungen. Verknappt das Substrat, sinkt die Produktbildungsrate wieder und die Kurve nähert sich der Sättigung.

In Abhängigkeit der eingesetzten Substratkonzentrationen ergeben sich unterschiedliche Produktbildungsraten bzw. Reaktionsgeschwindigkeiten (s. Abbildung 2.7 B). Unter Fließgleichgewichtsbedingungen ($d[ES]/dt = 0$) gilt:

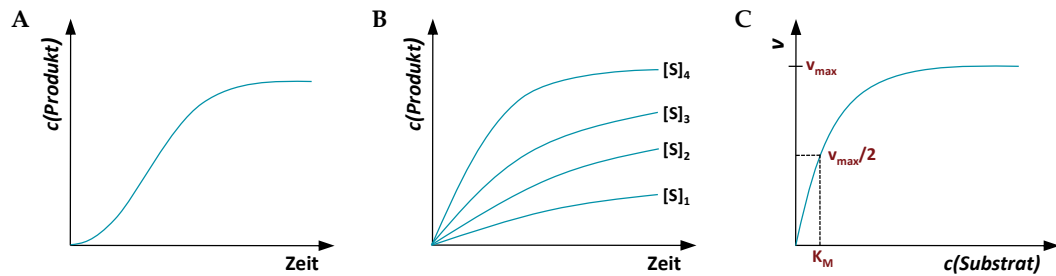


Abbildung 2.7: Michaelis-Menten-Kinetik. (A) Abhängigkeit der Produktkonzentration von der Zeit; die erste Phase ist stark verlängert dargestellt, (B) Abhängigkeit der Produktkonzentration von der Zeit und unterschiedlichen eingesetzten Substratkonzentrationen und (C) Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der Substratkonzentration.

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES] \quad (\text{Gl. 2.17})$$

mit: k_1 Geschwindigkeitskonstante Bildung ES-Komplex in $\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$

k_{-1} Geschwindigkeitskonstante Zerfall ES-Komplex zu E und S in s^{-1}

k_2 Geschwindigkeitskonstante Produktbildung in s^{-1}

$[E]$ Konzentration des freien Enzyms in M

$[S]$ Konzentration des freien Substrats in M

$[ES]$ Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes in M

Nach Ersetzen von $[E]$ durch $[E]_0 - [ES]$ ergibt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit v :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] = \frac{k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (\text{Gl. 2.18})$$

mit: $[P]$ Konzentration des freien Produkts in M

$[E]_0$ Ausgangskonzentration des Enzyms in M

Diese Gleichung kann weiter vereinfacht werden. Sind alle Bindungsstellen des Enzyms belegt, also $[ES] = [E]_0$, wird die Geschwindigkeit der Reaktion maximal. Somit gilt für $v_{\max}$:

$$v_{\max} = k_2 \cdot [E]_0 \quad (\text{Gl. 2.19})$$

Weiterhin ist die Konstante K_M , die Michaelis-Konstante, definiert als:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{Gl. 2.20})$$

Werden (Gl. 2.20) und (Gl. 2.19) in (Gl. 2.18) eingesetzt, erhält man die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Gl. 2.21})$$

Die Gleichung ähnelt der in Kapitel 2.5 beschriebenen Bindungsgleichung (Gl. 2.7), jedoch gibt K_M nur im Grenzfall die Dissoziationskonstante von E und S an und zwar wenn $k_{-1} \gg k_2$. K_M hat die Einheit einer Konzentration. Sein Wert gibt diejenige Konzentration an, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Aus v_{max} lässt sich bei bekannter Enzymkonzentration nach (Gl. 2.19) die Geschwindigkeitskonstante k_2 bestimmen, die auch als Wechselzahl k_{kat} bezeichnet wird. Mit Hilfe des Quotienten k_{kat}/K_M lässt sich die katalytische Effizienz des Umsatzes ableiten und damit auch die Substratspezifität des Enzyms.

Für die experimentelle Bestimmung der relevanten Parameter K_M und v_{max} gilt, dass die Substratkonzentration wesentlich höher sein muss als die Enzymkonzentration, damit $[S] \approx [S]_0$ angenommen werden kann. Bei Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die eingesetzte Substratkonzentration erhält man die in Abbildung 2.7 C dargestellte Kurve, aus der durch Anpassung von (Gl. 2.21) K_M und v_{max} bestimmt werden können.

2.8.2 Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse von UDP-Galactose

Die enzymatische Hydrolyse von UDP-Gal wurde zunächst in ihrem zeitlichen Verlauf mit einem radiochemischen Assay untersucht. Die Bedingungen waren dabei analog zu früheren NMR-Messungen. Anschließend wurden mit dem gleichen radiochemischen Assay die enzymkinetischen Konstanten K_M und k_{kat} für diese Reaktion bestimmt. Bei beiden Versuchsreihen wurde UDP-Gal eingesetzt, dessen Galactoseeinheit uniform ^{14}C -markiert war. Nicht umgesetztes, wegen der Phosphatgruppen negativ geladenes UDP-Gal wurde mit einem Anionenaustauscher von dem Produkt Galactose abgetrennt, welches anschließend mittels Flüssigkeitsszintillationszählung quantifiziert wurde. Das zugrundeliegende Protokoll wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. M. M. Palcic (Carlsberg Laboratory, Kopenhagen, Dänemark) entwickelt und für diese Fragestellungen entsprechend angepasst.

Der GTB-Dialysepuffer der GTB-Proben wurde mit Zentrifugen-Filtereinheiten gegen einen Hydrolyse-Puffer (s. Tabelle 2.16) ausgetauscht. Die Zentrifugationsschritte fanden bei 4 °C und 3220 × g statt. Wie in früheren NMR-Experimenten wurde Bis-Tris-Puffer verwendet. Beim Wechsel zu Mg^{2+} -haltigem Puffer wurden zuvor 10 mM EDTA zugegeben, um das im GTB-Dialysepuffer vorhandene Mn^{2+} zu komplexieren. Nach dem Pufferaustausch wurden Konzentration (2.4.2), Aktivität (2.4.4) und der A_{260}/A_{280} (s. 2.4.3) der GTB kontrolliert.

Tabelle 2.16: Puffer für Hydrolysemessungen. Der pH-Wert der Puffer betrug 6,7 bei 25 °C.

Puffer	Zusammensetzung	
Bis-Tris/ Mg^{2+}	50 mM	Bis-Tris
	50 mM	NaCl
	10 mM	MgCl_2
	1 mM	β -ME
Bis-Tris/ Mn^{2+}	50 mM	Bis-Tris
	50 mM	NaCl
	10 mM	MnCl_2
	1 mM	β -ME

Als starker Anionenaustauscher mit quartären Ammoniumgruppen wurde das Material AG1-X8 von Bio-Rad eingesetzt. Da die Chlorid-Form verwendet werden sollte, wurde die im Institut vorhandene Acetat-Form durch Waschen mit 5 SV 1,5 M NaCl-Lösung auf Cl^- umgesetzt. Die Konvertierung wurde in einer P4 Glasfritte durchgeführt und das Material vorher und hinterher mit 3-5 SV H_2O gewaschen und anschließend getrocknet. 0,4 g Anionenaustauscher (entspricht 640 μmol Bindestellen) wurden in 5 ml Mini-Säulen gefüllt, in 2 ml Reagiergefäße platziert und mit 1 ml H_2O äquilibriert. Kurz vor der Verwendung wurden die Säulen für 5-10 s bei 43 x g zentrifugiert und in ein neues 2 ml Reagiergefäß gestellt.

Für das Testen der Säulen sowie die Anpassung der Volumina zum Abstoppen der Reaktionen und zum Waschen der Säulen wurden zwei verschiedene Lösungen angesetzt. Die erste enthielt 1 mM UDP-Gal und 314 Bq UDP-u- ^{14}C -Gal pro 5 μl in Bis-Tris/ Mg^{2+} -Puffer, die zweite 0,83 mM UDP-Gal, 314 Bq UDP-u- ^{14}C -Gal pro 6 μl und 27 μM GTB in Bis-Tris/ Mg^{2+} -Puffer. Von der ersten Lösung wurden jeweils 5 μl eingesetzt, von der zweiten jeweils 6 μl . Die Experimente wurden sowohl mit der Chlorid-Form, als auch mit der Acetat-Form des Anionenaustauschers durchgeführt. Die Ansätze wurden wie in Tabelle 2.17 angegeben bei 25 °C inkubiert, zum Abstoppen der Reaktion mit eiskaltem H_2O versetzt und auf die vorbereiteten Säulen gegeben. Nach 5-10-sekündiger Zentrifugation bei 43 x g wurde nacheinander mit den angegebenen Volumina H_2O gewaschen und zwischendurch 5-10 s bei 43 x g zentrifugiert. Nach der letzten Zugabe erfolgte eine 15-sekündige Zentrifugation. Der Durchfluss wurde bei den Volumina über 600 μl nach jeder, bei den anderen nach der letzten Zentrifugation in eine Szintillationsflasche transferiert, auf 6 ml mit H_2O aufgefüllt und mit 6 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Aktivität der Proben wurde für zweimal 1 min mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Zusätzlich wurde für jede Lösung die maximale Aktivität bestimmt. Hierfür wurden 5 μl bzw. 6 μl der Lösungen mit 6 ml H_2O und 6 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und wie beschrieben gemessen.

Der Vergleich der Ionenaustauscher-Formen zeigte bei dem hier verwendeten Versuchsaufbau keine Unterschiede (3.1.2). Nachfolgend wird nur die Chlorid-Form eingesetzt.

Für die Aufnahme von Zeit-Umsatz-Kurven der Hydrolyse wurden zwei Reaktionen mit je 100 μl angesetzt. Der erste Ansatz bestand aus 1 mM UDP-Gal, 15,725 kBq UDP-u- ^{14}C -Gal und

Tabelle 2.17: Ansätze zur Überprüfung des Versuchsaufbaus. Ansätze 1-4 sind ohne, Ansätze 5-8 mit GTB. Die angegebenen Volumina zum Waschen wurden nacheinander eingesetzt.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
Form des Ionenaustauschers	Acetat	Acetat	Chlorid	Chlorid	Acetat	Acetat	Chlorid	Chlorid
Probenvolumen	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl	6 μl	6 μl	6 μl	6 μl
Inkubation	-	-	-	-	5,75 h	5,75 h	5,75 h	5,75 h
$V(\text{H}_2\text{O})$ zum Abstoppen	100 μl	600 μl	100 μl	600 μl	100 μl	600 μl	100 μl	600 μl
$V(\text{H}_2\text{O})$ zum Waschen	400 μl	600 μl	400 μl	600 μl	400 μl	600 μl	400 μl	600 μl
		800 μl	400 μl	800 μl	400 μl	800 μl	400 μl	800 μl
		1000 μl		1000 μl		1000 μl		1000 μl

27 μM GTB in Bis-Tris/ Mg^{2+} -Puffer, der zweite enthielt zusätzlich 1 mM 3DD. Die Inkubation fand in einem Thermoblock bei 25 °C statt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (s. Anhang Tabelle A 1) wurden Proben von 5 μl entnommen, mit 100 μl eiskaltem H_2O versetzt und auf die vorbereiteten Säulen gegeben. Nach 5-10-sekündiger Zentrifugation bei 43 x g wurde das Produkt durch zweimalige Zugabe von 400 μl H_2O und 5-10-sekündige Zentrifugation bei 43 x g von der Säule gewaschen. Im letzten Schritt wurde für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in eine Szintillationsflasche transferiert und mit 5 ml H_2O sowie 6 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Aktivität der Probe wurde zweimal für 1 min in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Für beide Reaktionen wurde die maximale Aktivität pro Probe bestimmt sowie ein entsprechender Leerwert ohne GTB, der von den Messwerten subtrahiert wurde. Die korrigierten Messwerte wurden in Galactosekonzentrationen umgerechnet, woran mit Origin 7 folgende Gleichung angepasst wurde:

$$c(\text{Gal}) = c(\text{Gal})_{\text{max}} (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (\text{Gl. 2.22})$$

mit: k Ratenkonstante in h^{-1}
 t Zeit in h

Die maximal erreichbare Galactosekonzentration betrug 1 mM und wurde entsprechend eingesetzt. Die exponentielle Funktion berücksichtigt weder die Anfangsphase der Reaktion noch die inhibierende, kompetitive Wirkung der Produkte. Für einen qualitativen Vergleich der beiden Ansätze reichte sie aber aus. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ wurde über den Zusammenhang $t_{1/2} = 0,69 k$ ermittelt.

Die enzymkinetischen Parameter wurden sowohl in Bis-Tris/ Mg^{2+} -Puffer als auch in Bis-Tris/ Mn^{2+} -Puffer bestimmt. Um den Einfluss der Akzeptorbindung auf die Hydrolyse zu untersuchen, wurden zusätzlich Messreihen in Anwesenheit des Akzeptoranalogs 3DD durchgeführt. Es wurden jeweils 7 Proben mit UDP-Gal-Konzentrationen im Bereich von mindestens $0,5-1,6 \times K_M$ angesetzt und zwar durch eine Reihe von 1:1 Verdünnungen. Proben mit den höchsten Konzentrationen enthielten 2,1-2,5 kBq UDP-u- ^{14}C -Gal. Die GTB-Konzentrationen betrugen 0,025-2,3 μM und die des 3DD 2,5-10 mM, um eine mindestens 95 %ige Belegung des Enzyms zu erreichen. Genauere Angaben sind in den Legenden von Abbildung 3.3 bis Abbildung 3.6 zu finden. Stammlösungen wurden jeweils so hergestellt, dass zu 4 μl UDP-Gal 4 μl GTB-Lösung und 4 μl H_2O bzw. 3DD pipettiert werden konnten. Einzig Proben mit Mn^{2+} und 3DD umfassten nicht das Gesamtvolumen von 12 μl , sondern 246 μl . Dies rührte von der Notwendigkeit her, trotz sehr niedriger UDP-Gal-Konzentrationen eine messbare Aktivität zu erreichen. Inkubiert wurde bei 25 °C bis zu einem Substratumsatz von maximal 10 %. Das radioaktiv markierte Reaktionsprodukt wurde wie oben beschrieben vom Substrat getrennt und quantifiziert. Die Aktivität wurde fünfmal für 1 min mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Zusätzlich wurden der Hintergrund sowie Leerwerte für jede Verdünnung (ohne GTB) ermittelt und von den Messwerten subtrahiert. K_M und v_{max} wurden durch Anpassung der Michaelis-Menten-Gleichung an die korrigierten Messwerte erhalten (s. 2.8.1). k_{kat} wurde aus v_{max} unter Berücksichtigung der GTB-Konzentration und der maximalen Aktivität der höchsten UDP-Gal-Konzentration berechnet. Die nicht-lineare Regression wurde mit Origin 7 durchgeführt.

2.9 NMR-Spektroskopie

Seit 1946 die ersten Kernresonanzsignale nachgewiesen wurden [114,115], entwickelte sich die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (*engl.* nuclear magnetic resonance, NMR) zu einer der wichtigsten Analysemethoden in der Chemie und später auch in der Strukturbiochemie. Neben der Röntgenkristallographie ist die NMR-Spektroskopie eine Methode zur Strukturaufklärung von kleinen und großen Molekülen auf atomarer Ebene. Darüber hinaus findet sie unter anderem breite Anwendung bei der Untersuchung von Moleküldynamiken [95], Protein-Ligand- [116] und Protein-Protein-Wechselwirkungen [117], sowie bei Metabolismusstudien [118]. Durch das Arbeiten in Lösung ist die Möglichkeit gegeben, die Experimente unter annähernd physiologischen Bedingungen durchzuführen.

In dieser Arbeit wurde die NMR-Spektroskopie bei verschiedenen Fragestellungen eingesetzt. Zum einen wurde analysiert, ob das Substratanalogon UDP-6-biotinyl-Gal an die GTB bindet und von ihr umgesetzt wird. Weiterhin wurden Experimente ausgewertet, die von R. Schönherr (Universität zu Lübeck) im Rahmen seines Wahlpflichtpraktikums zur Bestimmung von Bindungskonstanten durchgeführt wurden. Diese wurden als Vergleich zu den mit ITC und SPR ermittelten und in der Literatur beschriebenen K_D -Werten herangezogen. Einen Großteil der Experimente stellte die Protein-NMR-spektroskopische Untersuchung der GTB dar. Hierbei wurden die Proteinsignale isotoptenmarkierter GTB aufgenommen und ausgewertet.

Im Folgenden werden nun die Grundlagen dieser Experimente erläutert und anschließend die experimentellen Details beschrieben.

2.9.1 Theoretische Grundlagen der NMR-Spektroskopie

In einem NMR-Experiment können Atomkerne mit einem Kernspin ungleich null detektiert werden. Eine charakteristische Größe für jedes Isotop, das gyromagnetische Verhältnis γ , bestimmt die Empfindlichkeit der Kerne. In Anwesenheit eines statischen homogenen Magnetfeldes B_0 richten sich die Spins aus und nehmen dabei nur ganz bestimmte Orientierungen an. Die wichtigsten Kerne für die NMR-Spektroskopie von Biomolekülen sind ^1H , ^{13}C , und ^{15}N . Ihre Kernspins nehmen im Magnetfeld zwei Zustände mit geringfügig unterschiedlichen Energien ein, die in einer makroskopischen Probe minimal verschieden besetzt sind. Die Energiedifferenz ist abhängig vom γ des jeweiligen Kernels und B_0 . Ein größeres Feld B_0 bewirkt eine stärkere Aufspaltung der Energieniveaus. Es ergibt sich eine makroskopische Magnetisierung in Richtung des Feldes B_0 , definitionsgemäß in z-Richtung. Transversale Magnetisierungen in x- und y-Richtung sind nicht vorhanden, da die magnetischen Momente hier keine Vorzugsrichtung aufweisen. Zwischen den Zuständen können durch elektromagnetische Wellen mit der Resonanzfrequenz des Kernels Übergänge induziert werden. Sie liegen bei üblichen Magnetfeldstärken im Bereich von Radiowellen und erzeugen transversale x- bzw. y-Magnetisierung und verringerte z-Magnetisierung durch Umbesetzung der Energieniveaus. Die angeregten Spins emittieren Energie und induzieren eine Spannung in der Empfängerspule, die gemessen wird. Man erhält ein Signal in der Zeitdomäne, den sogenannten FID (*engl.* free induction decay). Das eigentliche NMR-Spektrum in der Frequenzdomäne wird durch eine Fouriertransformation (FT) erreicht.

Die Spins kehren nach kurzer Zeit (meist im Sekundenbereich) wieder in ihren Gleichgewichtszustand zurück. Diesen Vorgang nennt man Relaxation. Es werden zwei Relaxationsphänomene unterschieden und zwar die Spin-Gitter-Relaxation mit der Zeitkonstante T_1 und die Spin-Spin-Relaxation mit der Zeitkonstante T_2 . Unter der longitudinalen Relaxation T_1 versteht man die Wiederherstellung der z-Magnetisierung. Die Energie wird dabei in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben. Der Verlust der x-y-Magnetisierung durch Dephasierung der Spins wird als transversale Relaxation T_2 bezeichnet. Dieser Effekt beruht auf der Wechselwirkung von Spins untereinander und auf Magnetfeldinhomogenitäten. Auf die genauen Relaxationsmechanismen soll hier nicht weiter eingegangen werden, da sie für das weitere Verständnis der Experimente nicht entscheidend sind. Wichtig ist allerdings, dass T_2 umgekehrt proportional zu der Linienbreite des NMR-Signals ist. Ein kurzes T_2 führt zu einer großen Linienbreite. T_1 und T_2 hängen von der sogenannten Korrelationszeit ab, die die Rotationsgeschwindigkeit eines Moleküls und damit indirekt auch seine Größe beschreibt. Bei kleinen Molekülen sind T_1 und T_2 gleich groß, wohingegen bei großen Molekülen wie Proteinen T_2 sehr kurz wird und die Signale dementsprechend breit.

1D-NMR-Spektroskopie und spektrale Parameter

Bei der heute verwendeten Impuls-Spektroskopie werden mit einem kurzen (μs) Radiofrequenzimpuls mit hoher Leistung, gleichzeitig alle Kerne einer Sorte angeregt. Je kürzer dieser Puls ist, desto größer wird das abgedeckte Frequenzband. In Abbildung 2.8 ist das einfachste eindimensionale FT-NMR-Experiment dargestellt. Durch die Verwendung ganzer Pulssequenzen und verschiedener Wartezeiten zwischen den Pulsen können unterschiedlichste Phänomene detektiert werden. Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Messung zu erhöhen, wird das Experiment beliebig oft wiederholt (angegeben als Anzahl Scans) und die Daten addiert. Zwischen den Scans muss eine Wartezeit eingefügt werden, damit das System wieder seinen Gleichgewichtszustand erreichen kann. Vor der FT kann der FID mit einer sogenannten Fensterfunktion multipliziert werden, die entweder die Empfindlichkeit oder die Auflösung des Spektrums betont.

Bei 1D-NMR-Experimenten erhält man im Spektrum Signale von Kernen einer Sorte bei verschiedenen (Resonanz-)Frequenzen. Dies rührt von den unterschiedlichen chemischen Umgebungen her, der die Kerne eines Moleküls ausgesetzt sind. Der entsprechende Parameter ist die chemische Verschiebung δ und bestimmt die Position der Signale in einem NMR-Spektrum. Um Spektren, die bei unterschiedlichen Magnetfeldstärken aufgenommen wurden, vergleich-

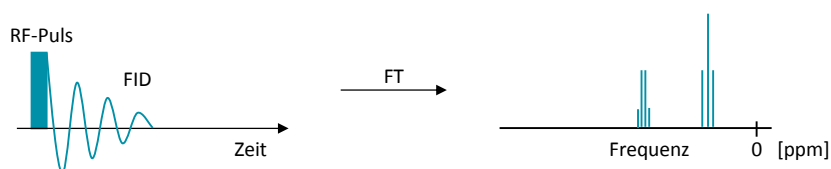


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung eines einfachen eindimensionalen NMR-Experiments. Der kurze Radiofrequenzpuls (RF-Puls) regt alle Kerne einer Sorte an. Der aufgezeichnete FID beschreibt die Summe aller Resonanzen, die mit der Zeit exponentiell abklingen. Durch eine FT erhält man ein Spektrum in der Frequenzdomäne.

bar zu machen, wird δ nicht in Hertz sondern in ppm angegeben. Als Referenz wird die Standardfrequenz einer Referenzsubstanz verwendet. Definitionsgemäß liegt das Signal der Methylprotonen von TMS bei 0 ppm. Eine weitere bei wässrigen Proteinlösungen gängige Referenzsubstanz ist das TSP, das für diese Arbeit verwendet wurde und dessen Methylprotonen ebenfalls bei 0 ppm liegen.

Kerne können über Bindungen hinweg miteinander koppeln. Im Spektrum ist die Kopplung durch eine Aufspaltung der Signale in Multipletts sichtbar. Die Distanz der Linien eines Multipletts wird Kopplungskonstante J genannt und ist unabhängig vom anliegenden Magnetfeld.

Das HSQC-Experiment

Das HSQC (*engl.* heteronuclear single quantum correlation)-Experiment ist ein zweidimensionales NMR-Experiment [119]. Durch die Einführung einer zweiten Frequenzdomäne sind die Signale besser separiert. Die Signalintensitäten sind in der dritten Dimension aufgetragen. Bei einem HSQC-Experiment werden Protonen mit Heteroatomen korreliert, die über eine Bindung miteinander koppeln. Die Magnetisierung wird von dem Proton auf den Heterokern und wieder zurück übertragen. Währenddessen findet eine Markierung der Protonenfrequenzen mit denen der Heterokerne statt. Ein für Proteine häufig eingesetztes NMR-Experiment ist das $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC, das auch für die GTB verwendet wurde. Stickstofffrequenzen werden hierbei mit denen der gebundenen Amidprotonen korreliert. Im Spektrum sind daher idealerweise die NH-Gruppen des Proteinrückgrats und der Aminosäurereste Arg, His und Trp sowie die NH_2 -Gruppen von Arg, Asn, Lys und Gln als Signale zu sehen. Die aus der Kopplung entstandenen Signalaufspaltungen - eine NH-Gruppe erzeugt vier Signale angeordnet wie die Ecken eines Quadrates - werden durch eine Entkopplung während der Aufnahme des FID zerstört, sodass nur ein Signal in der Mitte des gedachten Quadrates auftaucht.

Da ^{15}N eine natürliche Häufigkeit von nur ca. 0,4 % besitzt, müssen die Proben vorher mit diesem Isotop markiert werden (s. 2.2.4). Zur weiteren Vereinfachung der Spektren ist es möglich, das Protein nicht uniform zu markieren sondern nur ganz bestimmte Aminosäuren (selektive Isotopenmarkierung).

Die TROSY-Technik

Moleküle mit einer Größe über 30-40 kDa können mit konventionellen NMR-Techniken kaum noch untersucht werden, da die Spektren aufgrund sehr schneller transversaler Relaxation breite Linien (s. o.) und damit verbunden schlechte Sensitivität und Auflösung zeigen [120]. Hinzu kommen Signalüberlagerungen aufgrund vieler Resonanzen. Diese können durch gezielte Isotopenmarkierungen und mehrdimensionale Experimente (s. u.) verringert werden. Da Protonen eine der Hauptursachen für Relaxationsprozesse sind, bewirkt eine Deuterierung eine Verbesserung des Spektrums. Für Moleküle über 50 kDa, wie das GTB-Dimer, reichen diese Techniken jedoch nicht aus [121]. Hierfür wurde eine Methode entwickelt, die effizient die transversale Relaxation reduziert, sodass schärfere Signale mit höherer Empfindlichkeit aufgenommen werden können. Sie wird *engl.* als transverse relaxation-optimized spectroscopy (TROSY) bezeichnet [122]. Ohne Entkopplung erzeugen NH-Gruppen in einem 2D heteronuclearen Experiment vier Signale, die wie die Ecken eines Quadrates angeordnet sind. In großen Molekülen haben diese vier Signale aufgrund bestimmter Relaxationsprozesse unterschiedliche

Linienbreiten. Mit der TROSY-Technik kann die schärfste Linie selektiert werden. Verbessert wird dieser Effekt noch durch höhere Feldstärken (Optimum liegt bei 1 GHz-Spektrometern) und Deuterierung des Proteins [123]. Die TROSY-Sequenz kann mit vielen weiteren NMR-Experimenten verbunden werden. So findet sie bei HSQC-Experimenten und auch bei den nachfolgend besprochenen Tripelresonanzexperimenten Anwendung [124].

Tripelresonanzexperimente

Für weitergehende Untersuchungen von Proteinen mittels NMR-Spektroskopie ist eine Zuordnung der Signale in dem zugehörigen HSQC-Spektrum unerlässlich. Bei größeren Proteinen (>15 kDa) werden zu diesem Zweck sogenannte Tripelresonanzexperimente durchgeführt [125]. Hierfür werden ^{13}C , ^{15}N -markierte Proteine benötigt. Große Proteine wie die 69 kDa GTB müssen zusätzlich noch deuteriert werden, um vor allem die effiziente ^1H - C^α -Relaxation zu verhindern [126]. Tripelresonanzexperimente sind 3D-Experimente, die drei verschiedene Kerne ^1H , ^{13}C und ^{15}N miteinander korrelieren. Das oben besprochene 2D-Spektrum wird durch Einführung der dritten Dimension noch weiter entzerrt. Mit Hilfe spezieller Pulssequenzen, bei denen sich die unterschiedlichen Kopplungskonstanten innerhalb des Proteins zunutze gemacht werden (s. Abbildung 2.10), können in einem Spektrum ganz bestimmte Korrelationen dargestellt werden.

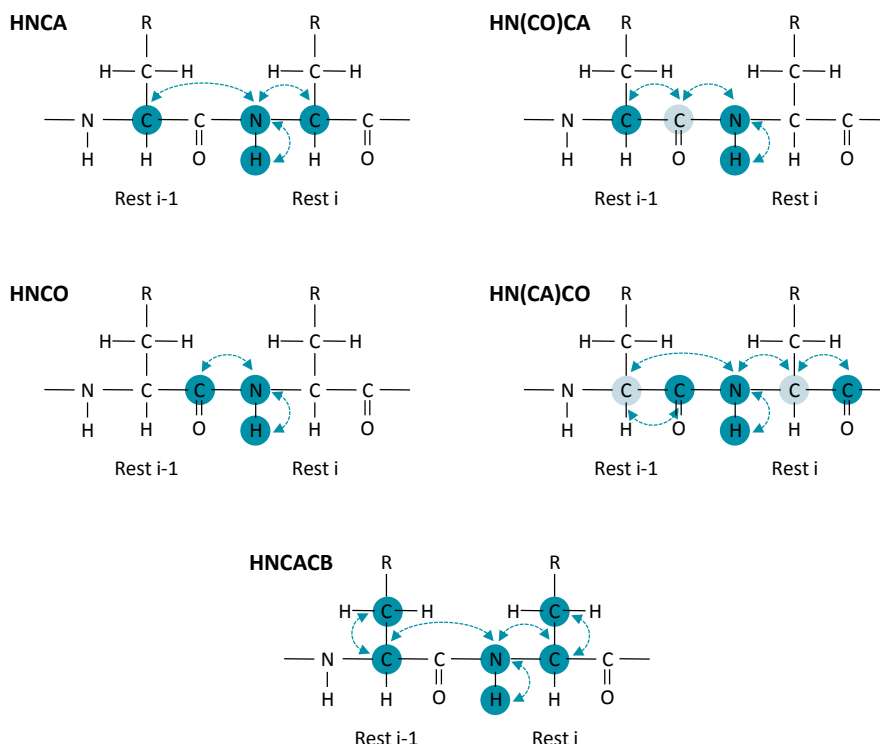


Abbildung 2.9: Verwendete Tripelresonanzexperimente. Schematisch gezeigt sind die Aminosäurereste $i-1$ und i eines Proteins. Die detektierten Kerne sind dunkelblau markiert, Kerne, die nur Magnetisierungsüberträger sind, sind hellblau unterlegt und die Wege des Magnetisierungstransfers mit Pfeilen gekennzeichnet.

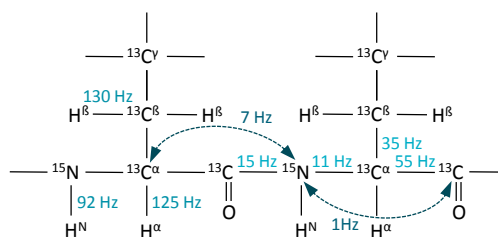


Abbildung 2.10: Skalare Kopplungskonstanten eines Proteins. Angegeben sind gemittelte Konstanten [127,128].

In dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Tripelresonanzexperimente durchgeführt, die in Abbildung 2.9 dargestellt sind. Die Benennung der Experimente erfolgt nach dem Transfer der Magnetisierung, wobei nicht detektierte Kerne in Klammern stehen. Zum Beispiel werden beim HNCA das Amidproton des Aminosäurerests (AS-Rest) *i*, der Stickstoffkern des Rests *i* und die C^α-Kerne der Reste *i* und *i*-1 miteinander korreliert. Man erhält zwei Signale mit identischen ¹H- und ¹⁵N-Frequenzen und verschiedenen ¹³C-Verschiebungen. In einem HN(CO)CA sind Amidproton und Stickstoffkern des AS-Rests *i* nur mit dem C^α des Rests *i*-1 verknüpft. Durch Kombination dieser beiden Spektren, wie auch der des HNCO mit dem HN(CA)CO lässt sich das Proteinrückgrat sequenziell zuordnen. Das HNCACB liefert neben den Informationen des HNCA zusätzlich die Verknüpfung zu den C^β-Kernen der AS-Reste *i* und *i*-1. Hierdurch wird eine Identifikation der AS erleichtert.

STD-NMR-Spektroskopie

Die Sättigungstransfer-Differenz (STD)-NMR-Spektroskopie hat sich zu einer etablierten Methode für die Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen entwickelt. Sie findet unter anderem Anwendung bei der Identifikation von Bindungspartnern aus Substanzbibliotheken [129] sowie der Bestimmung von Bindungsepitopen [130] und Bindungskonstanten [131].

Bei der STD-NMR-Spektroskopie wird das Protein selektiv durch bestimmte Pulssequenzen gesättigt. Die Sättigungsfrequenz (On-Resonanz-Frequenz) muss dabei entfernt von den Resonanzfrequenzen des Liganden liegen. Aufgrund der kurzen T₂-Relaxation breitet sich die Sättigung über die sogenannte Spindiffusion schnell und effizient im gesamten Protein aus. Bindet nun ein Ligand an das Protein wird die Sättigung auf die Ligandenprotonen übertragen (Abbildung 2.11). Die Effizienz des Transfers hängt sowohl vom Abstand zur Proteinoberfläche als auch von der Dauer der Bindung ab. Da sich die Liganden in ständigem Austausch zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand befinden, akkumulieren die gesättigten Liganden in der Lösung und können dort detektiert werden. Durch einen großen Ligandenüberschuss wird die Wahrscheinlichkeit des wiederholten Bindens vernachlässigbar gering. Das erhaltene Spektrum ist in der Regel ein 1D-Protonenspektrum und wird als On-Resonanz-Spektrum bezeichnet. In diesem Spektrum zeigen die Ligandenprotonen, die in engem Kontakt zum Protein standen, verminderte Signalintensitäten. Um diese identifizieren zu können, wird zusätzlich ein sogenanntes Off-Resonanz-Spektrum aufgenommen. Die Pulssequenz ist bis auf die Frequenz des Sättigungspulses identisch zum On-Resonanz-Experiment. Die Frequenz des

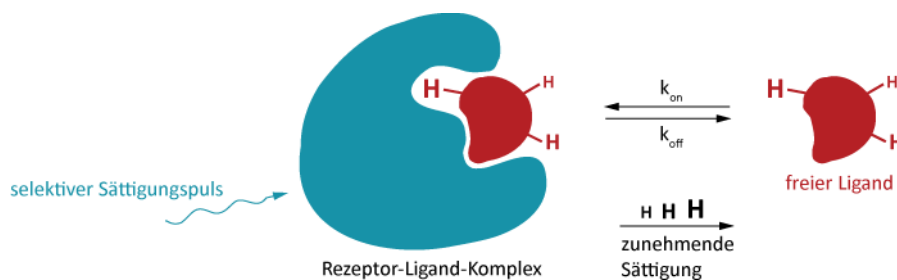


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung eines STD-NMR-Experiments. Gezeigt ist der Zustand während des On-Resonanz-Experiments. (nach [130])

Sättigungspulses liegt außerhalb der Resonanzen von Protein und Ligand. Durch Subtraktion des On-Resonanz-Spektrums vom Off-Resonanz-Spektrum erhält man das STD-Spektrum, in dem nur Signale von bindenden Molekülen zu sehen sind [116,129].

Für die Bestimmung von Bindungssepitopen oder K_D -Werten ist eine Quantifizierung der Signale notwendig. Die STD-Effekte werden relativ zu den Signalintensitäten im Off-Resonanz-Spektrum bestimmt. Man erhält die prozentuale Sättigung des jeweiligen Protons. Da der Anteil an gesättigtem Ligand mit zunehmendem Ligandenüberschuss abnimmt, werden für eine Vergleichbarkeit der bei unterschiedlichen Ligandenüberschüssen bestimmten STD-Effekte, diese mit dem jeweiligen Überschuss multipliziert. Man erhält den STD-Amplifikationsfaktor (*STD-AF*) [130] (Gl. 2.23).

$$STD-AF = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \cdot \text{Ligandenüberschuss} \quad (\text{Gl. 2.23})$$

mit: I_0 Signalintensität im Off-Resonanz-Spektrum

I_{sat} Signalintensität im On-Resonanzspektrum

$I_0 - I_{sat}$ Signalintensität im STD-Spektrum

Die Bestimmung der *STD-AF* bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen liefert für jedes detektierbare Proton eine Bindungsisotherme, aus der mit Hilfe von Gleichung (Gl. 2.9) der K_D -Wert ermittelt werden kann. Der niedrigste K_D -Wert, der für einen Liganden mit STD-NMR-Spektroskopie bestimmt wird, stellt eine obere Abschätzung des „realen“ K_D -Werts dar [132].

2.9.2 NMR-Experimente mit UDP-6-biotinyl-Gal

UDP-6-biotinyl-Gal wurde als Ligand bei SPR-Messungen eingesetzt (s. 2.7.2). Mittels NMR-Spektroskopie wurde überprüft, ob das Molekül von der GTB gebunden wird und als Donor-substrat fungiert. Die Zuordnung der Signale wurde bereits von Dr. E. Munoz (Universität zu Lübeck) durchgeführt und ist auch in der Literatur zu finden [133].

Der GTB-Dialysepuffer der GTB-Probe wurde nach Zugabe von 10 mM EDTA mit Zentrifugen-Filtereinheiten bei 4 °C und wiederholter Zentrifugation bei 3220 × g gegen den NMR-Probenpuffer (Tabelle 2.18) ausgetauscht. Es wurden insgesamt 3 Proben mit einem Volumen

Tabelle 2.18: Puffer für NMR-Experimente mit UDP-6-biotinyl-Gal. Der pH-Wert betrug 6,7 bei 25 °C. TSP wurde als interner Standard verwendet und 99,97 %iges D₂O als Lösungsmittel.

Puffer	Zusammensetzung	
NMR-Bis-Tris-Puffer (D ₂ O)	50 mM	Bis-Tris-d ₁₉
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	1 mM	β-ME-d ₆
	200 μM	TSP-d ₄

von 200 μl in 3 mm NMR-Röhrchen angesetzt. Eine Referenzprobe mit 1 mM H-Dis-octyl und 1 mM UDP-6-biotinyl-Gal, eine Kontrolle mit 20 μM GTB, 1 mM UDP-Gal und 1 mM H-Dis-octyl, und die eigentliche Probe mit 20 μM GTB, 1 mM H-Dis-octyl und 1 mM UDP-6-biotinyl-Gal. Die Proben wurden nach 2 h und nach 13 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur gemessen. Die Messungen wurden bei 298 K mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer durchgeführt. Von allen Proben wurden Protonenspektren mit dem Bruker Pulsprogramm zg mit 64 Scans und 32768 Datenpunkten aufgenommen. Die spektrale Breite betrug 6 kHz. Bevor der FID fouriertransformiert wurde, wurde er auf 65536 Datenpunkte mit Nullen aufgefüllt und mit einer exponentiellen Fensterfunktion (EM; Linienerweiterungsfaktor Lb von 1) multipliziert.

Von den Proben mit UDP-6-biotinyl-Gal wurden zusätzlich STD-NMR-Spektren mit dem Bruker Pulsprogramm stddiff.3 aufgenommen. On-Resonanz- und Off-Resonanz-Spektren wurden jeweils mit 512 Scans und 24576 Datenpunkten bei einer Sättigungszeit von 2 s und einer Wartezeit zwischen den Scans von 3 s aufgenommen. Die On-Resonanz-Frequenz wurde auf -1 ppm und die Off-Resonanz-Frequenz auf 80 ppm gesetzt. Die GTB wurde mit einer Kaskade von Gauß-Pulsen mit einer Pulslänge von 50 ms und einer Stärke von 49 Hz gesättigt. Die spektrale Breite betrug 7 kHz. Nach Differenzbildung wurden die FIDs auf 32768 Datenpunkte mit Nullen aufgefüllt, mit einer exponentiellen Fensterfunktion (Lb 3) multipliziert und fouriertransformiert.

2.9.3 Bestimmung von K_D -Werten mittels STD-NMR-Spektroskopie

Die Experimente zur Bestimmung der K_D -Werte von Uridin, UMP, UDP, UDP-Gal und UDP-Glc wurden von R. Schönherr (wissenschaftliche Hilfskraft, Universität zu Lübeck) durchgeführt. Die Daten wurden für diese Arbeit zum Vergleich mit SPR- und ITC-Daten sowie mit den in der Literatur beschriebenen Konstanten ausgewertet.

Tabelle 2.19: Puffer für STD-NMR-Experimente. Der pH-Wert betrug 6,7 bei 25 °C. TSP wurde als interner Standard verwendet und 99,97 %iges D₂O als Lösungsmittel.

Puffer	Zusammensetzung	
STD-NMR- Bis-Tris-Puffer (D ₂ O)	50 mM	Bis-Tris-d ₁₉
	50 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	1 mM	β-ME-d ₆
	200 μM	TSP-d ₄

Die NMR-Proben wurden in dem in Tabelle 2.19 angegebenen Puffer angesetzt. Vor dem Pufferaustausch mit Zentrifugen-Filtereinheiten bei 4 °C und 3220 x g wurden der GTB-Lösung 10 mM EDTA zugesetzt. Die 180 µl großen NMR-Proben enthielten 20 µM GTB und acht verschiedene Konzentrationen von 50 µM - 5 mM des entsprechenden Liganden (s. Legenden von Abbildung A 8 - Abbildung A 12). Die Spektren wurden in 3 mm NMR-Röhrchen bei 298 K mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen. Es wurde das Bruker Pulsprogramm stddiff.3 verwendet. Die GTB wurde für 2 s mit einer Kaskade von Gauß-Pulsen gesättigt, deren einzelne Pulse eine Länge von 50 ms und eine Stärke von 49 Hz besaßen. Die On-Resonanz-Frequenz lag bei -1 ppm und die Off-Resonanz-Frequenz bei 80 ppm. Die spektrale Breite wurde auf 6 kHz festgelegt und die Anzahl Datenpunkte auf 16384. Proben mit Ligandenkonzentrationen von 50 und 100 µM wurden mit 2048 Scans (1024 Scans On-Resonanz, 1024 Scans Off-Resonanz) aufgenommen, alle übrigen mit 1024 Scans. Vor der FT wurde der FID auf 32768 Datenpunkte mit Nullen aufgefüllt und mit einer exponentiellen Fensterfunktion (Lb 1-3 Hz, s. Unterschriften Abbildung A 8 - Abbildung A 12) multipliziert. Die relativen STD-Effekte wurden durch Skalierung des Off-Resonanz-Spektrums auf das STD-Spektrum bestimmt. Die weitere Auswertung erfolgte wie oben angegeben mit den Programmen Topspin 2.1 (Bruker) und Origin 7.

2.9.4 Protein-NMR-Experimente mit der GTB

Kontrolle der GTB und Ermittlung experimenteller Bedingungen

Die ersten Protein-NMR-Experimente wurden zur Qualitätskontrolle und zur Bestimmung einiger entscheidender Parameter durchgeführt. Es wurden sowohl ^{15}N - als auch ^2H , ^{15}N -markierte GTB-Proben bei Temperaturen von 298 K, 305 K, 310 K, 315 K und 323 K gemessen. Aufgenommen wurden ^1H , ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektren an 500 MHz und/oder 700 MHz NMR-Spektrometern. Weiterhin wurden die Puffer NMR-Bis-Tris-Puffer und NMR-Phosphatpuffer sowie 3 mm NMR-Röhrchen und 5 mm Shigemi-Röhrchen miteinander verglichen. Die Aufnahmeparameter sind in Tabelle 2.20 und Tabelle 2.21 zu finden.

Tabelle 2.20: Puffer für Protein-NMR-Experimente. Der pH-Wert betrug 6,7 bei 298 K (Bis-Tris-Puffer hatte davon ausgehend bei 323 K einen pH-Wert von 6,2, Phosphatpuffer von 6,6). 100-1000 µM TSP- d_4 wurden als interner Standard verwendet. Das Lösungsmittel bestand aus 90 % H_2O / 10 % D_2O oder 95 % H_2O / 5 % D_2O . Einige Proben enthielten kein MgCl_2 bzw. β -ME. Die genauen Zusammensetzungen sind bei der Darstellung der jeweiligen Experimente zu finden (3.3.1, 3.3.2.).

Puffer	Zusammensetzung	
NMR-Bis-Tris-Puffer ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$)	50 mM	Bis-Tris
	100 mM	NaCl
	± 5 mM	MgCl_2
	± 1 mM	β -ME
NMR-Phosphatpuffer ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$)	25 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$
	5 mM	MgCl_2
	1 mM	β -ME oder β -ME- d_6

Tabelle 2.21: Aufgenommene ^1H , ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektren der GTB zur Ermittlung geeigneter experimenteller Parameter. Angegeben sind jeweils Zusammensetzung der Proben und Aufnahme- sowie Prozessierungsparameter. Abkürzungen BT für NMR-Bis-Tris-Puffer, P für NMR-Phosphatpuffer, GM für Gauß-Multiplikation, QSINE für quadratische Sinusfunktion. Die Zahlen hinter GM und QSINE geben die Verschiebung der Maxima an. Die Spektren wurden mit dem Bruker Pulsprogramm troyetf3gpsi aufgenommen.

Probe	$u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB (1)	~	$u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB (2)	
c (GTB)/ μM	290	~	810	
Puffer	BT - β -ME - MgCl_2 , 10 % D_2O	BT + β -ME - MgCl_2 , 10 % D_2O	P, 10 % D_2O	
NMR-Röhrchen	3 mm	~	3 mm	
T / K	310	323	298; 323	
^1H -Frequenz Spektrometer / MHz	500	700	500	
Scans	32	64	24	
Anz. Datenpunkte	2048 x 256	4096 x 256	2048 x 256	
spektrale Breite ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$) / ppm	16/40	16/50	16/32	
Mitte des Spektrums ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$) / ppm	4,7/115	~	4,7/122	
Prozessierung ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$)	GM 0,1/QSINE 3	~	GM 0,1/QSINE 3	

Probe	$u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -GTB	~	~	~
c (GTB)/ μM	210	450	410	430
Puffer	BT+ β -ME + MgCl_2 , 10 % D_2O	~	P, 10 % D_2O	~
NMR-Röhrchen	3 mm	~	3 mm	5 mm Shigemi
T / K	298 ; 310; 323	298	~	~
^1H -Frequenz Spektrometer / MHz	700	500	~	~
Scans	64 (alle T) 96 (nur 298 K)	24	~	~
Anz. Datenpunkte	4096 x 256	2048 x 256	~	~
spektrale Breite ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$) / ppm	16/32	~	~	~
Mitte des Spektrums ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$) / ppm	4,7/122	~	~	~
Prozessierung ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$)	GM 0,1/QSINE 3	~	~	~

Pufferaustausch und Konzentrierung der GTB-Probe fanden mit Zentrifugen-Filtereinheiten bei 4 °C und 3220 x g statt. Sofern nicht in einem vorangegangenen Schritt durchgeführt (s. 2.3.5), wurde vorher noch vorhandenes Mn^{2+} durch Zugabe von 10 mM EDTA komplexiert. Die Proteinkonzentration wurde mit einem NanoDrop Spektralphotometer (s. 2.4.3) überprüft. Proben volumina betrugen 180 μl in 3 mm NMR-Röhrchen und 280 μl in 5 mm Shigemi-Röhrchen.

Die Spektren wurden entweder mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer oder einem 700 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen. Für Protonenspektren wurden die Bruker Pulsprogramme zgpgw5 oder zgsgp verwendet, die eine Unterdrückung des Wassersignals beinhalten. Die Aufnahme erfolgte mit 32 oder 64 Scans, 32768 Datenpunkten und einer spektralen Breite von 8 kHz. Die FIDs wurden auf 65536 Datenpunkte mit Nullen aufgefüllt und mit einer exponentiellen Fensterfunktion (EM mit Lb 1 Hz bzw. 3 Hz bei der Probe ^{15}N -GTB (1)) multipliziert. Die 2D-Spektren wurden mit dem Bruker Pulsprogramm troyetf3gpsi gemessen (s. Tabelle 2.21).

Die Prozessierung erfolgte wie angegeben mit dem Programm Topspin 2.1. Bei der Referenzierung wurde folgendermaßen vorgegangen: Das TSP-Signal wurde in dem $1\text{D-}^1\text{H-NMR}$ -Spektrum auf 0 ppm referenziert. Diese Referenzierung wurde in das 2D-Experiment übertragen und für die Berechnung der ^{15}N -Verschiebungen über das Frequenzverhältnis $^{15}\text{N}/^1\text{H}=0,101329118$ [134] herangezogen. Aufgrund des besonderen Aufnahmeprotokolls der TROSY-Spektren (s. o.) wurden die Signale anschließend um $\frac{1}{2} J_{\text{NH}}$ d. h. um 46 Hz, verschoben. ^1H -Signale werden zu tieferem Feld, ^{15}N -Signale zu höherem Feld verschoben.

$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren der $\text{u-}^2\text{H}$ und selektiv ^{15}N -markierten GTB wurden in NMR-Phosphatpuffer mit 1 mM $\beta\text{-ME-d}_6$, 100 μM TSP- d_4 und 5 % D_2O bei 298 K und pH 6,7 mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen. Die Auflösung betrug 2048×256 Datenpunkte und die spektrale Breite 16 ppm für ^1H und 32 ppm für ^{15}N . Die Mitte des Spektrums wurde auf 4,7 ppm bzw. 122 ppm gelegt. 180 μM $\text{u-}^2\text{H},\alpha\text{-}^{15}\text{N}$ -Lys-GTB wurde mit 440 Scans gemessen und die Spektren mit EM und einem Lb von 20 Hz prozessiert. Eine Probe mit 430 μM $\text{u-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -Met-GTB wurde mit 152 Scans aufgenommen und vor der FT in der direkten Dimension mit einer um 0,1 Einheiten verschobenen Gauß-Funktion multipliziert und in der indirekten Dimension mit einer um $3/2\pi$ verschobenen quadrierten Sinusfunktion (QSINE 3). Proben mit 400 μM $\text{u-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -Val-GTB bzw. 420 μM $\text{u-}^2\text{H},^2\text{H}^{15}\text{N}$ -Val-GTB wurden mit 164 Scans aufgenommen und die Spektren mit einem QSINE 2 in der direkten und einem QSINE 3 in der indirekten Dimension prozessiert.

Zuordnungsexperimente

Für die Zuordnung der GTB-Signale zu den entsprechenden Aminosäureresten wurden folgende Proben verwendet: $\text{u-}^{15}\text{N}$ -GTB, $\text{u-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB, $\text{u-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -GTB und $\text{u-}^2\text{H},\alpha\text{-}^{15}\text{N}$ -Lys-GTB. Die Messungen wurden in NMR-Phosphatpuffer (s. Tabelle 2.20) bei 298 K durchgeführt. Pufferaustausch und Konzentrierung der GTB-Probe fanden mit Zentrifugen-Filtereinheiten bei 4 °C und $3220 \times g$ statt. Die Proteinkonzentration wurde mit einem NanoDrop Spektralphotometer bestimmt (2.4.3). Die Probenvolumina betrugen 180-200 μl in 3 mm NMR-Röhrchen und ca. 300 μl in 5 mm Shigemi-Röhrchen. Von allen Proben wurden $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren aufgenommen. Die Aufnahme- und Prozessierungsparameter für die $\text{u-}^{15}\text{N}$ -GTB und $\text{u-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB sind in Tabelle 2.21 angegeben. Von der 250 μM $\text{u-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierten GTB wurden $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren und Tripelresonanzexperimente von Dr. F. Löhr an der Goethe Universität Frankfurt (Institut für Biophysikalische Chemie, Prof. Dr. V. Dötsch) durchgeführt (Tabelle 2.22). $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren wurden bei 950 MHz mit 16 Scans, 2048×768 Datenpunkten, spektralen Breiten von 16 und 50 ppm bei einer Spektralmitte von 4,7 und 119 ppm und bei 800 MHz mit 16 Scans, 1536×512 Datenpunkten, spektralen Breiten von 17 und 50 ppm bei einer Spektralmitte von ebenfalls 4,7 und 119 ppm aufgenommen. Die Prozessierung erfolgte mit einem QSINE 2 in beiden Dimensionen.

Tripelresonanzexperimente wurden in jeder Dimension mit QSINE 2 multipliziert und fouriertransformiert. Die Referenzierung der ^1H - und ^{15}N -Verschiebungen erfolgte wie oben angegeben. Für die Referenzierung der ^{13}C -Verschiebungen wird das Frequenzverhältnis $^{13}\text{C}/^1\text{H}=0,251449530$ [134] verwendet. Ausgewertet wurden die Spektren mit Topspin 2.1 und CCPNmr Analysis 2.1.

Tabelle 2.22: Durchgeführte Tripelresonanzexperimente. Die Probe enthielt ca. 250 μM u- ^2H , ^{13}C , ^{15}N -GTB in NMR-Phosphatpuffer, pH 6,7 mit 90 % H_2O / 10 % D_2O und 1 mM TSP. Spektren wurden bei 298 K in 5 mm Shigemi-Röhrchen und mit Spektrometern der angegebenen Protonenfrequenz ($\nu(^1\text{H})$) aufgenommen. Die von Dr. Frank Löhr modifizierten Pulsprogramme enthielten eine TROSY-Sequenz sowie bei Bedarf eine Deuteriumentkopplung und wurden entsprechend mit tr und 2h bezeichnet.

Experiment (Pulsprogramm)	$\nu(^1\text{H})$ / MHz	Scans	Datenpunkte ($^1\text{H} \times ^{15}\text{N} \times ^{13}\text{C}$)	spektrale Breite ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) /ppm	Mitte des Spektrums ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) / ppm
HNCA (hncatrwg2h.fl)	800	8	1024 x 192 x 128	13 / 28 / 26	4,7 / 53 / 119
HN(CO)CA (hncocatrwg_2H.fl)	600	4	800 x 128 x 52	13 / 29 / 26	4,7 / 54 / 119
HNCO (hncotrwg.fl)	700	8	1024 x 160 x 100	13 / 16 / 26	4,7 / 174 / 119
HN(CA)CO (hncacotrwg2h.fl)	800	16	1024 x 192 x 78	13 / 16 / 26	4,7 / 174 / 119
HNCACB (hncacbtrwg2h.fl)	950	8	1536 x 192 x 180	13 / 61,5 / 26	4,7 / 38 / 119

Um den Effekt geringer Konzentrationen von Mn^{2+} auf das NMR-Spektrum zu untersuchen wurden Lösungen von 300 μM u- ^{15}N -GTB (1) in 50 mM Bis-Tris, pH 6,2 bei 323 K, 100 mM NaCl, 1 mM β -ME, 200 μM TSP- d_4 und 10 % D_2O mit 300 μM MnCl_2 bzw. mit 300 μM MnCl_2 und 1 mM UDP versetzt. NMR-Experimente wurden wie in Tabelle 2.21 angegeben bei 700 MHz durchgeführt und entsprechend prozessiert.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich nach den Fragestellungen dieser Arbeit in drei Abschnitte. Zunächst werden die Ergebnisse aus Untersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse von UDP-Galactose dargestellt. Anschließend wird auf die nähere Charakterisierung der Ligandenbindung an die GTB mittels SPR-Spektroskopie, ITC und STD-NMR-Spektroskopie eingegangen. Der letzte Abschnitt zeigt die Ergebnisse der Isotopenmarkierung der GTB sowie die Aufnahme und Auswertung der zugehörigen NMR-Spektren. Die für die Experimente hergestellten GTB-Proben werden jeweils zu Beginn eines jeden Abschnitts beschrieben und sind durchnummeriert. Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt in Kapitel 4.

3.1 Enzymatische Hydrolyse von UDP-Galactose

Das Donorsubstrat UDP-Gal wird in Abwesenheit eines Akzeptorsubstrats von der GTB zu UDP und α -D-Gal hydrolysiert (s. 1.3.4). Die Anwesenheit eines bivalenten Kations ist für die Reaktion essentiell. In vorangegangenen Studien, die in Anwesenheit von Mg^{2+} und mit NMR-Spektroskopie durchgeführt wurden, wurde beobachtet, dass die Bindung des Akzeptoranalogs 3DD die Hydrolysereaktion beschleunigt [92]. Diese Ergebnisse sollten überprüft werden und zwar mit einem radiochemischen Assay, der zunächst etabliert werden musste. Anschließend wurde die Hydrolysereaktion durch die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter K_M und k_{kat} quantifiziert und die Studien mit der Untersuchung der Mn^{2+} -abhängigen Reaktion vervollständigt.

3.1.1 Präparation der GTB

Es wurden insgesamt drei GTB-Präparationen für die Untersuchung der Hydrolysereaktion eingesetzt (Tabelle 3.1). Die GTB wurde wie unter 2.2.3 und 2.3 angegeben in jeweils 1 l TB-Medium in *E. coli* synthetisiert und mittels Säulenchromatographie an einer einfachen Peristaltikpumpe (GTB (1) und (2)) oder dem ÄKTA-System (GTB (3)) gereinigt. Die Qualität der Präparationen wurde anhand von SDS-PAGEs (2.4.1) und Aktivitätstests (2.4.4) überprüft. Mit einem Nanodrop Spektralphotometer wurden die Proben auf Verunreinigungen mit Nucleinsäuren bzw. Nucleotiden, hier vorwiegend UDP aus der Reinigung, getestet (2.4.3) und der Proteingehalt mit einem Bradford-Test mit BGG als Standard bestimmt (2.4.2). Für die Hydrolyse-messungen wurde der GTB-Dialysepuffer, in dem die GTB gelagert wurde, über Zentrifugen-Filtereinheiten gegen einen Bis-Tris-Puffer ausgetauscht, der aus 50 mM Bis-Tris, 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$ bzw. $MnCl_2$ und 1 mM β -ME bestand (Bis-Tris/ Mg^{2+} bzw. Bis-Tris/ Mn^{2+} , s. 2.8.2). Nach dem Umpuffern wurden Aktivität, Konzentration und der A_{260}/A_{280} der GTB überprüft. Die gemessenen Parameter sind in Tabelle 3.1, die Bilder der SDS-PAGEs in Abbildung 3.1 dargestellt.

Die Ausbeuten lagen zwischen 68 mg und 83 mg pro Liter Kultur. Die spezifische Aktivität der

Tabelle 3.1: Bei den Hydrolysemessungen eingesetzte GTB-Präparationen. Angegeben sind die Ausbeuten pro Liter Kultur sowie die spezifischen Aktivitäten und die Quotienten A_{260}/A_{280} der Proben in GTB-Dialysepuffer und nach dem Umpuffern in die Messpuffer Bis-Tris/ Mg^{2+} und Bis-Tris/ Mn^{2+} . GTB (2) wurde zusammen mit M. Kock (Universität zu Lübeck) im Rahmen seines Praktikums präpariert.

	GTB (1)	GTB (2)	GTB (3)
Ausbeute	77 mg/l	83 mg/l	68 mg/l
spezifische Aktivität	17 U/mg	18 U/mg	13 U/mg
A_{260}/A_{280}	0,7	0,64	0,61
nach Umpuffern:			
spezifische Aktivität Bis-Tris/ Mg^{2+}	17 U/mg		5 U/mg
A_{260}/A_{280}	0,51		0,55
spezifische Aktivität Bis-Tris/ Mn^{2+}		19 U/mg	7 U/mg
A_{260}/A_{280}		0,56	0,56

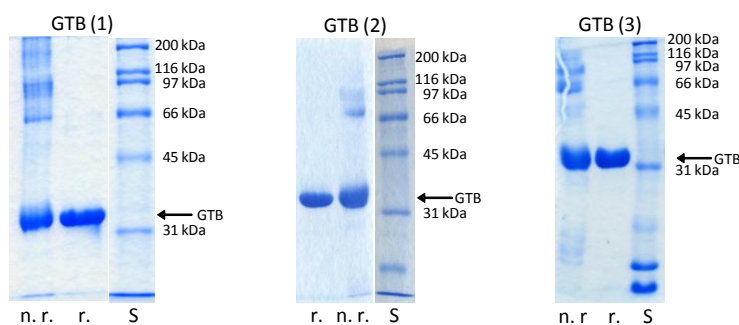


Abbildung 3.1: SDS-PAGE-Bilder der verwendeten GTB-Präparationen. Aufgetragen wurden denaturierte GTB-Proben in nicht reduzierendem (n. r.) und reduzierendem (r.) Probenpuffer, sowie ein Proteinstandard (S). Die Bande der monomeren GTB mit einem Molekulargewicht von 34,6 kDa liegt etwas oberhalb der 31 kDa Bande des Proteinstandards und ist in allen Spuren gut sichtbar. Ohne Reduktionsmittel sind neben dieser Bande weitere Banden zu erkennen, die etwa bei Vielfachen des Molekulargewichts monomerer GTB auftreten. Sie sind durch GTB-Oligomerisierungen über intermolekulare Disulfidbrücken entstanden.

GTB (3) war mit 13 U/mg deutlich geringer als die der beiden anderen Präparationen. Nach dem Umpuffern sank die spezifische Aktivität auf 5 bzw. 7 U/mg, während bei GTB (1) und GTB (2) nur geringe Unterschiede festzustellen waren. Die Quotienten A_{260}/A_{280} von unter 0,6 weisen auf nucleinsäurefreie Proben hin und die Bilder der SDS-PAGEs zeigen nur Banden der GTB. Die GTB wurde demnach gut gereinigt und war auch nach dem Umpuffern noch aktiv, jedoch mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten.

3.1.2 Radiochemische Assays

Etablierung des Protokolls

Das Protokoll zur Analyse der enzymatischen Hydrolyse mittels radiochemischer Assays stammt aus der Arbeitsgruppe von Prof. M. M. Palcic (Carlsberg Laboratory, Kopenhagen, Dä-

nemark). Hierbei wird UDP-Gal mit radioaktiv markierter Galactoseeinheit eingesetzt. Nach der Inkubation mit GTB wird nicht umgesetztes, durch die Phosphatgruppen negativ geladenes UDP-Gal mit einem Anionenaustauscher von dem Produkt Gal abgetrennt, das anschließend mittels Flüssigkeitsszintillationszählung quantifiziert wird (s. 2.8.2). Für eine einfache Handhabung vieler Proben wurde das Protokoll an einigen Stellen modifiziert. So wurden zentrifugierbare Mini-Säulen verwendet, um den Flüssigkeitsdurchlauf zu beschleunigen. Die Säulen wurden definiert mit 0,4 g Säulenmaterial gepackt. Dies entspricht etwa 640 μmol Bindestellen und übersteigt damit deutlich die maximal eingesetzten 48 nmol UDP-Gal. Um eine Vergleichbarkeit zu Studien am Carlsberg Institut zu ermöglichen, wurde der im Institut für Chemie vorhandene Anionenaustauscher in Acetat-Form in die selektivere Chlorid-Form umgewandelt. Dennoch wurde ein Vergleich der Formen durchgeführt. Desweiteren wurde überprüft, ob das Abstoppen der Reaktion mit 100 μl anstatt 600 μl und ein zweimaliges Waschen mit je 400 μl anstatt nacheinander mit 600 μl , 800 μl und 1000 μl ausreichend ist. In Hinblick auf die begrenzte Aufnahmekapazität des 2 ml Reagiergefäßes ist die Handhabung der kleineren Volumina wesentlich einfacher und sicherer. Es wurden zwei UDP-Gal-Lösungen hergestellt, eine ohne und eine mit GTB (s. 2.8.2). Die erste Lösung diente der Bestimmung der Leerwerte. Da die zweite Lösung GTB enthielt, wurde UDP-Gal hydrolysiert und es konnte die Separation der Galactose getestet werden. Die Ergebnisse der Experimente sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen Leerwerte, die nur geringfügig höher lagen als der Hintergrund, der erfahrungsgemäß zwischen 20 und 40 dpm liegt. Sie machten unter 0,6 % der eingesetzten Aktivität aus. Ein Unterschied zwischen den Formen ist bei dem hier verwendeten Versuchsaufbau nicht zu erkennen. Das Waschen mit insgesamt 2,4 ml H_2O resultierte im Vergleich zu dem Waschen mit 0,8 ml in etwas höheren Aktivitäten. Die Abweichungen betrugen 37 dpm bzw. 4 dpm bei den Leerwertmessungen und 197 dpm bzw. 48 dpm bei der Detektion von Galactose. Mit Ausnahme der Ansätze 1 und 2 lagen die Unterschiede damit bei maximal 5 %.

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Experimente zur Anpassung des radiochemischen Hydrolyseassays. Lösung 1 enthielt je 5 μl Ansatz 1 mM UDP-Gal und 314 Bq UDP- ^{14}C -Gal in Bis-Tris/ Mg^{2+} -Puffer. Lösung 2 enthielt pro 6 μl Ansatz 0,83 mM UDP-Gal, 314 Bq UDP- ^{14}C -Gal und 27 μM GTB (1) in Bis-Tris/ Mg^{2+} -Puffer und wurde für 5,75 h bei 25 °C inkubiert. Angegeben sind die verwendeten Anionenaustauscher-Formen, die Volumina zum Abstoppen der Reaktion und zum Waschen, sowie die Aktivitäten A_{Probe} der Proben und die maximalen Aktivitäten A_{max} der Lösungen.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
Lösung	1	1	1	1	2	2	2	2
A_{max} / dpm	17754	17754	17754	17754	17206	17206	17206	17206
Form des Ionenaustauschers	Acetat	Acetat	Chlorid	Chlorid	Acetat	Acetat	Chlorid	Chlorid
$V(\text{H}_2\text{O})$ zum Abstoppen	100 μl	600 μl	100 μl	600 μl	100 μl	600 μl	100 μl	600 μl
$V(\text{H}_2\text{O})$ zum Waschen	400 μl	600 μl	400 μl	600 μl	400 μl	600 μl	400 μl	600 μl
		800 μl	400 μl	800 μl	400 μl	800 μl	400 μl	800 μl
		1000 μl		1000 μl		1000 μl		1000 μl
A_{Probe} / dpm	67	104	78	82	3694	3891	3668	3716

Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Hydrolyse

Zunächst sollten die Ergebnisse der NMR-Messungen (1.3.4) mit Hilfe des radiochemischen Assays überprüft werden. Hierfür wurden analog zu diesen Messungen zwei Reaktionen mit identischen Konzentrationen an UDP-Gal und einer ähnlichen GTB-Konzentration ($27\ \mu\text{M}$ anstatt $26\ \mu\text{M}$; mit dem Nanodrop wurde in beiden Fällen $20\ \mu\text{M}$ gemessen) in Bis-Tris/ Mg^{2+} -Puffer angesetzt (s. Tabelle 2.16 und 2.8.2). Ein Ansatz enthielt zusätzlich das Akzeptoranalogen 3DD. Die Inkubation fand bei $25\ ^\circ\text{C}$ und pH 6,7 statt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, deren Aktivität und damit Galactosegehalt mit dem Hydrolyseassay ermittelt wurden (s. Anhang Tabelle A 1). Die um den Leerwert korrigierten und in die Galactosekonzentrationen umgerechneten Messwerte wurden gegen die Zeit aufgetragen und daran eine exponentielle Funktion (Gl. 2.22) angepasst (Abbildung 3.2). An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Funktion nicht die tatsächliche Reaktion beschreibt, da sie unter anderem nicht die inhibierende, kompetitive Wirkung der Produkte berücksichtigt. Für einen qualitativen Vergleich ist sie dennoch ausreichend (Tabelle 3.3).

Aus dem Graphen ist deutlich zu entnehmen, dass die Hydrolysereaktion mit 3DD zu Beginn deutlich schneller verlief als ohne. Die Probe mit 3DD erreichte fast die maximal mögliche Galactosekonzentration von $1\ \text{mM}$. Die bestimmten Parameter k_{app} und $t_{1/2}$ unterstützen diese Beobachtung. Somit konnte der zuvor mit NMR-Spektroskopie detektierte Effekt mit dem radiochemischen Hydrolyseassay bestätigt werden.

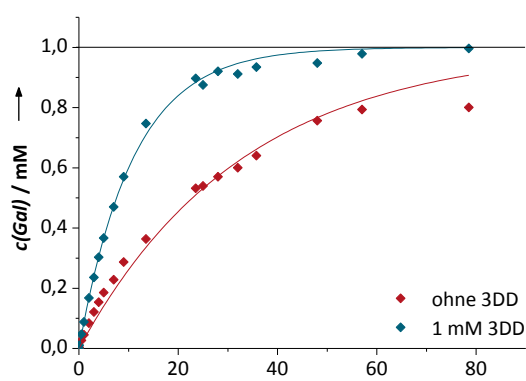


Abbildung 3.2: Zeit-Umsatz-Kurven zur Analyse der enzymatischen Hydrolyse von UDP-Gal durch die GTB. Die Inkubation fand bei $25\ ^\circ\text{C}$ statt. Die Proben enthielten zu Beginn der Reaktion $1\ \text{mM}$ UDP-Gal, $27\ \mu\text{M}$ GTB (1), 0 bzw. $1\ \text{mM}$ 3DD in $50\ \text{mM}$ Bis-Tris, pH 6,7, $10\ \text{mM}$ MgCl_2 , $50\ \text{mM}$ NaCl und $1\ \text{mM}$ β -ME. Die Kurvenanpassung erfolgte mit der Funktion $c(\text{Gal}) = c(\text{Gal})_{\max}(1 - \exp(-k_{app} \cdot t))$, (Gl. 2.22), mit $c(\text{Gal})_{\max} = 1\ \text{mM}$.

Tabelle 3.3: Apparente Ratenkonstanten k_{app} und Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der GTB-katalysierten Hydrolyse von UDP-Gal in An- und Abwesenheit des 3DD. Angegeben ist zusätzlich der Korrelationskoeffizient der Kurvenanpassung R^2 . Reaktionsbedingungen s. Legende der Abbildung 3.2. Da die exponentielle Funktion nur bedingt die eigentliche, wesentlich kompliziertere Reaktion abbildet, geben die aufgeführten Werte nur einen Trend wieder. Angaben mit Standardfehler der Einzelbestimmung.

	k_{app} / h^{-1}	$t_{1/2} / \text{h}$	R^2
ohne 3DD	$0,030 \pm 0,001$	22,9	0,984
1 mM 3DD	$0,092 \pm 0,002$	7,6	0,998

Bestimmung enzymkinetischer Konstanten

Die durch die GTB katalysierte Hydrolyse von UDP-Gal und der beschleunigende Einfluss des 3DD sollten nun durch die Bestimmung enzymkinetischer Konstanten näher charakterisiert werden. Bestimmt wurden K_M und k_{kat} in Gegenwart von Mg^{2+} bzw. Mn^{2+} ohne und mit 3DD. Es wurde angenommen, dass die Reaktion einer Kinetik folgt, die durch die Michaelis-Menten-Gleichung (s. 2.8.1 und (Gl. 2.21)) dargestellt werden kann.

Experimente mit Mg^{2+} wurden mit der GTB-Präparation (1) und Experimente mit Mn^{2+} mit der GTB-Präparation (2) durchgeführt. Es wurden Verdünnungsreihen mit jeweils sieben Verdünnungen von UDP-Gal in Bis-Tris/ Mg^{2+} -Puffer bzw. in Bis-Tris/ Mn^{2+} -Puffer (s. Tabelle 2.16) angesetzt. Die Verdünnungen wurden so gewählt, dass sie nach Möglichkeit ein Achtel bis das 8fache des K_M -Werts ausmachten. GTB-Konzentrationen und Inkubationszeiten wurden entsprechend angepasst, sodass die Inkubationszeiten von einigen Minuten bis zu wenigen Stunden reichten und insgesamt eine Produktbildung detektiert werden konnte. So wurde auch gewährleistet, dass die chemische Zersetzung von UDP-Gal nur in sehr geringem Maße ablief (s. 1.3.4). Bei den Experimenten mit Akzeptoranalogen wurde die GTB mit 3DD-Konzentrationen von 2,5 bis 10 mM zu mindestens 95 % gesättigt. Die Reaktionen fanden wie die vorangehend beschriebenen Experimente bei 25 °C und pH 6,7 statt und die Produktbildung wurde anschließend mittels radiochemischem Assay quantifiziert (s. 2.8.2).

Die Auswertung der Daten mittels Michaelis-Menten-Gleichung setzt voraus, dass das Substrat in großem Überschuss vorliegt und sich die Substratkonzentration durch die Bindung an das Enzym und während der Reaktion nur geringfügig verändert. Der Umsatz sollte zu maximal 5 % erfolgt sein, damit noch Fließgleichgewichtsbedingungen herrschen (s. 2.8.1) [135]. Diese Bedingung war mit ein paar geringeren Abweichungen und bis auf eine Ausnahme weitestgehend erfüllt (s. Tabelle A 2 - Tabelle A 5). Die Ermittlung der Bindungskonstanten zeigte jedoch (Tabelle 3.6), dass bei den Experimenten mit Mg^{2+} und 3DD bis zu 6 %, bei den Experimenten mit Mn^{2+} bis zu 3 % und bei den Experimenten mit Mn^{2+} und 3DD bis zu 2 % des UDP-Gal in gebundenem Zustand vorlag. Die Bestimmungen wurden daher mit geringeren GTB-Konzentrationen

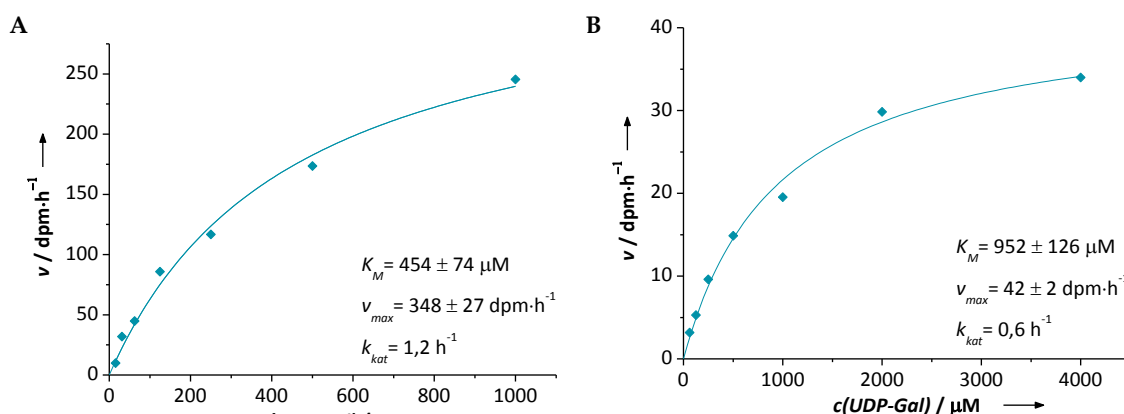


Abbildung 3.3: Bestimmung enzymkinetischer Parameter der GTB-katalysierten Hydrolyse von UDP-Gal bei 25 °C in Anwesenheit von Mg^{2+} . Proben enthielten 50 mM Bis-Tris, pH 6,7, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 1 mM β -ME und (A) bei Messung 1 2,3 μM GTB (1) und 15,625-1000 μM UDP-Gal und (B) bei Messung 2 2 μM GTB (3) und 62,5-4000 μM UDP-Gal. Die Michaelis-Menten-Gleichung wurde an die Daten mit einem $R^2 > 0,991$ angepasst.

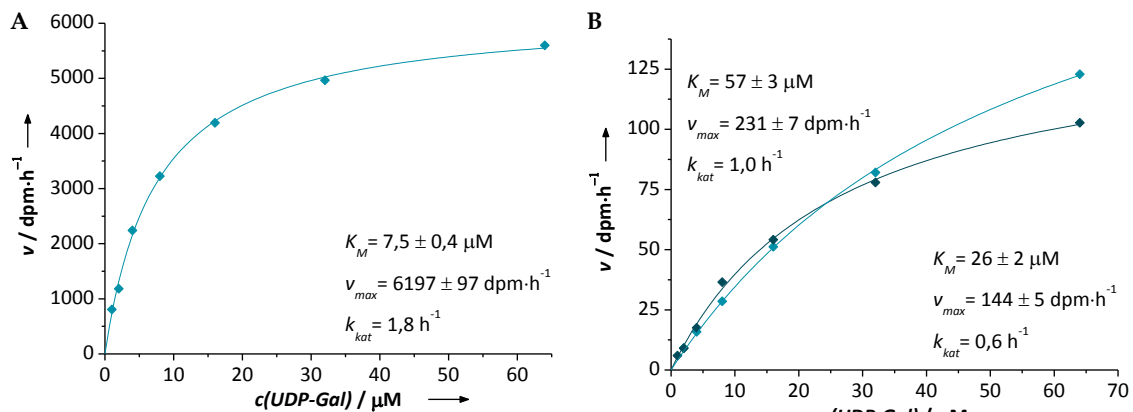


Abbildung 3.4: Bestimmung enzymkinetischer Parameter der GTB-katalysierten Hydrolyse von UDP-Gal bei 25 °C in Anwesenheit von Mg^{2+} und 3DD. Proben enthielten 50 mM Bis-Tris, pH 6,7, 10 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, 1 mM β -ME, 1-64 μM UDP-Gal und (A) bei Messung 1 1,6 μM GTB (1) und 10 mM 3DD und (B) bei den Messungen 2 (hellblau) und 3 (dunkelblau) 0,1 μM GTB (3) und 5 mM 3DD. Die Michaelis-Menten-Gleichung wurde an die Daten mit einem $R^2 > 0,998$ angepasst. Bei Messung 2 wurde der Wert bei 1 μM für die Auswertung nicht berücksichtigt, weil er negativ war.

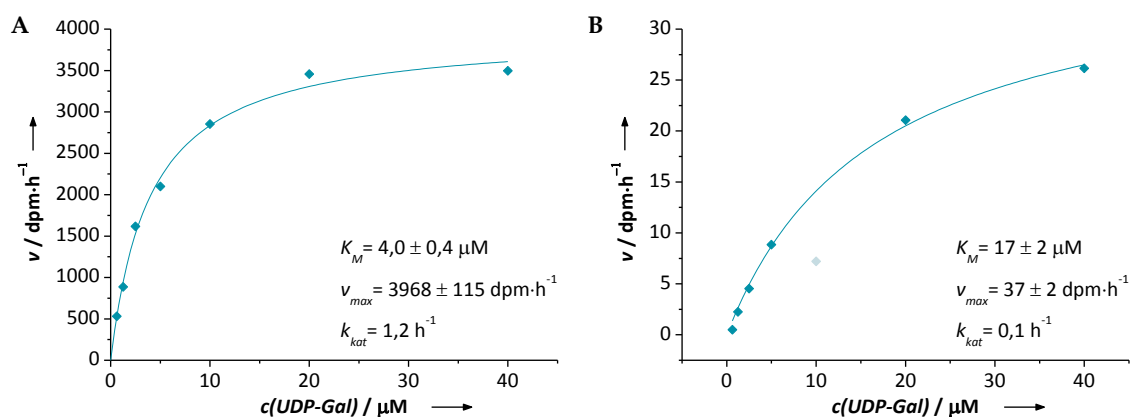


Abbildung 3.5: Bestimmung enzymkinetischer Parameter der GTB-katalysierten Hydrolyse von UDP-Gal bei 25 °C in Anwesenheit von Mn^{2+} . Proben enthielten 50 mM Bis-Tris, pH 6,7, 10 mM MnCl_2 , 50 mM NaCl, 1 mM β -ME, 0,625-40 μM UDP-Gal und (A) bei Messung 1 0,5 μM GTB (2) und (B) bei Messung 2 0,1 μM GTB (3). Die Michaelis-Menten-Gleichung wurde an die Daten mit einem $R^2 > 0,993$ angepasst. Der Messwert bei 10 μM in Messung 2 wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

trationen wiederholt, sodass UDP-Gal zu maximal 0,5 % gebunden vorlag. Hierfür wurde die GTB-Präparation (3) verwendet.

Die Ergebnisse der Experimente sind in Abbildung 3.3 - Abbildung 3.6 sowie in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die Messdaten sind im Anhang in Tabelle A 2 - Tabelle A 5 zu finden. Eine Überprüfung, ob die ermittelte maximale Aktivität der höchsten UDP-Gal-Konzentration auch tatsächlich erreicht werden konnte, ergab nach 48-stündiger Inkubation mit GTB einen 94%igen Umsatz.

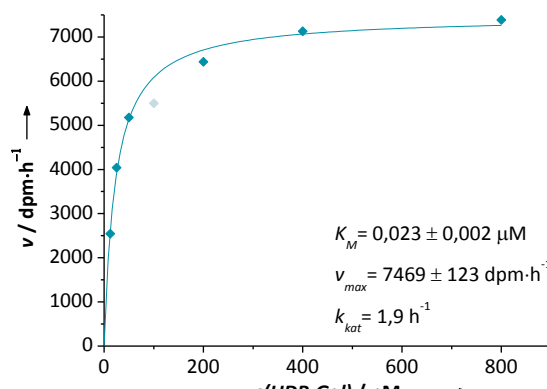


Abbildung 3.6: Bestimmung enzymkinetischer Parameter der GTB-katalysierten Hydrolyse von UDP-Gal bei 25 °C in Anwesenheit von Mn^{2+} und 3DD. Proben enthielten 50 mM Bis-Tris, pH 6,7, 10 mM MnCl_2 , 50 mM NaCl, 1 mM β -ME, 12,5-800 nM UDP-Gal, 25 nM GTB und 2,5 mM 3DD. Die Michaelis-Menten-Gleichung wurde an die Daten mit einem $R^2 > 0,993$ angepasst. Der Messwert bei 100 nM wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Tabelle 3.4: Enzymkinetische Parameter der GTB-katalysierten Hydrolyse von UDP-Gal bei 25 °C und pH 6,7. Das Ergebnis der wiederholten Bestimmung ist in der zweiten Reihe bzw. zweiten und dritten Reihe angegeben. Es wurden insgesamt drei verschiedene GTB-Präparationen mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten in verschiedenen Konzentrationen sowie Lösungen mit nicht ganz identischen Aktivitäten eingesetzt. Hieraus resultieren die Unterschiede in v_{max} . Angaben mit Standardfehler der Einzelbestimmung.

	$K_M / \mu\text{M}$	$v_{max} / \text{dpm}\cdot\text{h}^{-1}$	k_{kat} / h^{-1}
Mg^{2+}	454 ± 74	348 ± 26	1,2
	952 ± 126	42 ± 2	0,6
$\text{Mg}^{2+} + 3\text{DD}$	$7,5 \pm 0,4$	6197 ± 97	1,8
	57 ± 3	231 ± 7	1,0
	26 ± 2	144 ± 5	0,6
Mn^{2+}	$4,0 \pm 0,4$	3968 ± 115	2,3
	17 ± 2	37 ± 2	0,1
$\text{Mn}^{2+} + 3\text{DD}$	$0,023 \pm 0,002$	7469 ± 123	1,9

Anhand der Korrelationskoeffizienten von größer 0,991 und der wenigen Ausreißer ist zu erkennen, dass sich die Michaelis-Menten-Gleichung gut an die Messwerte anpassen ließ. Die Fehler der K_M -Werte liegen zwischen 5 % und 16 % und die von v_{max} zwischen 2 % und 8 %. Die Unterschiede zwischen den K_M -Werten der beiden Messreihen sind deutlich größer und erreichen im Fall der Experimente mit Mg^{2+} und 3DD fast das 8fache. Der k_{kat} -Wert befindet sich hingegen bis auf einen Ausreißer von $0,1 \text{ h}^{-1}$ im Rahmen von $0,6$ - $2,3 \text{ h}^{-1}$. Grundsätzlich waren die Werte der zweiten Messreihe, die mit GTB einer deutlich geringeren spezifischen Aktivität durchgeführt wurde, zu höheren K_M - und niedrigeren k_{kat} -Werten verschoben. Messungen mit Mn^{2+} und 3DD konnten aufgrund des hohen Ligandenbedarfs nicht wiederholt werden.

Die enzymkinetischen Konstanten zeigen eindeutig, dass die Anwesenheit des Akzeptoranalogo-

gons 3DD den K_M -Wert verringert, während die Wechselzahl k_{kat} annähernd gleich bleibt. In einigen Fällen wurden mehrere Versuchsreihen benötigt, um die richtigen experimentellen Bedingungen zu ermitteln. Die daraus bestimmten weitaus unsichereren K_M -Werte unterstützen dieses Resultat sowie die in Tabelle 3.4 aufgeführten Parameter (Tabelle A 6). Weiterhin ist deutlich ein Einfluss des bivalenten Kations zu erkennen. Während ein Austausch des bivalenten Kations keine Auswirkung auf den k_{kat} -Wert hat, führt die Anwesenheit von 10 mM $MnCl_2$ anstatt von $MgCl_2$ zu einer Verkleinerung des K_M -Werts um einen Faktor von mindestens 50.

3.2 Charakterisierung der Ligandenbindung an die GTB

Die Kenntnis von Bindungskonstanten und thermodynamischen Parametern führt zu einem detaillierteren Verständnis der Funktionsweise eines Enzyms und unterstützt die Entwicklung von Inhibitoren. Hinweise auf die Affinitäten der GTB liefern die K_M -Werte enzymkinetischer Untersuchungen und kompetitive STD-NMR-Experimente. Eine Bestimmung bindungsrelevanter Größen unter genauer Diskriminierung zwischen den bivalenten Kationen Mg^{2+} und Mn^{2+} ist bisher noch nicht durchgeführt worden. Im Folgenden werden die Ergebnisse vorgestellt, die mittels SPR-Spektroskopie, ITC und STD-NMR-Spektroskopie erzielt worden sind. Ein Schwerpunkt der Studie lag auf der Untersuchung der kooperativen Effekte bei der Substratbindung.

3.2.1 Präparation der GTB

Für die Charakterisierung der Ligandenbindung wurden insgesamt fünf verschiedene GTB-Präparationen verwendet. Eine davon ist die bereits unter 3.1.1 beschriebene GTB (2), die in dem SPR-Puffer MOPS/ Mn^{2+} eine spezifische Aktivität von 12,5 U/mg und einen A_{260}/A_{280} von 0,59 aufwies. Die weiteren GTB-Proben wurden wie unter 2.2.3 und 2.3 angegeben in TB-Medium in *E. coli* synthetisiert und mittels Säulenchromatographie an einer einfachen Peristaltikpumpe gereinigt. Die Qualität der Präparationen wurde mit SDS-PAGEs (s. 2.4.1) und Aktivitätstests (s. 2.4.4) überprüft. Ein Bradford-Test mit BGG als Standard wurde zur Bestimmung des Proteingehalts verwendet (s. 2.4.2) und mit einem Nanodrop Spektralphotometer wurden die Proben auf Verunreinigungen mit Nucleinsäuren bzw. Nucleotiden, hier vorwiegend UDP aus der Reinigung, getestet (s. 2.4.3). Für die Experimente wurde der GTB-Dialysepuffer, in dem die GTB gelagert wurde, sorgfältig gegen den entsprechenden Messpuffer ausgetauscht. Nähere Angaben hierzu finden sich im Methodenteil bei den jeweiligen Experimenten. Nach Pufferaustausch wurden Aktivität, Konzentration und der A_{260}/A_{280} der GTB überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 und Abbildung 3.7 dargestellt.

Die Ausbeuten lagen bis auf die GTB-Präparation (5) zum Teil deutlich über 100 mg pro Liter Kultur und damit auch über den Ausbeuten der unter 3.1.1 beschriebenen Proben. Die spezifischen Aktivitäten nach dem Pufferaustausch mit Werten zwischen 10 U/mg und 17 U/mg zeigen, dass die eingesetzten GTB-Proben aktiv waren, wenngleich unterschiedlich. Alle bestimmten Quotienten A_{260}/A_{280} lagen unter 0,6 und weisen auf nucleinsäurefreie Proben hin. Da die Bilder der SDS-PAGEs nur Banden der GTB zeigen, kann geschlossen werden, dass die GTB gut gereinigt wurde und aktiv war.

Tabelle 3.5: Bei den Bindungsstudien eingesetzte GTB-Präparationen. Angegeben sind die Ausbeuten pro Liter Kultur sowie die spezifischen Aktivitäten und die Quotienten A_{260}/A_{280} der Proben in GTB-Dialysepuffer und nach dem Umpuffern in die jeweiligen Messpuffer (n. b. = nicht bestimmt). Präparationen GTB (5) und (6) wurden von Dr. H. Peters und C. Blunk (beide Institut für Chemie) zur Verfügung gestellt.

		GTB (4)	GTB (5)	GTB (6)	GTB (7)
Ausbeute		128 mg/l	54 mg/l	105 mg/l	153 mg/l
spez. Aktivität		16 U/mg	10 U/mg	14 U/mg	13 U/mg
A_{260}/A_{280}		0,64	0,7	n. b.	0,67
nach Umpuffern:					
spez. Aktivität	MOPS/Mg ²⁺	17 U/mg			15 U/mg
A_{260}/A_{280}		0,54			0,57
spez. Aktivität	MOPS/Mn ²⁺	16 U/mg	10 U/mg	13 U/mg	14 U/mg
A_{260}/A_{280}		0,56	0,56	0,59	0,55
spez. Aktivität	MOPS/-				13 U/mg
A_{260}/A_{280}					0,55

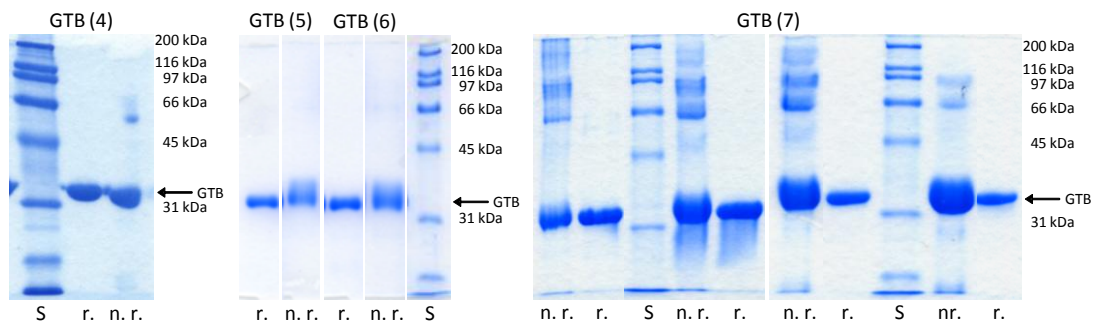


Abbildung 3.7: SDS-PAGE-Bilder der verwendeten GTB-Präparationen. Aufgetragen wurden denaturierte GTB-Proben in nicht reduzierendem (n. r.) und reduzierendem (r.) Probenpuffer, sowie ein Proteinstandard (S). GTB (5) und (6) wurden auf dem gleichen Gel laufen gelassen. GTB (7) ist eine Mischung aus vier Präparationen, von denen zwei Gele gemacht wurden. Die Bande der monomeren GTB mit einem Molekulargewicht von 34,6 kDa liegt etwas oberhalb der 31 kDa Bande des Proteinstandards und ist in allen Spuren gut sichtbar. Ohne Reduktionsmittel sind neben dieser Bande meist weitere Banden zu erkennen, die etwa bei Vielfachen des Molekulargewichts monomerer GTB auftreten. Sie sind durch GTB-Oligomerisierungen über intermolekulare Disulfidbrücken entstanden.

3.2.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine Methode zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten und Bindungsenthalpien und damit auch Entropien (s. 2.6.1). Sie wurde eingesetzt, um die Interaktion zwischen GTB und ihren Liganden näher zu charakterisieren (s. 2.6.2). Als Liganden wurden UDP, UDP-Gal, UDP-Glc und das Akzeptorsubstrat H-Dis-octyl verwendet. Bei UDP-Gal ist zu beachten, dass es während des etwa 2,5-stündigen Experiments auch hydrolysiert wird. Für die Untersuchung der kooperativen Effekte wurden daher UDP und H-Dis-octyl gewählt. Hierbei wurde die GTB mit dem einen Bindungspartner in der Probenzelle vor-

gelegt und mit dem anderen titriert. Der Sättigungsgrad der vorgelegten GTB betrug mindestens 96 %, berechnet mit den hier bestimmten K_D -Werten. Die Messungen fanden bei 25 °C und bei pH-Werten von 7 und 6,7 statt. Bindungskonstanten wurden sowohl in Mn^{2+} - als auch Mg^{2+} -haltigem Puffer bestimmt. Versuche, die Affinität von Mn^{2+} und Mg^{2+} zu der GTB zu bestimmen, waren nicht erfolgreich. Hierfür wurden 428 μM GTB (7) in MOPS/-Puffer bei pH 6,7 mit einer 5 mM $MnCl_2$ -Lösung titriert. Es waren keine Wärmeveränderungen messbar. Gleiches war bei der Verwendung einer 4,25 mM UDP-Lösung zu sehen. Es konnte in Abwesenheit eines bivalenten Kations in diesem Konzentrationsbereich mit ITC keine Bindung von UDP an die GTB detektiert werden.

Grundsätzlich waren einige Punkte bei den ITC-Experimenten zu beachten: Die Proben für ein Experiment mussten in demselben Puffer vorliegen und wurden kurz vor dem Einsatz entgast und temperiert. Es musste kontrolliert werden, ob die bloße Injektion von Puffer in Puffer Wärmeveränderungen in entscheidendem Ausmaße hervorruft. Dies konnte sowohl für MOPS/ Mn^{2+} als auch für MOPS/ Mg^{2+} verneint werden. Bis auf 2-3 Ausreißer von 49 Injektionen bewegte sich die Differenz der Heizleistungen von Referenz- und Probenzelle (ΔP) im Bereich von $\pm 0,01 \mu cal \cdot s^{-1}$ unsystematisch um $0 \mu cal \cdot s^{-1}$ (Abbildung 3.8). Die weiteren Messdaten mussten daher nicht um diesen Leerwert korrigiert werden. Darüber hinaus musste darauf geachtet werden, dass die GTB während einer Messung stabil in Lösung bleibt. Die Bildung von Aggregaten bzw. Präzipitaten senkt die Proteinkonzentration und ist mit extrem großen Signalausschlägen im Graphen zu erkennen, sodass die Messung abgebrochen werden muss. Abhängig von dem K_D -Wert mussten zum Teil hohe GTB-Konzentrationen von über 400 μM in der Probenzelle vorgelegt werden. Wie für ITC-Messungen empfohlen, wurden die ersten Experimente ohne Reduktionsmittel durchgeführt. Da es jedoch häufig bereits kurz nach Beginn einer Messung zu Präzipitationen kam, wurde der Einsatz von 1 mM β -ME geprüft, ein regelmäßig für die GTB eingesetztes Reduktionsmittel. Sowohl bei der Puffer-in-Puffer-Injektion (Abbildung 3.8) als auch bei folgenden Messungen (s. z. B. Abbildung 3.9 B) fielen keine Unregelmäßigkeiten oder Besonderheiten auf. Daher wurden alle weiteren ITC-Experimente mit 1 mM β -ME durchgeführt. Die GTB-Lösungen blieben dadurch stabiler, jedoch konnte β -ME die Präzipitationsneigung der GTB bei diesen hohen Konzentrationen nicht immer ganz unterbinden. Einige Messkurven zeigen zum Ende des Experiments wieder größer werdende Signale (s. z. B. Abbildung A 6 B, D), die mitunter den Anzeigebereich weit überschreiten (nicht gezeigt) und ein Hinweis auf eine beginnende Präzipitation der Probe sind. Bei der Einstellung der Messparameter war zu beachten, dass die Referenzleistung entsprechend des größten ΔP zu setzen war.

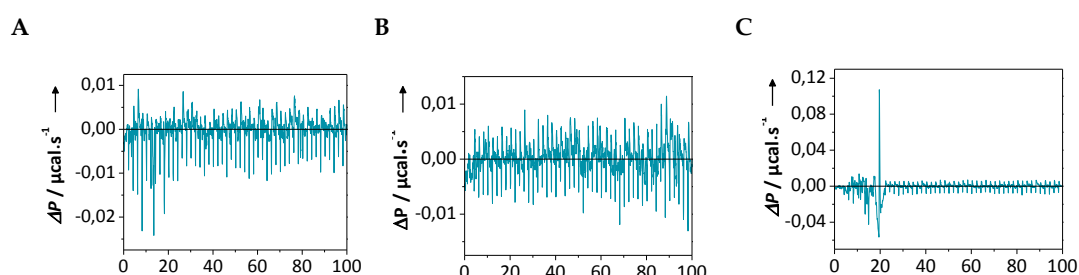


Abbildung 3.8: Titrationen von Puffer in Puffer. Es wurden 49 Titrationen à 5 μl durchgeführt. (A) MOPS/ Mn^{2+} ohne β -ME, (B) MOPS/ Mn^{2+} mit β -ME und (C) MOPS/ Mg^{2+} ohne β -ME.

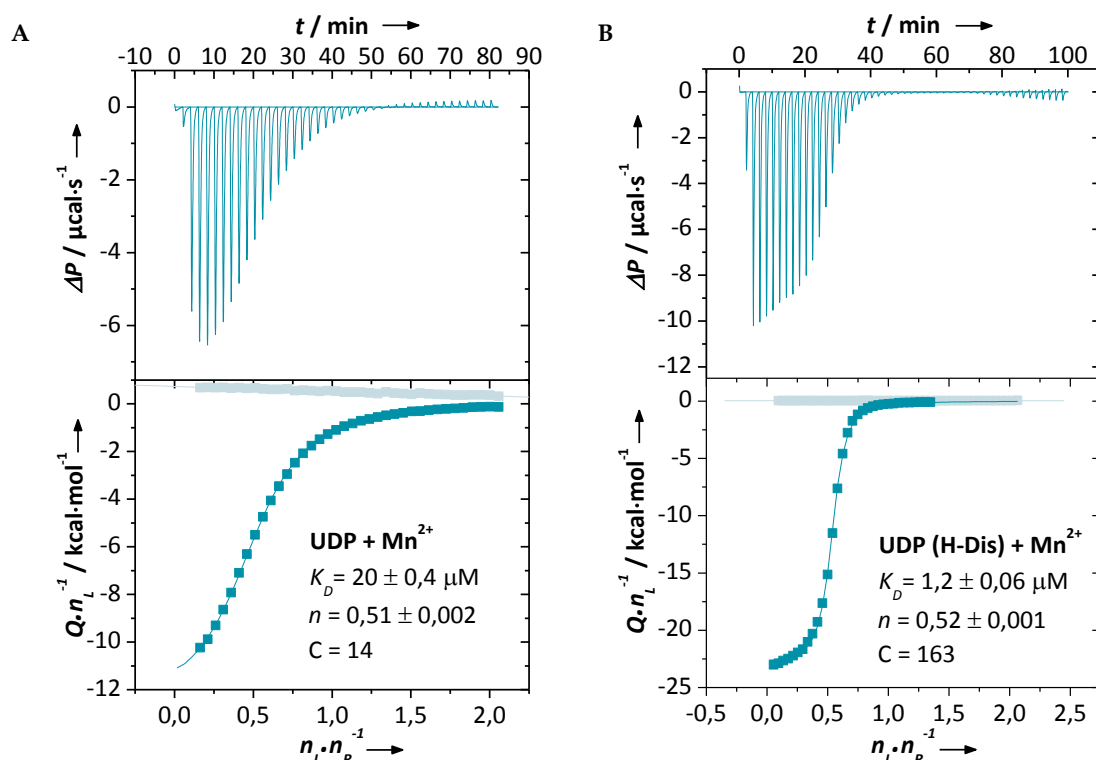


Abbildung 3.9: Ergebnisse von ITC-Experimenten bei 25 °C. Durchgeführt wurden die Messungen in 50 mM MOPS, 100 mM NaCl, 5 mM MnCl₂ und **(A)** mit 283 µM GTB (5) und 3,33 mM UDP bei pH 7, **(B)** mit 1 mM β-ME, 200 µM GTB (7), 2,7 mM H-Dis-octyl und 2,3 mM UDP bei pH 6,7. Die Ergebnisse der Referenzmessungen ohne GTB sind in grau dargestellt.

Die anfangs eingestellten 10 µcal·s⁻¹ reichten bei einigen Experimenten nicht aus. Eine Erhöhung auf 20 µcal·s⁻¹ sicherte bei allen weiteren Experimenten die Detektion.

Durchführung und Auswertung der Experimente erfolgten wie unter 2.6 beschrieben. Exemplarisch sind in Abbildung 3.9 zwei Ergebnisse von ITC-Messungen dargestellt, alle weiteren sind im Anhang zu finden (Abbildung A 4 - Abbildung A 7). Die ermittelten Konstanten sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Stöchiometriefaktor n und C-Faktor sind in den Abbildungen angegeben.

Wie bereits unter 2.6.1 beschrieben, nähert sich eine ideale Titrationskurve am Anfang und am Ende einem konstanten Wert. Diese vollständige Kurve wird in der Regel bei C-Faktoren (s. 2.6.2) über 10 erhalten, wie auch die hier dargestellten Ergebnisse zeigen. Messungen mit C-Faktoren unter 10 wie bei UDP-Glc und H-Dis-octyl ergaben nur den oberen bzw. hinteren Abschnitt. Die Kurvenanpassung ist in diesen Fällen mit einer größeren Unsicherheit behaftet. Aufgrund des großen Ressourcenbedarfs konnten aber nicht alle Messungen in Mehrfachbestimmung durchgeführt werden. Für eine Messung wurden zwischen 12,4 und 26,8 mg GTB und mehrere Milligramm Ligand benötigt. Generell war eine sehr gute Reproduzierbarkeit bei der Bestimmung der K_D -Werte (und damit auch von ΔG) gegeben. ΔH und damit auch $T\Delta S$ wichen in den Doppelbestimmungen stärker voneinander ab. Die größte Differenz ist bei

der Messung mit H-Dis-octyl in Anwesenheit von UDP und Mn^{2+} zu beobachten. Sie beträgt $25 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ für ΔH und damit 45 %. Die Reduktion des pH von 7 auf 6,7 scheint durchgehend eine geringe Verbesserung der Affinität bewirkt zu haben. Da sich die Unterschiede aber im Bereich des Fehlers befinden, kann hierzu keine gesicherte Aussage gemacht werden. Die Stöchiometriefaktoren liegen zwischen 0,17 und 0,69. Eine Korrelation zwischen n und den verwendeten Präparationen und deren spezifischen Aktivitäten ist nicht zu erkennen. Aus Experimenten mit GTB (5), der Präparation mit der niedrigsten spezifischen Aktivität, wurden ähnliche Werte für n erhalten, wie für GTB (7). Sie lagen bei 0,51 und 0,46 für GTB (5) und bei 0,38-0,52 für GTB (7). GTB (6) sind mit 0,17-0,33 die niedrigsten Werte für n zugeordnet, jedoch auch der höchste Wert mit 0,69. Es war nicht möglich, die Dissoziationskonstante für UDP an die GTB in Anwesenheit von Mg^{2+} zu bestimmen. Aufgrund der niedrigen Affinität waren sehr hohe GTB-Konzentrationen erforderlich, bei denen es zu schnell zu Präzipitationen kam.

Durchgehend zeigen die thermodynamischen Parameter, dass die Bindungen mit negativen (günstigen) Enthalpieänderungen und positiven (ungünstigen) Entropieänderungen ablaufen. Darüber hinaus ist eindeutig positive Kooperativität bei der Bindung von UDP und H-Dis-octyl gegeben. Der Effekt auf die Affinität beträgt etwa eine Größenordnung.

Tabelle 3.6: Übersicht über die thermodynamischen Parameter, die mit ITC bei 25 °C bestimmt wurden. H-Dis in dieser Tabelle entspricht dem H-Dis-octyl. In Klammern stehende Liganden wurden in Konzentrationen, die zu einer mindestens 96 %igen Sättigung der GTB führten, vorgelegt. Von H-Dis und UDP-Glc konnte keine komplette Bindungskurve aufgenommen werden. Ergebnisse von UDP-Gal beinhalten eine gleichzeitig stattfindende Hydrolysereaktion. Angaben mit Standardfehler der Einzelbestimmung.

Ligand	Mn^{2+}	pH	$\Delta H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$-T\Delta S / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta G / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$K_D / \mu\text{M}$
UDP	Mn^{2+}	7	$-53 \pm 0,4$	26	-27	$20 \pm 0,4$
UDP	Mn^{2+}	7	$-52 \pm 0,5$	25	-27	$21 \pm 0,6$
UDP	Mn^{2+}	6,7	$-57 \pm 0,5$	30	-27	$17 \pm 0,8$
UDP (H-Dis)	Mn^{2+}	7	$-88 \pm 0,3$	55	-34	$1,4 \pm 0,05$
UDP (H-Dis)	Mn^{2+}	6,7	$-96 \pm 0,4$	62	-34	$1,2 \pm 0,06$
UDP-Gal	Mn^{2+}	7	$-42 \pm 1,3$	15	-27	$18 \pm 1,1$
UDP-Glc	Mn^{2+}	7	$-90 \pm 6,2$	66	-23	$77 \pm 2,6$
H-Dis	Mn^{2+}	7	$-26 \pm 0,8$	3,8	-23	$0,11 \cdot 10^3 \pm 4$
H-Dis	Mn^{2+}	6,7	$-33 \pm 2,7$	10	-23	$0,10 \cdot 10^3 \pm 10$
H-Dis (UDP)	Mn^{2+}	7	$-55 \pm 0,09$	24	-32	$3,0 \pm 0,05$
H-Dis (UDP)	Mn^{2+}	6,7	$-80 \pm 0,09$	48	-32	$2,6 \pm 0,3$
UDP (H-Dis)	Mg^{2+}	6,7	$-90 \pm 0,2$	64	-26	$27 \pm 0,2$
H-Dis	Mg^{2+}	6,7	$-31 \pm 0,5$	6,8	-24	$71 \pm 2,2$
H-Dis	Mg^{2+}	6,7	$-32 \pm 0,6$	8,7	-24	$70 \pm 1,7$
H-Dis (UDP)	Mg^{2+}	6,7	$-75 \pm 0,6$	46	-30	$6,7 \pm 0,4$

3.2.3 Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie

Mit der SPR-Spektroskopie (s. 2.7.1) wurde die Bindung des Donorsubstrats UDP-Gal an die GTB bei 25 °C und pH 6,7 untersucht. Es wurden sowohl Experimente mit immobilisierter GTB als auch Experimente mit immobilisierter UDP-Gal durchgeführt (s. 2.7.2). Für die Kopplung von UDP-Gal an den Sensor-Chip wurde eine biotinylierte Verbindung verwendet, UDP-6-biotinyl-Gal (Abbildung 2.6), das von Prof. Dr. L. Elling (RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt wurde. Es sollte als Donorsubstrat verschiedener GTs fungieren [133]. Dr. E. Munoz hatte bereits mittels STD-NMR-Spektroskopie (2.9.1) nachgewiesen, dass UDP-6-biotinyl-Gal von der GTB gebunden wird und zwar mit einem ähnlichen Bindungssepitop wie UDP-Gal (Abbildung 4.2) [136]. Vor den SPR-Experimenten sollte ebenfalls mit NMR-Spektroskopie die Bindung bestätigt und untersucht werden, ob UDP-6-biotinyl-Gal ein Donorsubstrat für die GTB ist und die biotinylierte Galactoseeinheit auf das Akzeptorsubstrat H-Dis-octyl übertragen wird (2.9.2). Die Auswertung des STD-NMR-Experiments zeigt, dass UDP-6-biotinyl-Gal an die GTB bindet (Abbildung 3.10). Für das ebenfalls in der Probe vorhandene H-Dis-octyl ist auch Bindung detektierbar. Die Spektren zeigen außerdem, dass alle Einheiten der Liganden gebunden werden. Von UDP-6-biotinyl-Gal sind sowohl STD-Signale des UDPs und der Galactose sichtbar als auch von dem Biotin. H-Dis-octyl zeigt STD-Signale der Fucose- und Galactoseeinheit sowie vom Octylrest. Eine direkte Anregung der Ligandenprotonen ist nach dem STD-Spektrum der Probe ohne GTB auszuschließen. Die Spektren in Abbildung 3.11 zeigen, dass die GTB das natürliche Substrat UDP-Gal innerhalb von zwei Stunden nahezu vollständig umgesetzt hat, während sich in der Probe mit UDP-6-biotinyl-Gal nach 13 Tagen kaum Veränderungen zeigten. Der Unterschied zwischen den Spektren besteht in zwei Signalen, die nicht zugeordnet wurden, aber bei denen ausgeschlossen ist, dass sie von einem Glycosylierungsprodukt stammen. UDP-6-biotinyl-Gal dient demnach nicht als Substrat für die GTB, zeigt aber Bindung mit UDP-Gal-ähnlichem Bindungssepitop.

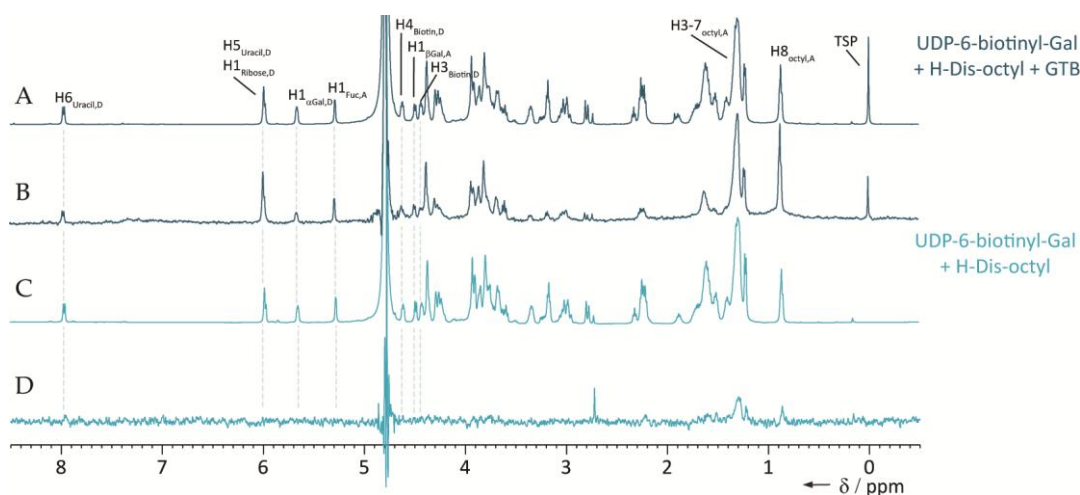


Abbildung 3.10: STD-NMR-Spektren von 1 mM UDP-6-biotinyl-Gal und 1 mM H-Dis-octyl mit und ohne 20 µM GTB. (A), (C) Off-Resonanz-Spektren, (B), (D) STD-Spektren. Der Puffer enthielt 50 mM Bis-Tris- d_{19} , pH 6,7, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM β -ME- d_6 und 200 µM TSP- d_4 als Referenz. Einige Ligandensignale sind gekennzeichnet, dabei steht A für das H-Dis-octyl und D für UDP-6-biotinyl-Gal.

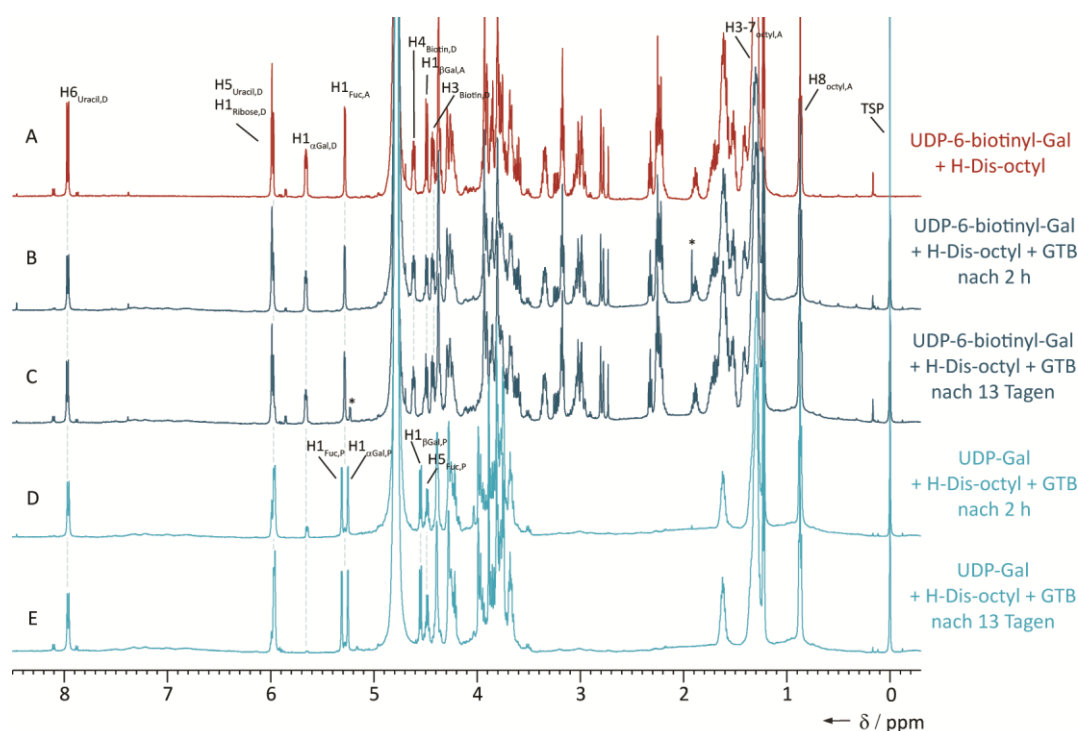


Abbildung 3.11: ^1H -NMR-Spektren nach Inkubation von 1 mM UDP-6-biotinyl-Gal bzw. UDP-Gal mit 20 μM GTB und 1 mM H-Dis-octyl bei 25 $^{\circ}\text{C}$. Die Inkubationszeiten sind angegeben. Die Referenzprobe (rot) ist ohne GTB. Der Puffer enthielt 50 mM Bis-Tris- d_{19} , pH 6,7, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM β -ME- d_6 und 200 μM TSP- d_4 als Referenz. Einige Ligandensignale sind gekennzeichnet, dabei steht A für H-Dis-octyl, D für UDP-6-biotinyl-Gal und P für das entstandene B-Trisaccharid-octyl. Unterschiede zwischen den Spektren B und C sind mit einem * gekennzeichnet.

Für die Immobilisierung von UDP-6-biotinyl-Gal wurde ein Streptavidin-Chip verwendet (s. 2.7.2 und Tabelle 2.15). Der Einsatz eines Goldchips auf dem über HS-PEG-COOH NeutrAvidin immobilisiert worden war, war nicht erfolgreich. Als Referenz diente eine mit D-Biotin belegte Flusszelle. In der mobilen Phase befand sich GTB bzw. eine mit 3DD zu mindestens 95 % gesättigte GTB in MOPS/ Mn^{2+} -Puffer. Die Konzentrationen der insgesamt 10 Verdünnungen lagen um den K_D -Wert. Tests mit unterschiedlichen Flussraten und Kontaktzeiten im Bereich von 10–100 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 2–5 min ergaben, dass eine Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ und eine Kontaktzeit von 3 min für dieses System gute und die Sättigung erreichende SPR-Antworten lieferten. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass eine Regenerierung mit 1 M NaCl zwischen den Injektionen notwendig war, um die GTB von der Chipoberfläche zu entfernen. Beispielhaft sind in Abbildung 3.12 zwei Sensorgramme der Messungen abgebildet. Alle weiteren befinden sich im Anhang (Abbildung A 1). Es handelt sich hierbei immer um die Differenz von Proben- und Referenzzelle. Die Sensorgramme zeigen SPR-Antworten, die während der GTB-Injektion nahezu den Sättigungsbereich erreichten. In diesem Bereich befand sich das System im Gleichgewicht und es konnten pro Konzentration die entsprechenden Gleichgewichtsantworten ermittelt werden. Die resultierenden Bindungsisothermen sind in Abbildung 3.13 und Abbildung 3.14 dargestellt. Zur Ermittlung der K_D -Werte wurde die Langmuir-Gleichung angepasst (Tabelle 3.7).

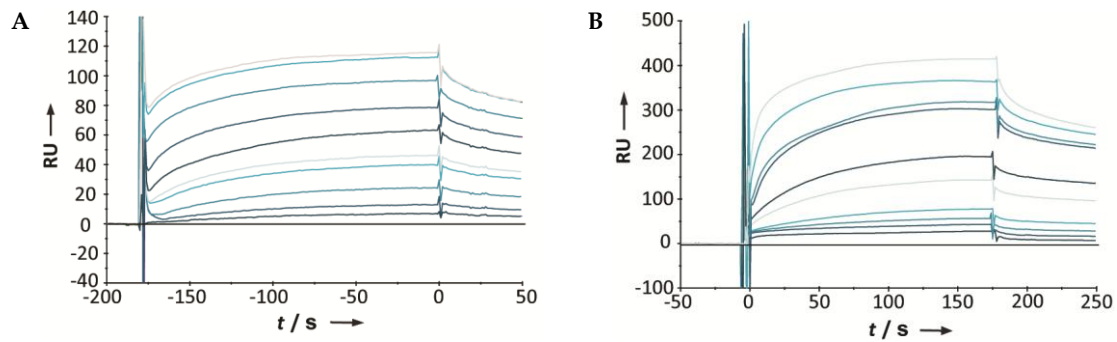


Abbildung 3.12: Exemplarische Sensorgramme der Bindung von GTB an immobilisiertes UDP-6-biotinyl-Gal in Ab- (A) und Anwesenheit (B) des 3DD bei 25 °C. Die Puffer enthielten 50 mM MOPS, pH 6,7, 100 mM NaCl und 5 mM MnCl₂. (A) Messung 2, Fc 2-1 und GTB (4) in zehn Konzentrationen von 75 nM - 15 µM und (B) Messung 1 mit 2,5 mM 3DD, Fc 4-3 und GTB (4) in zehn Konzentrationen von 20 nM - 5 µM.

Bei allen Messungen erreichte $RU_{\max}$ nur etwa 1-4 % der theoretischen RU. Die SPR-Antworten lagen nach Korrektur um die Antworten der Referenzzelle in einem Bereich von 7-521 RU und damit deutlich über dem Rauschen. Die Daten der Messreihen 1-4, die ohne 3DD durchgeführt wurden, werden mit einem hohen Korrelationskoeffizienten von über 0,994 von der Langmuir-Gleichung beschrieben. Der resultierende K_D -Wert von 1,7 µM ist mit einem Standardfehler von unter 6 % belegt. Im Gegensatz dazu erfolgte die Kurvenanpassung an die Daten der beiden Messreihen mit 3DD mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,978. Die Messwerte streuen wesentlich stärker um die Kurve und beschreiben einen zweiphasigen Ablauf. Ob dieser durch Messfehler zustande gekommen ist oder ein reales Phänomen darstellt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Der K_D -Wert von 0,85 µM besitzt einen Fehler von fast 13 %. Grundsätzlich zeigen die Experimente, dass die Anwesenheit des 3DD eine geringfügige Verbesserung der Bindung von GTB an UDP-6-biotinyl-Gal hervorruft.

Tabelle 3.7: Ergebnisse der SPR-Experimente zur Bestimmung des K_D -Werts von GTB an immobilisiertes UDP-6-biotinyl-Gal bei 25 °C und pH 6,7. Vier Messungen ohne und zwei Messungen mit 2,5 mM 3DD wurden mit einem SA-Chip und einem Puffer mit 50 mM MOPS, 100 mM NaCl und 5 mM MnCl₂ durchgeführt. Die Kurvenanpassungen erfolgten global an die Messreihen. Angaben mit Standardfehler.

Analyt	M ²⁺	Fc	$RU_{\max, \text{theor}}$	$RU_{\max}$	$K_D / \mu\text{M}$
GTB	Mn ²⁺	2-1	13072	176 ± 0,7	1,7 ± 0,1
				130 ± 0,5	
				83 ± 1,2	
		4-3	14840	608 ± 11	
GTB/3DD	Mn ²⁺	4-3	14840-15021	491 ± 17	0,85 ± 0,11
				430 ± 16	

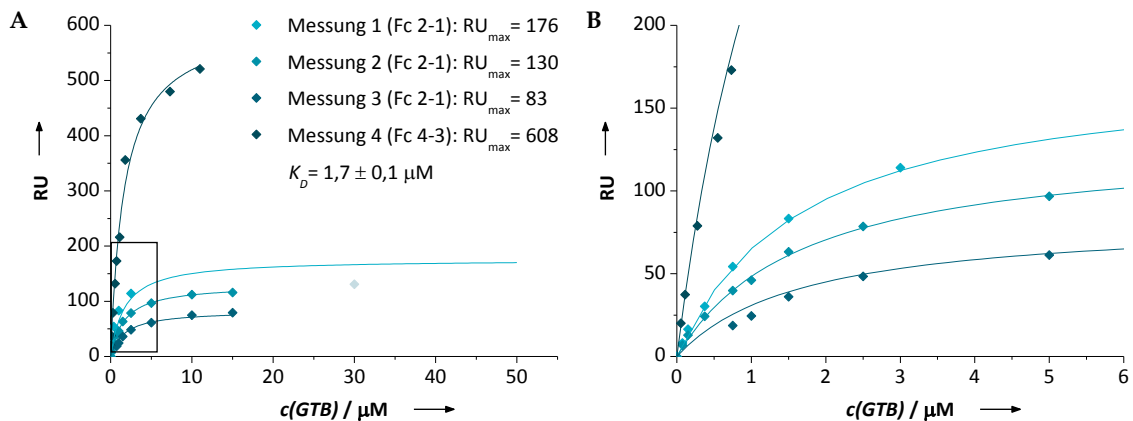


Abbildung 3.13: Bindungsisothermen der Interaktion von GTB und immobilisiertem UDP-6-biotinyl-Gal bei 25 °C. Der Puffer enthielt 50 mM MOPS, pH 6,7, 100 mM NaCl und 5 mM MnCl_2 . GTB (4) wurde in zehn Konzentrationen von 75 nM - 50 μM (Messung 1) bzw. von 75 nM - 15 μM (Messungen 2-4) eingesetzt. Der umrandete Bereich ist vergrößert in (B) dargestellt. Die Kurvenanpassung erfolgte global mit einem $R^2 > 0,994$. Der grau markierte Wert von Messung 1 wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

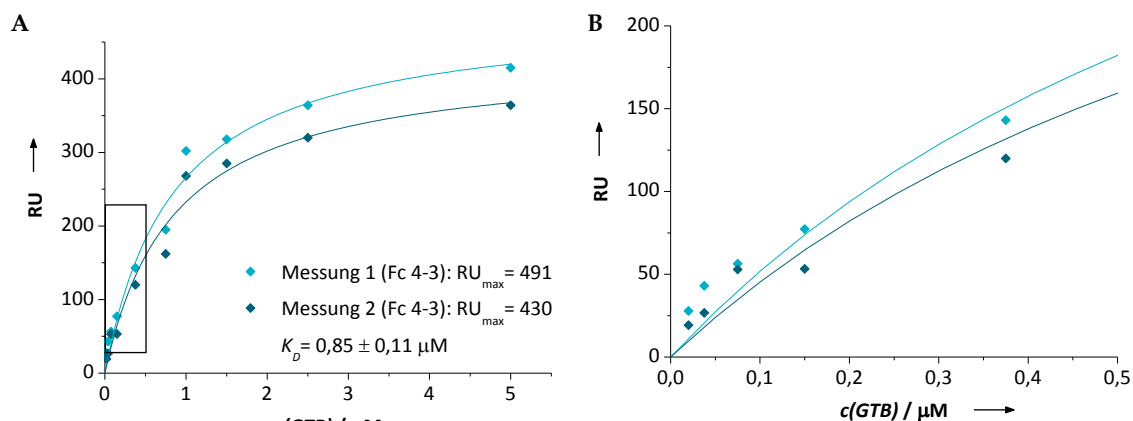


Abbildung 3.14: Bindungsisothermen der Interaktion von GTB und immobilisiertem UDP-6-biotinyl-Gal in Anwesenheit des 3DD bei 25 °C. Der Puffer enthielt 50 mM MOPS, pH 6,7, 100 mM NaCl und 5 mM MnCl_2 . GTB (4) wurde in zehn Konzentrationen von 20 nM - 5 μM und mit 2,5 mM 3DD eingesetzt. Der umrandete Bereich ist vergrößert in (B) dargestellt. Die Kurvenanpassung erfolgte global mit einem $R^2 > 0,978$.

Für eine weitere Studie wurde GTB über primäre Aminogruppen auf einem Chip mit carboxymethyliertem Dextran immobilisiert. Eine Analyse früherer SPR-Experimente mit der GTB ergab, dass Chipbelegungen im Bereich von 2000-4000 RU gute Ergebnisse zeigten. Höhere Belegungsichten resultierten vor allem in negativen Differenzsignalen. Die Chipoberfläche wurde daher mit ca. 2500-4100 RU GTB belegt. Insgesamt wurden je zwei Flusszellen zweier Sensorchips (A und B) mit GTB belegt (s. Tabelle 2.15). Flusszelle 2 des Chips A wurde mit GTB (2) belegt, alle weiteren mit GTB (4). Die Verwendung einer geeigneten Referenzzelle ist für die SPR-Messungen wichtig, da hierdurch die Messwerte um den Anteil unspezifischer Effekte korrigiert werden können. Es wurden zwei unterschiedlich behandelte Referenzzellen getestet. Die

Referenzzellen wurden entweder nur aktiviert und deaktiviert oder waren ähnlich der GTB-Belegungsichte mit NeutrAvidin® belegt. Mit diesem Aufbau wurden K_D -Werte von UDP-Gal an die GTB sowohl mit Mg^{2+} als auch mit Mn^{2+} bestimmt. Abbildung 3.15 zeigt exemplarisch zwei Sensorgramme, alle weiteren sind im Anhang zu finden (Abbildung A 2, Abbildung A 3). Die Sensorgramme haben die Form von Rechteckkurven, was auf schnelle Assoziations- und Dissoziationsraten hinweist. Eine Auswertung der Gleichgewichtsantworten war daher gut durchführbar. Die Differenz zwischen Mess- und Referenzzelle war mit maximal 20 RU recht gering und die ermittelten maximalen Antworten lagen zwischen 26 % und 34 % der theoretischen maximalen Antworten. Eine spezielle Regenerierung des Chips war nicht notwendig, um UDP-Gal von der Oberfläche zu entfernen. Waschen mit Laufpuffer für 10 min bei 10 μ l/min war ausreichend. Die zwischen den UDP-Gal-Injektionen durchgeführten Pufferinjektionen zeigten bei den Messungen mit leerer Referenzzelle konstante Werte, sodass alle Gleichgewichtsantworten um den gleichen Wert korrigiert werden konnten. Wurde eine mit NeutrAvidin® belegte Referenzzelle verwendet, wurden die durch die Pufferinjektion hervorgerufenen Antworten während der Messreihe immer geringer (Abbildung A 3) und zwar mit einer nicht vernachlässigbaren Differenz von insgesamt etwa 2 RU. Die Antworten auf UDP-Gal lagen im Bereich von 0,3-18,6 RU. Daher wurde die UDP-Gal-Antwort jeweils um die Antwort des zuvor injizierten Puffers korrigiert. Durch Auftragung der SPR-Effekte gegen die UDP-Gal-Konzentration wurden Bindungsisothermen erhalten, die mit der Langmuir-Gleichung angepasst wurden (Abbildung 3.16, Abbildung 3.17). Ein Vergleich der Ergebnisse unter Berücksichtigung der beiden Referenzzellen zeigt keine Unterschiede. Größere Abweichungen waren zwischen den beiden Chips auszumachen. In einer Einfachbestimmung mit Mg^{2+} und UDP-Gal wurde mit Chip A ein K_D -Wert von $1,2 \pm 0,1$ mM ermittelt, mit Chip B in einer Doppelbestimmung ein Wert von $1,7 \pm 0,05$ mM (Tabelle 3.8). Der K_D -Wert mit einer leeren Zelle als Referenz und Chip B beträgt $1,8 \pm 0,09$ mM. Diese Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Experimente mit Mn^{2+} -haltigem Puffer lieferten einen K_D -Wert von 47 ± 4 μ M. Dieser ist deutlich geringer als der mit Mg^{2+} . Die Art des bivalenten Kations hat demnach einen großen Einfluss auf die Bindungsaffinität des Donorsubstrats UDP-Gal an die GTB.

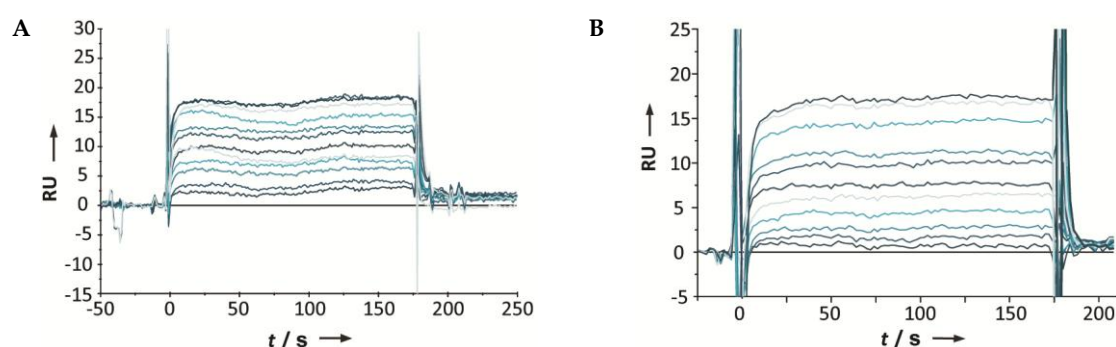


Abbildung 3.15: Exemplarische Sensorgramme für die Bestimmung der K_D -Werte von UDP-Gal an immobilisierte GTB bei 25 °C. Der Puffer enthielt 50 mM MOPS, pH 6,7, 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ bzw. 5 mM $MgCl_2$. (A) Messung 1 mit Mn^{2+} (Fc 2-1, Chip A), die mit zwölf Konzentrationen UDP-Gal von 5 μ M - 2 mM durchgeführt wurde sowie (B) Messung 1 mit Mg^{2+} (Fc 2-1, Chip B), die mit elf Konzentrationen UDP-Gal von 70 μ M - 8 mM durchgeführt wurde. Als Referenz diente eine leere Fc.

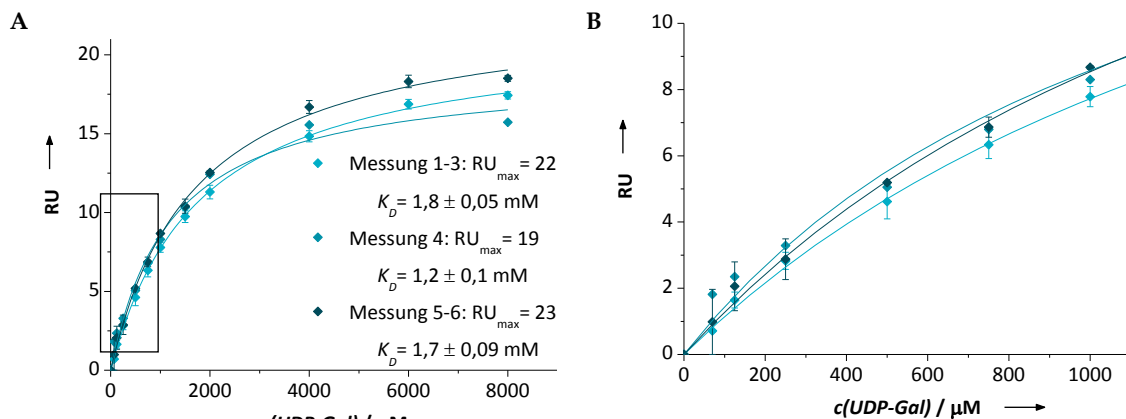


Abbildung 3.16: Bindungsisothermen der Interaktion zwischen UDP-Gal und immobilisierter GTB bei 25 °C in Anwesenheit von Mg^{2+} . Der Puffer enthielt 50 mM MOPS, pH 6,7, 100 mM NaCl und 5 mM $MgCl_2$. UDP-Gal wurde in zehn bzw. elf Konzentrationen von 70 μM - 8 mM eingesetzt. Der umrandete Bereich ist vergrößert in (B) dargestellt. Messungen wurden in einer Dreifachbestimmung mit einer leeren Fc als Referenz (Messungen 1-3, Chip B, Fc 2-1) sowie einer Einfachbestimmung (Messung 4, Chip A, Fc 4-3) und einer Doppelbestimmung (Messungen 5-6, Chip B, Fc 4-3) mit NA als Referenz durchgeführt. Die Kurvenanpassungen erfolgten mit einem R^2 größer 0,997, 0,988 bzw. 0,995. Fehlerbalken sind angegeben.

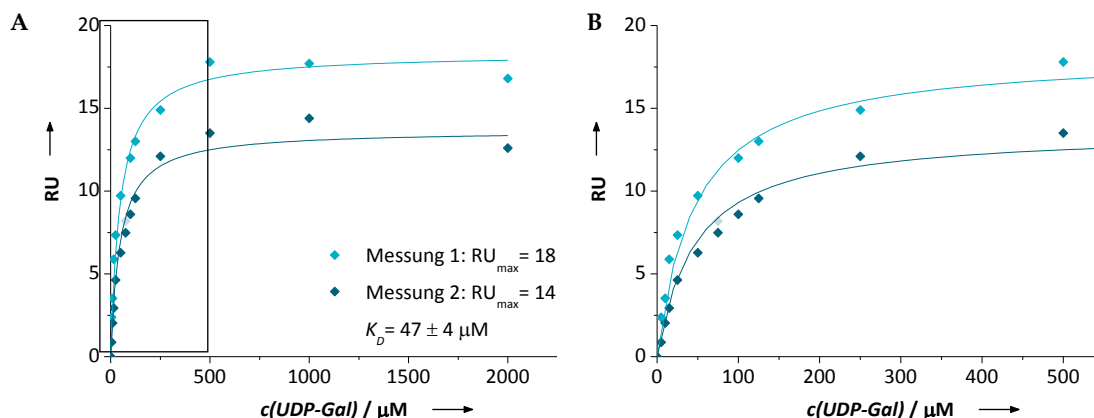


Abbildung 3.17: Bindungsisothermen der Interaktion zwischen UDP-Gal und immobilisierter GTB bei 25 °C in Anwesenheit von Mn^{2+} . Der Puffer enthielt 50 mM MOPS, pH 6,7, 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$. UDP-Gal wurde in zwölf Konzentrationen von 5 μM - 2 mM eingesetzt. Der umrandete Bereich ist vergrößert in (B) dargestellt. Die Kurvenanpassung erfolgte global mit einem $R^2 > 0,983$. Der grau markierte Wert von Messung 1 wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Tabelle 3.8: Zusammenfassung der Ergebnisse der SPR-Experimente zur Bestimmung des K_D -Werts von UDP-Gal an immobilisierte GTB bei 25 °C und pH 6,7. Der Puffer enthielt 50 mM MOPS, pH 6,7, 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ bzw. 5 mM $MgCl_2$.

Chip	M^{2+}	Messungen	Fc	Referenz	$RU_{max, theor}$	RU_{max}	K_D
A - CM5	Mn^{2+}	1-2	2-1	leere Zelle	45	$18 \pm 0,3$ $14 \pm 0,3$	$47 \pm 4 \mu M$
B - CM5	Mg^{2+}	1-3	2-1	leere Zelle	70	$22 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,05 mM$
A - CM5	Mg^{2+}	4	4-3	NA	72	$19 \pm 0,8$	$1,2 \pm 0,1 mM$
B - CM5	Mg^{2+}	5-6	4-3	NA	68	$23 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,09 mM$

3.2.4 STD-NMR-Spektroskopie

Mittels STD-NMR-Spektroskopie (s. 2.9.1) wurden die K_D -Werte von Uridin, UMP, UDP, UDP-Gal und UDP-Glc an die GTB bestimmt (s. 2.9.3). Die Messungen fanden in Anwesenheit von Mg^{2+} bei pH 6,7 und 298 K statt und wurden von R. Schönherr durchgeführt. Die in der Literatur von A. Blume beschriebenen K_D -Werte wurden durch kompetitive Titrations erhalten [87] und sollten mit diesen direkt bestimmten verglichen werden. Es wurden Proben mit 20 μ M GTB und acht verschiedenen Ligandenkonzentrationen in STD-NMR-Bis-Tris-Puffer (s. Tabelle 2.19) angesetzt und gemessen. Die Spektren wurden wie unter 2.9.3 beschrieben ausgewertet. Bindungsisothermen wurden von so vielen Protonen eines Liganden wie möglich bestimmt. Signalüberlappungen oder nicht sichtbare STD-NMR-Signale in Spektren von Proben mit niedrigen Ligandenkonzentrationen hielt die Anzahl jedoch gering. Es wurden keine Bindungsisothermen von Protonen erstellt, die bei weniger als vier Proben verschiedener Konzentrationen Signale zeigten. Bei UMP und UDP konnten nur die überlappenden Signale von H1 der Ribose und dem H5 des Uracil ausgewertet werden. Bei Uridin, UDP-Gal und UDP-Glc waren es insgesamt fünf Protonen. Die Bindungsisothermen sind zusammen mit den Ergebnissen der Kurvenanpassungen und den Strukturen der Liganden im Anhang zu finden (Abbildung A 8 - Abbildung A 12). Die in Tabelle 2.9 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass Uridin und UMP mit 2,5 mM die schlechtesten Binder sind. Die zweite Phosphatgruppe des UDP führt zu einer höheren Affinität, die auch UDP-Gal und UDP-Glc aufweisen. Deutliche Affinitätsunterschiede sind zwischen den drei Letztgenannten nicht zu erkennen.

Tabelle 3.9: Mit STD-NMR-Spektroskopie bestimmte K_D -Werte. Angegeben sind die niedrigsten K_D -Werte, die für einen Liganden in diesem Experiment ermittelt wurden. Die entsprechenden Protonen sind zusammen mit der Anzahl ausgewerteter Messpunkte und dem Korrelationskoeffizienten der Kurvenanpassung mit der Langmuir-Gleichung aufgeführt.

Ligand	Proton	Messpunkte	R^2	K_D / mM
Uridin	H3 _R	6	0,986	$2,5 \pm 0,6$
UMP	H1 _R /H5 _U	5	0,993	$2,5 \pm 0,6$
UDP ^a	H1 _R /H5 _U	5	0,995	$0,43 \pm 0,04$
		5	0,992	$0,91 \pm 0,12$
UDP-Gal	H1 _R /H5 _U	7	0,997	$0,72 \pm 0,05$
UDP-Glc	H2 _R /H3 _R	8	0,993	$0,53 \pm 0,05$

^a s. Abbildung A 10

3.3 Protein-NMR-Spektroskopie

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie können Proteine auf atomarer Ebene untersucht werden. Hierfür werden isotoopenmarkierte Proteine sowie eine je nach Fragestellung zumindest partielle Zuordnung der Signale in den NMR-Spektren benötigt. Um auch die GTB für NMR-spektroskopische Studien zugänglich zu machen, sollte zunächst die Herstellung isotoopenmarkierter Proben erfolgen. Desweiteren wurden geeignete Bedingungen für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen ermittelt. Anschließend erfolgte die Aufnahme und Auswertung von Spektren für die Signалуordnung.

3.3.1 Präparation der GTB

Für NMR-spektroskopische Untersuchungen wurden insgesamt acht GTB-Präparationen verwendet. Zwei $u\text{-}^{15}\text{N}$ -markierte GTB-Proben wurden eingesetzt, um die Notwendigkeit einer Deuterierung und die Möglichkeiten einer solchen Probe zu prüfen. Die $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -markierte GTB wurde als Vergleich zu der $u\text{-}^{15}\text{N}$ -markierten Probe und für die Ermittlung der experimentellen Bedingungen verwendet. Tripelresonanzexperimente für die Zuordnung der Proteinsignale in den NMR-Spektren erforderten eine $u\text{-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierte GTB. Um die Identifikation der Aminosäuren zu erleichtern, wurden zusätzlich vier uniform deuterierte Proben hergestellt, bei denen eine Aminosäure ^{15}N -markiert war. Bei der Auswahl der Aminosäuren war darauf zu achten, dass sie nicht über den Stoffwechsel der Bakterienzellen zu anderen Aminosäuren umgebaut werden und sogenannte Kreuzmarkierungen auftreten. Lys und Met befinden sich am Ende der Aminosäurestoffwechselkette und sollten daher geeignet sein [137]. Sie wurden ausgewählt, da sie nur mit einer geringen Häufigkeit in der gesamten GTB aber in der interessanten internen Schleife vorkommen. Es gibt 13 Lysine und 11 Methionine der insgesamt 298 Aminosäurereste. Lys und Met waren selber nur ^{15}N -markiert, aber nicht deuteriert. Um die Auswirkung einer zusätzlichen Deuterierung der ^{15}N -markierten Aminosäure zu ermitteln, wurde Val verwendet. Für Val ist zwar bekannt, dass es in begrenztem Maße für Kreuzmarkierungen bei Ala, Leu und Glu sorgt [138], jedoch gehört es zu den günstigeren der insgesamt sehr teuren isotoopenmarkierten Aminosäuren und wurde daher ausgewählt. Eine Reduktion der Signalanzahl im Vergleich zu uniform markierter GTB war auf jeden Fall zu erwarten.

Die Synthese der isotoopenmarkierten GTB fand in Minimalmedium statt, dem neben Salzen, Vitaminen und Antibiotika, Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle sowie Glucose und Glycerin als Kohlenstoffquelle zugesetzt waren (s. 2.2.1). Je nach Markierung wurden $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ und ^{13}C -markierte Glucose verwendet, sowie D_2O anstatt H_2O . Der Deuterierungsgrad lässt sich durch die Zugabe deuterierter Glucose steigern [139], die hier nur für die Herstellung der dreifach markierten GTB eingesetzt wurde, da bei den anderen durchgeführten Experimenten eine 100 %ige Deuterierung nicht unbedingt erforderlich war. Bei der Synthese der $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -markierten GTB wurden zusätzlich 20 % eines kommerziell erhältlichen $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -markierten reichhaltigen Mediums zugesetzt, das hauptsächlich aus Aminosäuren besteht und die Proteinausbeute steigern sollte.

Die Synthese der GTB wurde wie unter 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Für die Reinigung mittels Säulenchromatographie wurde für die uniform markierte GTB eine einfache Peristaltikpumpe und für selektiv markierte GTB ein ÄKTA-System verwendet (2.3). Da die isotoopenmarkierte GTB ausschließlich für NMR-spektroskopische Experimente verwendet werden sollte, wurden einige Präparationen direkt nach der Elution anstatt gegen GTB-Dialysepuffer gegen Mg^{2+} -haltigen GTB-Phosphatpuffer dialysiert (2.3.5). Die Qualität einer Präparation wurde mit einer SDS-PAGE (2.4.1) und einem Aktivitätstest (2.4.4) überprüft. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde ein Bradford-Test mit BGG als Standard verwendet (2.4.2) und mit einem Nanodrop Spektralphotometer wurden die Proben auf Verunreinigungen mit Nucleinsäuren bzw. Nucleotiden, hier vorwiegend UDP aus der Reinigung, getestet (2.4.3). Nach der Konzentrierung einer GTB-Probe mit Zentrifugen-Filtereinheiten und eventuellem gleichzeitigen Pufferwechsel wurden Konzentration und A_{260}/A_{280} mit einem Nanodrop Spektralphotometer über-

prüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.10 und Abbildung 3.18 dargestellt.

Die GTB-Ausbeuten lagen bezogen auf 250 ml Kultur zwischen 7,1 und 19 mg. Die höchste Ausbeute wurde demnach mit dem zusätzlich angereicherten Medium erzielt, die geringste mit Medium ohne Glycerin und mit $u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C -Glucose. Die synthetisierten und gereinigten Mengen reichten jeweils für die Herstellung von mindestens einer NMR-Probe aus, für die etwa 5 mg benötigt werden. Spezifische Aktivitäten im Bereich von 7-19 U/mg zeigen, dass die GTB aktiv war, jedoch der Anteil aktiven Proteins am Gesamtproteingehalt der Probe recht unterschiedlich ausfiel. Die Quotienten A_{260}/A_{280} lagen bei fünf Präparationen nach Umpuffern und Konzentrierung unter 0,6 und weisen auf nucleinsäurefreie Proben hin. Bei drei Präparationen lag der A_{260}/A_{280} knapp über 0,6, was sich auf kleine Verunreinigungen mit UDP zurückführen lassen könnte. Da bei der Proteinkonzentrierung häufig Verluste über 30 % auftraten, die GTB-Menge limitiert war und im Vergleich zu dem Proteingehalt sehr geringe Mengen an Nucleinsäuren die NMR-Messungen nicht stören, wurde in diesen Fällen auf eine weitere Reinigung verzichtet. Die Bilder der SDS-PAGEs zeigen nur Banden der GTB. Daraus kann geschlossen werden, dass die GTB gut gereinigt wurde und aktiv war.

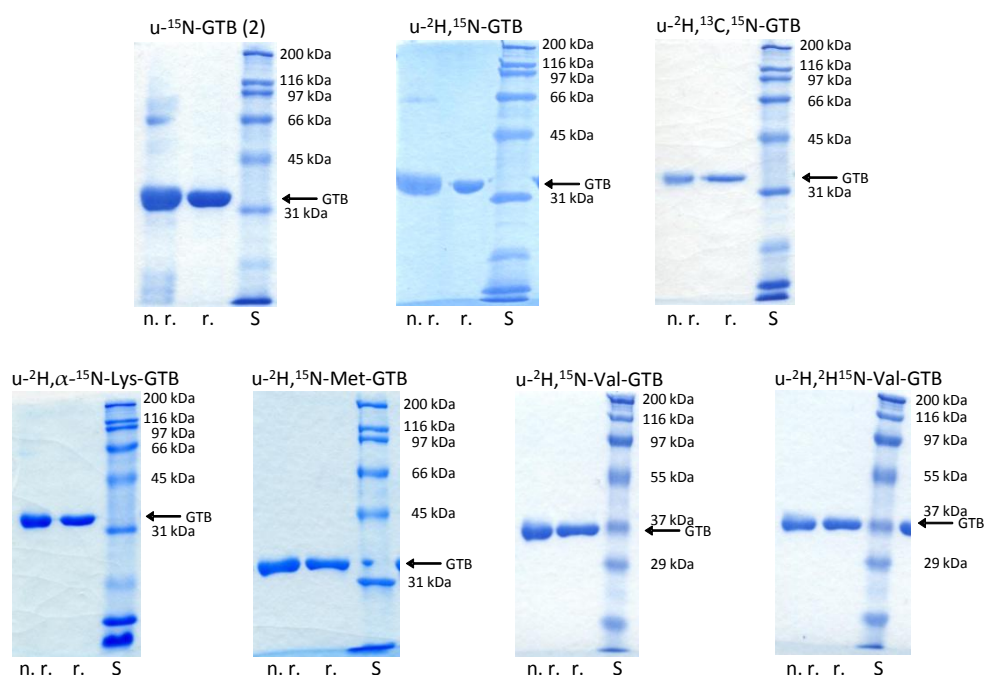


Abbildung 3.18: SDS-PAGE-Bilder der verwendeten GTB-Präparationen. Aufgetragen wurden denaturierte GTB-Proben in nicht reduzierendem (n. r.) und reduzierendem (r.) Probenpuffer, sowie ein Proteinstandard (S). Von der $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB (1) existiert kein Gel mehr. Die Bande der monomeren 34,6 kDa schweren GTB ist mit einem Pfeil gekennzeichnet und deutlich in allen Bildern zu erkennen. Ohne Reduktionsmittel sind bei der $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB (2) und der $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -GTB weitere Banden zu erkennen, die etwa bei Vielfachen des Molekulargewichts monomerer GTB auftreten. Sie sind durch GTB-Oligomerisierungen über intermolekulare Disulfidbrücken entstanden.

Tabelle 3.10: GTB-Präparationen für NMR-Spektroskopie. Angegeben sind die Ausbeuten pro angesetztem Volumen Kultur sowie die spezifischen Aktivitäten und die Quotienten A_{260}/A_{280} der Proben nach der Reinigung und nach dem Umpuffern in die Messpuffer NMR-Bis-Tris-Puffer (H_2O) (NMR-BT) und NMR-Phosphatpuffer (H_2O) (NMR-P). $u\text{-}^{15}N$ -GTB (1) wurde von R. Schönherr (Universität zu Lübeck) im Rahmen seines Praktikums präpariert.

		$u\text{-}^{15}N$ -GTB (1)	$u\text{-}^{15}N$ -GTB (2)	$u\text{-}^2H, ^{15}N$ -GTB	$u\text{-}^2H, ^{13}C, ^{15}N$ -GTB
Ausbeute		61 mg/l	62 mg/l	38 mg/0,5 l	7,1 mg/0,25 l
spez. Aktivität		8 U/mg	19 U/mg	16 U/mg	10 U/mg
A_{260}/A_{280}		0,57	0,64	0,58	
nach Umpuffern:					
A_{260}/A_{280}	NMR-BT	0,58	0,54	0,55-0,56	
A_{260}/A_{280}	NMR-P			0,54	0,59

		$u\text{-}^2H, \alpha\text{-}^{15}N$ -Lys-GTB	$u\text{-}^2H, ^{15}N$ -Met-GTB	$u\text{-}^2H, ^{15}N$ -Val-GTB	$u\text{-}^2H, ^2H^{15}N$ -Val-GTB
Ausbeute		19 mg/0,5 l	23 mg/0,5 l	17 mg/0,5 l	14 mg/0,25 l
spez. Aktivität		12 U/mg	12 U/mg	7 U/mg	8 U/mg
A_{260}/A_{280}			0,65	0,62	0,67
nach Umpuffern:					
A_{260}/A_{280}	NMR-P	0,57	0,62	0,61	0,63

Die NMR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit, die isotopenmarkierte GTB weitergehend zu charakterisieren. Abbildung 3.19 und Abbildung 3.21 A und B zeigen eindimensionale Protonenspektren ausgewählter GTB-Präparationen. Alle weiteren $1D\text{-}^1H$ -NMR-Spektren sind im Anhang zu finden (Abbildung A 13). Die Amidprotonen des Proteinrückgrats, die mit dem Lösungsmittel H_2O austauschen, sind in allen Spektren im Bereich zwischen 10 und 7 ppm zu erkennen. Überlagernd in einem Bereich zwischen 8 und 6 ppm sind die Signale der Amid- und aromatischen Protonen der meisten AS-Seitenketten zu erwarten. Das Spektrum des Abschnitts von 10 bis 6 ppm ist von allen deuterierten GTB-Proben ähnlich. Unterschiede gibt es zu den Spektren der beiden $u\text{-}^{15}N$ -markierten GTB-Proben, die aber untereinander wiederum vergleichbare Spektren zeigen. Der Effekt der Deuterierung ist deutlich im Bereich von 4 bis -0,5 ppm zu erkennen. Hier erscheinen für gewöhnlich die Signale der aliphatischen Protonen der Seitenketten, die nicht mit dem Lösungsmittel austauschen können. Durch die Deuterierung befinden sich an diesen Stellen Deuteronen, die bei einem $1D\text{-}^1H$ -NMR-Experiment nicht detektiert werden, sodass sich die Signalintensität im Vergleich zu den Spektren nicht deuterierter Proben verringert. Eine 100 % deuterierte Probe würde dort keine Signale zeigen. In den Spektren der $u\text{-}^2H$ -markierten GTB-Proben sind trotz der Synthese in 100 % D_2O und der für die $u\text{-}^2H, ^{13}C, ^{15}N$ -markierte GTB zusätzlich verwendeten $u\text{-}^2H, ^{13}C$ -Glucose noch deutlich Signale zu erkennen. Aus einem Vergleich mit Spektren der $u\text{-}^{15}N$ -GTB lässt sich ein Deuterierungsgrad von etwa 80 % (± 10 %) abschätzen.

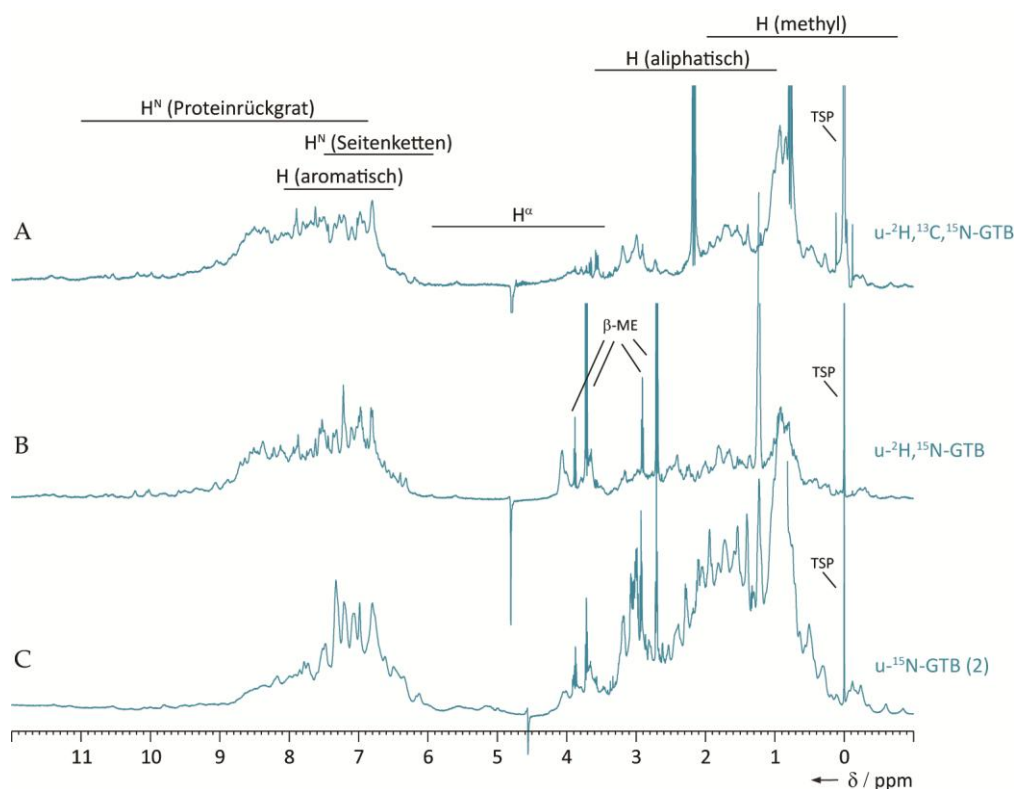


Abbildung 3.19: 1D- ^1H -NMR-Spektren von isotopenmarkierter GTB. Alle Spektren wurden mit Wasserunterdrückung an einem 500 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen. Aufnahmeparameter s. 2.9.4. (A) 250 μM $u\text{-}^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -GTB in 25 mM Na-P-Puffer, pH 6,7, 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME-d}_6$, 1 mM TSP und 10 % D_2O bei 298 K. (B) 410 μM $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -GTB in 25 mM Na-P-Puffer, pH 6,7, 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME}$, 100 μM TSP- d_4 und 10 % D_2O bei 298 K. (C) 810 μM $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB, Puffer wie in (B) bei 323 K und pH 6,6. Eingezeichnet sind außerdem gewöhnliche chemische Verschiebungen der unterschiedlichen Protonen eines Proteins [128].

Ob die selektive Aminosäuremarkierung erfolgreich war, kann mit $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experimenten überprüft werden. Erwartet wird nur die entsprechende Anzahl Signale der ^{15}N -markierten Aminosäure. Abbildung 3.20 zeigt die $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren der ^{15}N -Lys- und ^{15}N -Met-markierten deuterierten GTB. Das Spektrum der $u\text{-}^2\text{H}, \alpha\text{-}^{15}\text{N}$ -Lys-GTB enthält 13 Signale, die den 13 Lysinen der GTB entsprechen könnten. Die sehr breiten Signale kommen durch die Verwendung eines Linienverbreiterungsfaktors von 20 Hz zustande, der notwendig war, um überhaupt Signale im Spektrum zu sehen. Vier kleine Signale liegen teilweise unterhalb der Signale der $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Met-GTB und sind daher schwer zu erkennen. Die Anzahl der Signale in dem Spektrum der $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Met-GTB übersteigt mit ca. 65 weit die erwarteten 11. Methionin scheint demnach für den Aufbau weiterer Aminosäuren verwendet worden zu sein. Das Spektrum dieser Probe ist daher nicht für die Signalzuordnung geeignet. Dass die GTB in beiden Proben gefaltet vorlag, kann aus den gut verteilten Signalen geschlossen werden.

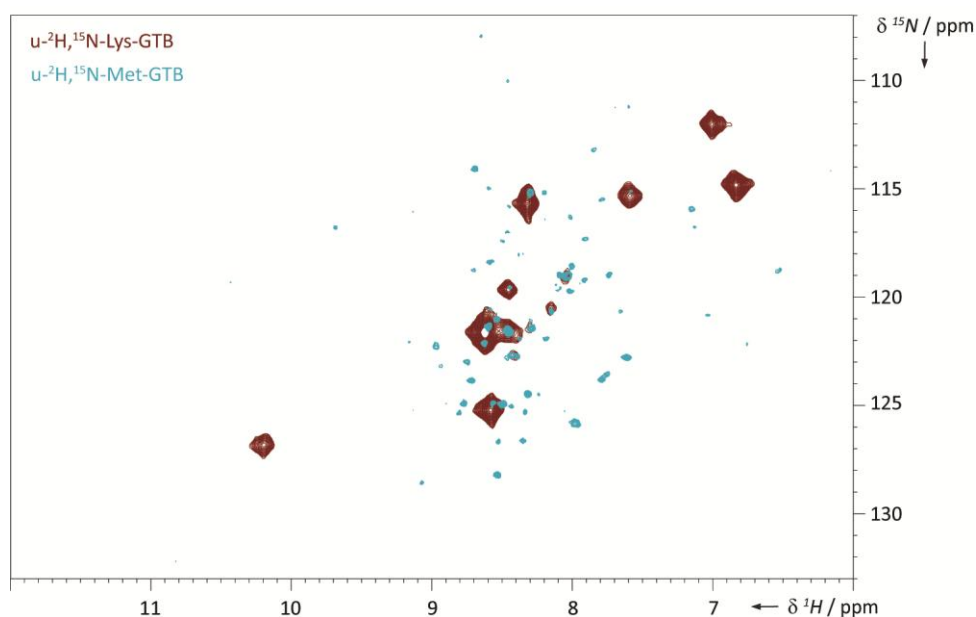


Abbildung 3.20: $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von uniform ^2H und selektiv α -Lys- bzw. Met- ^{15}N -markierter GTB. Die Spektren wurden mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 298 K und pH 6,7 in 25 mM Na-P-Puffer, 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME-d}_6$, 100 μM TSP- d_4 und 5 % D_2O aufgenommen. Weitere Aufnahmeparameter s. 2.9.4. (A) 180 μM $u\text{-}^2\text{H},\alpha\text{-}^{15}\text{N}$ -Lys-GTB, (B) 430 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -Met-GTB.

Für die Herstellung weiterer selektiv markierter GTB-Proben war es interessant zu untersuchen, inwiefern sich eine Markierung der Aminosäuren nicht nur mit ^{15}N , sondern zusätzlich mit ^2H auf die Proteinspektren auswirkt. Die Protonen in den Seitenketten bieten Möglichkeiten zur Relaxation, die durch eine Deuterierung unterbunden werden könnte, sodass die Linien schärfer werden würden und die Signalintensität zunehmen würde. Da die restliche GTB bereits deuteriert wurde, stellte sich die Frage, ob sich eine Verbesserung durch die eine weitere Aminosäure erzielen ließe. Es wurden selektiv ^{15}N - und $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -Val-markierte deuterierte GTB-Proben mit annähernd gleichen Konzentrationen angesetzt und unter identischen Bedingungen NMR-spektroskopisch gemessen. Die 1D- ^1H -NMR-Spektren zeigen die oben bereits beschriebenen Charakteristika (Abbildung 3.21 A, B). Gut zu erkennen ist der Unterschied zwischen den beiden Spektren im Bereich von 1-0,5 ppm, in dem die Signale der Methylprotonen liegen. Durch den Einsatz von deuteriertem Val kommt es hier zu einer deutlichen Signalreduktion. Die $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren der beiden Präparationen sind bis auf wenige Ausnahmen nahezu identisch (Abbildung 3.21 C). Die Signale der $u\text{-}^2\text{H},^2\text{H}^{15}\text{N}$ -Val-GTB sind insgesamt etwas intensiver und klarer umrissen, zudem sind sowohl zusätzliche Signale sichtbar, als auch Signale verschwunden. Beide Präparationen zeigen weitaus mehr Signale als von den insgesamt 31 Valinen hervorgerufen werden können. Es wurden 97 Signale gezählt. Wie erwartet kam es zu Kreuzmarkierungen.

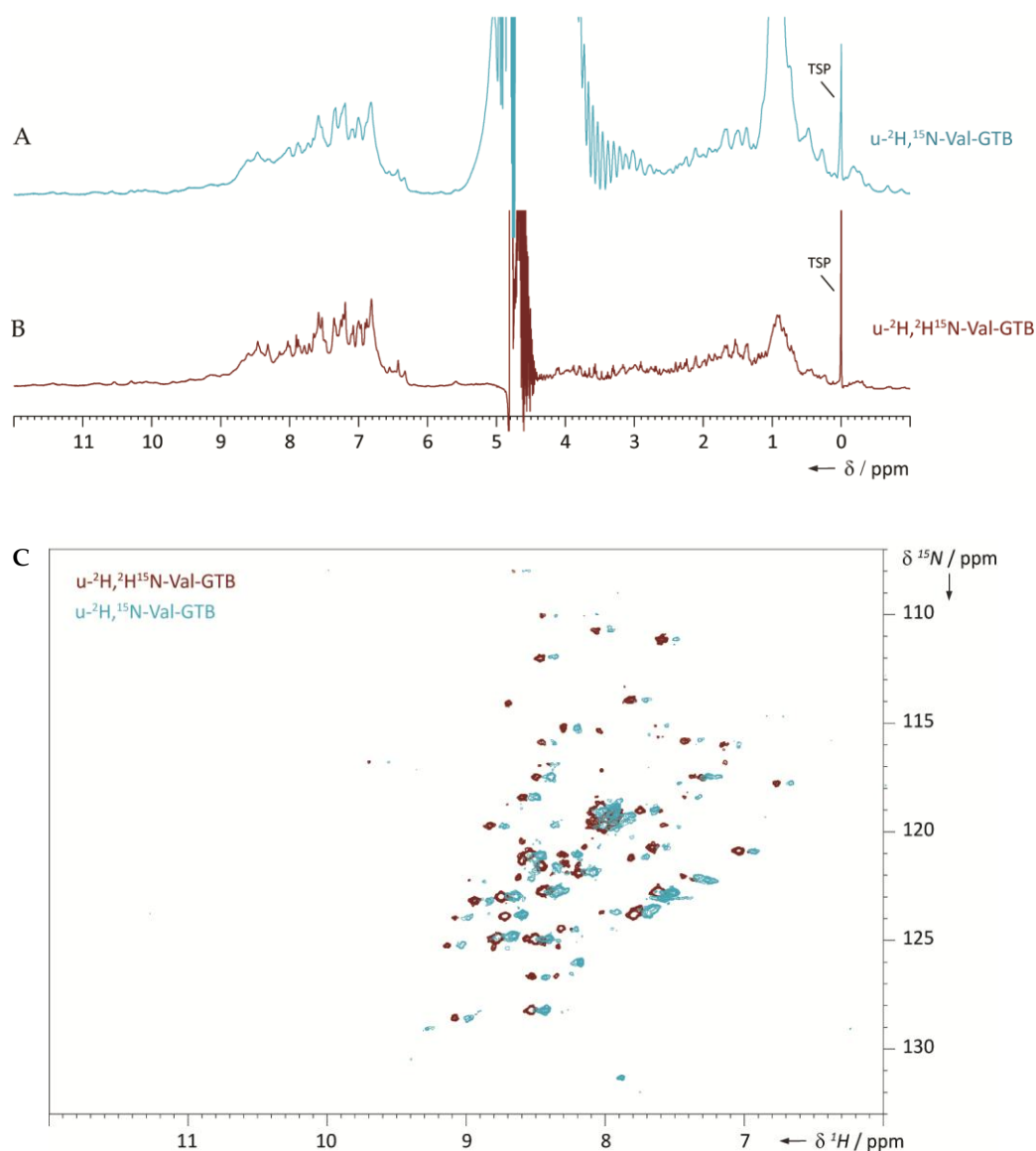


Abbildung 3.21: NMR-Spektren von $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}\text{-Val-GTB}$ und $u\text{-}^2\text{H}, ^2\text{H}^{15}\text{N}\text{-Val-GTB}$ bei 298 K und pH 6,7. Aufgenommen mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer, Parameter s. 2.9.4. Die Proben enthielten 400 μM $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}\text{-Val-GTB}$ bzw. 420 μM $u\text{-}^2\text{H}, ^2\text{H}^{15}\text{N}\text{-Val-GTB}$ in 25 mM Na-P-Puffer, 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME-d}_6$, 100 μM TSP- d_4 und 5 % D_2O . **(A)** 1D- ^1H -NMR-Spektren mit Wasserunterdrückung, **(B)** $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren. Das blaue Spektrum ist aus Gründen der Übersichtlichkeit um 0,1 ppm verschoben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass isotopenmarkierte GTB in ausreichender Menge und als aktives Protein hergestellt werden konnte. Der Deuterierungsgrad der deuterierten GTB-Proben lag grob abgeschätzt bei etwa 80 %. Ohne das sichtbare Auftreten von Kreuzmarkierungen konnte nur GTB mit selektiv ^{15}N -markiertem Lys synthetisiert werden. Met und Val sorgten für zahlreiche Kreuzmarkierungen. Die Markierung mit einer deuterierten Aminosäure bewirkte nur eine geringere Verbesserung des NMR-Spektrums.

3.3.2 Ermittlung geeigneter experimenteller Bedingungen

Für weitergehende NMR-Studien ist es bedeutsam, einige grundlegende experimentelle Bedingungen zu testen. Hierfür wurden Experimente bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, zwei verschiedene Puffer und NMR-Röhrchen ausprobiert (2.9.4). Es stellte sich darüber hinaus die Frage, ob auch einfach ^{15}N -markierte-GTB für NMR-Experimente verwendet werden kann. Hierfür wurden Spektren von $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB bei Temperaturen zwischen 298 K und 323 K aufgenommen (Abbildung 3.22). Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Erhöhung der Temperatur eine Verbesserung des Spektrums bewirkte. Messungen bei 298 K und 310 K lieferten unzureichende Ergebnisse mit wenigen und breiten Signalen. Das Spektrum bei 323 K zeigt hingegen wesentlich mehr (etwa 143) und vergleichbar gut aufgelöste Signale. Die Ergebnisse der Messungen bei 305 K und 315 K sind der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt, reihen sich aber in die dargestellte Abfolge ein.

Ein Vergleich der nicht deuterierten $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB mit einer deuterierten $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB zeigt bei annähernd gleichen Bedingungen Spektren gleichen Musters (Abbildung 3.23). Die $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB lag mit 210 μM etwas geringer konzentriert vor als die $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB (290 μM), deren Puffer kein MgCl_2 enthielt. Feldstärke, Anzahl der Scans, Temperatur und Prozessierung waren bei beiden Experimenten identisch, die nicht deuterierte GTB wurde allerdings mit einer größeren spektralen Breite in der ^{15}N -Dimension gemessen. Bei detaillierterer Betrachtung der Spektren wird auffällig, dass die deuterierte Probe wesentlich mehr und intensivere Signale erzeugte als die nicht deuterierte.

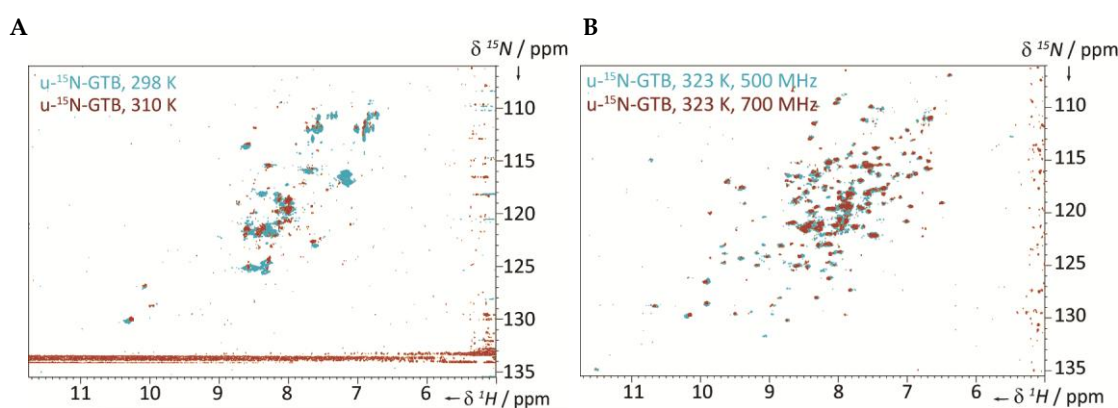


Abbildung 3.22: $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB bei 298 K, 310 K und 323 K. (A) 810 μM $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB (2) in 25 mM Na-P-Puffer, pH 6,7, 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME}$, 100 μM TSP- d_4 und 10 % D_2O , aufgenommen bei 298 K und 500 MHz und 290 μM $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB (1) in 50 mM Bis-Tris, pH 6,5, 100 mM NaCl, 200 μM TSP- d_4 und 10 % D_2O bei 310 K und 500 MHz. (B) $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB (2) wie in (A) bei pH 6,6, 323 K und 500 MHz sowie $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB (1) wie in (A) mit 1 mM $\beta\text{-ME}$ bei pH 6,2, 323 K und 700 MHz.

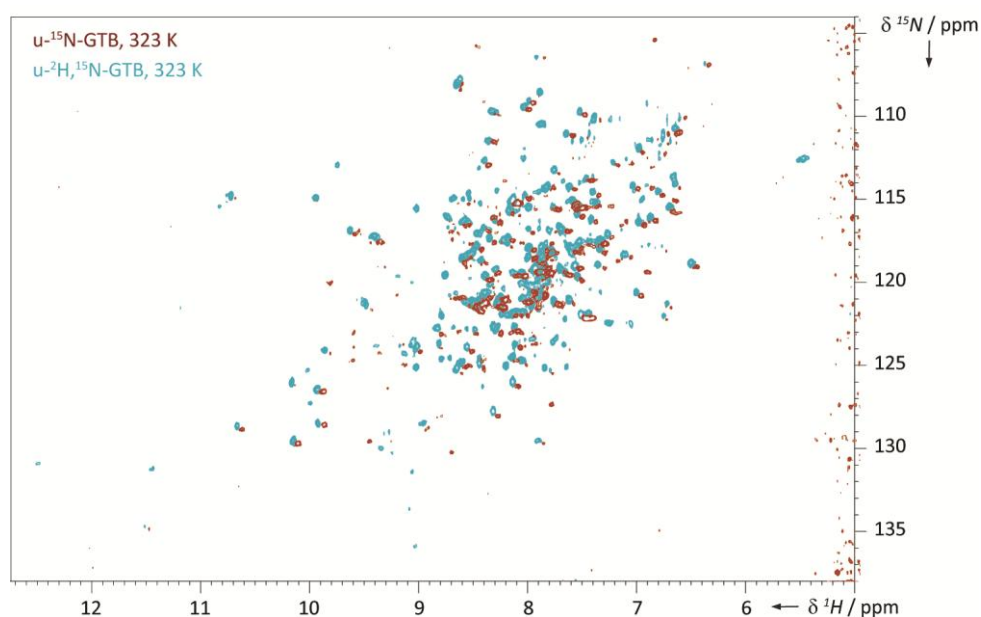


Abbildung 3.23: $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB und $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB bei 323 K und 700 MHz. Proben enthielten 290 μM $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB (1) wie in Abbildung 3.22 A angegeben bzw. 210 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB in 50 mM Bis-Tris, pH 6,2, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME}$, 1 mM TSP- d_4 und 10 % D_2O . Weitere Aufnahmeparameter s. Tabelle 2.21. Das rote Spektrum ist um 0,2 ppm verschoben abgebildet.

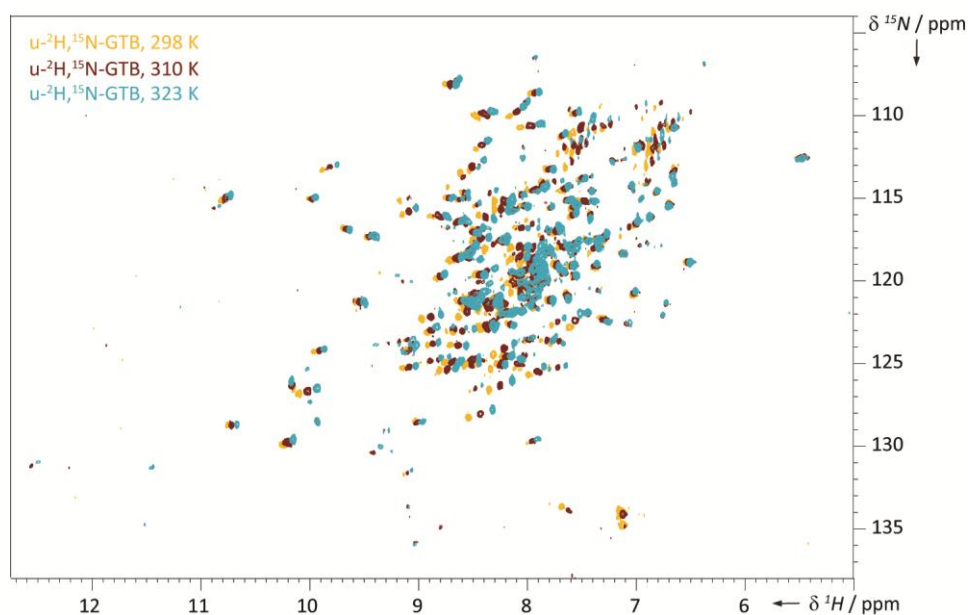


Abbildung 3.24: $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB bei 298 K, 310 K und 323 K. Aufgenommen bei 700 MHz, weitere Aufnahmeparameter s. Tabelle 2.21. Probenzusammensetzung mit 210 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB s. Abbildung 3.23.

Erfahrungen im Umgang mit der GTB zeigten, dass Temperaturen um die 8 °C eine Lagerungsdauer von einem halben Jahr und mehr ohne signifikante Protein- und Aktivitätsverluste ermöglichten. Höhere Temperaturen führten zu vermehrter Bildung von Aggregaten, die nicht wieder gelöst werden konnten. Diese Neigung gab es auch bei zunehmender Konzentration der GTB. Bei Betrachtung der GTB-Proben nach den NMR-Messungen, die bis zu vier Stunden dauerten, spiegelte sich dieses Bild wider. In den Proben, die bei 323 K gemessen wurden, war deutlicher Niederschlag erkennbar. Dieser war nach Messungen bei niedrigerer Temperatur geringer. Vor allem die Aufnahme von dreidimensionalen Spektren für die Signalzuordnung dauert wesentlich länger und liegt gewöhnlich im Bereich von ein paar Tagen bis zu einer Woche. Es ist daher wichtig, die GTB über mindestens einen solchen Zeitraum, möglichst länger, ohne signifikante Verluste in Lösung zu halten. Experimente mit $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -GTB bei Temperaturen zwischen 298 K und 323 K sollten klären, ob Messungen auch bei niedrigeren Temperaturen möglich sind. Diese Frage kann klar bejaht werden. Bei 298 K, 310 K und 323 K aufgenommene Spektren zeigen vergleichbare Auflösungen und Signalintensitäten (Abbildung 3.24). Es sind zahlreiche Signalverschiebungen zu erkennen, die unterschiedlich stark ausfielen, aber nachverfolgbar blieben. Einige Signale haben sich gar nicht verschoben, andere wenige sind nur in einem oder zwei Spektren zu sehen. Insgesamt kann festgehalten werden, dass eine Durchführung der NMR-Experimente mit $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -GTB bei 298 K möglich ist.

Ein weiterer Punkt, den es zu untersuchen galt, war die Zusammensetzung des Puffers. In GTB-Studien, die nicht mit NMR-Spektroskopie durchgeführt wurden, fand MOPS mit MnCl_2 breite Anwendung. Mn^{2+} kann aufgrund seiner paramagnetischen Eigenschaften nicht in den benötigten Konzentrationen für NMR-Messungen eingesetzt werden. Die Signale werden sehr breit und sind dadurch nicht mehr zu sehen. Daher wird anstatt Mn^{2+} Mg^{2+} als bivalentes Kation verwendet. Die GTB-Aktivität wird dadurch verringert, jedoch nicht zerstört. MOPS ist keine gängige NMR-Puffersubstanz. Es wurde daher bisher deuteriertes Bis-Tris verwendet, das den erwünschten pH-Bereich um das Optimum für die GTB von pH 6,5 abdeckt. Nicht deuteriertes Bis-Tris ist wesentlich preisgünstiger, ruft allerdings in Protonenspektren aufgrund der hohen Konzentration riesige Signale hervor, die nicht zusätzlich zum Wassersignal unterdrückt werden können. In heteronuclearen Experimenten ist der Puffer kein Problem, da die Puffersubstanz keine entsprechenden Kerne besitzt, jedoch kann es unter anderem durch Wechselwirkungen mit dem Protein zu schlechteren Spektren kommen. Desweiteren sollte bei der Verwendung von Kryoprobeköpfen darauf geachtet werden, die Salzkonzentration möglichst gering zu halten [140], was mit zunehmender Feldstärke noch wichtiger wird [141]. Kryoprobeköpfe haben gegenüber nicht gekühlten Probeköpfen eine höhere Sensitivität, die jedoch durch einen hohen Salzgehalt wieder verringert wird. Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob der zuvor für NMR-Studien verwendete Bis-Tris-Puffer mit 50-100 mM NaCl und 5-10 mM MgCl_2 durch einen 25 mM Natriumphosphatpuffer mit 5 mM MgCl_2 ersetzt werden kann. Phosphatpuffer puffert in dem benötigten Bereich um pH 6,7 und ist ein gängiger NMR-Puffer, da er aufgrund seiner austauschenden Protonen nicht deuteriert erworben werden muss. Abbildung 3.25 zeigt Spektren von GTB sowohl in Bis-Tris als auch in Phosphatpuffer. Bis auf wenige Ausnahmen sind die Spektren identisch. Kontrollen einer in Phosphatpuffer gelagerten Probe ergaben ebenfalls keine Auffälligkeiten, sodass daraus zu schließen ist, dass auch Experimente in diesem Puffer durchgeführt werden können.

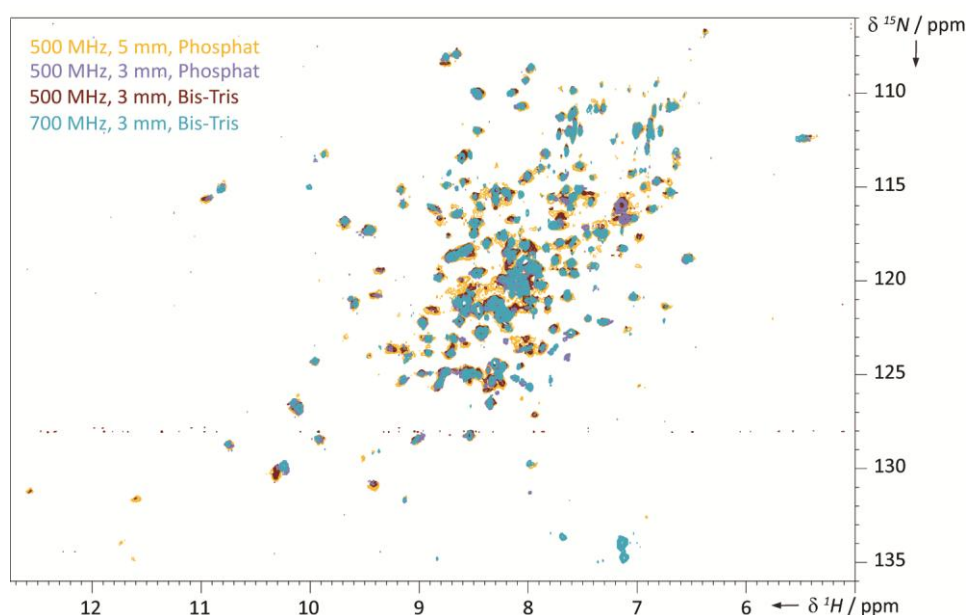


Abbildung 3.25: $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB in Phosphat- und Bis-Tris-Puffer bei 298 K. Experimente wurden wie angegeben bei 500 MHz oder 700 MHz und in 3 mm NMR-Röhrchen bzw. 5 mm Shigemi-NMR-Röhrchen bei pH 6,7 durchgeführt. Proben enthielten 410-450 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB in 50 mM Bis-Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME}$, 100 μM TSP- d_4 und 10 % D_2O oder in 25 mM Na-P-Puffer mit 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME}$, 100 μM TSP- d_4 und 10 % D_2O . Details s. Tabelle 2.21.

Zuletzt wurde die Verwendung von 5 mm Shigemi-Röhrchen mit der von 3 mm NMR-Röhrchen verglichen. 3 mm NMR-Röhrchen haben den Vorteil, dass sich wenig Salz im aktiven Probenvolumen des Probenkopfes befindet und das Probenvolumen mit 180 μl im Gegensatz zu normalen 5 mm NMR-Röhrchen mit ca. 500 μl recht gering ist. Nachteil ist, dass auch vergleichbar wenig Probe im aktiven Volumen ist. Shigemi-Röhrchen besitzen Einsätze aus speziellem Glas, das eine vergleichbare magnetische Suszeptibilität besitzt wie D_2O . Hierdurch wird das benötigte Probenvolumen von 5 mm NMR-Röhrchen auf ca. 280 μl verringert. In Abbildung 3.25 ist als unterstes Spektrum eine Aufnahme in Shigemi-Röhrchen gezeigt, die an einigen Stellen zusätzliche Signale bzw. intensivere Signale aufweist.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass NMR-Experimente mit $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB bei 298 K und in 25 mM Phosphatpuffer mit 5 mM MgCl_2 durchführbar sind und der Einsatz von 5 mm Shigemi-Röhrchen zu einem Intensitätsgewinn führt. Es ist darüber hinaus in begrenztem Rahmen möglich nicht deuterierte $u\text{-}^{15}\text{N}$ -markierte GTB bei 323 K für NMR-Experimente einzusetzen.

3.3.3 Aufnahme und Auswertung von Spektren für die Signalzuordnung

Wie im Abschnitt „Tripelresonanzexperimente“ des Kapitels 2.9.1 beschrieben, dienen Zuordnungsexperimente der Zuordnung der Signale eines HSQC-Spektrums zu den entsprechenden Aminosäureresten eines Proteins. Für größere Proteine (> 15 kDa) finden Tripelresonanzexperimente Anwendung, die auch mit der GTB aufgenommen werden sollten. Es wurde eine ca.

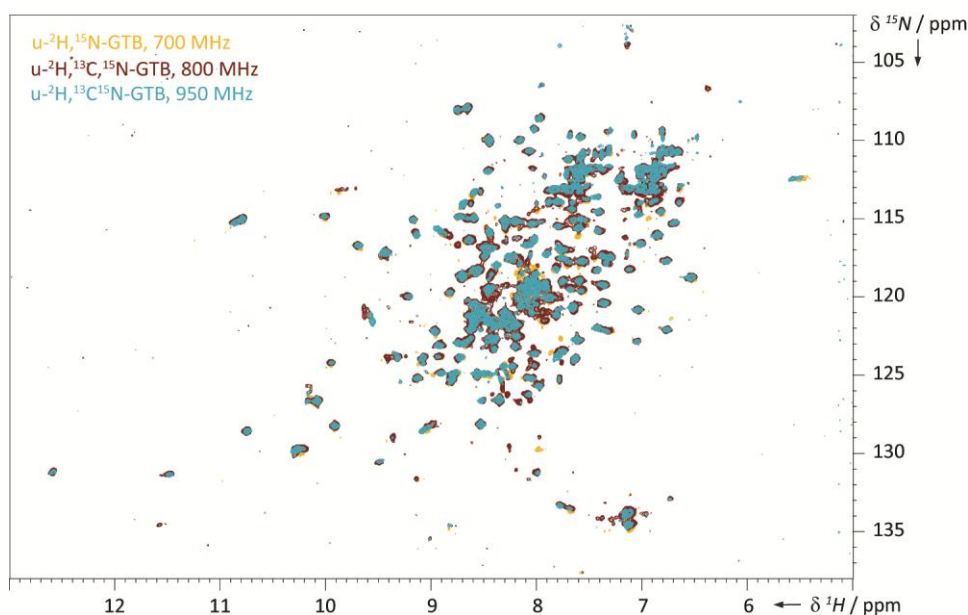


Abbildung 3.26: ^1H , ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektren von $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -GTB bei 700 MHz und $u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N -GTB bei 800 und 950 MHz. Experimente wurden bei 298 K und pH 6,7 durchgeführt, weitere Aufnahmeparameter s. 2.9.4. Die Proben enthielten 210 μM $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -GTB in 50 mM Bis-Tris, pH 6,7, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME}$, 1 mM TSP- d_4 und 10 % D_2O bzw. 250 μM $u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N -GTB in 25 mM Na-P-Puffer mit 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME-}d_6$, 1 mM TSP und 10 % D_2O .

250 μM Probe mit $u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N -GTB in NMR-Phosphatpuffer mit einem pH von 6,7 in Shigemi-Röhrchen angesetzt. Eigentlich sollte eine höhere Konzentration erzielt werden, jedoch gab es bei der Proteinkonzentrierung Verluste von fast 50 %, sodass diese für Protein-NMR-Experimente geringe Konzentration verwendet werden musste. ^1H , ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektren bilden die Grundlage für die Signalzuordnung und wurden unter anderem mit 2048×768 Datenpunkten mit einem 950 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen (Abbildung 3.26). Darüber hinaus erfolgte eine Messung mit einem 800 MHz NMR-Spektrometer mit 1536×512 Datenpunkten (2.9.4). Beide Spektren zeigen im Vergleich zu denjenigen, die bei 500 MHz oder auch 700 MHz aufgenommen wurden, wie erwartet eine verhältnismäßig gute Auflösung der Signale. Es ist jedoch auch zu erkennen, dass es Bereiche mit starken Signalüberlagerungen gibt. Insgesamt konnten in dem bei 950 MHz aufgenommenen Spektrum 308 Signale und in dem bei 800 MHz aufgenommenen Spektrum 283 Signale gezählt werden. Erwartet wurden 281 Signale des Proteinrückgrats (298 Reste minus 17 Proline) sowie zusätzliche Signale der 15 Gln-, 7 Asn-, 10 His-, 6 Trp-, 21 Arg- und 13 Lys-Reste.

Die Aufnahme der Tripelresonanzexperimente erfolgte an der Goethe Universität Frankfurt und wurde von Dr. F. Löhrl durchgeführt. Die Spektren, deren Messzeit etwa eine Woche betrug, sind in Abbildung 3.27 dargestellt. Ihre ^1H , ^{15}N -Projektion ist zu dem ^1H , ^{15}N -TROSY-HSQC deckungsgleich. Es ist auf den ersten Blick erkennbar, dass die Anzahl der sichtbaren Signale weit unter der maximal möglichen liegt. Die Sensitivität der einzelnen Experimente ist zudem

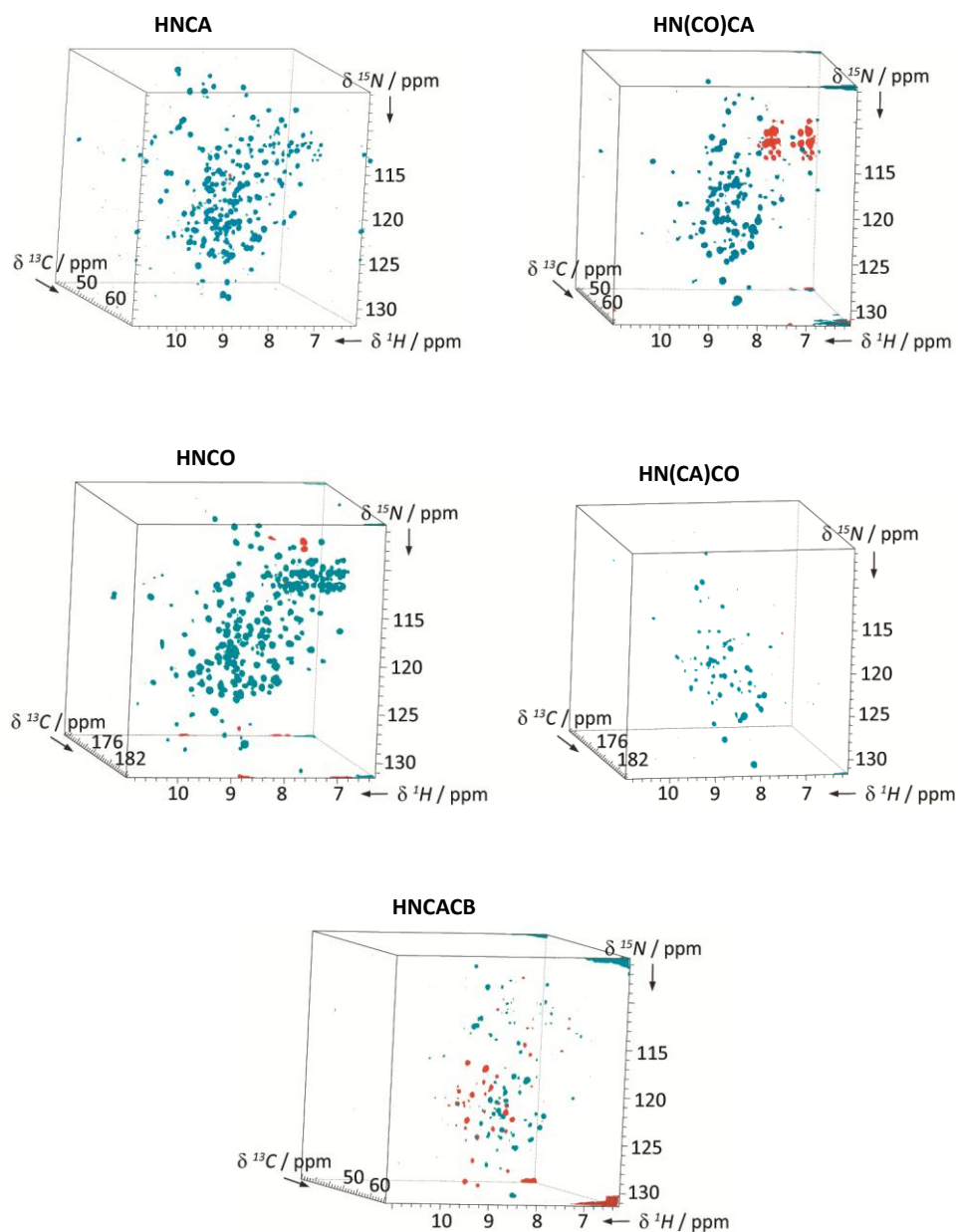


Abbildung 3.27: Tripelresonanzexperimente der $u\text{-}^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -GTB bei 298 K und pH 6,7. Der Puffer enthielt 25 mM Na-P-Puffer mit 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME-d}_6$, 1 mM TSP und 10 % D_2O . Aufnahmeparameter s. Tabelle 2.22. Positive Signale sind blau, negative Signale rot dargestellt.

unterschiedlich. Durch das HNCA-Experiment werden das Amidproton eines Aminosäurerests, der Stickstoffkern dieses Rests und die C^α -Kerne des gleichen und des vorangehenden AS-Rests miteinander korreliert. Man erhält zwei Signale mit identischen ^1H - und ^{15}N -Frequenzen und verschiedenen ^{13}C -Verschiebungen. Für dieses Experiment wurden 291 Signale gezählt, 156 davon zeigen Verknüpfungen von je zwei C^α -Kernen. Das HN(CO)CA gibt nur die Korrelationen zwischen ^1H und ^{15}N mit dem C^α -Kern des vorangehenden AS-Rests wieder. Hier konnten 156 Signale detektiert werden. Die negativen Signale sind Restsignale von den Seiten-

ketten, die außerhalb der aufgenommenen ^{13}C -Region liegen und deshalb reinfalteten. HN(CA)CO und HNCO korrelieren jeweils das Carbonyl-C (CO) anstatt das C^α mit ^1H und ^{15}N . Es wurden 222 Signale in dem HNCO-Spektrum und 91 Signale in dem HN(CA)CO-Spektrum gezählt. In dem HN(CA)CO zeigten insgesamt 42 Signale Verknüpfungen von je zwei COs. Das HNCACB zeigt ebenfalls mit etwa 105 nur sehr wenige Signale. Dieses Experiment ist vor allem für die Identifikation der Aminosäurereste wichtig, da die chemischen Verschiebungen der C^β -Kerne charakteristischer sind als die der anderen besprochenen Kerne. In dem dargestellten Spektrum sind resultierend aus dem Pulsprogramm die C^β -korrelierten Signale negativ, die C^α -korrelierten positiv. Aufgrund der wenigen Signale und Korrelationen konnte mit diesen Spektren alleine keine Signalzuordnung erfolgen. Es mussten weitere Strategien in Betracht gezogen werden.

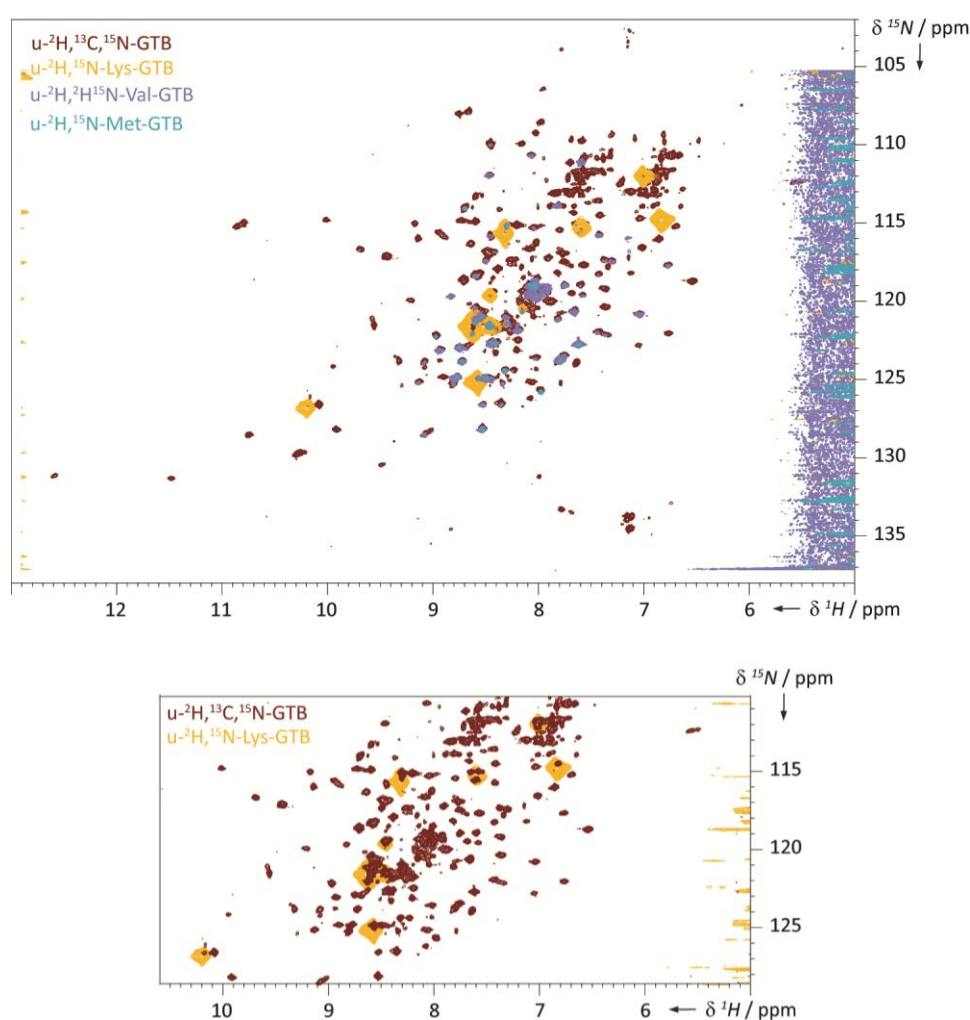


Abbildung 3.28: ^1H , ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektren bei 298 K und pH 6,7 von uniform ^2H - und selektiv $\alpha\text{-}^{15}\text{N}$ -Lys-, ^{15}N -Met- und ^2H , ^{15}N -Val-markierter GTB sowie von $u\text{-}^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -GTB. Aufgenommen bei 950 MHz (uniform markierte GTB) und 500 MHz in NMR-Phosphatpuffer. Details s. Legenden der Abbildung 3.20, Abbildung 3.21 und Abbildung 3.26 sowie unter 2.9.4.

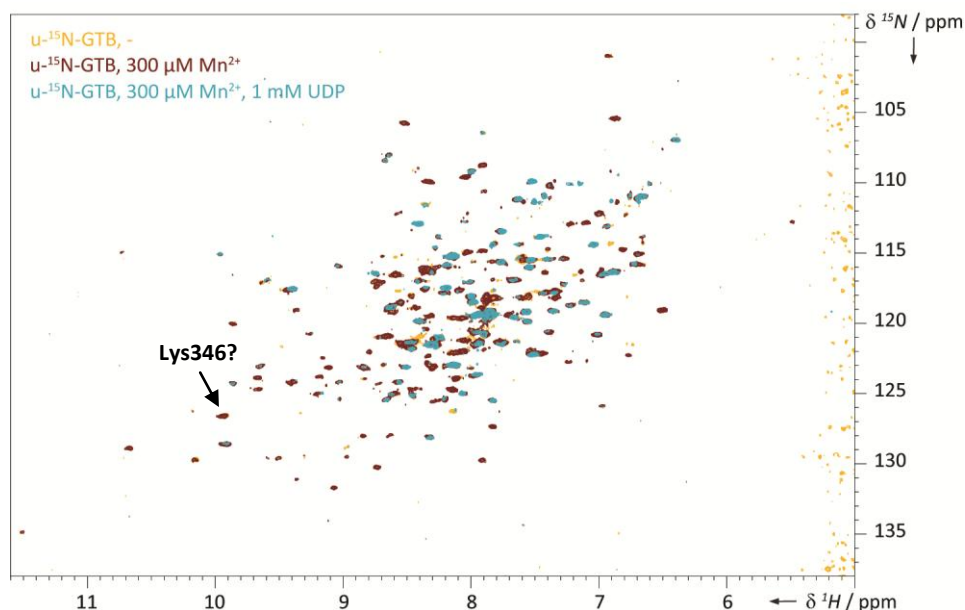


Abbildung 3.29: $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB mit und ohne Mn^{2+} und UDP bei 323 K und pH 6,2. Proben enthielten 290 μM $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB (1) in 50 mM Bis-Tris, 100 mM NaCl, 1 mM $\beta\text{-ME}$, 200 μM TSP- d_4 und 10 % D_2O mit oder ohne 300 μM MnCl_2 und 1 mM UDP. Spektren wurden bei 700 MHz aufgenommen, Details s. 2.9.4.

In Abschnitt 3.3.1 wurde bereits die Präparation von selektiv ^{15}N - und uniform ^2H -markierter GTB beschrieben, deren Spektren die Zuordnung der Signale erleichtern sollten. Es wurde festgestellt, dass nur die $u\text{-}^2\text{H}, \alpha\text{-}^{15}\text{N}$ -Lys-GTB ohne sichtbare Kreuzmarkierungen synthetisiert werden konnte. Abbildung 3.28 stellt das bei 950 MHz aufgenommene $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum der $u\text{-}^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -GTB zusammen mit den Spektren der selektiv markierten GTB dar und zeigt, dass sich die Signale aller selektiv markierten Proben bis auf wenige Ausnahmen mit denen der uniform markierten Probe decken.

Eine weitere Strategie für die Erleichterung einer Zuordnung ist die Verwendung von paramagnetischen Relaxationsbeschleunigern [142]. Es wurde bereits erläutert, dass die Anwesenheit des paramagnetischen Mn^{2+} -Ions, die Relaxation beschleunigt und dadurch sehr breite, nicht mehr sichtbare Signale im Spektrum entstehen. In geringen Konzentrationen hinzugegeben, kann allerdings ein abstandsabhängiger Einfluss beobachtet werden. Kerne, die sich näher an dem Relaxationsbeschleuniger befinden, werden stärker beeinflusst, als weiter entfernt liegende. Sind Struktur und die Bindungsstelle bekannt, wie im Fall der GTB, ist eine Diskriminierung zwischen Signalen von nah und entfernt liegenden AS-Resten möglich. R. Schönherr hat im Rahmen seines Praktikums NMR-Proben mit $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB und geringen Konzentrationen von Mn^{2+} hergestellt. Die Zugabe von etwa äquimolaren Mengen Mn^{2+} führte zunächst zu kaum Veränderungen im Spektrum (Abbildung 3.29). Hieraus lässt sich folgern, dass Mn^{2+} keine starke Bindung zur GTB eingeht. Erst das Hinzufügen von 1 mM UDP bewirkte den erwarteten Ef-

fekt. Zahlreiche Signale wurden ausgelöscht. Ein Vergleich der Spektren aus Abbildung 3.28 und Abbildung 3.29 ergab nach dem Hinzuziehen der Kristallstruktur, dass das gekennzeichnete Signal wahrscheinlich von Lys346 stammt. Es ist das einzige Lys-Signal, das durch Zugabe von Mn^{2+} und UDP verschwand. In der Kristallstruktur war zu sehen, dass es als einziges Lys recht nah am aktiven Zentrum und damit am Mn^{2+} lag. Eine weitere Zuordnung war nicht möglich, da dieses Signal in den Tripelresonanzspektren nicht zu sehen war.

4 Diskussion

Glycosyltransferasen bilden eine große Enzymfamilie, die an der Biosynthese von Oligosacchariden, Polysacchariden und Glycokonjugaten beteiligt ist (s. 1.2). Diese Biomoleküle erfüllen essentielle Funktionen, die von der Strukturgebung über Energiespeicherung bis zur Signaltransduktion reichen (s. 1.1). Ihre ubiquitäre Präsenz in allen lebenden Organismen hebt die große Bedeutung dieser Enzymsuperfamilie hervor. Der Mechanismus der katalysierten Glycosylierungsreaktion ist nur für einen Teil der GTs, die invertierenden GTs, weitestgehend geklärt, wohingegen der Mechanismus der konfigurationserhaltenden GTs immer noch unbekannt ist (s. 1.2.3). Mit dem Reaktionsmechanismus in Zusammenhang stehend sind Konformationsänderungen, die das Enzym während der Katalyse durchläuft. Zwar sind flexible Schleifen identifiziert worden, die sich bei Substratbindung von einer offenen in eine geschlossene Konformation begeben, jedoch ist über die Dynamik kaum etwas bekannt (1.3.2). Es ist demnach von großem Interesse, neue Erkenntnisse zu den Eigenschaften und der Funktionsweise von GTs zu gewinnen. Diese Arbeit befasst sich mit der humanen Blutgruppe B Galactosyltransferase, einer konfigurationserhaltenden GT vom GT-A-Faltungstyp, deren lösliche Domäne rekombinant in *E. coli* synthetisierbar ist und deren Struktur mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt wurde (1.3). Es wurden sowohl enzymkinetische Untersuchungen als auch umfangreiche Studien zur Ligandenbindung durchgeführt, die zu einem besseren Verständnis der Funktionsweise dieses Enzyms beitragen sollten. Darüber hinaus sollte die GTB über die Herstellung isotoopenmarkierter GTB-Proben für Protein-NMR-Experimente zugänglich gemacht werden. Die Ergebnisse werden nun im Folgenden diskutiert.

4.1 Präparation von unmarkierter GTB

Grundlegend für alle Studien war eine sorgfältige und mengenmäßig ausreichende Präparation der GTB. Unmarkierte GTB wurde in insgesamt sieben Chargen mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 95 mg pro Liter Vollmedium synthetisiert und gereinigt. Der Reinigungserfolg konnte jeweils mit einer SDS-PAGE und der Bestimmung des Quotienten A_{260}/A_{280} nachgewiesen werden (s. 3.1.1 und 3.2.1). Die mit hohen Proteinmengen, ca. 5-10 µg, beladenen Gele zeigten unter reduzierenden Bedingungen nur die Bande der monomeren GTB, sodass grobe Verunreinigungen mit anderen Proteinen ausgeschlossen werden konnten (Abbildung 3.1, Abbildung 3.7). Die Sensitivität der Gelfärbelösung beträgt laut Hersteller für die meisten Proteine 25 ng pro Bande. Spätestens nach dem Austausch des GTB-Dialysepuffers mit dem gewählten Messpuffer lag der A_{260}/A_{280} der Proben unter 0,6, sodass von weitestgehend nucleinsäurefreien Proben ausgegangen werden konnte (s. 2.4.3). Aktivitätstests zeigten mit spezifischen Aktivitäten zwischen 5 und 18 U/mg, dass aktive GTB in der Probe vorlag. Die Unterschiede können verschiedene Ursachen haben. Obwohl die Messungen mindestens in Doppelbestimmung durchgeführt wurden, sind sowohl Proteinbestimmung als auch Aktivitätstest mit Fehlern behaftet. Beim Aktivitätstest ist eine Abweichung von etwa 10 % nicht selten. Desweiteren ist zu

berücksichtigen, dass bei der Proteinbestimmung nicht zwischen aktiven und inaktiven Molekülen unterschieden werden kann und damit auch inaktive Moleküle zu der Proteinkonzentration beitragen, die anschließend für die Berechnung der spezifischen Aktivität herangezogen wurde. Grobe Präzipitate wurden aus diesem Grund zuvor durch Filtration entfernt.

Die nachfolgenden Experimente wurden sowohl in Mn^{2+} - als auch in Mg^{2+} -haltigem Puffer durchgeführt. Hierfür gab es mehrere Gründe. Zum einen ist nicht abschließend geklärt, welches bivalente Kation *in vivo* verwendet wird. Für viele GTs wird Mn^{2+} angenommen, wie z. B. für die invertierende bovine β -1,4-GalT [143,144]. Aber auch andere bivalente Kationen werden neben Mn^{2+} diskutiert, unter anderem Zn^{2+} für die mit der GTB nah verwandten α -1,3-GalT [90,145]. Zum anderen wurden die meisten GTB-Studien mit Mn^{2+} durchgeführt. Dies ist bei NMR-Experimenten aufgrund der relaxationsbeschleunigenden Eigenschaft des Mn^{2+} nicht möglich. Für NMR-Studien wurde deshalb Mg^{2+} eingesetzt. Die Aktivität der GTB ist mit Mg^{2+} zwar wesentlich geringer als mit Mn^{2+} , aber nicht gänzlich verloren [87]. Es sollte daher unter anderem untersucht werden, welche unterschiedlichen Einflüsse die beiden Kationen auf Bindung und Katalyse haben. Da die Reinigung der GTB mit Mn^{2+} -haltigen Puffern erfolgte, war ein sauberer Austausch gegen Mg^{2+} für reproduzierbare Ergebnisse ganz entscheidend. Vorherige Experimente zeigten, dass eine bloße Dialyse hierfür nicht ausreicht [92]. Sichtbar gemacht werden konnten Reste von Mn^{2+} mit NMR-Spektroskopie z. B. von GTB mit UDP-Gal. Die Anwesenheit von Mn^{2+} führte zu einer erkennbaren Linienverbreiterung der UDP-Gal-Signale. Erst nach Zugabe mindestens äquimolarer Mengen EDTA und intensivem Austausch des Puffers mit Zentrifugen-Filtereinheiten konnte eine Mn^{2+} -freie Probe erhalten werden.

4.2 Enzymatische Hydrolyse von UDP-Galactose

In Abwesenheit eines Akzeptorsubstrats katalysiert die GTB die Hydrolyse des Donorsubstrats UDP-Gal zu UDP und α -D-Gal (s. 1.3.4). In vorangehenden Studien konnte mittels NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass die Reaktion wie die natürliche Transferreaktion konfigurationserhaltend abläuft und die Anwesenheit des Akzeptoranalogs 3DD eine Beschleunigung der Hydrolyse hervorruft. Die enzymatische Hydrolyse bietet damit die Möglichkeit bisher unbekannte und durch die natürliche Transferreaktion nicht erschließbare Aspekte des Katalysenmechanismus der GTB zu untersuchen. Die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen sollten zunächst mit Hilfe eines radiochemischen Assays bestätigt werden. UDP-Gal mit radioaktiv markierter Galactoseeinheit wurde zusammen mit der GTB inkubiert. Anschließend wurde das nicht umgesetzte UDP-Gal mit einem Anionenaustauscher von dem Produkt Gal abgetrennt. Dieses konnte durch Flüssigkeitsszintillationszählung quantifiziert werden. Das in der Arbeitsgruppe von Prof. M. M. Palcic (Carlsberg Laboratory, Kopenhagen, Dänemark) entwickelte Protokoll wurde für diese Fragestellungen und den Einsatz im Institut für Chemie der Universität zu Lübeck entsprechend angepasst (3.1.2). Für eine einfachere Handhabung vieler Proben wurden unter anderem zentrifugierbare Mini-Säulen verwendet, wodurch der Flüssigkeitsdurchlauf beschleunigt wurde ohne dass signifikante Mengen an UDP-Gal ungebunden durch die Säule gelaufen sind. Die sowohl mit der Acetat-Form des Ionenaustauschers als auch mit der Chlorid-Form gemessenen Leerwerte betrugen unter 0,6 % der eingesetzten Aktivität und lagen

mit 67-104 dpm nur geringfügig höher als der Hintergrund, der erfahrungsgemäß zwischen 20 und 40 dpm liegt. Zusätzlich wurde eine Reaktion mit UDP-Gal und GTB angesetzt, um herauszufinden, welche Volumina zum Herunterwaschen der Galactose notwendig sind. Es wurden Volumina von 0,8 ml und 2,4 ml H₂O getestet. Die begrenzte Aufnahmekapazität des 2 ml Reagiergefäßes berücksichtigend ist die Handhabung des kleineren Volumens wesentlich einfacher und sicherer. Es wird zwischen den Waschschritten kein Transfer des radioaktiven Materials in die Szintillationsflaschen benötigt. Das Waschen mit dem größeren Volumen resultierte in etwas höheren Aktivitäten, die mit maximal 5 % Abweichung allerdings erfahrungsgemäß im Bereich des Fehlers der Messung lagen. Ebenfalls im Rahmen des experimentellen Fehlers lag der Unterschied von 37 dpm zwischen den Leerwerten, entsprechend einer Abweichung von 55 %. Für eine gesicherte Aussage wären weitere Experimente notwendig gewesen. Aufgrund des begrenzten radioaktiven Materials und der schnelleren und sichereren Arbeitsweise durch nur einen Transfer des Durchflusses, wurde an dieser Stelle die Verwendung der kleineren Volumina festgelegt. Die folgenden Experimente zeigten, dass mit diesem Assay nach langer Inkubation ein annähernd vollständiger Umsatz von UDP-Gal nachgewiesen werden konnte. Dies weist darauf hin, dass auch mit 0,8 ml H₂O das Produkt Gal vollständig von der Säule gewaschen wird. Zwischen den beiden Formen des Anionenaustauschers konnten für diesen Assay keine Unterschiede festgestellt werden. Im Folgenden wurde daher die Chlorid-Form des Ionenaustauschers verwendet, sowie mit 100 µl H₂O die Reaktion gestoppt und die Säule zweimal mit je 400 µl H₂O gewaschen.

Die Überprüfung der mit NMR-Spektroskopie erhaltenen Ergebnisse erfolgte mit zwei zu den NMR-Ansätzen analogen Proben. Die eine enthielt GTB und UDP-Gal in Mg²⁺-haltigem Puffer, die andere zusätzlich das Akzeptoranalogen 3DD. Der Reaktionsverlauf wurde mit Zeit-Umsatz-Kurven aufgezeichnet, aus denen durch Anpassung einer exponentiellen Zerfallsfunktion apparente Ratenkonstanten und Halbwertszeiten bestimmt wurden. Die Funktion beschreibt nicht die wirkliche, wesentliche komplizierter Reaktion, da sie unter anderem nicht die Produktinhibition berücksichtigt, sondern dient der Veranschaulichung. Ein Vergleich der apparenten Konstanten (Tabelle 1.1, Tabelle 3.3) zeigt, dass mit beiden Verfahren ähnliche Ergebnisse erhalten wurden. Die Halbwertszeiten lagen zwischen 23 h und 24 h ohne sowie 6 h und 12 h mit 1 mM 3DD. Der Effekt der Reaktionsbeschleunigung durch 3DD wurde hiermit bestätigt.

Für eine nähere Charakterisierung der Hydrolysereaktion und des Einflusses des Akzeptoranalogs wurden die enzymkinetischen Konstanten K_M und k_{kat} ermittelt und zwar sowohl in Gegenwart von Mg²⁺ als auch von Mn²⁺ (3.1.2). Die Bestimmung erfolgte mit dem besprochenen radiochemischen Assay über die Auswertung von Umsatzraten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Die Umsatzraten wurden unter Fließgleichgewichtsbedingungen gemessen. Mit der Anpassung der Michaelis-Menten-Gleichung an die Messwerte wurden K_M und k_{kat} erhalten. Die Michaelis-Menten-Kinetik stellt den einfachsten Ablauf einer enzymkatalysierten Reaktion dar (2.8.1). Obwohl die Bedingung einer irreversiblen Produktbildung für die GTB-katalysierte Hydrolysereaktion erfüllt ist, ist es möglich, dass die Reaktion nicht über einen Schritt, sondern über mehrere Schritte abläuft. Auch in diesem Fall bleibt die Michaelis-Menten-Gleichung gültig. K_M und k_{kat} bestehen dann aus einer komplexen Kombination von Raten- und

Gleichgewichtskonstanten [135].

Beim Versuchsaufbau mussten einige Aspekte berücksichtigt werden. Um Fließgleichgewichtsbedingungen zu gewährleisten, durfte der Umsatz nur zu maximal 5 % abgelaufen sein. Dies wurde bis auf ein paar geringe Abweichungen und einen Ausreißer erfüllt. GTB-Konzentrationen und Inkubationszeiten wurden so angepasst, dass die Inkubationszeiten von einigen Minuten bis zu wenigen Stunden reichten, wodurch ein signifikanter Einfluss der chemischen Zersetzung von UDP-Gal unterbunden wurde. Die Substratkonzentrationen sollten deutlich über der Enzymkonzentration liegen und etwa ein Zehntel bis das Zehnfache des K_M -Werts ausmachen. Für die Auswertung mit der Michaelis-Menten-Gleichung ist es wichtig, dass sich die Substratkonzentration durch Bindung an das Enzym nur unmerklich verändert. Nach der Ermittlung von Bindungskonstanten wurde festgestellt, dass diese Bedingung nicht ganz erfüllt wurde und der Anteil an gebundenem Substrat bis zu 6 % (bei Experimenten mit Mg^{2+} und 3DD) ausmachte. Bei einer Wiederholung der Messreihen mit geringeren Enzymkonzentrationen konnte der Anteil auf maximal 0,5 % reduziert werden. Eine weitere Reduktion war aufgrund der sehr langsam ablaufenden Reaktion und der begrenzten Ressourcen an radioaktivem Material nicht möglich. An dieser Stelle ist noch anzumerken, dass sich trotz der ausreichenden Kapazität des Ionenaustauschers, die Leerwerte konzentrationsabhängig veränderten. Daher musste für jede Verdünnung ein Leerwert angefertigt werden.

Die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten ließen sich mit Korrelationskoeffizienten von größer 0,991 sehr gut von der Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben (Abbildung 3.3 - Abbildung 3.6). Die Standardfehler der K_M - und v_{max} -Werte lagen mit 5-16 % bzw. 2-8 % innerhalb des üblichen experimentellen Fehlers. Die zweite Messreihe lieferte deutlich größere K_M -Werte, die für die Reaktion mit Mg^{2+} und 3DD fast das 8fache erreichten (Tabelle 3.4). Größenordnung und Reihenfolge blieben jedoch erhalten. Wäre die erste Messreihe wegen der hohen Enzymkonzentrationen nicht unter Fließgleichgewichtsbedingungen aufgenommen worden, wären niedrigere Werte in der zweiten Messreihe zu erwarten gewesen [112]. Erfahrungsgemäß sind trotz guter Messkurven der Einzelmessungen, Abweichungen in dieser Größe nicht ungewöhnlich. Neben möglichen Unstimmigkeiten zwischen realen und theoretischen Konzentrationen darf vermutet werden, dass die Aktivitäten der einzelnen GTB-Moleküle eventuell nicht so groß waren, wie bei der ersten Messreihe. Es wurden verschiedene GTB-Präparationen eingesetzt. Unterschiede in v_{max} sind auf verschiedene spezifische Aktivitäten und Konzentrationen der GTB zurückzuführen. Hinzu kommt, dass nicht 100 %ig gleiche Aktivitäten eingesetzt wurden. v_{max} wurde zur Einschätzung des Fehlers angegeben, besitzt aber ohne Berücksichtigung des Substrateinsatzes keine Aussagekraft. Erst die daraus ermittelten Wechselzahlen k_{kat} liefern allgemeine Konstanten der Reaktion. Für die Hydrolysereaktion wurden k_{kat} -Werte von 0,6-2,3 h⁻¹ und 0,1 h⁻¹ als abweichendem Wert ermittelt. Sie waren damit für alle vier untersuchten Bedingungen (Mn^{2+}/Mg^{2+} ; $\pm$ 3DD) annähernd gleich und im Vergleich zu der Transferreaktion mit einem k_{kat} von 6,5 s⁻¹ sehr gering [66]. Im Gegensatz dazu bewirkte die Anwesenheit des 3DD in nahezu GTB-sättigenden Konzentrationen eine deutliche Verringerung des K_M -Werts von mindestens einer Größenordnung. Darüber hinaus ist ein Einfluss des bivalenten Kations auf den K_M -Wert zu erkennen. Die Gegenwart von Mn^{2+} anstatt von Mg^{2+} führte zu einer Reduktion um mindestens einen Faktor von 50.

Ein Vergleich der Dissoziationsrate von GTB und UDP-Gal im Bereich von 10 s⁻¹ mit den Um-

satzraten im Bereich von 1-2 h⁻¹ lässt Folgendes schließen: Durch die wesentlich höhere Dissoziationsrate kann angenommen werden, dass sich zumindest in Abwesenheit des 3DD die K_M -Werte im Bereich der K_D -Werte befinden (s. 2.8.1). Der Einfluss der Akzeptorbindung auf die Bindungsaffinität des Donorsubstrats sollte daher mit Hilfe der isothermen Titrationskalorimetrie weitergehend untersucht werden.

4.3 Charakterisierung der Ligandenbindung

Die Kenntnis bindungsrelevanter Parameter ist grundlegend für die Aufklärung der Funktionsweise der GTB sowie für die Entwicklung von Inhibitoren (1.2.4). Für die GTB sind Bindungskonstanten bisher nur aus kompetitiven STD-NMR-Experimenten bekannt (1.3.3). Sie identifizierten UDP als die maßgeblich die Affinität bestimmende Einheit von UDP-Gal [87]. Die angegebenen Bindungskonstanten wurden jedoch relativ zum K_M -Wert der Transferreaktion bestimmt. Bei weiteren direkten STD-NMR-Experimenten und SPR-spektroskopischen Untersuchungen, die mit Mg²⁺ durchgeführt wurden, war nicht auszuschließen, dass noch Mn²⁺ in der Probe vorhanden war. Eine direkte Ermittlung von Bindungskonstanten mit genauer Unterscheidung zwischen Mn²⁺ und Mg²⁺ stand demnach noch aus und wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Als Methoden wurden ITC, SPR-Spektroskopie und STD-NMR-Spektroskopie gewählt.

Die ITC bietet die Möglichkeit neben Bindungsaffinitäten auch Bindungsenthalpien und Entropien zu bestimmen (2.6.1). Eine Charakterisierung der Bindung an die GTB wurde mit den Liganden UDP, UDP-Gal, UDP-Glc und H-Dis-octyl sowohl in Mn²⁺- als auch in Mg²⁺-haltigem Puffer durchgeführt (3.2.2). Weil UDP-Gal während der Messung hydrolysiert wird und auch diese Reaktion einen Beitrag zu den gemessenen Wärmemengen liefert, wurde die Untersuchung des kooperativen Effekts mit UDP und H-Dis-octyl vorgenommen.

Am zuverlässigsten waren Experimente, die unter folgenden Bedingungen durchgeführt wurden: a) GTB und Ligand befanden sich in exakt demselben Puffer und bei der gleichen Temperatur, b) β -ME war zugesetzt, um Präzipitation der GTB zu vermindern, c) die Referenzleistung war entsprechend auf die maximal frei werdende Wärmemenge eingestellt und d) der C-Faktor lag über 10, sodass die gesamte Bindungskurve gemessen werden konnte. Vor allem die Einhaltung der letzten Bedingung begrenzt die Bestimmung von Bindungskonstanten mittels ITC für die GTB nach oben auf einen K_D von etwa 100 μ M. Hier müsste für sehr gute Ergebnisse eine GTB-Konzentration von 1 mM eingesetzt werden, die bisher noch nicht erreicht werden konnte. Aufgrund dieser Beschränkung und außerhalb der Empfindlichkeit des Geräts liegenden Wärmeveränderungen, konnte mit den eingesetzten 428 μ M GTB keine Bindung von Mn²⁺ oder Mg²⁺ detektiert werden. Gleiches galt für die Bindung von UDP in Abwesenheit eines bivalenten Kations. Dass UDP auch ohne bivalentes Kation an die GTB bindet, ist aus STD-NMR-Experimenten bekannt [81], mit denen auch millimolare Bindungen untersucht werden können. Die untere Grenze für ITC-Messungen liegt im niedrigen nanomolaren Bereich und stellt für Untersuchungen der GTB kein Problem dar, weil noch keine so starken Binder identifiziert wurden. Insgesamt hat die Durchführung eines Experiments mit GTB und einem VP-ITC einen

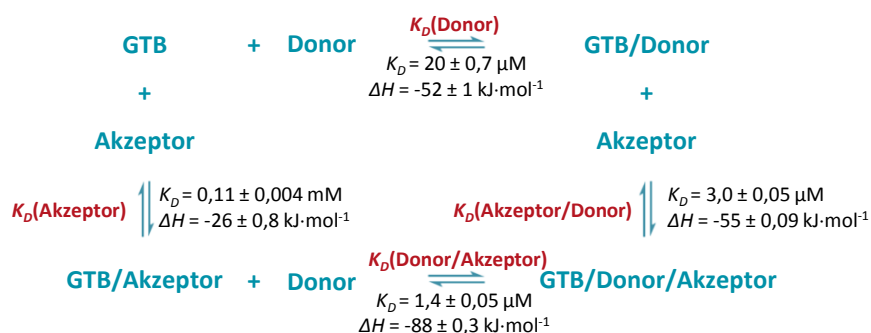


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Bindung von Donor- und Akzeptorsubstrat an die GTB. Die Abbildung zeigt die Zusammenhänge der K_D -Werte, nicht die Reihenfolge, in der Donor und Akzeptor an die GTB binden. Das vorgelegte Substrat steht zuletzt. Angegebene Werte beziehen sich auf Experimente mit Mn^{2+} bei pH 7.

hohen Ressourcenbedarf. Für nur eine Messung wurden zwischen 12 und fast 27 mg GTB und mehrere Milligramm Ligand benötigt.

K_D -Werte konnten mittels ITC mit einer sehr guten Reproduzierbarkeit bestimmt werden (s. Tabelle 3.6). Die Abweichungen bei den Doppelbestimmungen lagen bei unter 20 %. Größere Unterschiede waren bei ΔH und damit auch $T\Delta S$ zu verzeichnen. Sie betrugen bei der Messung mit H-Dis-octyl in Anwesenheit von UDP und Mn^{2+} bis zu 45 % bzw. 100 %, in absoluten Werten 25 bzw. 24 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Eine Verringerung des pH-Werts von 7 auf 6,7 schien eine Erhöhung der Affinität bewirkt zu haben. Dies wäre im Hinblick auf das pH-Optimum der Transferreaktion von pH 6,5 durchaus nachvollziehbar. Jedoch liegen die Unterschiede im Bereich des Messfehlers, sodass hierzu keine gesicherte Aussage gemacht werden kann.

Deutlich zu erkennen war der positive kooperative Effekt bei der Bindung von UDP und H-Dis-octyl. Der K_D -Wert der Bindung von UDP in Gegenwart von Mn^{2+} wurde durch das H-Dis-octyl um einen Faktor von 14 verringert, der K_D -Wert der Bindung von H-Dis-octyl durch die Zugabe von UDP um einen Faktor zwischen 37 und 38 in Gegenwart von Mn^{2+} und um einen Faktor von 10 in Gegenwart von Mg^{2+} . Die Bindungskonstanten der Substrate mit und ohne des jeweils anderen Substrats stehen miteinander in Zusammenhang (Abbildung 4.1) [146]. Beeinflusst die Bindung des Donors die Bindung des Akzeptors, so muss die Bindung des Akzeptors die Bindung des Donors in gleichem Maße beeinflussen. Analog dazu müssen die Differenzen zwischen den Bindungsenthalpien mit und ohne des jeweils anderen Substrats für beide Reihenfolgen übereinstimmen. Beides ist aus dem Grundsatz der Energieerhaltung ersichtlich. Für die Bindung in Anwesenheit von Mn^{2+} können diese Zusammenhänge nachverfolgt werden. Für ΔH stimmen die Differenzen sehr gut überein. Bei den K_D -Werten gibt es geringe Abweichungen zu den idealen Bedingungen im Rahmen eines Faktors von 2,6-2,7. Begründet liegt diese Abweichung vermutlich in experimentellen Fehlern, die aus den zwei Bestimmungen bei unterschiedlichem pH nicht erkennbar sind.

Insgesamt kann geschlossen werden, dass die Beschleunigung der Hydrolysereaktion und der

geringere K_M -Wert in Anwesenheit des 3DD weitestgehend auf eine erhöhte Bindungsaffinität zum Donorsubstrat UDP-Gal zurückzuführen ist. Die Zeit-Umsatz-Kurven (Abbildung 1.13, Abbildung 3.2) lassen sich nun folgendermaßen erklären: Bei einem K_M -Wert für UDP-Gal in Gegenwart von Mg^{2+} von 0,45 mM setzte die GTB die am Anfang der Reaktion vorhandenen 1 mM UDP-Gal mit einer Geschwindigkeit von ca. 69 % der maximalen Geschwindigkeit um. Mit dem 3DD wurde diese Geschwindigkeit auf mindestens 95 % gesteigert. Durch Spuren von Mn^{2+} wurden aufgrund eines niedrigeren K_M auch ohne 3DD mit der Startkonzentration von 1 mM hohe Umsatzzraten erreicht, sodass der Effekt des 3DD kaum sichtbar war. Es darf angenommen werden, dass positive Kooperativität auch bei der normalen Transferreaktion auftritt. Die thermodynamischen Parameter zeigen uneingeschränkt, dass die Bindungen mit negativen (günstigen) Enthalpieänderungen und positiven (ungünstigen) Entropieänderungen einhergehen.

Wie einleitend schon angemerkt, gibt es nicht viele thermodynamische Untersuchungen von GTs (1.3.3). Für die GTB selber liegt mittlerweile eine Studie vor, bei der mittels MS temperaturabhängig K_D -Werte des H-Dis-octyl in An- und Abwesenheit von UDP und Mn^{2+} bestimmt wurden [102]. Die ITC-Messungen unterstützend konnte bei 24 °C in Anwesenheit von UDP eine 9fach geringere Dissoziationskonstante festgestellt werden. Über van't Hoff-Plots (die eine Temperaturabhängigkeit von ΔH nicht berücksichtigen) wurden ΔH und ΔS bestimmt. Die Ergebnisse stimmen zwar nicht vollkommen mit denen der ITC überein, geben aber ein ähnliches Bild wieder. Weitere ITC-Studien sind für die verwandte bovine α -1,3-GalT [82], die humane β -1,4-GalT 7 [83] sowie für die humane α -1,4-*N*-Acetylhexosaminyltransferase [85] publiziert; alles GTs mit UDP-aktiviertem Donorzucker. In keinem Fall konnten vollständige Bindungskurven aufgenommen werden. Die ermittelten Werte für Donorsubstrat und UDP stimmen jedoch von der Größenordnung her mit den Werten der GTB überein. Es wurde darüber hinaus in zwei der genannten Studien gezeigt, dass die Detektion einer Akzeptorbindung nur in Anwesenheit von UDP möglich war. Dies weist darauf hin, dass kooperative Effekte bei der Substratbindung eine generelle Eigenschaft von GTs sind.

Anhand der Kristallstrukturen von GTB mit Donor- und/oder Akzeptorliganden kann nachvollzogen werden, wie der kooperative Effekt zustande kommt. Die Substrate werden jeweils über ein Netzwerk an Wasserstoffbrücken gebunden und die Phosphatreste des UDP koordinieren das zweiwertige Kation Mn^{2+} [70]. Die Ausbildung dieser Bindungen ist enthalpisch begünstigt. Darüber hinaus ist in den Kristallstrukturen sichtbar, dass die Bindung des Donorsubstrats oder beider Substrate zu konformationellen Veränderungen im Bereich der flexiblen Schleifen führt (s. Abbildung 1.10, 1.3.2). Diese sind bei Bindung des Akzeptorsubstrats nicht zu beobachten. Sind beide Substrate an die GTB gebunden, bilden sich zusätzliche Wasserstoffbrücken zwischen den Substraten und den Schleifen aus, worin vermutlich die affinere Bindung ihre Ursache hat. Es kann spekuliert werden, dass die Entropieverluste neben dem Anteil, den die Liganden haben, von dem Ordnen dieser Schleifen herrühren. Es ist an dieser Stelle anzuführen, dass die Abläufe innerhalb des Enzyms bei Substratbindung und Katalyse wesentlich komplexer sind und maßgeblich von dynamischen Prozessen des gesamten Proteins bestimmt werden [147,148]. Es wurde demonstriert, dass Ligandenbindung und Freisetzung von Bindungsenergie mit einem Verlust an Entropie im Rezeptor einhergeht [149]. Dies geschieht durch die Einnahme einer kompakteren und rigideren Struktur, die wiederum die Bindung des Li-

ganden begünstigt. Darüber hinaus wird angenommen, dass Enzyme Bindungsenthalpie für die Katalyse nutzen [150] und der Übergangszustand der Substrate stärker an das Enzym bindet als die Substrate selber [151]. Auch dies würde mit einer Reduktion der Enzymbewegungen einhergehen. Für die GTB wurde gezeigt, dass das Donorsubstrat UDP-Gal in einer rückgefalteten Konformation gebunden wird, die im freien Zustand nicht detektiert werden konnte [81]. Es ist denkbar, dass dieser Zustand höherer Energie von der GTB über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und eine kompaktere Enzymstruktur im Gegensatz zu der in Lösung vorhandenen Konformation stabilisiert wird und dies durch die Akzeptorbindung weiter verstärkt wird. Studien zur Konformationsdynamik in atomarer Auflösung, wie zum Beispiel mittels NMR-Spektroskopie, würden hier interessante Einblicke in die Funktionsweise der GTB geben.

Eine weitere häufig eingesetzte Methode zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten ist die SPR-Spektroskopie (2.7). In dieser Arbeit wurde die Bindung des Donorsubstrats UDP-Gal an die GTB bei 25 °C und pH 6,7 untersucht (3.2.3). Es wurden sowohl Experimente mit immobilisiertem UDP-Gal als auch mit immobilisierter GTB durchgeführt. Im Gegensatz zu den langen ITC-Messungen waren GTB und UDP-Gal nur wenige Minuten in Kontakt, sodass die enzymatische Hydrolyse nur in extrem geringen Maße abgelaufen sein könnte. Der Lösungsfluss verhinderte zusätzlich, dass die möglichen Produkte zum Messsignal beitrugen. Frühere Experimente mit UDP-Gal in Gegenwart von Mg^{2+} ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Mit immobilisierter GTB und UDP-Gal als Analyt wurden K_D -Werte im millimolaren Bereich gemessen, mit immobilisiertem UDP-6-biotinyl-Gal (s. Abbildung 2.6) im mikromolaren Bereich. Dies sollte mit der nun vorhandenen Kenntnis über eine sorgfältige GTB-Präparation überprüft werden. Vermutet wurde, dass restliches Mn^{2+} in den GTB-Proben zu diesem Ergebnis führte. Zudem sollten in Hinblick auf zukünftige Untersuchungen einige grundlegende Parameter festgelegt werden. Dies war trotz umfangreicher Studien von Dr. E. Munoz (Institut für Chemie) unter anderem wegen der widersprüchlichen Daten noch nicht abschließend geschehen.

Für die Kopplung von UDP-Gal an einen Sensor-Chip wurde eine biotinylierte Verbindung verwendet, das UDP-6-biotinyl-Gal. Es ist publiziert, dass es als Donorsubstrat verschiedener GTs fungiert [133]. Vor dem Einsatz in SPR-Experimente wurde mittels NMR-Spektroskopie überprüft, ob GTB UDP-6-biotinyl-Gal bindet und als Donorsubstrat verwendet. Dr. E. Munoz hatte bereits ein Bindungsepitop für die Bindung von UDP-6-biotinyl-Gal an die GTB erstellt (Abbildung 4.2) [136]. Dies war vergleichbar mit dem von UDP-Gal [87]. Die Bindung konnte für die hier verwendete Substanzcharge bestätigt werden (3.2.3). Für das ebenfalls in der Probe vorhandene H-Dis-octyl wurde auch Bindung detektiert. Hier ist anzumerken, dass dies nicht bedeutet, dass auch beide gleichzeitig binden können. Ein Umsatz von UDP-6-biotinyl-Gal konnte auch nach 13-tägiger Inkubation nicht nachgewiesen werden. Schon Bülter et al. demonstrierten, dass die bovine β -1,4-Galactosyltransferase 1 im Gegensatz zu den humanen β -1,4-Galactosyltransferasen 2-4 UDP-6-biotinyl-Gal nicht umsetzte. Dies ist ein Hinweis, dass es nicht generell analog zu UDP-Gal eingesetzt werden kann.

Für die SPR-Experimente wurden zwei Flusszellen eines Streptavidin-Chips mit UDP-6-biotinyl-Gal sättigend belegt (2.7.2, 3.2.3). Als Referenzzelle dienten mit D-Biotin belegte Flusszellen. Die Messungen wurden mit GTB sowie mit GTB, die mit 3DD gesättigt worden war, in

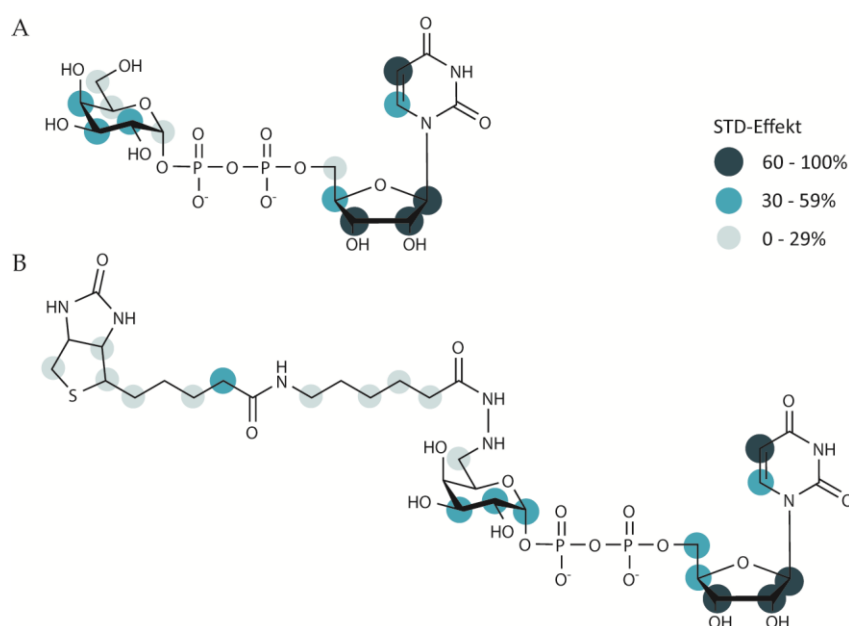


Abbildung 4.2: Bindungsepitope von (A) UDP-Gal und (B) UDP-6-biotinyl-Gal ermittelt mit STD-NMR-Spektroskopie. Daten aus [87] für UDP-Gal und [136] für UDP-6-biotinyl-Gal. Aufnahmen erfolgten unter gleichen Bedingungen bei 15 °C, pH 6,7 und mit einer Sättigungszeit von 2 s. Die Kreise stellen die relative Sättigung dar, die die Protonen an den entsprechenden Positionen erfahren haben und spiegeln die Nähe zur Bindungsstelle wider. Ein engerer Kontakt resultiert in größeren STD-Effekten. Keine Kreise sind bei Protonen, deren Signale nicht ausgewertet werden konnten.

Gegenwart von Mn^{2+} durchgeführt. Eine Flussrate der GTB-Lösung von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit einer Kontaktzeit von 3 min und einer anschließenden Regenerierung mit 1 M NaCl ergaben charakteristische Sensorgramme (Abbildung 3.12, Abbildung A 1). Da sie die Sättigungsphase erreichten, konnten die Gleichgewichtsantworten gut bestimmt werden. Daraus wurden unter Verwendung der Langmuir-Gleichung die K_D -Werte sowie die maximalen SPR-Antworten RU_{max} ermittelt. Die Kurvenanpassung war im Fall von GTB ohne 3DD sehr gut, mit 3DD mäßig. Die Messwerte streuten um die Kurve und beschrieben eher einen zweiphasigen Ablauf. Ob dieser durch experimentelle Fehler zustande kam oder ein reales Phänomen durch die Kombination mit 3DD darstellt, wurde nicht geklärt. RU_{max} erreichte nur etwa 1-4 % der theoretischen RU. Vermutlich liegt das darin begründet, dass nicht alle UDP-6-biotinyl-Gal-Moleküle zugänglich waren. Streptavidin ist ein 53 kDa großes Tetramer, mit je einer Biotinbindestelle pro Einheit. Darüber hinaus besteht der Chip aus einer dreidimensionalen Dextran-Matrix, in und auf der das Streptavidin immobilisiert wurde. Es ist demnach durchaus möglich, dass ein Großteil des gebundenen UDP-6-biotinyl-Gal gar nicht erreicht werden konnte.

Die K_D -Werte betrugen 1,7 μM ohne und 0,85 μM mit 3DD und waren mit Standardfehlern von 6 % bzw. 13 % belegt. Im Vergleich zu den ITC-Messungen wurden mit diesem SPR-Aufbau insgesamt geringere Bindungskonstanten erhalten (s. Tabelle 4.1). Zudem ist kaum ein Unterschied zwischen der Ab- und Anwesenheit des 3DD erkennbar. Ein Faktor von 2 ist für Bindungsstudien ein sehr geringer Unterschied.

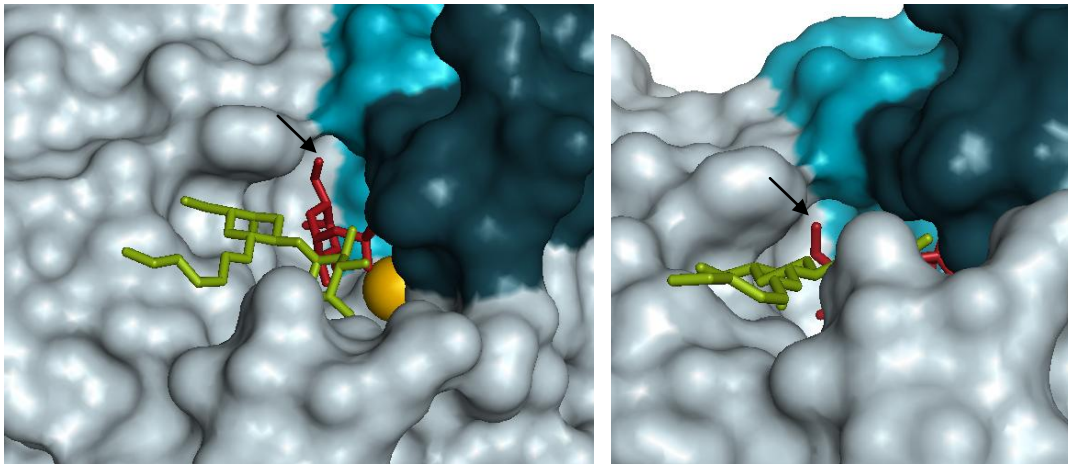


Abbildung 4.3: Geschlossene Konformation von AABBB mit UDP-Gal und 3DD. Gezeigt ist das aktive Zentrum aus zwei Perspektiven. Die Proteinoberfläche ist grau dargestellt mit hervorgehobener interner (hellblau) und C-terminaler (dunkelblau) Schleife. UDP-Gal ist in rot, 3DD in grün und Mn^{2+} in gelb abgebildet. Der Pfeil kennzeichnet die Hydroxylgruppe an Position 6 der Galactose von UDP-Gal, welche bei UDP-6-biotinyl-Gal durch einen Biotinrest mit Linker ersetzt ist. (PDB ID: 2RJ7)

Die Ursache hierfür könnte die gleiche sein, wie die für die nicht katalysierte Transferreaktion. Die SPR-Experimente in Kombination mit dem Bindungssepitop belegen, dass UDP-6-biotinyl-Gal spezifisch von der GTB gebunden wird. Das Bindungssepitop zeigt weiterhin, dass sich auch die Biotineinheit nah zu der Proteinoberfläche befindet und vermutlich Wechselwirkungen mit ihr eingeht, demnach zur Bindungsaffinität beiträgt. Wird davon ausgegangen, dass UDP-6-biotinyl-Gal in gleicher Weise wie UDP-Gal an die GTB bindet, kann aus der einzigen Kristallstruktur mit UDP-Gal (AABBB mit UDP-Gal und 3DD) entnommen werden, dass die Einnahme der geschlossenen Konformation zusammen mit der Bindung des Akzeptors wegen des Linkers und des Biotinrests wahrscheinlich sterisch nicht möglich ist (Abbildung 4.3) [70]. Zu der Hydroxylgruppe an Position 6 der Galactose von UDP-Gal bildet His301 normalerweise eine Wasserstoffbrücke aus. Vermutlich ist diese auch nicht in der gleichen Art - wenn überhaupt - zu dem Amid in UDP-6-biotinyl-Gal aufgebaut. Ist die Schließung der C-terminalen Schleife nicht möglich, kann auch die Bindung von 3DD zu keiner Verbesserung der Affinität beitragen. Die normalerweise ablaufenden Konformationsänderungen könnten nicht in dem Maße stattfinden, wie bei der Bindung von UDP-Gal und einem Akzeptor.

Die Immobilisierung von Liganden auf einen Chip ist nicht immer möglich. Für die GTB wäre darüber hinaus ein SPR-Aufbau sinnvoll, mit dem viele verschiedene Liganden in einem direkten Assay getestet werden können. Daher wurde GTB auf einem Chip immobilisiert. Die Verwendung eines CM5-Chips, der mit 2500-4100 RU GTB belegt war, erwies sich als passend. Als Puffer wurde 50 mM MOPS gewählt, dem 100 mM NaCl und 5 mM $MgCl_2$ bzw. $MnCl_2$ zugesetzt waren. Auch hierbei gab es keine Auffälligkeiten. Die Flussrate wurde auf 10 μ l/min gesetzt und führte bei einer 3-minütigen Injektion von UDP-Gal zu rechteckigen Sensorgrammen. Das Gleichgewicht stellte sich demnach sehr schnell ein. Eine Regenerierung nach der UDP-

Gal-Injektion war nicht notwendig. Es wurde lediglich mit Puffer gewaschen. Als Referenzzellen wurden leere Zellen, die nur aktiviert und deaktiviert wurden, und mit NeutrAvidin® belegte Zellen eingerichtet. Ein Vergleich der damit erhaltenen K_D -Werte zeigte keine Unterschiede. Sie waren zwischen den verschiedenen Chips größer. Jedoch war zu beobachten, dass zur Kontrolle während der Messreihe gemachte Pufferinjektionen mit NA als Referenz keine konstanten Antworten zeigten. Sie wurden mit zunehmender Messdauer immer negativer. Die Verwendung einer leeren Referenzzelle erwies sich daher als besser. Die Langmuir-Gleichung ließ sich mit Korrelationskoeffizienten von über 0,98 an die SPR-Antworten anpassen. Für UDP-Gal in Gegenwart von Mn^{2+} konnte ein K_D -Wert von 47 μM ermittelt werden, in Gegenwart von Mg^{2+} ein Wert von durchschnittlich 1,7 mM. Hiermit zeigte sich erneut, dass die Affinität von UDP-Gal in Anwesenheit von Mn^{2+} wesentlich größer ist als mit Mg^{2+} . Die Vermutung zu Beginn des Abschnitts zu der Ursache der widersprüchlichen Ergebnisse, konnte somit bestätigt werden. Sie liegt in der Präparation der GTB und nicht an der Immobilisierungsmethode. Es ist ebenso möglich mit immobilisierter GTB mikromolare Bindungen zu erhalten.

Die SPR-Spektroskopie bietet auch die Möglichkeit, Bindungskinetiken über die Ermittlung von on- und off-Raten zu untersuchen. Diese Auswertung ist mit den hier erhaltenen rechteckigen Sensorgrammen (Abbildung 3.12, Abbildung 3.15) nicht möglich und nach Kenntnis der Dissoziationsraten auch nicht zu erwarten gewesen. Sie liegen bei etwa 10 Hz für den Donor und bei 100 Hz für den Akzeptor [81]. Vom Hersteller wird ein deutlich niedrigerer Messbereich von $0,1\text{--}5 \cdot 10^{-6}$ Hz angegeben. Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Ermittlung von K_D -Werten mittels SPR-Spektroskopie unter den hier verwendeten Bedingungen gut funktioniert hat und in dieser Weise auch für weitere Studien verwendet werden kann.

Als dritte Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten wurde die STD-NMR-Spektroskopie verwendet (2.9.1). Da es nicht möglich ist, Mn^{2+} in millimolaren Konzentrationen einzusetzen, wurden die Messungen nur mit Mg^{2+} als bivalentem Kation durchgeführt. Es wurden K_D -Werte von UDP-Gal, UDP-Glc und den Fragmenten UDP, UMP und Uridin mit der GTB bestimmt (3.2.4). Hierfür wurden STD-NMR-Spektren mit unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen aufgenommen und die daraus abgelesenen und anschließend normierten STD-Effekte gegen die Konzentration aufgetragen. Durch Anpassung der Langmuir-Bindungs-gleichung wurden die K_D -Werte erhalten. Bei der Auswertung der Spektren konnte festgestellt werden, dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis vor allem bei den geringen Konzentrationen schlecht war. Daher konnten nicht immer alle eingesetzten Konzentrationen berücksichtigt werden. Eine längere Messzeit wäre hier von Vorteil, jedoch nicht umsetzbar gewesen. Für eine Verdopplung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses hätten die Proben viermal so lang gemessen werden müssen, was eine Erhöhung von zwei auf acht Stunden bedeutet hätte. Ausgewertet werden konnten jeweils nur bestimmte Signale, aber immer das überlappende Signal des H1 der Ribose und des H5 des Uracils. Ein Vergleich mit den veröffentlichten Bindungsepitopen zeigt übereinstimmend, dass diese Protonen auch dort die meiste Sättigung erfahren haben und somit nah an Protonen der Proteinoberfläche lagen [87]. Einige Signale waren aufgrund von Signalüberlappungen nicht auswertbar, andere waren in vielen Spektren nicht sichtbar. So stand nur eine begrenzte Anzahl für die Bestimmung des K_D -Werts zur Verfügung. Es wurden Bindungskonstanten im hohen mikromolaren bis niedrigen millimolaren Bereich erhalten. Uri-

din und UMP zeigten mit 2,5 mM die niedrigste Affinität. Die zweite Phosphatgruppe erhöhte die Affinität von UDP, UDP-Gal und UDP-Glc. Sie ist an der Koordination des Mg^{2+} beteiligt. Wie in der Literatur beschrieben, führten auch hier ein zusätzliches Gal oder Glc nicht zu einer großen Veränderung der Affinität (1.3.3) [87]. Desweiteren zeigt ein Vergleich mit den durch kompetitive STD-NMR-Experimente erhaltenen K_D -Werten von der Reihenfolge her ein weitestgehend übereinstimmendes Ergebnis. Die Referenz, die damals für die Berechnung der K_D -Werte herangezogen wurde, war - wie nun bekannt - nicht korrekt. Allerdings war der K_M der Transferreaktion der einzig bekannte Wert.

Die Bestimmung von Bindungsaffinitäten mittels STD-NMR-Spektroskopie liefert nur einen Näherungswert. Dies ist unter anderem daran zu sehen, dass die Auswertung der unterschiedlichen Protonen auch unterschiedliche K_D -Werte ergab (Abbildung A 8 - Abbildung A 12). Angulo et al. zeigten, dass die Größe des K_D -Werts auch abhängig von der Sättigungszeit sein kann [132]. Ist der K_D -Wert eines kompetitiven Liganden bekannt, kann ein kompetitives Titrationsexperiment hier Abhilfe schaffen.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit aus der Anwendung von drei verschiedenen Methoden, der ITC, der SPR-Spektroskopie und der STD-NMR-Spektroskopie, Bindungskonstanten bezogen. Mit allen Methoden konnten aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden. Es wurden jedoch auch die Vor- und Nachteile deutlich. Die ITC gilt nach wie vor als Goldstandard für die Bestimmung von Bindungskonstanten und lieferte für diese Arbeit reproduzierbare Ergebnisse. Sie bietet den großen Vorteil, dass gleichzeitig auch Informationen über Bindungsenthalpie und -entropie gewonnen werden können. Außerdem kann ohne Markierung und in Lösung gearbeitet werden. Eine Messung dauerte ca. 2,5 h und die anschließende Datenauswertung geht einigermaßen zügig. Die Nachteile bei der Untersuchung der GTB wurden jedoch auch klar. Insgesamt war der Bedarf an GTB und Ligand sehr hoch. Zudem waren Messungen mit Donorsubstratfragmenten in Gegenwart von Mg^{2+} aufgrund der schwachen Bindungen nicht möglich. Hierfür wären noch wesentlich höhere, mit der GTB nicht erreichbare, Konzentrationen notwendig gewesen oder aber ein stärker bindender kompetitiver Ligand, den es bisher aber nicht gibt.

Für SPR-Spektroskopie sind wesentlich geringere Probenmengen notwendig, insbesondere von dem immobilisierten Bindungspartner. Die Experimente können automatisiert durchgeführt werden, sodass bei einem funktionierenden Versuchsaufbau viele Analyten vermessen werden können. Der Zeitaufwand am Gerät ist ab diesem Punkt gering, eine komplette Bindungsisotherme kann innerhalb von etwa einer Stunde aufgenommen werden. Allerdings finden die Reaktionen nicht frei in Lösung, sondern an einer Oberfläche statt. Hinzu kommt, dass unspezifische Wechselwirkungen mit der Chipoberfläche auftreten und die Wahl der Referenzzelle gut getroffen sein muss. Es war möglich, K_D -Werte für die GTB sowohl im mikromolaren Bereich (mit Mn^{2+}) als auch im millimolaren Bereich (mit Mg^{2+}) zu bestimmen.

Mit STD-NMR-Spektroskopie können nur Messungen in Gegenwart von Mg^{2+} durchgeführt werden. Sie bietet allerdings den Vorteil, dass auch die Bindung niedrig affiner Liganden untersucht werden kann. Die Experimente können in Lösung und ohne Markierung der Bindungspartner durchgeführt werden, erfordern jedoch eine aufwändigere Probenpräparation, da in deuteriertem Puffer gemessen werden muss. Der Verbrauch an Probe ist ähnlich zu SPR recht

gering. Je nachdem, ob für jede Konzentration eine Probe angesetzt oder eine Titration durchgeführt werden soll, etwas mehr oder weniger. Wurden zuvor alle Proben angesetzt, so ist eine automatisierte Messung mit Probenwechsler möglich. Die Messzeit ist insgesamt sehr lang. Für einen Messpunkt wird mindestens eine Stunde benötigt.

Die K_D -Werte sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst und den aus der Literatur bekannten, bzw. ebenfalls im Institut für Chemie ermittelten Konstanten gegenübergestellt. Die Messungen fanden nicht immer unter gleichen Bedingungen statt. Abbildung 4.4 gibt eine Übersicht über die Verteilung der bisher erhobenen Daten. Aus dieser ist noch einmal gut der Einfluss des bivalenten Kations auf die Donorbindung bzw. Donoranalogsbindung sichtbar. Die Bindung des Akzeptors scheint hingegen nicht ausschlaggebend beeinflusst zu werden. Dies ist nicht verwunderlich, da die Phosphatreste des Donors die Bindungen mit dem Metallion eingehen. Hier wird Mn^{2+} klar bevorzugt. Die niedrigsten K_D -Werte wurden in Anwesenheit beider Substrate erhalten. Dies wurde bereits oben erläutert. Uridin, UMP und UDP werden in Gegenwart von Mg^{2+} mit steigender Affinität gebunden. Es kommen Einheiten hinzu, die die Bindung maßgeblich mitbestimmen. Ebenfalls gut aus dem Diagramm ersichtlich ist, dass die Galactose- bzw. Glucoseeinheit, werden sie ohne Akzeptor gebunden, keinen weiteren Beitrag zur Affinität leisten. Der Vergleich der unterschiedlichen Techniken miteinander zeigt insgesamt sehr gute Übereinstimmungen. Der einzig größere Unterschied liegt in einem Faktor von 10 zwischen der mit SPR und MS ermittelten Dissoziationskonstante von UDP in Gegenwart von Mn^{2+} . Alle anderen bewegen sich unterhalb eines Faktors von 2,8.

Abschließend kann also festgehalten werden, dass alle vier Methoden für die Untersuchung der GTB zur Verfügung stehen und übereinstimmende Ergebnisse liefern. Auf dieser Grundlage ist es möglich, weitere Studien zur Ligandenbindung durchzuführen. Auch für die Entwicklung von Inhibitoren ist die Verfügbarkeit geeigneter Testsysteme von großer Bedeutung.

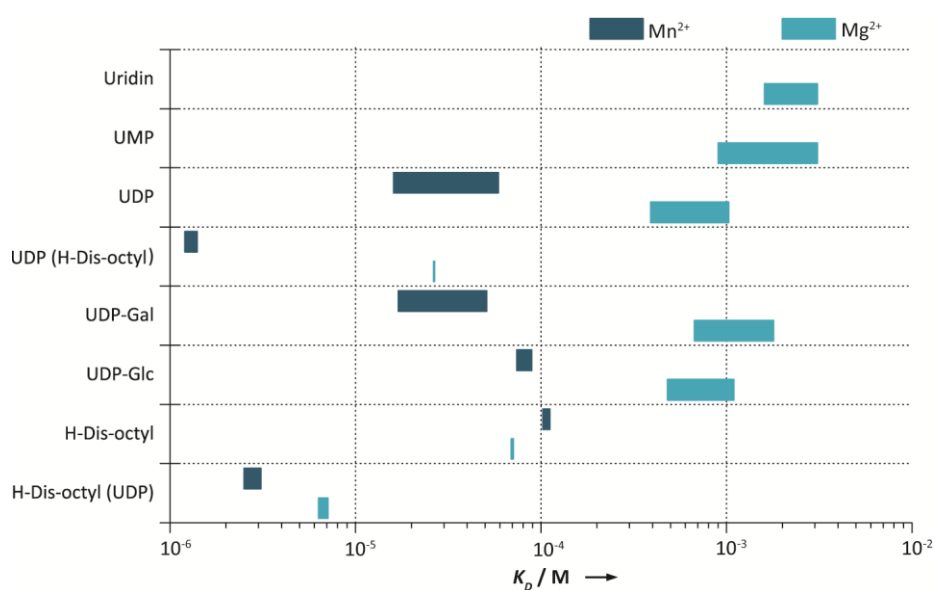


Abbildung 4.4: Übersicht über die mit ITC, SPR und STD-NMR bei 25 °C bestimmten Dissoziationskonstanten der GTB. Gezeigt sind K_D -Bereiche $\pm$ eine Standardabweichung bzw. einen Standardfehler. Der pH betrug 6,7-7.

Tabelle 4.1: Dissoziationskonstanten K_D für die Interaktion zwischen GTB und Substratanaloga bzw. Substratfragmenten, bestimmt mit ITC, SPR und STD-NMR bei 25 °C. Messungen wurden in Anwesenheit von Mn^{2+} oder Mg^{2+} und pH 6,7 oder 7 durchgeführt. Zum Vergleich sind K_D -Werte aufgelistet, die mit MS bei 24 °C und pH 7 bestimmt wurden [67].

Substrat	M^{2+}	ITC	SPR ^a	STD-NMR ^a	MS ^{b,c}
UDP	Mn^{2+}	$17 \pm 1 \mu M^{a,e}$ $20 \pm 0,7 \mu M^b$	$55 \pm 4 \mu M^d$		$5,3 \pm 1,1 \mu M$
UDP (H-Dis-octyl) ^g	Mn^{2+}	$1,2 \pm 0,06 \mu M^{a,e}$ $1,4 \pm 0,05 \mu M^{b,e}$			
UDP-Gal	Mn^{2+}	$18 \pm 1 \mu M^{b,e,j}$	$47 \pm 4 \mu M$		$50 \pm 18 \mu M$
UDP-6-biotinyl-Gal	Mn^{2+}		$1,7 \pm 0,1 \mu M$		
UDP-6-biotinyl-Gal (3DD) ^g	Mn^{2+}		$0,85 \pm 0,11 \mu M$		
UDP-Glc	Mn^{2+}	$77 \pm 3 \mu M^{b,e,h}$	$84 \pm 5 \mu M^d$		$83 \pm 21 \mu M$
H-Dis-octyl	Mn^{2+}	$0,10 \pm 0,01 mM^{a,e,h}$ $0,11 \pm 0,004 mM^{b,e,h}$			$59 \pm 10 \mu M$
H-Dis-octyl (UDP) ^g	Mn^{2+}	$2,6 \pm 0,3 \mu M^{a,e}$ $3,0 \pm 0,05 \mu M^{b,e}$			$6,7 \pm 1,3 \mu M$
Uridin	Mg^{2+}		$1,7 \pm 0,1 mM^d$	$2,5 \pm 0,6 mM^e$	
UMP	Mg^{2+}		$1,0 \pm 0,1 mM^d$	$2,5 \pm 0,6 mM^e$	
UDP	Mg^{2+}	- ^f	$0,71 \pm 0,09 mM^d$	$0,43 \pm 0,04 mM^e$ $0,91 \pm 0,12 mM^e$	
UDP (H-Dis-octyl) ^g	Mg^{2+}	$27 \pm 0,2 \mu M^{a,e}$			
UDP-Gal	Mg^{2+}		$1,7 \pm 0,2 mM$	$0,72 \pm 0,05 mM^e$	
UDP-Glc	Mg^{2+}		$1,0 \pm 0,1 mM^d$	$0,53 \pm 0,05 mM^e$	
H-Dis-octyl	Mg^{2+}	$70 \pm 1 \mu M^{a,h}$	$67 \pm 1 \mu M^k$	$93 \pm 16 \mu M^{e,l}$	
H-Dis-octyl (UDP) ^g	Mg^{2+}	$6,7 \pm 0,4 \mu M^a$			

^a Messungen bei pH 6,7; ^b Messungen bei pH 7; ^c Werte aus [67]; ^d Wert von L. L. Grimm (Institut für Chemie), bestimmt mit analogem Versuchsaufbau; ^e Einfachbestimmung; ^f Messung wegen starker Präzipitationen bei benötigten sehr hohen GTB-Konzentrationen nicht möglich; ^g Sättigung der entsprechenden Bindungsstellen der GTB lag bei > 95 %; ^h nur oberer Teil der Bindungskurve; ^j keine reine Bindungskonstante, da UDP-Gal während der Messung auch hydrolysiert wurde; ^k Wert von Dr. E. Munoz; ^l Wert von A. Gohlke ohne Mg^{2+} , bei 301 K [89]

4.4 Protein-NMR-Spektroskopie

Bei der Diskussion der Ligandenbindung und der damit in Zusammenhang stehenden konformationellen Veränderungen im Enzym ist noch einmal deutlich geworden, welche reichhaltigen Informationen die Aufklärung der Konformationsdynamik von GTs liefern würde. Die NMR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit, dynamische Prozesse über eine große Zeitskala von Piko- bis zu Sekunden in atomarer Auflösung zu erfassen [95]. Zusätzlich können Protein-Ligand-Wechselwirkungen von der Proteinseite aus untersucht werden [152,153]. Dies könnte in Hinblick auf den katalytischen Reaktionsmechanismus einmal interessante Aspekte liefern. Für die NMR-spektroskopische Untersuchung von Proteinen ist eine Isotopenmarkierung sowie die Zuordnung der Signale eines Spektrums zu den entsprechenden Aminosäureresten erforder-

derlich.

Um auch die GTB für NMR-spektroskopische Studien zugänglich zu machen, wurden zunächst isotopenmarkierte Proben hergestellt. Diese umfassten $u\text{-}^{15}\text{N}$ -, $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ - und $u\text{-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -GTB sowie $u\text{-}^2\text{H}$ - und selektiv mit $\alpha\text{-}^{15}\text{N}$ -Lys-, ^{15}N -Met-, ^{15}N -Val- oder $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -Val-markierte GTB. Die Synthese der isotopenmarkierten GTB fand in Minimalmedium statt, sodass wie erwartet die Ausbeuten nicht so hoch waren, wie in Vollmedium (3.3.1). Sie lagen im Gegensatz zu den durchschnittlich 95 mg pro Liter Kultur zwischen 28 mg und 76 mg pro Liter Kultur. Angesetzt wurden aufgrund begrenzter Ressourcen allerdings nur 250 ml oder 500 ml. Dies reichte mindestens für die Herstellung einer NMR-Probe aus, für die etwa 5 mg GTB benötigt wird. Die höchste Ausbeute wurde mit einem Medium erzielt, dem kommerziell erhältliches, isotopenmarkiertes Medium zugesetzt wurde. Dieses Medium ist reichhaltiger und trug damit zu einer besseren Expression bei. Die geringste Ausbeute wurde mit dem nährstoffarmsten Medium erzielt. Es beinhaltete kein Glycerin, sondern nur $u\text{-}^2\text{H},^{13}\text{C}$ -Glucose als Kohlenstoffquelle. Die Qualitätskontrollen der Präparationen zeigten, dass die GTB gut gereinigt wurde und aktiv war. Wie unter 4.1 bereits festgestellt, streuten die spezifischen Aktivitäten mit 7-19 U/mg stark. Der Deuterierungsgrad der uniform ^2H -markierten GTB-Präparationen lag, grob aus den Protonenspektren abgeschätzt, bei etwa 80 % (± 10 %). Dieser Anteil konnte erwartet werden. Erst durch die Verwendung von deuterierter Glucose, soll der Deuterierungsgrad auf 100 % gesteigert werden können [139]. Daher ist es verwunderlich, dass genau bei der mit $u\text{-}^2\text{H}$ -Glucose synthetisierten Probe, der Deuterierungsgrad anscheinend geringer ausfiel. Eine Ursache hierfür ist nicht bekannt. Bei dem verwendeten Protokoll wurden die Zellen zunächst in Vollmedium angezogen und nach Waschen in Minimalmedium überführt [97]. Hierdurch könnten unmarkierte Substanzen übertragen worden sein. Eine andere Möglichkeit wäre, die Zellen vor der Induktion bereits auf Minimalmedium anzuziehen. Dies hat jedoch den Nachteil, dass ein großes Volumen an markiertem Medium benötigt wird und die Zellen extrem schlecht wachsen. Damit sinkt auch die Ausbeute. Allerdings ist aus der Literatur bekannt, dass mit der Methode nach Marley et al. ein ähnlicher Deuterierungsgrad erreicht werden kann wie durch die Synthese ausschließlich in Minimalmedium [137]. Da die übrigen GTB-Präparationen mit einem guten Deuterierungsgrad hergestellt werden konnten, sollte von dieser Vorgehensweise nicht abgewichen werden. Für höhere Ausbeuten könnte eine generelle Verwendung bzw. der Zusatz von reichhaltigem, isotopenmarkierten Medium überlegt werden.

Die selektive ^{15}N -Markierung der Aminosäuren war nur mit Lys erfolgreich. Aus den NMR-Spektren war abzulesen, dass der Einsatz von Met und Val zu zahlreichen Kreuzmarkierungen führte. Während dieser Effekt für Val bekannt ist, war er für Met nicht unbedingt zu erwarten [138]. Met steht am Ende des Aminosäurestoffwechsels. Es wird später noch darauf eingegangen, dass selektiv markierte GTB-Proben für die Signalzuordnung äußerst wichtig sind. Daher ist es von Bedeutung, Bedingungen zu schaffen unter denen keine Kreuzmarkierungen auftreten. Hierfür gibt es zahlreiche Strategien. Unter anderem können *E. coli* Stämme verwendet werden, die defizient sind für Enzyme, die die zu markierende Aminosäure für den Aufbau weiterer Aminosäuren verwenden oder auxotrophe Stämme. Es sind zahlreiche *E. coli* Mutanten erhältlich [138]. Desweiteren besteht die Möglichkeit, alle anderen Aminosäuren unmarkiert in hohem Maße dem Medium zuzugeben [154]. Eine Deuterierung ist hierbei ausgeschlossen, weil

die kommerzielle Verfügbarkeit deuterierter Aminosäuren begrenzt ist und wenn möglich, extrem kostenintensiv. Fiaux et al. umgingen dieses Problem, indem sie angereichertes $u\text{-}^2\text{H}$ -markiertes Medium verwendeten. Ein ähnliches Medium wurde bereits für die Synthese von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB eingesetzt (s. o.). Die ^{15}N -markierte Aminosäure bzw. $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -markierte Aminosäure wird zusätzlich zu dem Medium gegeben, wobei die Dosierung kritisch sein soll [137]. An dieser Stelle ist anzumerken, dass eine Deuterierung der ausgewählten Aminosäure, hier ^{15}N -Val, keinen entscheidenden Effekt auf die Qualität des Spektrums hatte und somit nicht zwingend erforderlich ist. Eine weitere Strategie für die Synthese von selektiv isotoopenmarkierten Proteinen ist die zellfreie Expression [155]. Sie besitzt den großen Vorteil, dass nur wenig Substanz benötigt wird und eine Kreuzmarkierung nicht auftreten kann. Aber auch hier ist eine Deuterierung wahrscheinlich nur schwer möglich.

Vor der Aufnahme von Spektren für die Signalzuordnung wurden einige wichtige experimentelle Bedingungen getestet und festgelegt (3.3.2). Dies erfolgte über die Aufnahme von $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB und $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB. Die Experimente wurden bei Temperaturen zwischen 298 K und 323 K in unterschiedlichen Puffern und unterschiedlichen NMR-Röhrchen durchgeführt. $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB lieferte erst bei einer Temperatur von 323 K ein einigermaßen aufgelöstes Spektrum. Die Signalanzahl betrug etwas weniger als die Hälfte der erwarteten Anzahl. Im Vergleich dazu konnten mit der $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB über den gesamten untersuchten Temperaturbereich gute Spektren mit einer größeren Anzahl an Signalen erhalten werden. Sowohl der Temperatureffekt als auch der Einfluss der Deuterierung ist auf Relaxationseigenschaften zurückzuführen. Große Moleküle mit langen Korrelationszeiten haben eine effiziente transversale Relaxation (2.9.1). Daraus folgen breite Signale. Hieran sind maßgeblich Protonen beteiligt, weshalb eine Deuterierung zu langsamerer transversaler Relaxation und damit zu schmalen Signalen führt. Eine Temperaturerhöhung bewirkt eine Reduktion der Korrelationszeit, wodurch ebenfalls wieder schmalere Signale hervorgerufen werden. Für den Einsatz bei Tripelresonanzexperimenten ist eine deuterierte Probe aus mehreren Gründen vorzuziehen. Die Möglichkeit bei einer niedrigeren Temperatur messen zu können ist positiv für die Stabilität der ohnehin hoch konzentrierten Probe. GTB neigt zu verstärkter Aggregation je höher die Temperaturen sind. In Hinblick auf die langen Experimente ist dies ein wichtiger Punkt. Zudem waren in den Spektren der $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB auch bei 323 K bei weitem nicht alle Signale zu sehen, die Sensitivität demnach gering. Proteine in der Größenordnung der GTB werden mit der TROSY-Technik aufgenommen. Auch diese hat einen größeren Effekt bei deuterierten Proteinen [121]. Neben der Ermittlung geeigneter Messtemperaturen wurde gezeigt, dass Experimente in 25 mM Phosphatpuffer ohne NaCl und in 50 mM Bis-Tris-Puffer mit 100 mM NaCl vergleichbare Ergebnisse liefern. Der gewählte Phosphatpuffer beinhaltet weniger Salz und bis auf das ohnehin vorhandene H_2O keine NMR-aktiven Kerne. Er erzeugt demnach im Gegensatz zu nicht deuteriertem Bis-Tris auch kein Signal im 1D Protonenspektrum. Ein hoher Salzgehalt senkt die Sensitivität der verwendeten Kryoprobenköpfe und wirkt sich damit negativ auf das Spektrum aus [140,141]. Wie erwartet führte der Einsatz von 5 mm Shigemi-Röhrchen zu einem Intensitätsgewinn, da sich im aktiven Volumen der Probe mehr Moleküle befinden. Sie haben gegenüber herkömmlichen 5 mm NMR-Röhrchen den Vorteil, dass ein geringeres Probenvolumen benötigt wird.

Nach diesen Erkenntnissen wurde eine $u\text{-}^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markierte GTB-Probe in Phosphatpuffer und 5 mm Shigemi-Röhrchen für die Aufnahme von Spektren für die Signalzuordnung verwendet (3.3.3). Die Grundlage für eine Signalzuordnung bildet das $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -(TROSY)-HSQC-Spektrum. Die Signale dieses Spektrums sollen den Aminosäureresten des Proteins mit Hilfe weiterer Experimente zugeordnet werden. Ein entsprechendes Spektrum, aufgenommen bei 950 MHz, zeigte die größte Anzahl an Signalen aller bisher aufgenommenen GTB-Spektren. Identifiziert wurden 308 von erwarteten 281 Signalen des Rückgrats und weiteren Signalen der Seitenketten von Arg, Asn, Gln, His, Lys und Trp. Zudem sind trotz des sehr hohen Feldes von 950 MHz einige Regionen nicht richtig aufgelöst. Hiermit werden auch die Schwierigkeiten sichtbar, die die NMR-spektroskopische Untersuchung eines solch großen Proteins mit sich bringt. Höhere Magnetfeldstärken resultieren in der Regel in höherer Sensitivität und besserer Auflösung. Ein 950 MHz NMR-Spektrometer besitzt jedoch schon die zweitgrößte Feldstärke, die momentan möglich ist. Es gibt weltweit bisher nur sehr wenige NMR-Spektrometer mit einer Protonenfrequenz von 1 GHz. Zumal ist es wahrscheinlich, dass die Signale so stark überlagern, dass sie auch mit höheren Feldstärken nicht anständig aufgelöst werden können.

Um die Signalüberlappungen zu reduzieren und sequentielle Verknüpfungen zwischen den Atomen des Proteinrückgrats zu erhalten, wurden dreidimensionale Tripelresonanzexperimente durchgeführt (2.9.1, 3.3.3). Je nach Experiment waren Sensitivität und damit Anzahl der Signale im Spektrum unterschiedlich. Das HNCO als sensitivstes Experiment zeigte mit 222 Signalen die verhältnismäßig größte Anzahl. Das für die sequentielle Zuordnung notwendige komplementäre Spektrum, das HN(CA)CO-Spektrum beinhaltet hingegen nur 91 Signale von vermutlich 49 Amididen. Jedes $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ -Paar sollte mit zwei COs korreliert sein und damit zwei Signale ergeben. Das für die Identifikation der Aminosäuren wichtige HNCACB enthält mit 105 ebenfalls wenige Resonanzen. Trotzdem konnten in den Spektren einige Korrelationen identifiziert werden. Jedoch ist es bei den zum Teil sehr nah beieinander liegenden Signalen nicht einfach, eindeutige Zuordnungen zu einem vorangehenden Rest zu treffen. Aus diesen Ergebnissen können zwei grundlegende Feststellungen gemacht werden: Es ist zum einen nicht möglich, eine Zuordnung allein auf Basis der Tripelresonanzspektren zu machen. Sie besitzen jedoch eine Qualität, die es ermöglicht, in Kombination mit anderen Strategien wertvolle zusätzliche Informationen zu der Abfolge der Aminosäurereste zu liefern. An dieser Stelle sei noch einmal erwähnt, dass es nicht das Ziel ist, die Signale der GTB vollständig zuzuordnen und eine Struktur zu bestimmen. Es ist notwendig, entscheidende Bereiche zuzuordnen, um Dynamikstudien und Untersuchungen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen durchführen zu können.

Es gibt zahlreiche weitere Möglichkeiten, die Signalzuordnung zu unterstützen. Hierzu gehört auch das schon angesprochene selektive Markieren von Aminosäureresten. Das Problem der Kreuzmarkierung und Methoden diese zu unterbinden wurden oben angeführt. Es konnte bereits eine selektiv $\alpha\text{-}^{15}\text{N}$ -Lys-markierte GTB erfolgreich hergestellt werden. Von den dreizehn Signalen wurden sechs Signale eindeutig Signalen der uniform markierten GTB zugeordnet. Auf die jeweilige Position kann hiermit allerdings nicht geschlossen werden. Es gibt mittlerweile viele verschiedene Strategien, durch selektive Markierung von bestimmten Aminosäureresten eine Signalzuordnung zu erhalten. Erweitert wurden diese durch die Einführung der zellfreien Expression [155]. Neben der Markierung von nur einer Aminosäure können z. B. durch gezielte Kombination mehrerer Aminosäuren sequentielle Zuordnungen gemacht werden [156].

Für größere Proteine ist ein Markierungsschema bereits erfolgreich angewendet worden, bei dem die Methylgruppen von Leu, Val und Ile protoniert sind, eventuell auch ^{13}C markiert, bei einem ansonsten uniform ^2H , ^{13}C , ^{15}N -markierten Protein [157-159].

Eine weitere Erleichterung der Signalzuordnung kann durch den Einsatz von paramagnetischen Relaxationsverstärkern kommen [142,160]. Durch die Verwendung von paramagnetischen Ionen, wie Mn^{2+} oder Lanthanoiden, können mit Hilfe der Struktur Signalzuordnungen vorgenommen werden. Hierbei macht man sich zunutze, dass der Effekt abstandsabhängig ist. Da die GTB eine Metallionen-abhängige GT ist, liegt nahe, das auch für die Signalzuordnung zu nutzen. Eine zusätzliche Markierung mit einem Relaxationsverstärker ist nicht notwendig. In einem ersten Versuch konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass die Zugabe von Mn^{2+} in Kombination mit UDP einen Verlust von einigen Signalen bewirkt. Diese gehören wahrscheinlich zu Aminosäuren, die in der Nähe des aktiven Zentrums liegen und damit auch in der Nähe zum Mn^{2+} . Die Reichweite des Mn^{2+} kann bis zu 35 Å groß sein, die Abstandsabhängigkeit ist r^{-6} . Eine quantitative Auswertung des Effekts in Kombination mit selektiv markierter GTB könnte entscheidend zu einer erfolgreichen Signalzuordnung beitragen.

An dieser Stelle kann zusammengefasst werden, dass Tripelresonanzspektren mit $u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N -GTB aufgenommen werden konnten, eine Signalzuordnung allein mit diesen Spektren jedoch nicht möglich war. Daher wurden zwei weitere Strategien ausprobiert, die sich beide als vielversprechende Ansätze bezeichnen lassen. Neben diesen könnten weitere Methoden zum Einsatz kommen. Unter anderem können mit H/D-Austauschexperimenten Amidprotonen über ihre Austauschraten mit dem Lösungsmittel identifiziert werden [161]. Protonen, die z. B. Wasserstoffbrücken ausbilden, tauschen nur sehr langsam aus, Protonen, die sich an der Oberfläche des Proteins befinden, schnell. Neben den probenbezogenen Methoden ist es auch möglich, über weitere NMR-Techniken zusätzliche Informationen zu erhalten. Mit einer $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -markierten GTB-Probe könnten zum Beispiel 4D HMQC-NOESY-HMQC (oder TROSY)-Spektren aufgenommen werden, die die NHs des eigenen Aminosäurerests mit denen der benachbarten korrelieren. Es gibt demnach zahlreiche Möglichkeiten, eine Signalzuordnung der 69 kDa großen GTB zu erreichen. Allen Strategien ist gemein, dass sie sowohl was die Präparation der Proben als auch die Aufnahme und Auswertung der Spektren anbelangt, sehr zeitintensiv sind und in neuen Projekten bearbeitet werden müssen.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der Substratbindung an die GTB positive kooperative Effekte auftreten. Diese spiegeln sich in den Michaelis-Konstanten der enzymatischen Hydrolyse des Donorsubstrats in An- und Abwesenheit eines Akzeptoranalogs wider. Die Resultate sind konsistent mit Konformationsänderungen, die von Alfaro et al. in Kristallstrukturen der humanen Blutgruppen Glycosyltransferasen nach Substratbindung beobachtet wurden. Die Substratbindung erfolgt mit negativen (günstigen) Enthalpieänderungen und positiven (ungünstigen) Entropieänderungen. Diese Art von Veränderungen könnten auf die Ausbildung einer rigideren und kompakteren Proteinstruktur bei der Ligandenbindung zurückzuführen sein. Zusammengefasst lässt das auf einen Mechanismus schließen, mit dem

Glycosyltransferasen eine ganz gezielte Auswahl der Substrate treffen können. Es wäre nun interessant, Kenntnisse über die Dynamik der GTB im freien und gebundenen Zustand zu erlangen. Hierfür stehen grundsätzlich verschiedene Methoden zur Verfügung, unter anderem die Fluoreszenzspektroskopie [162,163] und die NMR-Spektroskopie [95,158], in begrenztem Maße aber zum Beispiel auch spezielle Anwendungen der Röntgenbeugung [164] und Massenspektrometrie [165]. Erste Versuche mittels (Einzelmolekül-)Fluoreszenzspektroskopie Bewegungen der GTB zu untersuchen, wurden bereits durchgeführt [166]. Ein Ziel ist, die Bewegungen der flexiblen Schleifen näher zu charakterisieren. Die NMR-Spektroskopie bietet den Vorteil, dass dynamische Prozesse auch in atomarer Auflösung erfasst werden können. Sie bietet die Möglichkeit, in Lösung und unter Gleichgewichtsbedingungen Bewegungen über eine Zeitskala von Pikosekunden bis zu Sekunden zu untersuchen [167,168]. Der für Konformationsänderungen von Proteinen und enzymatische Katalyse relevante Bereich liegt meist bei Mikrosekunden bis Millisekunden und es ist aufgrund der vorliegenden kinetischen Daten anzunehmen, dass auch die globaleren Konformationsänderungen der GTB in diesem Zeitbereich liegen. Für die Erfassung dieser dynamischen Prozesse finden beispielsweise sogenannte Relaxationsdispersionsmessungen Anwendung [169,170]. Nach einer erfolgten partiellen Signalzuordnung der GTB wäre der Einsatz dieser Experimente für die ersten Dynamikuntersuchungen sinnvoll.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Bindungskonstanten der GTB mittels isothermer Titrationskalorimetrie, Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie und STD-NMR-Spektroskopie bestimmt. Neben den kooperativen Effekten konnte demonstriert werden, dass die Donorbindung in Gegenwart von Mn^{2+} wesentlich affiner ist als in Gegenwart von Mg^{2+} . Die Dissoziationskonstanten unterscheiden sich in mindestens einer Größenordnung. Dieser Effekt tritt auch beim Substratumsatz auf. Bei der enzymatischen Hydrolyse des Donorsubstrats wird durch Austausch des bivalenten Kations nur ein Einfluss auf die Michaelis-Konstante beobachtet. Die Bindung des Akzeptorsubstrats scheint davon nicht beeinflusst zu sein. Es bildet keine direkten Interaktionen mit dem bivalenten Kation aus. Die Bindungsexperimente zeigten, dass alle verwendeten Methoden übereinstimmende Ergebnisse liefern. Innerhalb der ermittelten Rahmenbedingungen stehen sie nun weiteren Studien zur Liganden- und Inhibitorbindung der humanen Blutgruppen Glycosyltransferasen sowie anderer Glycosyltransferasen zur Verfügung.

Der dritte Teil der Arbeit widmete sich der Isotopenmarkierung der GTB sowie ersten NMR-spektroskopischen Untersuchungen. Uniform ^{15}N - und uniform ^2H , ^{15}N -markierte GTB konnten erfolgreich hergestellt werden. Mit diesen Proben wurde gezeigt, dass eine Deuterierung der GTB in niedrigeren möglichen Messtemperaturen (298 K) sowie höherer Auflösung und Sensitivität resultiert. Experimente mit $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB können jedoch in begrenztem Rahmen bei 323 K durchgeführt werden. Als Puffersubstanzen erwiesen sich sowohl Phosphatpuffer als auch Bis-Tris-Puffer als verwendbar. $u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N -GTB wurde ebenfalls erfolgreich, jedoch mit geringerem Deuterierungsgrad, synthetisiert und für Tripelresonanzexperimente eingesetzt. Das GTB-Dimer ist mit 69 kDa für die NMR-Spektroskopie ein großes Protein. Mit den insgesamt fünf aufgenommenen Spektren war es daher trotz des Einsatzes sehr hoher Feldstärken alleinig nicht möglich, eine Zuordnung der Signale zu den Aminosäureresten vorzunehmen, wie es

normalerweise bei kleineren Proteinen unter 20-30 kDa der Fall ist. Die Spektren beinhalten jedoch wertvolle Informationen, mit denen in Kombination mit weiteren Experimenten, Signalzuordnungen erfolgen können. Strategien für weiterführende Experimente wurden diskutiert. Unter anderem die selektive Markierung von Aminosäureresten, die mit Lysin, Methionin und Valin vorgenommen wurde. Der Einsatz von Methionin und Valin sorgte für Kreuzmarkierungen, sodass nur das Spektrum der α - ^{15}N -Lys-GTB zur Unterstützung der Signalzuordnung herangezogen werden kann. Da über selektiv markierte GTB viele Informationen bezogen werden können, wurden mögliche weitere Markierungsstrategien besprochen. Die Zugabe eines paramagnetischen Ions, des Mn^{2+} , bewirkte aufgrund seiner relaxationsbeschleunigenden Eigenschaft die Auslöschung zahlreicher Signale. Quantitative Auswertungen dieses Einflusses würden zusammen mit der Kristallstruktur ebenfalls Informationen für die Signalzuordnung liefern. Eine zumindest partielle Zuordnung der GTB-Signale wird die Möglichkeit eröffnen, Untersuchungen sowohl zur Dynamik (s. o.) als auch zum Mechanismus der GTB durchführen zu können und damit neue Erkenntnisse zu der Funktionsweise der metallionenabhängigen konfigurationserhaltenden GTs liefern. In dieser Arbeit konnte hierfür die Grundlage gelegt werden.

5 Literaturverzeichnis

- [1] A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler (2008). *Essentials of Glycobiology* 2nd edition. CSH Press.
- [2] T. W. Rademacher, R. B. Parekh, R. A. Dwek (1988). GLYCOBIOLOGY. *Annu Rev Biochem*, 57:785-838.
- [3] R. S. Haltiwanger, J. B. Lowe (2004). Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem*, 73:491-537.
- [4] M. M. Fuster, J. D. Esko (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*, 5:526-542.
- [5] A. Varki (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3:97-130.
- [6] K. Ohtsubo, J. D. Marth (2006). Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*, 126:855-867.
- [7] J. C. Paulson, K. J. Colley (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem*, 264:17615-17618.
- [8] J. T. Weadge, M. M. Palcic, T. P. Begley (2007). Chemistry of Glycosyltransferases. In *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- [9] S. Silberstein, R. Gilmore (1996). Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J*, 10:849-858.
- [10] I. Hug, M. F. Feldman Analogies and homologies in lipopolysaccharide and glycoprotein biosynthesis in bacteria. *Glycobiology*, 21:138-151.
- [11] B. L. Cantarel, P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, B. Henrissat (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, 37:D233-238.
- [12] P. M. Coutinho, E. Deleury, G. J. Davies, B. Henrissat (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol*, 328:307-317.
- [13] J. A. Campbell, G. J. Davies, V. Bulone, B. Henrissat (1997). A classification of nucleotide-

- p diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities.
- Biochem J*
- , 326 (Pt 3):929-939.
- [14] Y. Yuan, D. Barrett, Y. Zhang, D. Kahne, P. Sliz, S. Walker (2007). Crystal structure of a peptidoglycan glycosyltransferase suggests a model for processive glycan chain synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:5348-5353.
 - [15] C. Breton, L. Snajdrová, C. Jeanneau, J. Koca, A. Imberty (2006). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*, 16:29R-37R.
 - [16] L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies, S. G. Withers (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem*, 77:521-555.
 - [17] Y. Bourne, B. Henrissat (2001). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr Opin Struct Biol*, 11:593-600.
 - [18] J. Liu, A. Mushegian (2003). Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein Sci*, 12:1418-1431.
 - [19] U. M. Unligil, J. M. Rini (2000). Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol*, 10:510-517.
 - [20] L. J. Alderwick, G. S. Lloyd, H. Ghadbane, J. W. May, A. Bhatt, L. Eggeling, K. Futterer, G. S. Besra (2011). The C-terminal domain of the Arabinosyltransferase *Mycobacterium tuberculosis* EmbC is a lectin-like carbohydrate binding module. *PLoS Pathog*, 7:e1001299.
 - [21] M. Igura, N. Maita, J. Kamishikiryo, M. Yamada, T. Obita, K. Maenaka, D. Kohda (2008). Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase. *EMBO J*, 27:234-243.
 - [22] R. G. Spiro (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12:43R-56R.
 - [23] M. L. Sinnott (1990). Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem Rev*, 90:1171-1202.
 - [24] S. S. Lee, S. Y. Hong, J. C. Errey, A. Izumi, G. J. Davies, B. G. Davis (2011). Mechanistic evidence for a front-side, S(N)i-type reaction in a retaining glycosyltransferase. *Nat Chem Biol*, 7:631-638.
 - [25] D. L. Zechel, S. G. Withers (1999). Glycosidase Mechanisms: Anatomy of a Finely Tuned Catalyst. *Acc Chem Res*, 33:11-18.

- [26] L. N. Gastinel, C. Bignon, A. K. Misra, O. Hindsgaul, J. H. Shaper, D. H. Joziase (2001). Bovine alpha1,3-galactosyltransferase catalytic domain structure and its relationship with ABO histo-blood group and glycosphingolipid glycosyltransferases. *EMBO J*, 20:638-649.
- [27] S. I. Patenaude, N. O. L. Seto, S. N. Borisova, A. Szpacenko, S. L. Marcus, M. M. Palcic, S. V. Evans (2002). The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nat Struct Biol*, 9:685-690.
- [28] N. Soya, Y. Fang, M. M. Palcic, J. S. Klassen (2011). Trapping and characterization of covalent intermediates of mutant retaining glycosyltransferases. *Glycobiology*, 21:547-552.
- [29] A. Monegal, A. Planas (2006). Chemical rescue of alpha3-galactosyltransferase. Implications in the mechanism of retaining glycosyltransferases. *J Am Chem Soc*, 128:16030-16031.
- [30] I. André, I. Tvaroska, J. P. Carver (2003). On the reaction pathways and determination of transition-state structures for retaining alpha-galactosyltransferases. *Carbohydr Res*, 338:865-877.
- [31] L. L. Lairson, C. P. Chiu, H. D. Ly, S. He, W. W. Wakarchuk, N. C. Strynadka, S. G. Withers (2004). Intermediate trapping on a mutant retaining alpha-galactosyltransferase identifies an unexpected aspartate residue. *J Biol Chem*, 279:28339-28344.
- [32] W. A. Cowdrey, E. D. Hughes, C. K. Ingold, S. Masterman, A. D. Scott (1937). 257. Reaction kinetics and the Walden inversion. Part VI. Relation of steric orientation to mechanism in substitutions involving halogen atoms and simple or substituted hydroxyl groups. *J Chem Soc*:1252-1271.
- [33] M. L. Sinnott, W. P. Jencks (1980). Solvolysis of D-glucopyranosyl derivatives in mixtures of ethanol and 2,2,2-trifluoroethanol. *J Am Chem Soc*, 102:2026-2032.
- [34] K. Persson, H. D. Ly, M. Dieckelmann, W. W. Wakarchuk, S. G. Withers, N. C. Strynadka (2001). Crystal structure of the retaining galactosyltransferase LgtC from *Neisseria meningitidis* in complex with donor and acceptor sugar analogs. *Nat Struct Biol*, 8:166-175.
- [35] I. Tvaroska (2004). Molecular modeling insights into the catalytic mechanism of the retaining galactosyltransferase LgtC. *Carbohydr Res*, 339:1007-1014.
- [36] C. Goedl, R. Griessler, A. Schwarz, B. Nidetzky (2006). Structure-function relationships for *Schizophyllum commune* trehalose phosphorylase and their implications for the

- p style="padding-left: 40px;">catalytic mechanism of family GT-4 glycosyltransferases.
- Biochem J*
- , 397:491-500.
- [37] R. P. Gibson, J. P. Turkenburg, S. J. Charnock, R. Lloyd, G. J. Davies (2002). Insights into trehalose synthesis provided by the structure of the retaining glucosyltransferase OtsA. *Chem Biol*, 9:1337-1346.
 - [38] A. Ardèvol, C. Rovira (2011). The Molecular Mechanism of Enzymatic Glycosyl Transfer with Retention of Configuration: Evidence for a Short-Lived Oxocarbenium-Like Species. *Angew Chem Int Ed*, 50:10897-10901.
 - [39] J. R. Brown, B. E. Crawford, J. D. Esko (2007). Glycan Antagonists and Inhibitors: A Fount for Drug Discovery. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 42:481-515.
 - [40] S. R. Hamilton, T. U. Gerngross (2007). Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Curr Opin Biotechnol*, 18:387-392.
 - [41] T. Kajimoto, M. Node (2009). Synthesis of Glycosyltransferase Inhibitors. *Synthesis*, 2009:3179,3210.
 - [42] P. Compain, O. R. Martin (2001). Carbohydrate mimetics-based glycosyltransferase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 9:3077-3092.
 - [43] M. Izumi, H. Yuasa, H. Hashimoto (2009). Bisubstrate Analogues as Glycosyltransferase Inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 9:87-105.
 - [44] T. Pesnot, R. Jorgensen, M. M. Palcic, G. K. Wagner (2010). Structural and mechanistic basis for a new mode of glycosyltransferase inhibition. *Nat Chem Biol*, 6:321-323.
 - [45] D. Skropeta, R. Schwörer, T. Haag, R. Schmidt (2004). Asymmetric synthesis and affinity of potent sialyltransferase inhibitors based on transition-state analogues. *Glycoconjugate J*, 21:205-219.
 - [46] C. Rademacher, J. Landstrom, N. Sindhuwinata, M. M. Palcic, G. Widmalm, T. Peters (2010). NMR-based exploration of the acceptor binding site of human blood group B galactosyltransferase with molecular fragments. *Glycoconjugate J*, 27:349-358.
 - [47] K. Hosoguchi, T. Maeda, J.-i. Furukawa, Y. Shinohara, H. Hinou, M. Sekiguchi, H. Togame, H. Takemoto, H. Kondo, S.-I. Nishimura (2010). An Efficient Approach to the Discovery of Potent Inhibitors against Glycosyltransferases. *J Med Chem*, 53:5607-5619.
 - [48] R. Jorgensen, L. L. Grimm, N. Sindhuwinata, T. Peters, M. M. Palcic (angenommenes Manuskript). A novel glycosyltransferase inhibitor from a molecular fragment library screen simultaneously interferes with metal ion and substrate binding. *Angew Chem*.

- [49] K. Landsteiner (1901). Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wien Klin Wochenschr*.
- [50] A. von Decastello, A. Sturli (1902). Über die Isoagglutinine im Serum gesunder und kranker Menschen. *München Med Wochen*, 49:1090-1095.
- [51] F. Yamamoto (2004). Review: ABO blood group system--ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. *Immunohematology*, 20:3-22.
- [52] G. Hartmann (1941). Group Antigens in Human Organs.
- [53] W. T. Morgan, W. M. Watkins (1959). Some aspects of the biochemistry of the human blood-group substances. *Brit Med Bull*, 15:109-113.
- [54] W. T. Morgan, W. M. Watkins (1969). Genetic and biochemical aspects of human blood-group A-, B-, H-, Le-a- and Le-b-specificity. *Brit Med Bull*, 25:30-34.
- [55] A. Kobata, E. F. Grollman, V. Ginsburg (1968). An enzymatic basis for blood type B in humans. *Biochem Biophys Res Commun*, 32:272-277.
- [56] A. Kobata, E. F. Grollman, V. Ginsburg (1968). An enzymic basis for blood type A in humans. *Arch Biochem Biophys*, 124:609-612.
- [57] F. Yamamoto, H. Clausen, T. White, J. Marken, S. Hakomori (1990). Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*, 345:229-233.
- [58] J. Milland, M. S. Sandrin (2006). ABO blood group and related antigens, natural antibodies and transplantation. *Tissue Antigens*, 68:459-466.
- [59] T. L. Lowary, O. Hindsgaul (1993). Recognition of synthetic deoxy and deoxyfluoro analogs of the acceptor alpha-L-Fuc p-(1-->2)-beta-D-Gal p-OR by the blood-group A and B gene-specified glycosyltransferases. *Carbohydr Res*, 249:163-195.
- [60] M. M. Palcic, L. D. Heerze, M. Pierce, O. Hindsgaul (1988). The use of hydrophobic synthetic glycosides as acceptors in glycosyltransferase assays. *Glycoconjugate J*, 5:49-63.
- [61] M. M. Palcic, N. O. Seto, O. Hindsgaul (2001). Natural and recombinant A and B gene encoded glycosyltransferases. *Transfus Med*, 11:315-323.
- [62] N. O. Seto, C. A. Compston, A. Szpacenko, M. M. Palcic (2000). Enzymatic synthesis of blood group A and B trisaccharide analogues. *Carbohydr Res*, 324:161-169.

- [63] S. Marionneau, A. Cailleau-Thomas, J. Rocher, B. Le Moullac-Vaidye, N. Ruvoen, M. Clement, J. Le Pendu (2001). ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie*, 83:565-573.
- [64] N. O. Seto, M. M. Palcic, O. Hindsgaul, D. R. Bundle, S. A. Narang (1995). Expression of a recombinant human glycosyltransferase from a synthetic gene and its utilization for synthesis of the human blood group B trisaccharide. *Eur J Biochem*, 234:323-328.
- [65] S. L. Marcus, R. Polakowski, N. O. L. Seto, E. Leinälä, S. Borisova, A. Blancher, F. Roubinet, S. V. Evans, M. M. Palcic (2003). A single point mutation reverses the donor specificity of human blood group B-synthesizing galactosyltransferase. *J Biol Chem*, 278:12403-12405.
- [66] N. O. Seto, M. M. Palcic, C. A. Compston, H. Li, D. R. Bundle, S. A. Narang (1997). Sequential interchange of four amino acids from blood group B to blood group A glycosyltransferase boosts catalytic activity and progressively modifies substrate recognition in human recombinant enzymes. *J Biol Chem*, 272:14133-14138.
- [67] N. Soya, G. K. Shoemaker, M. M. Palcic, J. S. Klassen (2009). Comparative Study of Substrate and Product Binding to the Human ABO(H) Blood Group Glycosyltransferases. *Glycobiology*, 19:1224-1234.
- [68] G. K. Shoemaker, E. N. Kitova, M. M. Palcic, J. S. Klassen (2007). Equivalency of binding sites in protein-ligand complexes revealed by time-resolved tandem mass spectrometry. *J Am Chem Soc*, 129:8674-8675.
- [69] H. J. Lee, C. H. Barry, S. N. Borisova, N. O. L. Seto, R. B. Zheng, A. Blancher, S. V. Evans, M. M. Palcic (2005). Structural basis for the inactivity of human blood group O2 glycosyltransferase. *J Biol Chem*, 280:525-529.
- [70] J. A. Alfaro, R. B. Zheng, M. Persson, J. A. Letts, R. Polakowski, Y. Bai, S. N. Borisova, N. O. Seto, T. L. Lowary, M. M. Palcic, S. V. Evans (2008). ABO(H) blood group A and B glycosyltransferases recognize substrate via specific conformational changes. *J Biol Chem*.
- [71] A. Hassinen, A. Rivinoja, A. Kauppila, S. Kellokumpu (2010). Golgi N-glycosyltransferases form both homo- and heterodimeric enzyme complexes in live cells. *J Biol Chem*, 285:17771-17777.
- [72] K. J. Colley (1997). Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology*, 7:1-13.

- [73] C. L. de Graffenried, C. R. Bertozzi (2004). The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol*, 16:356-363.
- [74] H. P. Nguyen, N. O. L. Seto, Y. Cai, E. K. Leinala, S. N. Borisova, M. M. Palcic, S. V. Evans (2003). The influence of an intramolecular hydrogen bond in differential recognition of inhibitory acceptor analogs by human ABO(H) blood group A and B glycosyltransferases. *J Biol Chem*, 278:49191-49195.
- [75] J. A. Letts, N. L. Rose, Y. R. Fang, C. H. Barry, S. N. Borisova, N. O. L. Seto, M. M. Palcic, S. V. Evans (2006). Differential recognition of the type I and II H antigen acceptors by the human ABO(H) blood group A and B glycosyltransferases. *J Biol Chem*, 281:3625-3632.
- [76] N. O. Seto, C. A. Compston, S. V. Evans, D. R. Bundle, S. A. Narang, M. M. Palcic (1999). Donor substrate specificity of recombinant human blood group A, B and hybrid A/B glycosyltransferases expressed in Escherichia coli. *Eur J Biochem*, 259:770-775.
- [77] J. A. Letts, M. Persson, B. Schuman, S. N. Borisova, M. M. Palcic, S. V. Evans (2007). The effect of heavy atoms on the conformation of the active-site polypeptide loop in human ABO(H) blood-group glycosyltransferase B. *Acta Crystallogr D: Biol Crystallogr*, 63:860-865.
- [78] P. K. Qasba, B. Ramakrishnan, E. Boeggeman (2005). Substrate-induced conformational changes in glycosyltransferases. *Trends Biochem Sci*, 30:53-62.
- [79] H. Jamaluddin, P. Tumbale, S. G. Withers, K. R. Acharya, K. Brew (2007). Conformational changes induced by binding UDP-2F-galactose to alpha-1,3 galactosyltransferase- implications for catalysis. *J Mol Biol*, 369:1270-1281.
- [80] V. P. Kamath, N. O. Seto, C. A. Compston, O. Hindsgaul, M. M. Palcic (1999). Synthesis of the acceptor analog alphaFuc(1-->2)alphaGal-O(CH₂)₇ CH₃: a probe for the kinetic mechanism of recombinant human blood group B glycosyltransferase. *Glycoconjugate J*, 16:599-606.
- [81] J. Angulo, B. Langpap, A. Blume, T. Biet, B. Meyer, N. R. Krishna, H. Peters, M. M. Palcic, T. Peters (2006). Blood group B galactosyltransferase: insights into substrate binding from NMR experiments. *J Am Chem Soc*, 128:13529-13538.
- [82] E. Boix, Y. Zhang, G. J. Swaminathan, K. Brew, K. R. Acharya (2002). Structural basis of ordered binding of donor and acceptor substrates to the retaining glycosyltransferase, alpha-1,3-galactosyltransferase. *J Biol Chem*, 277:28310-28318.
- [83] F. Daligault, S. Rahuel-Clermont, S. Gulberti, M. T. Cung, G. Branlant, P. Netter, J. Magdalou, V. Lattard (2009). Thermodynamic insights into the structural basis

- p>governing the donor substrate recognition by human beta1,4-galactosyltransferase 7.
- Biochem J*
- , 418:605-614.
- [84] Y. Xiang, U. Baxa, Y. Zhang, A. C. Steven, G. L. Lewis, J. L. Van Etten, M. G. Rossmann (2010). Crystal Structure of a Virus-Encoded Putative Glycosyltransferase. *J Virol*, 84:12265-12273.
- [85] M. Sobhany, M. Negishi (2006). Characterization of specific donor binding to alpha1,4-N-acetylhexosaminyltransferase EXTL2 using isothermal titration calorimetry. *Methods Enzymol*, 416:3-12.
- [86] S. Rahuel-Clermont, F. Daligault, M. H. Piet, S. Gulberti, P. Netter, G. Branlant, J. Magdalou, V. Lattard (2010). Biochemical and thermodynamic characterization of mutated beta1,4-galactosyltransferase 7 involved in the progeroid form of the Ehlers-Danlos syndrome. *Biochem J*, 432:303-311.
- [87] A. Blume, J. Angulo, T. Biet, H. Peters, A. J. Benie, M. Palcic, T. Peters (2006). Fragment-based screening of the donor substrate specificity of human blood group B galactosyltransferase using saturation transfer difference NMR. *J Biol Chem*, 281:32728-32740.
- [88] J. S. Klassen (unveröffentlicht). Department of Chemistry, University of Alberta.
- [89] A. Gohlke (2006). NMR-Untersuchungen an Komplexen der GTB mit Akzeptorliganden [Masterarbeit]. Institut für Chemie, Universität zu Lübeck.
- [90] Y. Zhang, P. G. Wang, K. Brew (2001). Specificity and mechanism of metal ion activation in UDP-galactose:beta -galactoside-alpha -1,3-galactosyltransferase. *J Biol Chem*, 276:11567-11574.
- [91] H. D. Ly, B. Loughheed, W. W. Wakarchuk, S. G. Withers (2002). Mechanistic studies of a retaining alpha-galactosyltransferase from *Neisseria meningitidis*. *Biochemistry*, 41:5075-5085.
- [92] N. Sindhuwinata (2007). NMR-Studien zum Mechanismus der humanen Blutgruppe B Galactosyltransferase [Masterarbeit]. Institut für Chemie, Universität zu Lübeck.
- [93] H. A. Nunez, R. Barker (1976). The metal ion catalyzed decomposition of nucleoside diphosphate sugars. *Biochemistry*, 15:3843-3847.
- [94] F. J. Munoz (2008). Síntesis quimioenzimática de glicoconjugados y estudio cuantitativo de su implicación en procesos de reconocimiento molecular. Organic and Pharmaceutical Chemistry Department, University Complutense of Madrid.

- [95] A. Mittermaier, L. E. Kay (2006). New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics. *Science*, 312:224-228.
- [96] T. A. Phillips, R. A. VanBogelen, F. C. Neidhardt (1984). lon gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *J Bacteriol*, 159:283-287.
- [97] J. Marley, M. Lu, C. Bracken (2001). A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *J Biomol NMR*, 20:71-75.
- [98] U. K. Laemmli (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- [99] M. M. Bradford (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- [100] S. J. Compton, C. G. Jones (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem*, 151:369-374.
- [101] O. Warburg, W. Christian (1941/1942). Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem Z*, 310:384-421.
- [102] G. K. Shoemaker, N. Soya, M. M. Palcic, J. S. Klassen (2008). Temperature Dependent Cooperativity in Donor-Acceptor Substrate Binding to the Human Blood Group Glycosyltransferases. *Glycobiology*.
- [103] I. Langmuir (1916). THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. PART I. SOLIDS. *J Am Chem Soc*, 38:2221-2295.
- [104] S. Bjelic, I. Jelesarov (2008). A survey of the year 2007 literature on applications of isothermal titration calorimetry. *J Mol Recognit*, 21:289-312.
- [105] MicroCal (MAU130030 Rev. E). *VP-ITC MicroCalorimeter - User`s Manual*. MicroCal.
- [106] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L. N. Lin (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem*, 179:131-137.
- [107] L. Indyk, H. F. Fisher (1998). Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry. *Methods Enzymol*, 295:350-364.
- [108] MicroCal (2002). *ITC Data Analysis in Origin - Tutorial Guide*. MicroCal.

- [109] K. Nagata, H. Handa (2000). *Real-Time Analysis of Biomolecular Interactions*. Springer.
- [110] F. Lottspeich, J. W. Engels (2006). *Bioanalytik* 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- [111] M. A. Cooper (2003). Label-free screening of bio-molecular interactions. *Anal Bioanal Chem*, 377:834-842.
- [112] H. Bisswanger (2000). *Enzymkinetik* 3. Auflage. Wiley-VCH.
- [113] J. B. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer (2003). *Biochemie* 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- [114] F. Bloch (1946). Nuclear Induction. *Phys Rev*, 70:460-474.
- [115] E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound (1946). Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys Rev*, 69:37-38.
- [116] B. Meyer, T. Peters (2003). NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angew Chem Int Ed*, 42:864-890.
- [117] I. Shimada (2005). NMR techniques for identifying the interface of a larger protein-protein complex: cross-saturation and transferred cross-saturation experiments. *Methods Enzymol*, 394:483-506.
- [118] E. M. Lenz, I. D. Wilson (2006). Analytical Strategies in Metabonomics. *J Proteome Res*, 6:443-458.
- [119] G. Bodenhausen, D. J. Ruben (1980). Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem Phys Lett*, 69:185-189.
- [120] R. Riek, K. Pervushin, K. Wuthrich (2000). TROSY and CRINEPT: NMR with large molecular and supramolecular structures in solution. *Trends Biochem Sci*, 25:462-468.
- [121] C. Fernández, G. Wider (2003). TROSY in NMR studies of the structure and function of large biological macromolecules. *Curr Opin Struct Biol*, 13:570-580.
- [122] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich (1997). Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:12366-12371.
- [123] K. Pervushin (2000). Impact of transverse relaxation optimized spectroscopy (TROSY) on

- NMR as a technique in structural biology. *Q Rev Biophys*, 33:161-197.
- [124] M. Salzmann, K. Pervushin, G. Wider, H. Senn, K. Wuthrich (1998). TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:13585-13590.
- [125] M. Ikura, L. E. Kay, A. Bax (1990). A novel approach for sequential assignment of ^1H , ^{13}C , and ^{15}N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin. *Biochemistry*, 29:4659-4667.
- [126] K. H. Gardner, L. E. Kay (1998). The use of ^2H , ^{13}C , ^{15}N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 27:357-406.
- [127] M. Sattler, J. Schleucher, C. Griesinger (1999). Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 34:93-158.
- [128] J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer, 3rd, M. Rance, N. J. Skelton (2007). *Protein NMR Spectroscopy - Principles and Practice* 2nd edition.
- [129] M. Mayer, B. Meyer (1999). Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew Chem Int Ed*, 38:1784-1788.
- [130] M. Mayer, B. Meyer (2001). Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc*, 123:6108-6117.
- [131] L. Fielding (2007). NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 51:219-242.
- [132] J. Angulo, P. M. Enriquez-Navas, P. M. Nieto (2010). Ligand-receptor binding affinities from saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy: the binding isotherm of STD initial growth rates. *Chem Eur J*, 16:7803-7812.
- [133] T. Bulter, T. Schumacher, D. J. Namdjou, R. Gutierrez Gallego, H. Clausen, L. Elling (2001). Chemoenzymatic synthesis of biotinylated nucleotide sugars as substrates for glycosyltransferases. *ChemBioChem*, 2:884-894.
- [134] J. L. Markley, A. Bax, Y. Arata, C. W. Hilbers, R. Kaptein, B. D. Sykes, P. E. Wright, K. Wuthrich (1998). Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the Standardization of Data Bases of Protein and Nucleic Acid Structures Determined by NMR Spectroscopy. *J Biomol NMR*, 12:1-23.

- [135] A. Fersht (1999). *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. W. H. Freeman and Company.
- [136] E. Munoz (unveröffentlicht). Institut für Chemie, Universität zu Lübeck.
- [137] J. Fiaux, E. B. Bertelsen, A. L. Horwich, K. Wuthrich (2004). Uniform and residue-specific ¹⁵N-labeling of proteins on a highly deuterated background. *J Biomol NMR*, 29:289-297.
- [138] D. S. Waugh (1996). Genetic tools for selective labeling of proteins with alpha-¹⁵N-amino acids. *J Biomol NMR*, 8:184-192.
- [139] B. Leiting, F. Marsilio, J. F. O'Connell (1998). Predictable deuteration of recombinant proteins expressed in *Escherichia coli*. *Anal Biochem*, 265:351-355.
- [140] P. F. Flynn, D. L. Mattiello, H. D. W. Hill, A. J. Wand (2000). Optimal Use of Cryogenic Probe Technology in NMR Studies of Proteins. *J Am Chem Soc*, 122:4823-4824.
- [141] T. Horiuchi, M. Takahashi, J. Kikuchi, S. Yokoyama, H. Maeda (2005). Effect of dielectric properties of solvents on the quality factor for a beyond 900 MHz cryogenic probe model. *J Magn Reson*, 174:34-42.
- [142] G. Pintacuda, M. A. Keniry, T. Huber, A. Y. Park, N. E. Dixon, G. Otting (2004). Fast Structure-Based Assignment of ¹⁵N HSQC Spectra of Selectively ¹⁵N-Labeled Paramagnetic Proteins. *J Am Chem Soc*, 126:2963-2970.
- [143] B. Ramakrishnan, E. Boeggeman, V. Ramasamy, P. K. Qasba (2004). Structure and catalytic cycle of beta-1,4-galactosyltransferase. *Curr Opin Struct Biol*, 14:593-600.
- [144] D. L. Witsell, C. E. Casey, M. C. Neville (1990). Divalent cation activation of galactosyltransferase in native mammary Golgi vesicles. *J Biol Chem*, 265:15731-15737.
- [145] D. H. Van Den Eijnden, W. M. Blanken, H. Winterwerp, W. E. C. M. Schiphorst (1983). Identification and Characterization of an UDP-Gal: N-Acetyllactosaminide α -1,3-d-Galactosyltransferase in Calf Thymus. *Eur J Biochem*, 134:523-530.
- [146] A. Velazquez-Campoy, G. Goni, J. R. Peregrina, M. Medina (2006). Exact analysis of heterotropic interactions in proteins: Characterization of cooperative ligand binding by isothermal titration calorimetry. *Biophys J*, 91:1887-1904.
- [147] D. Kern, E. R. Zuiderweg (2003). The role of dynamics in allosteric regulation. *Curr Opin Struct Biol*, 13:748-757.

-
- [148] D. H. Williams, E. Stephens, D. P. O'Brien, M. Zhou (2004). Understanding noncovalent interactions: ligand binding energy and catalytic efficiency from ligand-induced reductions in motion within receptors and enzymes. *Angew Chem Int Ed*, 43:6596-6616.
- [149] D. H. Williams, E. Stephens, M. Zhou (2003). Ligand binding energy and catalytic efficiency from improved packing within receptors and enzymes. *J Mol Biol*, 329:389-399.
- [150] W. P. Jencks (1975). Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the circe effect. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 43:219-410.
- [151] D. H. Williams, M. Zhou, E. Stephens (2006). Ligand binding energy and enzyme efficiency from reductions in protein dynamics. *J Mol Biol*, 355:760-767.
- [152] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik (1996). Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science*, 274:1531-1534.
- [153] P. J. Hajduk, D. J. Augeri, J. Mack, R. Mendoza, J. Yang, S. F. Betz, S. W. Fesik (2000). NMR-Based Screening of Proteins Containing ^{13}C -Labeled Methyl Groups. *J Am Chem Soc*, 122:7898-7904.
- [154] L. P. McIntosh, F. W. Dahlquist (1990). Biosynthetic Incorporation of ^{15}N and ^{13}C for Assignment and Interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Proteins. *Q Rev Biophys*, 23:1-38.
- [155] D. Staunton, R. Schlinkert, G. Zanetti, S. A. Colebrook, I. D. Campbell (2006). Cell-free expression and selective isotope labelling in protein NMR. *Magn Reson Chem*, 44 Spec No:S2-9.
- [156] N. Trbovic, C. Klammt, A. Koglin, F. Löhr, F. Bernhard, V. Dötsch (2005). Efficient Strategy for the Rapid Backbone Assignment of Membrane Proteins. *J Am Chem Soc*, 127:13504-13505.
- [157] M. K. Rosen, K. H. Gardner, R. C. Willis, W. E. Parris, T. Pawson, L. E. Kay (1996). Selective Methyl Group Protonation of Perdeuterated Proteins. *J Mol Biol*, 263:627-636.
- [158] L. E. Kay (2005). NMR studies of protein structure and dynamics. *J Magn Reson*, 173:193-207.
- [159] V. Tugarinov, V. Kanelis, L. E. Kay (2006). Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy. *Nat Protoc*, 1:749-754.
- [160] G. Otting (2010). Protein NMR using paramagnetic ions. *Annu Rev Biophys*, 39:387-405.

- [161] G. Wagner, K. Wuthrich (1982). Sequential resonance assignments in protein ¹H nuclear magnetic resonance spectra. Basic pancreatic trypsin inhibitor. *J Mol Biol*, 155:347-366.
- [162] S. Myong, B. C. Stevens, T. Ha (2006). Bridging Conformational Dynamics and Function Using Single-Molecule Spectroscopy. *Structure*, 14:633-643.
- [163] X. Michalet, S. Weiss, M. J  nger (2006). Single-Molecule Fluorescence Studies of Protein Folding and Conformational Dynamics. *Chem Rev*, 106:1785-1813.
- [164] D. Bourgeois, A. Royant (2005). Advances in kinetic protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol*, 15:538-547.
- [165] S. W. Englander (2006). Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry: A Historical Perspective. *J Am Soc Mass Spectrom*, 17:1481-1489.
- [166] E. Wamhoff (2010). Humane Blutgruppe B Galactosyltransferase: smFRET-Studien zur Konformationsdynamik [Bachelorarbeit]. Institut für Chemie, Universität zu Lübeck.
- [167] K. Henzler-Wildman, D. Kern (2007). Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 450:964-972.
- [168] D. D. Boehr, H. J. Dyson, P. E. Wright (2006). An NMR Perspective on Enzyme Dynamics. *Chem Rev*, 106:3055-3079.
- [169] A. G. Palmer, 3rd, C. D. Kroenke, J. P. Loria (2001). Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules. *Methods Enzymol*, 339:204-238.
- [170] E. Z. Eisenmesser, O. Millet, W. Labeikovsky, D. M. Korzhnev, M. Wolf-Watz, D. A. Bosco, J. J. Skalicky, L. E. Kay, D. Kern (2005). Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature*, 438:117-121.

6 Anhang

Tabelle A 1: Messwerte des zeitlichen Verlaufs der enzymatischen Hydrolyse von UDP-Gal durch die GTB bei 25 °C. Angegeben sind die gemessenen und um den Leerwert A_{Leerwert} korrigierten Aktivitäten A_{Probe} sowie die daraus berechneten Galactosekonzentrationen. Die Proben enthielten zu Beginn der Reaktion 1 mM UDP-Gal, 27 μM GTB (1), 0 bzw. 1 mM 3DD in 50 mM Bis-Tris, pH 6,7, 10 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl und 1 mM β -ME.

t / h	ohne 3DD			1 mM 3DD		
	$A_{\text{Probe}} /$ dpm	korr. $A_{\text{Probe}} /$ dpm	$c(\text{Gal}) /$ mM	$A_{\text{Probe}} /$ dpm	korr. $A_{\text{Probe}} /$ dpm	$c(\text{Gal}) /$ mM
A_{Leerwert}	167	0		163	0	
0,02	319	153	0,004	632	468	0,011
0,5	1344	1177	0,027	2239	2076	0,047
1,0	2148	1982	0,046	4022	3859	0,088
2,0	3842	3676	0,084	7511	7348	0,167
3,0	5429	5263	0,121	10511	10347	0,236
4,0	6857	6691	0,154	13456	13293	0,303
5,0	8238	8072	0,186	16249	16086	0,367
7,0	10110	9943	0,229	20785	20622	0,470
9,0	12667	12501	0,287	25193	25030	0,571
13,5	15994	15828	0,364	32946	32783	0,747
23,5	23323	23156	0,532	39520	39357	0,897
25,0	23654	23488	0,540	38569	38405	0,875
28,0	24982	24816	0,570	40558	40395	0,921
32,0	26284	26117	0,600	40161	39998	0,912
35,75	28036	27870	0,641	41179	41016	0,935
48,0	33093	32927	0,757	41752	41589	0,948
57,0	34708	34542	0,794	43105	42942	0,979
78,5	34990	34823	0,800	43877	43713	0,996
A_{max}	43503	43503	1,000	43870	43870	1,000

Tabelle A 2: Messergebnisse zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter der GTB-katalysierten Hydrolyse von UDP-Gal in Bis-Tris/Mg²⁺-Puffer bei 25 °C. Die GTB-Konzentration betrug 2,3 µM (Messung 1) bzw. 2 µM (Messung 2). Die Aktivität der Probe ohne UDP-Gal entspricht der Aktivität des Hintergrunds und wurde bereits von allen Messwerten subtrahiert. Bei der korrigierten Aktivität (korr. A_{Probe}) wurde die entsprechende Leerwertaktivität A_{Leerwert} subtrahiert, die ohne GTB mit dem Assay gemessen wurde. Die Reaktionsgeschwindigkeit v wird durch Division von korr. A_{Probe} durch die Inkubationszeit t erhalten.

$c(\text{UDP-Gal}) /$ µM	$A_{\text{max}} /$ dpm	t / min	$A_{\text{Probe}} /$ dpm	$A_{\text{Leerwert}} /$ dpm	korr. $A_{\text{Probe}} /$ dpm	$v / \text{dpm} \cdot \text{h}^{-1}$
Messung 1:						
0	21,8					
15,625	2070	85	24,1	10,0	14,1	10,0
31,25		90	53,0	5,1	47,8	31,9
62,5		90	93,4	26,1	67,3	44,8
125		90	176,7	48,1	128,6	85,7
250		180	462,8	112,5	350,4	116,8
500		180	713,9	193,2	520,7	173,6
1000	131663	180	1161,7	425,2	736,5	245,5
Messung 2:						
0	22,6					
62,5	1985	880	53,0	6,5	46,5	3,2
125		1248	133,1	22,8	110,2	5,3
250		1300	236,7	28,7	208,0	9,6
500		1300	385,1	62,8	322,4	14,9
1000		1310	561,2	134,8	426,4	19,5
2000		1310	900,1	249,0	651,2	29,8
4000	151213	1325	1283,6	533,0	750,5	34,0

Tabelle A 3: Messergebnisse zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter der GTB-katalysierten Hydrolyse von UDP-Gal in Bis-Tris/Mg²⁺-Puffer mit 3DD bei 25 °C. Die GTB-Konzentration betrug 1,6 µM (Messung 1) bzw. 0,1 µM (Messungen 2 und 3) und die 3DD-Konzentrationen 10 mM (Messung 1) bzw. 5 mM (Messungen 2 und 3). Die Aktivität der Probe ohne UDP-Gal entspricht der Aktivität des Hintergrunds und wurde bereits von allen Messwerten subtrahiert. Bei der korrigierten Aktivität (korr. A_{Probe}) wurde die entsprechende Leerwertaktivität A_{Leerwert} subtrahiert, die ohne GTB mit dem Assay gemessen wurde. Die Reaktionsgeschwindigkeit v wurde durch Division von korr. A_{Probe} durch die Inkubationszeit t erhalten.

$c(\text{UDP-Gal}) /$ µM	$A_{\text{max}} /$ dpm	t / min	$A_{\text{Probe}} /$ dpm	$A_{\text{Leerwert}} /$ dpm	korr. $A_{\text{Probe}} /$ dpm	$v / \text{dpm} \cdot \text{h}^{-1}$
Messung 1:						
0	27,3					
1	1902	1	16,0	2,5	13,5	808,8
2		3	68,8	9,7	59,1	1182,0
4		5	205,0	18,4	186,6	2239,7
8		10	588,5	50,5	538,0	3227,8
16		20	1503,8	106,3	1397,6	4192,7
32		75	6407,5	199,6	6207,9	4966,3
64	136747	75	7425,1	425,4	6999,7	5599,7

Messung 2:

0	0					
1	1984	90	36,6	37,7	-1,0	-0,7
2		210	69,2	37,0	32,2	9,2
4		485	188,4	60,0	128,5	15,9
8		485	312,9	82,1	230,9	28,6
16		490	570,6	152,4	418,2	51,2
32		505	1007,8	316,9	690,9	82,1
64	148065	505	1548,7	514,1	1034,6	122,9

Messung 3:

0	22,6					
1	1981	880	108,3	20,0	88,3	6,0
2		925	165,4	26,3	139,1	9,0
4		925	304,0	33,8	270,3	17,5
8		931	640,3	73,0	567,3	36,6
16		931	968,2	127,3	840,9	54,2
32		949	1500,5	268,1	1232,5	77,9
64	153394	949	2129,6	505,4	1624,2	102,7

Tabelle A 4: Messergebnisse zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter der GTB-katalysierten Hydrolyse von UDP-Gal in Bis-Tris/Mn²⁺-Puffer bei 25 °C. Die GTB-Konzentration betrug 0,5 µM (Messung 1) bzw. 0,1 µM (Messung 2). Die Aktivität der Probe ohne UDP-Gal entspricht der Aktivität des Hintergrunds und wurde bereits von allen Messwerten subtrahiert. Bei der korrigierten Aktivität (korr. A_{Probe}) wurde die entsprechende Leerwertaktivität A_{Leerwert} subtrahiert, die ohne GTB mit dem Assay gemessen wurde. Die Reaktionsgeschwindigkeit v wird durch Division von korr. A_{Probe} durch die Inkubationszeit t erhalten.

$c(\text{UDP-Gal}) /$ µM	$A_{\text{max}} /$ dpm	t / min	$A_{\text{Probe}} /$ dpm	$A_{\text{Leerwert}} /$ dpm	korr. $A_{\text{Probe}} /$ dpm	$v / \text{dpm} \cdot \text{h}^{-1}$
Messung 1:						
0	25,4					
0,625	1868	5	43,0	-1,2	44,2	530,9
1,25		10	152,9	5,1	147,9	887,3
2,5		15	425,3	20,9	404,4	1617,5
5		30	1079,1	28,9	1050,1	2100,3
10		45	2210,1	69,3	2140,8	2854,4
20		45	2726,9	133,2	2593,6	3458,2
40	137898	60	3763,9	268,5	3495,4	3495,4
Messung 2:						
0	18,9					
0,625	1910	880	26,2	18,9	7,3	0,5
1,25		1248	67,9	20,9	47,1	2,3
2,5		1340	147,6	46,3	101,2	4,5
5		1380	302,0	98,7	203,3	8,8
10		1380	336,5	170,9	165,5	7,2
20		1385	836,1	349,7	486,4	21,1
40	150655	1385	1266,2	662,4	603,9	26,2

Tabelle A 5: Messergebnisse zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter der GTB-katalysierten Hydrolyse von UDP-Gal in Bis-Tris/Mn²⁺-Puffer mit 3DD bei 25 °C. Die GTB-Konzentration betrug 0,025 µM und die 3DD-Konzentrationen 2,5 mM. Die Aktivität der Probe ohne UDP-Gal entspricht der Aktivität des Hintergrunds und wurde bereits von allen Messwerten subtrahiert. Bei der korrigierten Aktivität (korr. A_{Probe}) wurde die entsprechende Leerwertaktivität A_{Leerwert} subtrahiert, die ohne GTB mit dem Assay gemessen wurde. Die Reaktionsgeschwindigkeit v wurde durch Division von korr. A_{Probe} durch die Inkubationszeit t erhalten.

$c(\text{UDP-Gal}) / \text{nM}$	$A_{\text{max}} /$ dpm	t / min	$A_{\text{Probe}} /$ dpm	$A_{\text{Leerwert}} /$ dpm	korr. A_{Probe} / dpm	$v / \text{dpm} \cdot \text{h}^{-1}$
0	25,9					
12,5	1886	3	133,3	6,0	127,3	2546,4
25		3	223,5	21,5	202,0	4040,0
50		5	461,4	29,8	431,5	5178,5
100		10	970,9	54,2	916,6	5499,8
200		20	2278,0	131,8	2146,1	6438,4
400		30	3793,1	228,3	3564,7	7129,5
800	125733	45	6010,9	470,9	5540,0	7386,7

Tabelle A 6: Nicht weiter berücksichtigte K_M -Werte der enzymatischen Hydrolyse. Sie wurden aus Messungen ermittelt, bei denen der Konzentrationsbereich von UDP-Gal nicht um den K_M -Wert lag, die Messwerte zu stark streuten, sodass der Fehler zu groß war oder der Umsatz über 10 % lag.

	$K_M / \mu\text{M}$
Mg ²⁺	378 ± 110
	553 ± 251
Mg ²⁺ + 3DD	9,8 ± 2,0
	7,1 ± 1,8
Mn ²⁺	5,2 ± 1,4
	4,2 ± 0,5
Mn ²⁺ + 3DD	0,07 ± 0,009
	0,05 ± 0,005
	0,03 ± 0,004

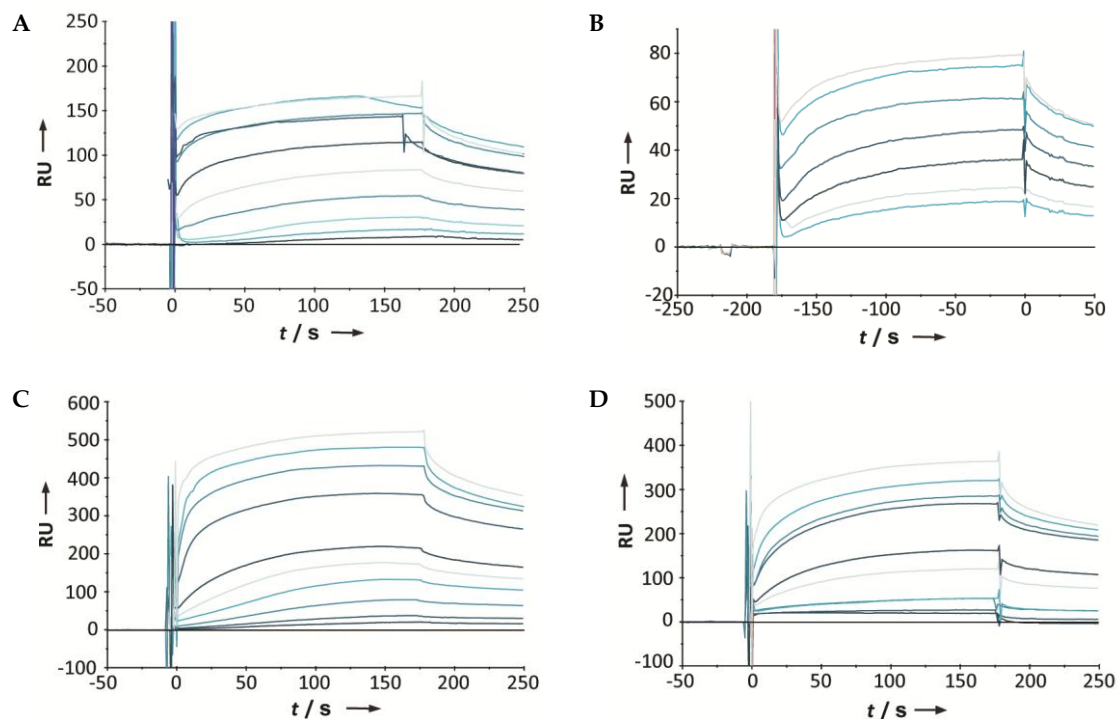


Abbildung A 1: Sensorgramme der Bindung von GTB an immobilisiertes UDP-6-biotinyl-Gal in Ab-(A)-(C) und Anwesenheit (D) des 3DD bei 25 °C. Die Puffer enthielten 50 mM MOPS, pH 6,7, 100 mM NaCl und 5 mM MnCl_2 . **(A)** Messung 1, Fc 2-1 und GTB (4) in zehn Konzentrationen von 75 nM - 50 μM , **(B)** Messung 3, Fc 2-1 und GTB (4) in zehn Konzentrationen von 75 nM - 15 μM . Die ersten 3 Messwerte wurden nicht ausgewertet, da die Antworten negativ waren. **(C)** Messung 4, Fc 4-3 und GTB (4) in zehn Konzentrationen von 75 nM - 15 μM , **(D)** Messung 2 mit 2,5 mM 3DD, Fc 4-3 und GTB (4) in zehn Konzentrationen von 20 nM - 5 μM .

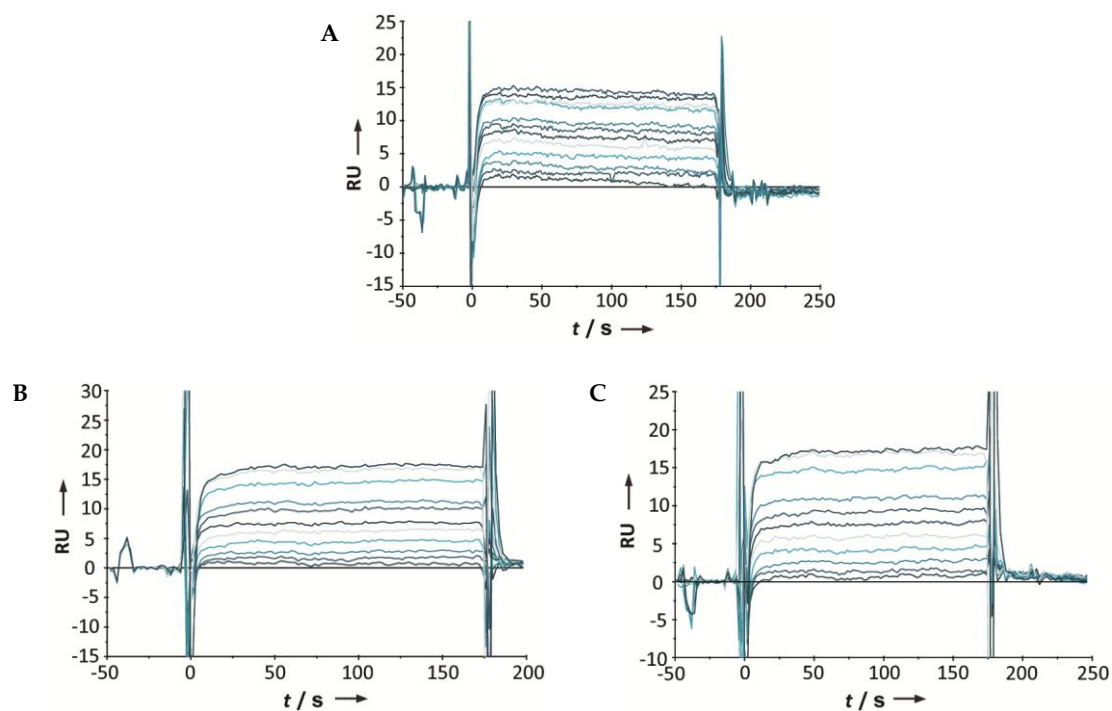


Abbildung A 2: Sensorgramme der Bindung von UDP-Gal an immobilisierte GTB bei 25 °C unter Verwendung einer leeren Referenzzelle. Die Puffer enthielten 50 mM MOPS, pH 6,7, 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ bzw. $MgCl_2$. **(A)** Messung 2 mit Mn^{2+} (Fc 2-1, Chip A) mit zwölf Konzentrationen UDP-Gal von 5 μ M - 2 mM, **(B), (C)** Messungen 2 und 3 mit Mg^{2+} (Fc 2-1, Chip B) mit elf Konzentrationen UDP-Gal von 70 μ M - 8 mM.

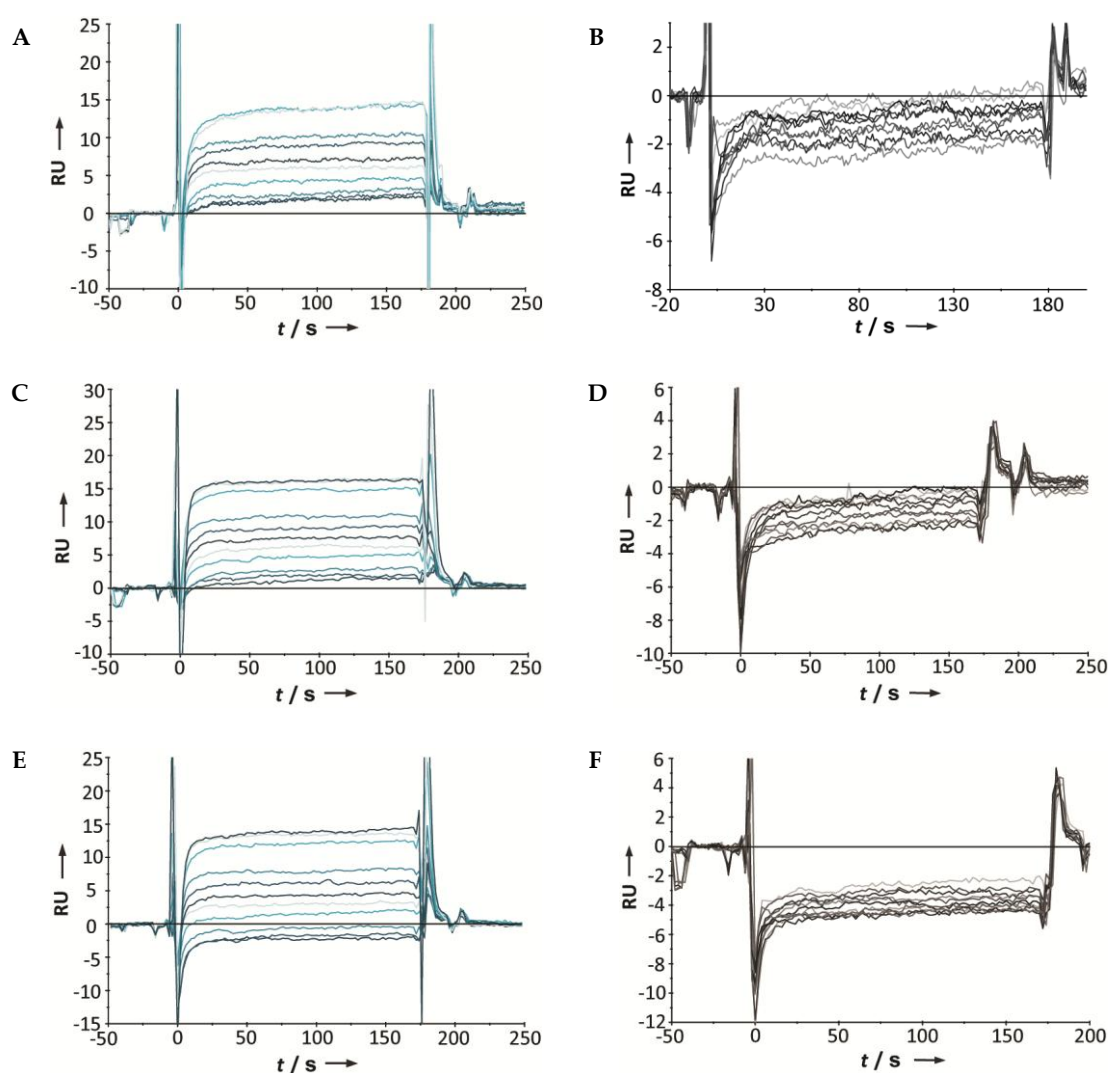


Abbildung A 3: Sensorgramme der Bindung von UDP-Gal an immobilisierte GTB bei 25 °C unter Verwendung einer mit NeutrAvidin® belegten Referenzzelle. Der Puffer enthielt 50 mM MOPS, pH 6,7, 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂. (B), (D) und (F) zeigen die Sensorgramme der jeweils vor der Analyt-injektion durchgeführten Pufferinjektion. Die Signale wurden mit zunehmender Messdauer immer negativer. Die entsprechenden Sensorgramme der Analytinjektionen sind in (A), (C) bzw. (E) dargestellt. (A) Messung 4 mit Mg²⁺ (Fc 4-3, Chip A) mit zehn Konzentrationen UDP-Gal von 70 µM - 8 mM, (C), (E) Messungen 5 und 6 mit Mg²⁺ (Fc 4-3, Chip B) mit elf Konzentrationen UDP-Gal von 70 µM - 8 mM.

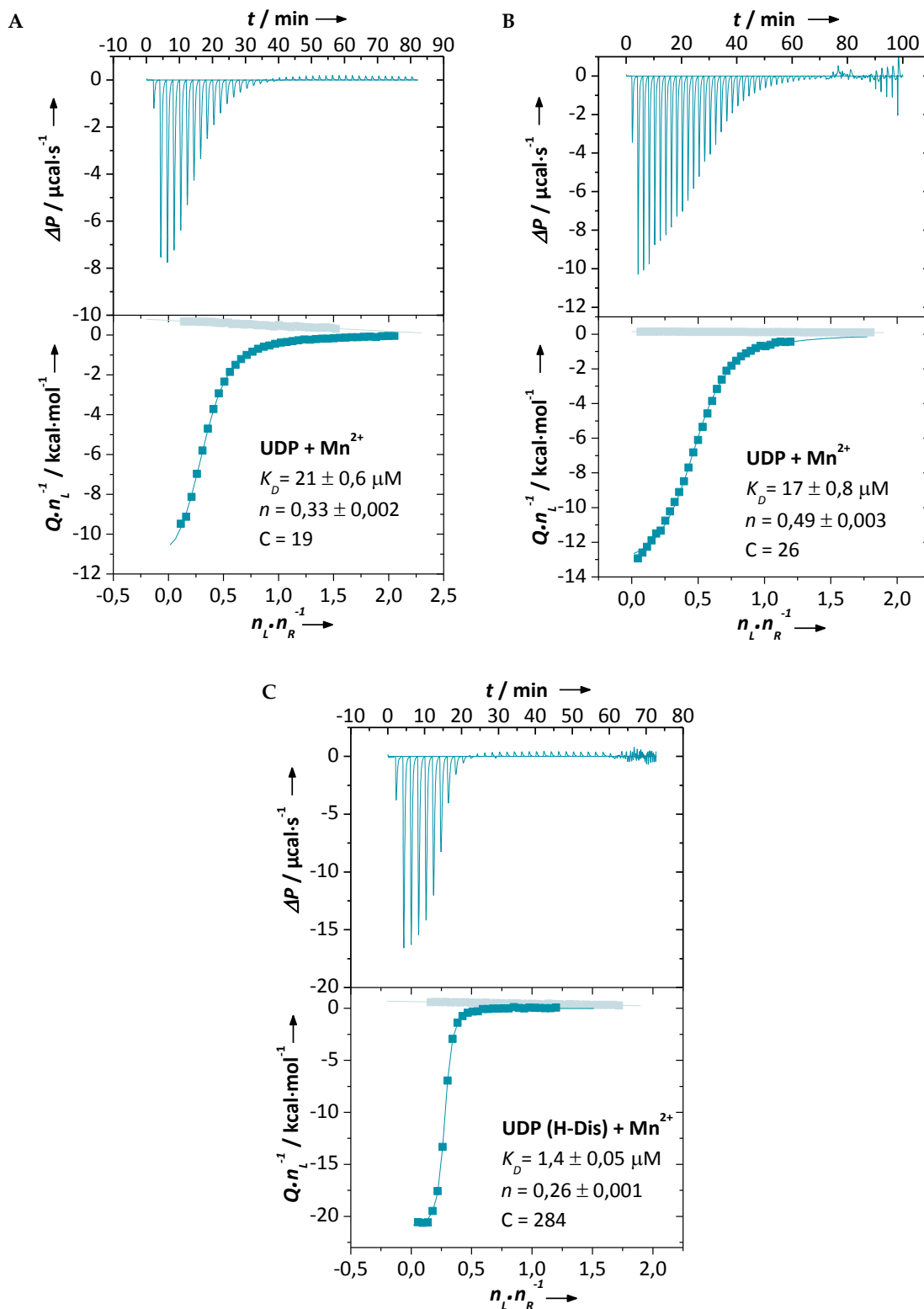


Abbildung A 4: Ergebnisse von ITC-Experimenten bei 25 °C. Durchgeführt wurden die Messungen in 50 mM MOPS, 100 mM NaCl, 5 mM MnCl_2 und (A) mit 390 μM GTB (6) und 4,58 mM UDP bei pH 7, (B) mit 430 μM GTB (7) und 4,25 mM UDP bei pH 6,7, (C) mit 390 μM GTB (6), 2,6 mM H-Dis-octyl und 4,58 mM UDP bei pH 7. Die Ergebnisse der Referenzmessungen ohne GTB sind in grau dargestellt.

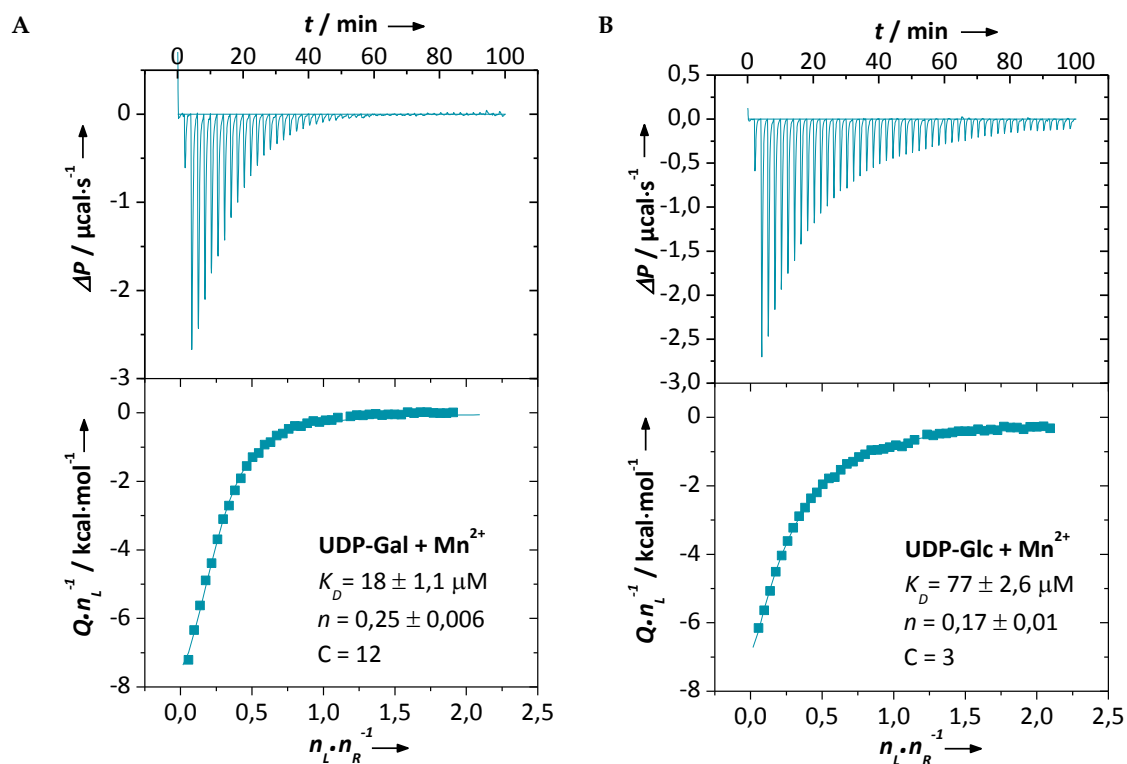


Abbildung A 5: Ergebnisse von ITC-Experimenten bei 25 °C. Durchgeführt wurden die Messungen in 50 mM MOPS, pH 7, 100 mM NaCl, 5 mM MnCl_2 mit 214,5 μM GTB (6) und **(A)** 2,5 mM UDP-Gal, **(B)** 2,5 mM UDP-Glc.

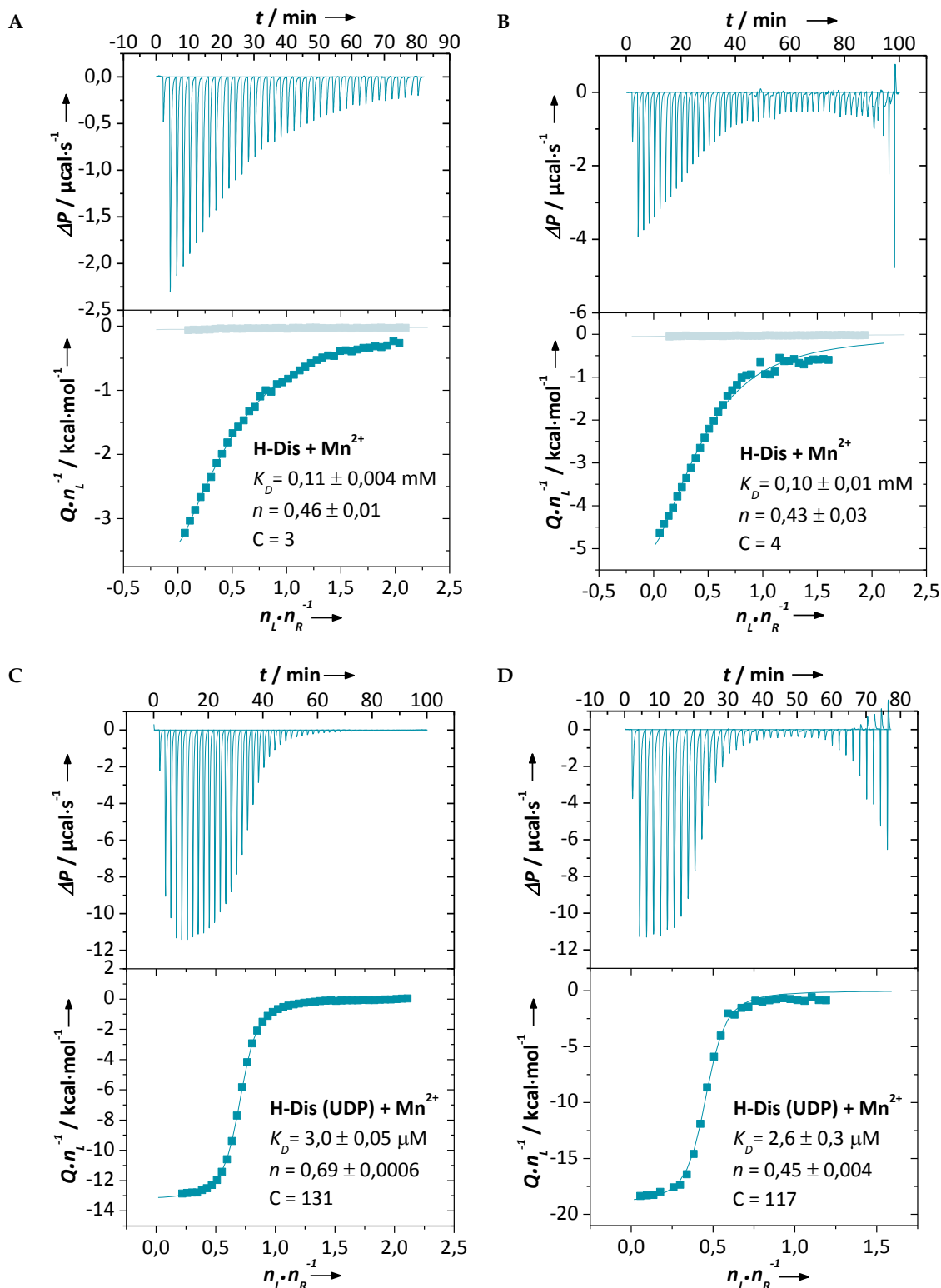


Abbildung A 6: Ergebnisse von ITC-Experimenten bei 25 °C. Durchgeführt wurden die Messungen in 50 mM MOPS, 100 mM NaCl, 5 mM MnCl_2 und (A) mit 283 μM GTB (5) und 3,33 mM H-Dis-octyl bei pH 7, (B) mit 1 mM β -ME, 400 μM GTB (7) und 4,7 mM H-Dis-octyl bei pH 6,7, (C) mit 390 μM GTB (6), 6,3 mM UDP und 4,58 mM H-Dis-octyl bei pH 7, (D) mit 1 mM β -ME, 300 μM GTB (7), 1,5 mM UDP und 3,5 mM H-Dis-octyl bei pH 6,7. Die Ergebnisse einbezogener Referenzmessungen ohne GTB sind in grau dargestellt.

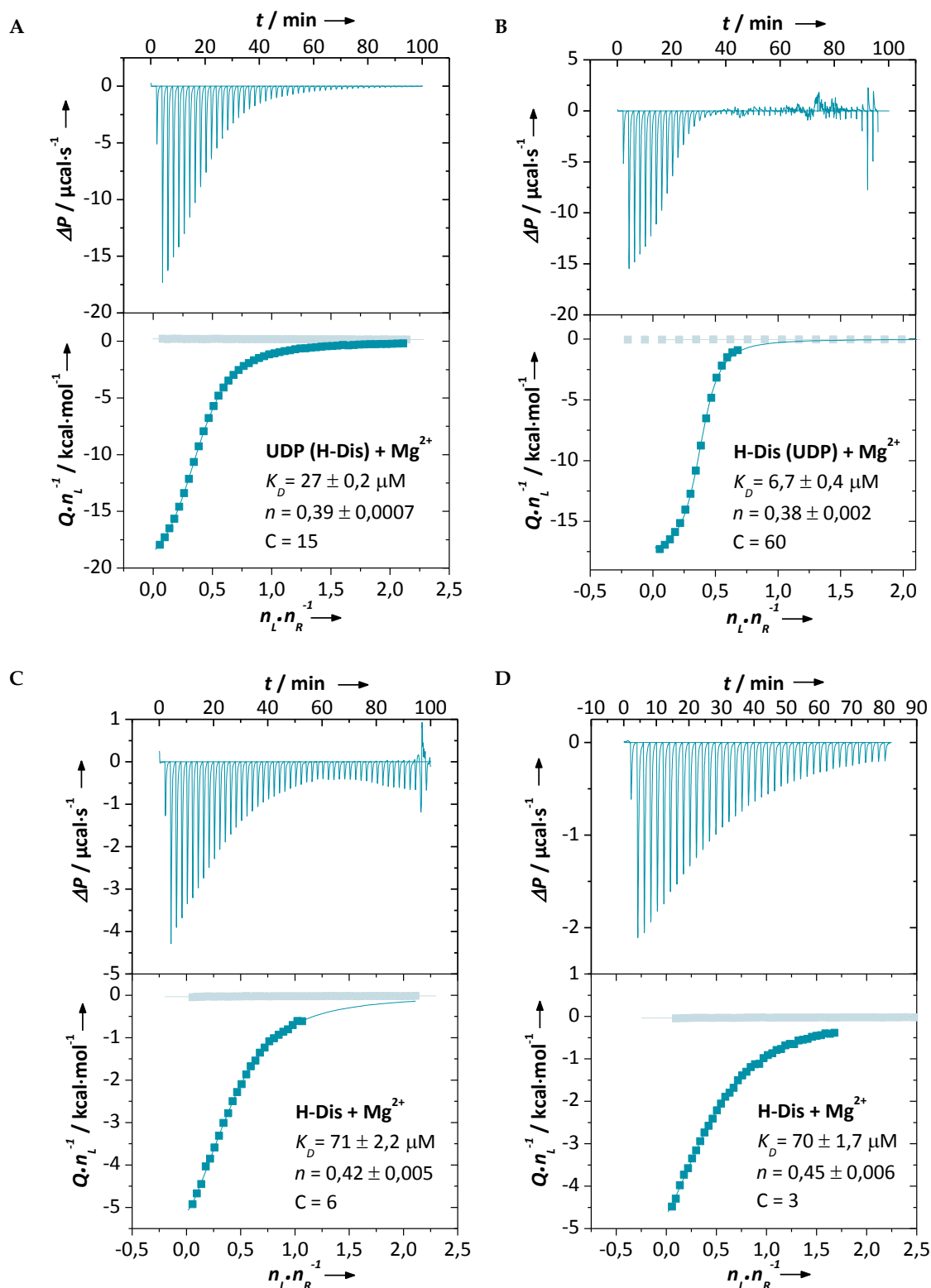


Abbildung A 7: Ergebnisse von ITC-Experimenten bei 25 °C. Durchgeführt wurden die Messungen in 50 mM MOPS, pH 6,7, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM β -ME und **(A)** mit 400 μM GTB (7), 3,8 mM H-Dis-octyl und 4,7 mM UDP, **(B)** mit 400 μM GTB (7), 19,6 mM UDP und 4,7 mM H-Dis-octyl, **(C)** mit 400 μM GTB (7) und 4,7 mM H-Dis-octyl, **(D)** mit 230 μM GTB (7) und 2,68 mM H-Dis-octyl.

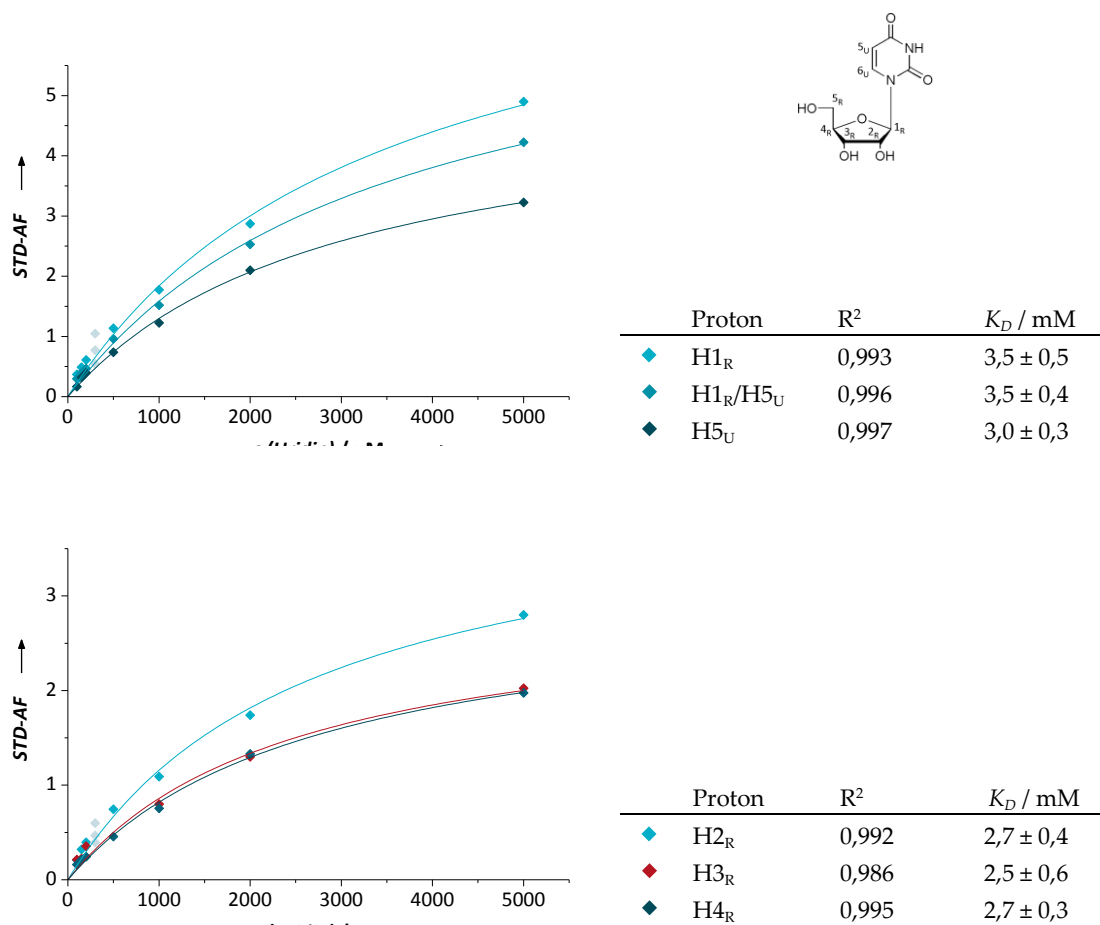


Abbildung A 8: Bindungsisothermen der Interaktion von Uridin und GTB bei 298 K und pH 6,7. STD-NMR-Experimente wurden mit 20 μM GTB und Uridin in acht verschiedenen Konzentrationen von 100-5000 μM in 50 mM Bis-Tris- d_{19} , 50 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME-d}_6$, 200 μM TSP- d_4 und D_2O durchgeführt. Die Spektren wurden mit EM und einem Lb von 2 Hz prozessiert. Die Probe mit 300 μM Uridin wurde bei der Analyse nicht berücksichtigt, da die erhaltenen STD-AFs durchgängig zu hoch waren (*). Die Signale von H1_R und H5_U überlappten zum Teil und wurden auch gemeinsam ausgewertet. Das Signal H3_R in der Probe mit 500 μM Uridin konnte nicht ausgewertet werden. Die K_D -Werte der auswertbaren Protonen sind mit Standardfehler und dem R^2 der Kurvenanpassung angegeben. Aus der roten Kurve wurde der in Tabelle 3.9 angegebene K_D -Wert erhalten.

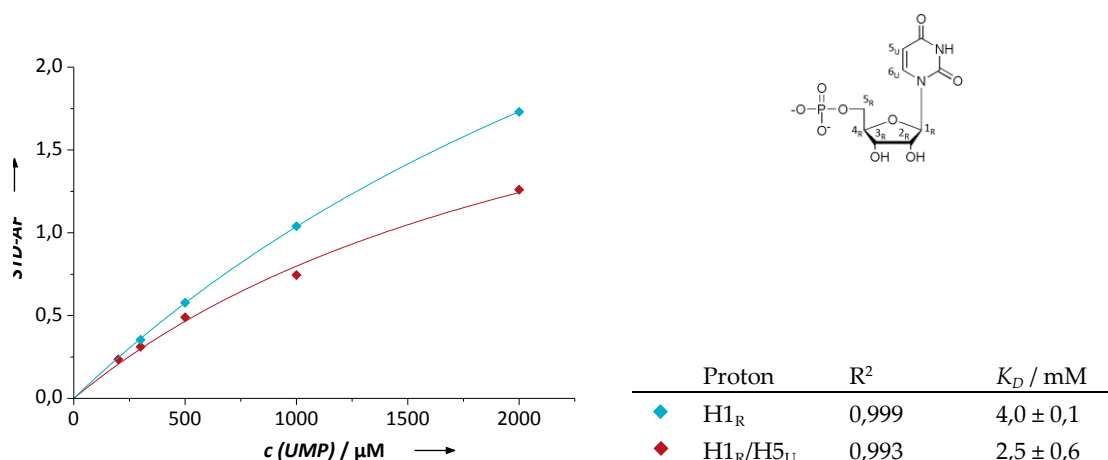


Abbildung A 9: Bindungsisothermen der Interaktion von UMP und GTB bei 298 K und pH 6,7. STD-NMR-Experimente wurden mit 20 μM GTB und UMP in acht verschiedenen Konzentrationen von 50-2000 μM in 50 mM Bis-Tris-d₁₉, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β-ME-d₆, 200 μM TSP-d₄ und D₂O durchgeführt. Die Spektren wurden mit EM und einem Lb von 3 Hz bzw. 1 Hz für die Analyse des H1_R prozessiert. Die Proben mit 50, 100 und 150 μM UMP, sowie das Signal H1_R des Spektrums mit 200 μM UMP waren nicht auswertbar. Die Signale von H1_R und H5_U überlappten und wurden auch gemeinsam ausgewertet. Die K_D-Werte der auswertbaren Protonen sind mit Standardfehler und dem R² der Kurvenanpassung angegeben. Aus der roten Kurve wurde der in Tabelle 3.9 angegebene K_D-Wert erhalten.

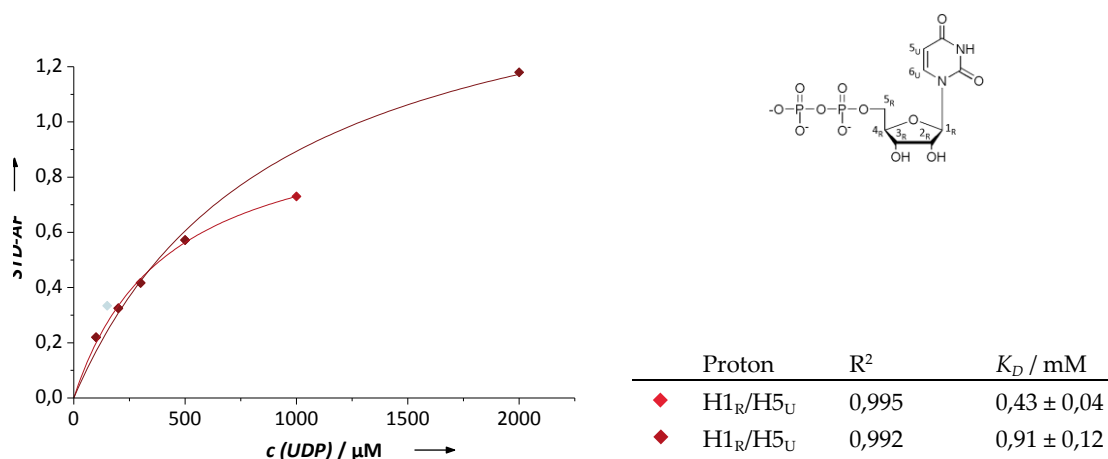


Abbildung A 10: Bindungsisothermen der Interaktion von UDP und GTB bei 298 K und pH 6,7. STD-NMR-Experimente wurden mit 20 μM GTB und UDP in acht verschiedenen Konzentrationen von 50-2000 μM in 50 mM Bis-Tris-d₁₉, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β-ME-d₆, 200 μM TSP-d₄ und D₂O durchgeführt. Die Spektren wurden mit EM und einem Lb von 3 Hz prozessiert. Die Probe mit 50 μM UDP war nicht auswertbar und die Probe mit 150 μM UDP (●) wurde aufgrund der Abweichung nicht in die Analyse einbezogen. Es scheint, dass entweder die Probe mit 1 mM oder die mit 2 mM UDP ein Ausreißer ist, jedoch kann aus dieser Messung nicht geschlossen werden, welche der beiden. Die K_D-Werte der auswertbaren Protonen H1_R und H5_U, die aufgrund Signalüberlappungen gemeinsam ausgewertet wurden, sind mit Standardfehler und dem R² der Kurvenanpassung angegeben. Beide K_D-Werte sind in Tabelle 3.9 angegeben.

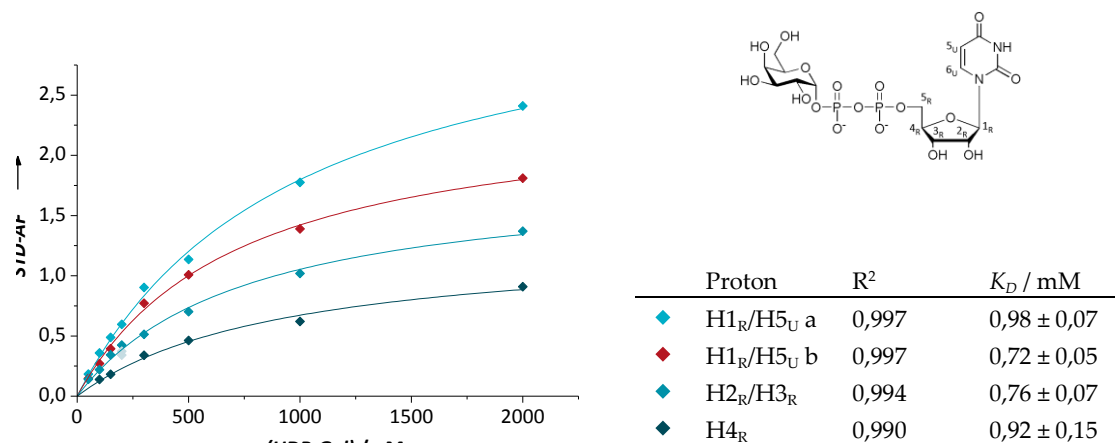


Abbildung A 11: Bindungsisothermen der Interaktion von UDP-Gal und GTB bei 298 K und pH 6,7.

STD-NMR-Experimente wurden mit 20 μM GTB und UDP-Gal in acht verschiedenen Konzentrationen von 50-2000 μM in 50 mM Bis-Tris- d_{19} , 50 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME-d}_6$, 200 μM TSP- d_4 und D_2O durchgeführt. Die Spektren wurden mit einem Lb von 3 Hz prozessiert. Die beiden Dubletts von H1_R und H5_U überlappten und gaben ein Signal mit zwei Maxima, die als H1_R/H5_U a und b gekennzeichnet und ausgewertet wurden. Die Signale H1_R/H5_U a (◆) und H4_R (◆) der Probe mit 200 μM UDP-Gal wurden aufgrund der Abweichung nicht in die Analyse einbezogen und das Signal H4_R der Probe mit 50 μM UDP-Gal war nicht auswertbar. Die K_D-Werte der auswertbaren Protonen sind mit Standardfehler und dem R² der Kurvenanpassung angegeben. Aus der roten Kurve wurde der in Tabelle 3.9 angegebene K_D-Wert erhalten.

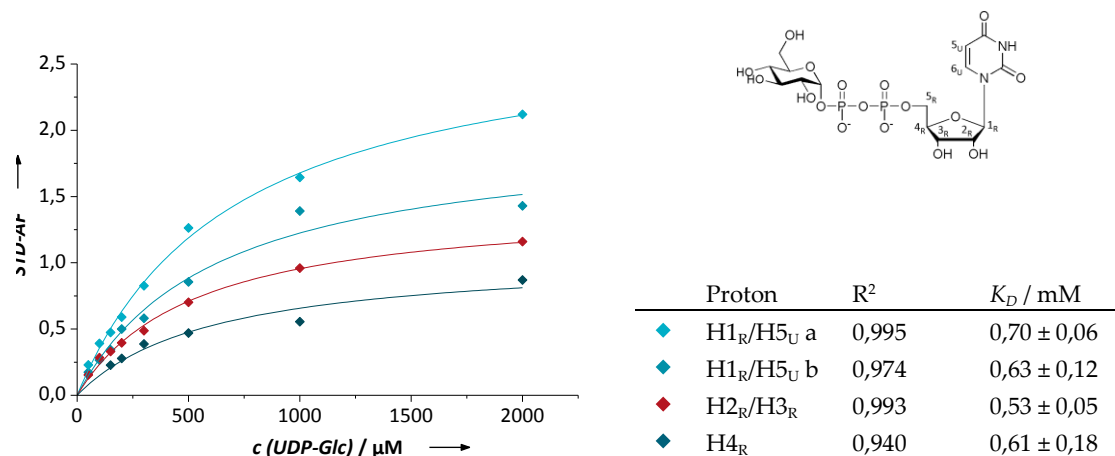


Abbildung A 12: Bindungsisothermen der Interaktion von UDP-Glc und GTB bei 298 K und pH 6,7.

STD-NMR-Experimente wurden mit 20 μM GTB und UDP-Glc in acht verschiedenen Konzentrationen von 50-2000 μM in 50 mM Bis-Tris- d_{19} , 50 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME-d}_6$, 200 μM TSP- d_4 und D_2O durchgeführt. Die Spektren wurden mit einem Lb von 3 Hz prozessiert. Die beiden Dubletts von H1_R und H5_U überlappten und gaben ein Signal mit zwei Maxima, die als H1_R/H5_U a und b gekennzeichnet und ausgewertet wurden. Signal H4_R der Proben mit 50 und 100 μM UDP-Glc konnte nicht ausgewertet werden. Die K_D-Werte der auswertbaren Protonen sind mit Standardfehler und dem R² der Kurvenanpassung angegeben. Aus der roten Kurve wurde der in Tabelle 3.9 angegebene K_D-Wert erhalten.

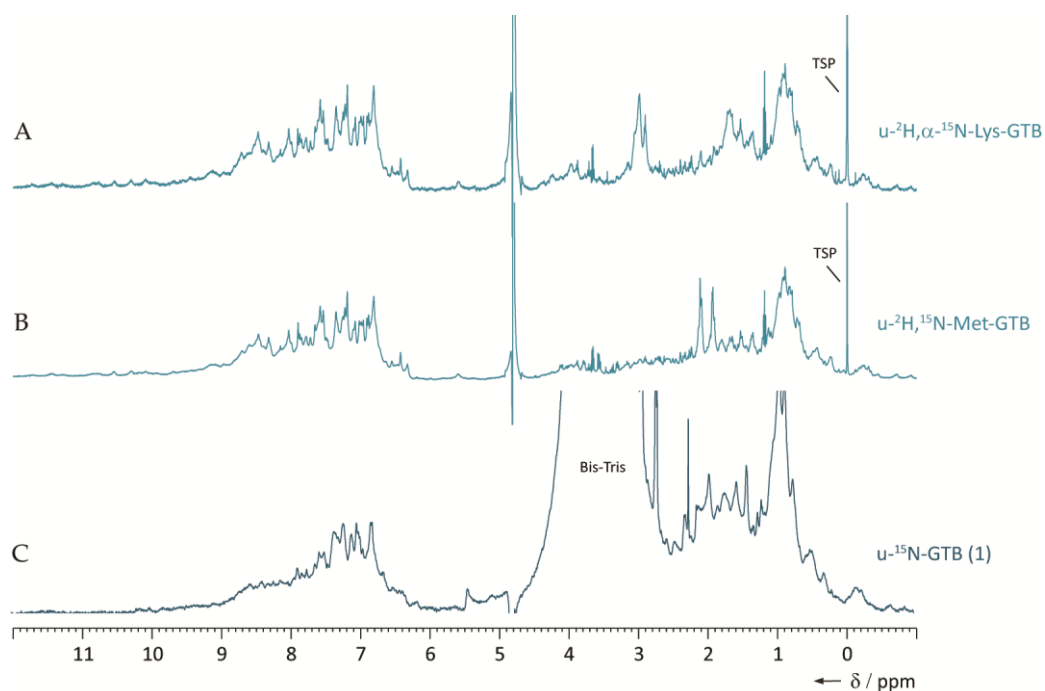


Abbildung A 13: 1D- ^1H -NMR-Spektren von isotopenmarkierter GTB. Alle Spektren wurden mit Wasserunterdrückung an einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 298 K und pH 6,7 aufgenommen. Aufnahmeparameter s. 2.9.4. **(A)** 180 μM $u\text{-}^2\text{H}, \alpha\text{-}^{15}\text{N}$ -Lys-GTB in 25 mM Na-P-Puffer, 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\beta\text{-ME-d}_6$, 100 μM TSP- d_4 und 5 % D_2O . **(B)** 430 μM $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Met-GTB, Puffer wie (A). **(C)** 200 μM $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB in 50 mM Bis-Tris, 100 mM NaCl, 1 mM $\beta\text{-ME}$ und 10 % D_2O .

Publikationen

Originalartikel

C. Rademacher, J. Landström, N. Sindhuwinata, M. M. Palcic, G. Widmalm, T. Peters (2010). NMR-based exploration of the acceptor binding site of human blood group B galactosyltransferase with molecular fragments. *Glycoconjugate J*, 27:349-358.

N. Sindhuwinata, E. Munoz, F. J. Munoz, M. M. Palcic, H. Peters, T. Peters (2010). Binding of an acceptor substrate analog enhances the enzymatic activity of human blood group B galactosyltransferase. *Glycobiology*, 20:718-723.

K. Schaefer, J. Albers, N. Sindhuwinata, T. Peters, B. Meyer (im Druck). A new concept for glycosyltransferase inhibitors: Non-ionic mimics of the nucleotide donor of the human blood group B galactosyltransferase. *ChemBioChem*, x:x-x.

R. Jørgensen, L. L. Grimm, N. Sindhuwinata, T. Peters, M. M. Palcic (angenommenes Manuskript). A novel glycosyltransferase inhibitor from a molecular fragment library screen simultaneously interferes with metal ion and substrate binding. *Angew Chem*

K. Schaefer, N. Sindhuwinata, T. Peters, B. Meyer (in Bearbeitung). A Non-Ionic Inhibitor with High Specificity for the UDP-Gal Donor Binding Site of Human Blood Group B Galactosyltransferase (GTB).

N. Sindhuwinata, E. Munoz, L. L. Grimm, M. M. Palcic, T. Peters (in Bearbeitung). A comprehensive thermodynamic study of human blood group B galactosyltransferase.

Vorträge

N. Sindhuwinata, H. Peters, T. Köhli, E. Munoz, T. Weimar, M. M. Palcic, T. Peters (2009). Novel aspects of the catalytic mechanism of human blood group B galactosyltransferase from NMR and microcalorimetry. *20th International Symposium on Glycoconjugates, San Juan, Puerto Rico*

N. Sindhuwinata (2007). Allosteric Effects upon Acceptor Binding Detected with NMR. *1st Meeting on Structure, Dynamics and Function of Human Glycosyltransferases, Victoria, Kanada*

Poster

N. Sindhuwinata, R. Schönherr, H. Peters, T. Biet, T. Peters (2010). Investigations into a 69 kDa dimeric Glycosyltransferase: Isotope Labeling and NMR studies. 32. *Discussion Meeting and Joint Benelux/ German MR Conference, Münster; Joint EUROMAR 2010 and 17th ISMAR Conference, Florenz, Italien*

N. Sindhuwinata, H. Peters, T. Köhli, E. Munoz, T. Weimar, M. M. Palcic, T. Peters (2009). Novel aspects of the catalytic mechanism of human blood group B galactosyltransferase from NMR and microcalorimetry. 20th *International Symposium on Glycoconjugates, San Juan, Puerto Rico*

C. Rademacher, J. Landström, N. Sindhuwinata, M. M. Palcic, G. Widmalm, T. Peters (2009). Fragment-Based Screening against Human Blood Group B Galactosyltransferase. 31st *Discussion Meeting of the GDCh: Magnetic Resonance in Chemistry and Materials Research, Dresden*

C. Rademacher, B. Langpap, J. Landström, N. Sindhuwinata, T. Peters (2009). NMR Screening of Viruses and Virus Like Particles. 50th *Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, Pacific Grove, Kalifornien*

N. Sindhuwinata, H. Peters, T. Biet, T. Köhli, E. Munoz, T. Weimar, M. M. Palcic, T. Peters (2008). Influence of Acceptor-Substrate Binding on the Activity of Human Blood Group B Galactosyltransferase. 24th *Interantional Carbohydrate Symposium, Oslo, Norwegen*; 30th *Trinational Annual Discussion Meeting of the GDCh: Magnetic Resonance in Biology and Chemistry, Regensburg*

N. Sindhuwinata, E. Munoz, H. Peters, T. Biet, M. M. Palcic, T. Peters (2007). NMR investigations into the mechanism of human blood group B galactosyltransferase. 14th *European Carbohydrate Symposium, Lübeck*; 29th *Annual Discussion Meeting of the GDCh, Göttingen*

Im Rahmen der Dissertation betreute Abschlussarbeiten

S. Weißbach (2011). Mechanistische Studien an Mutanten der humanen Blutgruppen AB0 Glycosyltransferasen [Masterarbeit]. Institut für Chemie, Universität zu Lübeck. (vorbereitende Arbeiten)

J. U. Schweiger (2011). NMR-Studien zur Bindung eines Akzeptorsubstratanalogons an die humane Blutgruppe B Galactosyltransferase [Bachelorarbeit]. Institut für Chemie, Universität zu Lübeck/ Georg August Universität Göttingen.

L. L. Grimm (2010). Zur Interaktion kleiner Moleküle mit humanen Blutgruppen AB0 Glycosyltransferasen [Masterarbeit]. Institut für Chemie, Universität zu Lübeck.

E.-C. Wamhoff (2010). Humane Blutgruppe B Galactosyltransferase: smFRET-Studien zur Kon-

formationsdynamik [Bachelorarbeit]. Institut für Chemie, Universität zu Lübeck.

S. Polk (2010). Charakterisierung der Bindung von 3-Amino-3-desoxy-Hexopyranosen an die humane Blutgruppengalaktosyltransferase B (GTB) [Diplomarbeit]. Institut für Chemie, Universität zu Lübeck/ Georg August Universität Göttingen.

F. J. Muñoz (2008). Síntesis quimioenzimática de glicoconjugados y estudio cuantitativo de su implicación en procesos de reconocimiento molecular [Doktorarbeit (Kapitel 5)]. Organic and Pharmaceutical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, University Complutense of Madrid, Spanien/ Kapitel 5 wurde am Institut für Chemie, Universität zu Lübeck angefertigt.

Im Rahmen der Dissertation betreute Praktika (8-12 Wochen)

R. Schönherr (2009). NMR-basierte Untersuchung der Manganbindung der humanen Blutgruppe B Galactosyltransferase. Institut für Chemie, Universität zu Lübeck.

M. Kock (2008/2009). Surface Plasmon Resonance Experiments on Human Blood Group B Galactosyltransferase. Institut für Chemie, Universität zu Lübeck.

I. Schmudde (2007/2008). Synthese des B-Trisaccharids und Untersuchung der Bindung durch Noroviren mit STD-NMR-Spektroskopie. Institut für Chemie, Universität zu Lübeck.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei all denjenigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich fortwährend unterstützt haben. Mein ganz besonderer Dank gilt:

- **Prof. Dr. Thomas Peters** für das hochinteressante Thema, unzählige wertvolle und ideenreiche Diskussionen, seine stetige Unterstützung sowie eine hervorragende Betreuung, die es mir ermöglicht hat, mich fachlich und persönlich weiterzuentwickeln.
- **Prof. Dr. C. G. Hübner** für die Erstellung des Zweitgutachtens sowie **Prof. Dr. E. Hartmann** für die Bereitschaft, den Vorsitz des Prüfungsausschusses zu übernehmen.
- **Prof. Dr. Monica M. Palcic** vom Carlsberg Laboratorium für ihren unermüdlichen Einsatz für dieses Projekt, viele inspirierende Diskussionen, ihre Hilfsbereitschaft, die Möglichkeit an ihrem Institut den radiochemischen Assay zu erlernen und die Bereitstellung der UDP-Hexanolamin-Sepharose.
- **Dr. Hanne Peters** für ihre Unterstützung und die Beantwortung zahlreicher Fragen rund um die GTB-Präparation, **Dr. Thorsten Biet** für seine Hilfe beim Umgang mit dem NMR-Spektrometer, **PD Dr. Thomas Weimar** für seine Ratschläge und die Einweisung in ITC- und SPR-Experimente und **Prof. Dr. Karsten Seeger** für viele ideenreiche Diskussionen.
- **Dr. Frank Löhner** von der Goethe Universität Frankfurt für seine Hilfe bei der Aufnahme der Tripelresonanzexperimente und **Prof. Dr. Volker Dötsch** für die Messzeit an den NMR-Spektrometern in Frankfurt.
- **Thies Köhli** für seine Unterstützung bei den ITC-Experimenten, der GTB-Synthese sowie für die Einweisung in das Biacore-System und **Wilfried Hellebrandt** für die Synthese der UDP-Hexanolamin-Sepharose, des H-Dis-octyl und des 3DD.
- **Prof. Dr. Beat Ernst** von der Universität Basel für die Synthese von UDP- α -D-Galactose, **Prof. Dr. Lothar Elling** von der RWTH Aachen für die Bereitstellung des UDP-6-biotinyl-Gal und **Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld**, Institut für Biochemie, für das Ausleihen des VP-ITC.
- **Robert Schönherr** für die Durchführung der STD-NMR-Experimente und seinen Beitrag zu den NMR-Experimenten mit $u\text{-}^{15}\text{N}$ -GTB und Mn^{2+} während seines Praktikums.
- **Dr. Javier Munoz, Sophie Weißbach, Sabrina Polk, Eike Wamhoff, Julietta Schweiger** und **Malte Kock**, die während ihrer Praktika bzw. Abschlussarbeiten weitere Aspekte dieses Themas beleuchtet und dadurch zum Fortgang beigetragen haben.
- **Lena L. Grimm** für die Korrektur des Manuskripts, eine tolle Zusammenarbeit und die Weiterführung dieses Projekts.
- **Brigitte Fiege** für viele gemeinsame schöne und erkenntnisreiche Konferenzreisen und zahlreiche unterstützende Diskussionen.
- allen weiteren derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern aus dem Institut für Chemie für ih-

re stetige Hilfsbereitschaft und die tolle und motivierende Arbeitsatmosphäre: **Dr. Bärbel Blaum, Christiane Blunk, Mailin Döpkins, Anika Gallinger, Elisabeth Hölting, Sarah Leineweber, Kirsten Petersohn, Dr. Rosa Pulz, Dr. Christoph Rademacher, Sarah Schöning und Anna Tomhardt.**

- der **Studienstiftung des deutschen Volkes** für die finanzielle und ideelle Förderung meines Promotionsvorhabens.