Identifizierung und Charakterisierung der ersten Histidin-Protein-Phosphatase in Mammalia

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

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jan Hermesmeier
aus Salzkotten

Marburg/Lahn 2000

Vom Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 27.6.2000 angenommen.

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Susanne Klumpp
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Dr. Josef Krieglstein

Tag der mündlichen Prüfung war der 28.6.2000.

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die diese Arbeit durch Rat und Tat sowohl in fachlichen als auch privaten Belangen überhaupt erst möglich gemacht haben:

Susanne Klumpp, deren Tür immer offen stand, und die es vermag zu leiten ohne einzuschränken.

Dagmar Selke, von deren Erfahrung ich in den drei Jahren profitieren durfte, und die maßgeblich an der guten Atmosphäre im Arbeitskreis beteiligt war.

Andreas Grummann, mit dem ich vom ersten Tag an einen regen Austausch in Sachen Wissenschaft und Humor unterhalten konnte.

Karin Rose, die immer hilfsbereit war und ihre eigenen Belange stets zurückstellte, wenn sie ihren Kollegen helfen konnte.

Allen Verwandten, Freunden und Kollegen, die mich in den Jahren meiner Promotion unterstützt und so zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

1 **Abkürzungen** 9

2 **Einleitung** 10

3 **Materialien** 19

3.1 Chemikalien und Proteine 19

3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien 19

3.3 Puffer und Lösungen 21
3.3.1 Herstellung der Gewebeextrakte 21
3.3.2 Phosphatase-Aktivitätstests 22
3.3.3 Säulenchromatographische Reinigung 22
3.3.4 Proteinbestimmung 22
3.3.5 Elektrophorese einschließlich Proteinfärbung 23
3.3.6 Semidry-Blotting 24
3.3.7 Western-Blot 24
3.3.8 Antikörperreinigung 24

4 **Methoden** 25

4.1 Herstellung der Gewebeextrakte 25
4.1.1 Herstellung des Kaninchenleberextrakts 25
4.1.2 Herstellung der Rattengewebeextrakte 25

4.2 Phosphatase-Aktivitätstests 26
4.2.1 Test auf Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität 26
4.2.1.1 [^{32}P]-Phosphorylierung von CheA 26
4.2.1.2 Messung der Histidin-Phosphatase-Aktivität 27
4.2.2 Test auf Serin/Threonin-Protein-Phosphatase-Aktivität 28
4.2.3 Test auf p-Nitrophenylphosphat-Dephosphorylierung 28

4.3 Test auf Protease-Aktivität 29

4.4 Säulenchromatographische Aufreinigung der Histidin-Protein-Phosphatase 29
4.4.1 Anionenaustausch-Chromatographie 30
4.4.2 Gelfiltration 30

4.4.3 Affinitäts-Chromatographie....31

4.5 Nicht in das Reinigungsschema aufgenommene Verfahren....31
4.5.1 Säulenchromatographische Verfahren....31
4.5.2 Ethanol-Fällung....32

4.6 Proteinkonzentrierung....32
4.6.1 Methanol/Aceton-Fällung....32
4.6.2 Ammoniumsulfat-Fällung (90 %)....33
4.6.3 Ultrafiltration....33

4.7 Proteinbestimmung....34
4.7.1 Bio-Rad-Methode....34
4.7.2 Lowry-Verfahren....34
4.7.3 Vergleich nach SDS-PAGE....35

4.8 Elektrophorese einschließlich Proteinfärbung....35
4.8.1 SDS-Gelelektrophorese....35
4.8.2 Native Gelelektrophorese....36
4.8.3 Coomassie-Färbung....37
4.8.4 Färbung mit kolloidalem Coomassie....37
4.8.5 Silber-Färbung....38

4.9 Semidry-Blotting....38

4.10 Immunologische Detektionsverfahren....39
4.10.1 Western-Blot....39
4.10.2 Dot-Blot....40

4.11 Reinigung der Antikörper gegen Peptide....40
4.11.1 Herstellung der Antigen-Säule....40
4.11.2 Chromatographische Reinigung der Antikörper....41

4.12 Dünnschicht-Chromatographie....42

4.13 Nachweis von Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität im nativen Elektrophorese-Gel....42

5 **Ergebnisse**....43

5.1 Entwicklung des Histidin-Phosphatase-Aktivitätstests....43

5.2 [^{32}P]-Phosphorylierung von CheA....45

5.3 Charakterisierung des Histidin-Phosphatase-Aktivitätstests 47
5.3.1 Identifizierung von Phosphat als Reaktionsprodukt 47
5.3.2 Zeitabhängigkeit der [^{32}P]CheA-Dephosphorylierung 48
5.3.3 Linearität des Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivitätstests 49
5.3.4 Untersuchung anderer Phosphatasen auf [^{32}P]CheA-Dephosphorylierungs-Aktivität 50

5.4 Reinigung der Histidin-Protein-Phosphatase 51
5.4.1 Verteilung der Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität 51
5.4.2 Ammoniumsulfat-Fällung (zur Konzentrierung vor der Gelfiltration) 51
5.4.3 Säulenchromatographische Aufreinigung 52
5.4.3.1 SOURCE 30Q (Anionenaustausch-Chromatographie) 54
5.4.3.2 Superdex 75 (Gelfiltration) 55
5.4.3.3 Blue Sepharose (Affinitäts-Chromatographie) 57
5.4.4 Bilanzierung 59
5.4.5 Nachweis von Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität im nativen Elektrophorese-Gel 61

5.5 Nicht in das Reinigungsschema aufgenommene Verfahren 62
5.5.1 Säulenchromatographische Verfahren 62
5.5.1.1 Heparin Sepharose (Affinitäts- und Kationenaustausch-Chromatographie) 62
5.5.1.2 Mono S (Kationenaustausch-Chromatographie) 62
5.5.2 Ethanol-Fällung 63

5.6 Charakterisierung der Histidin-Protein-Phosphatase 64
5.6.1 Temperaturabhängigkeit 64
5.6.2 Substratabhängigkeit 68
5.6.3 pH-Abhängigkeit 69
5.6.4 Einfluss zweiwertiger Kationen 71
5.6.5 Einfluss einwertiger Kationen 73
5.6.6 Einfluss gebräuchlicher Phosphatase-Inhibitoren 74
5.6.7 Einfluss von Nukleotiden 75
5.6.8 Einfluss von diversen Reagenzien 76
5.6.9 Substratspezifität 76

5.7 Sequenzbestimmung der Histidin-Protein-Phosphatase 78

5.8 Produktion polyklonaler Antikörper gegen Peptide der Histidin-Protein-Phosphatase-Sequenz 81

5.9 Reinigung der Antikörper 82

5.10 Charakterisierung der Antikörper 83

5.11 Expression der humanen Histidin-Protein-Phosphatase 84

5.12 Charakterisierung der rekombinanten humanen Histidin-Protein-Phosphatase 85
5.12.1 Allgemein 85
5.12.2 Temperaturabhängigkeit 86

5.13 Gewebeverteilung der Histidin-Protein-Phosphatase 87
5.13.1 Bestimmung auf Proteinebene 87
5.13.2 Bestimmung auf Aktivitätsebene 88
5.13.3 Vergleich von Proteinmenge und Aktivität 88

6 **Diskussion** 90

6.1 Die Histidin-Protein-Phosphatase 90

6.2 Ausblick 99

7 **Zusammenfassung** 101

8 **Literatur** 102

Anhang 113

Veröffentlichungen 113

Teilnahme an Kongressen 114

Lebenslauf 115

1 Abkürzungen

2-ME	2-Mercaptoethanol
Aa	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BS	Blue Sepharose
BSA	Rinderserumalbumin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
IAA	2-Iodacetamid
NDPK	Nukleosiddiphosphat-Kinase
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Protein-Phosphatase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
S 30Q	SOURCE 30Q
SD 75	Superdex 75
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV	Säulenvolumen
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
TV	Testvolumen
VF	Verdünnungsfaktor

Weitere Abkürzungen sind in [1] zu finden.

2 Einleitung

Die reversible Protein-Phosphorylierung spielt bei den meisten zellulären Signalübertragungswegen eine wichtige Rolle. Ausgehend vom vollständig aufgeklärten Genom von *Caenorhabditis elegans* [2] enthält die Erbmasse höherer Eukaryonten rund 1.200 Kinase- (Phosphorylierung) und 200 Phosphatasegene (Dephosphorylierung). Auf Proteinebene ist aufgrund von Splicingvarianten sogar von rund 2.000 Kinasen und 1.000 Phosphatasen auszugehen [3]. Etwa 30 % aller Proteine erfahren eine mehrfache Phosphorylierung und Dephosphorylierung [4]. Dabei ergibt sich der jeweilige Phosphorylierungsgrad eines bestimmten Proteins aus dem Zusammenspiel von Protein-Kinase und Protein-Phosphatase. Da diese Enzyme durch Faktoren wie regulatorische und lokalisierende Untereinheiten sowie Inhibitoren und Aktivatoren beeinflusst werden, ergibt sich ein äußerst komplexes System. Die oftmals gleich an mehreren Aminosäuren eines Proteins stattfindende Bildung oder Hydrolyse von Phosphorsäureestern resultiert in einer Konformationsänderung, welche die Eigenschaften des betroffenen Proteins, z. B. Enzymaktivität oder Bindungsverhalten, in vielfacher Hinsicht modifizieren kann. Dabei sind die anfänglichen Dogmen, Kinasen würden ein Protein aktivieren, Phosphatasen dagegen inhibieren, und nur Kinasen, nicht aber Phosphatasen unterlägen eine Regulation, aufgrund der heutigen Kenntnisse so nicht mehr haltbar.

Die Geschichte der reversiblen Protein-Phosphorylierung hat ihren Ausgangspunkt in der 1959 erfolgten Reinigung der stoffwechselregulierenden Phosphorylase-Kinase – einer Serin-Kinase – durch Krebs and Fischer [5]. Diese Arbeit wurde 1992 auch mit dem Nobelpreis gewürdigt. Nach einer Reihe von weiteren Serin-Kinasen wie der cAMP-abhängigen Protein-Kinase wurde 1979 mit der Isolierung der ersten Tyrosin-Kinase [6] ein neues Prinzip der reversiblen Protein-Phosphorylierung entdeckt. Seit dem Ende der siebziger Jahre explodiert die Zahl der gefundenen Kinasen. Dies liegt im Wesentlichen daran, dass die Serin/Threonin-Kinasen zwei und die Tyrosin-Kinasen nur einer Genfamilie entstammen. Sie enthalten hoch konservative katalytische Domänen [7], womit die Homologieklonierung zu einem mächtigen Werkzeug wird. Die Existenz der dazugehörigen Phosphatasen wurde zwar schon früh erkannt [8], trotzdem standen sie lange im Schatten der Kinasen. Erst Ende der achtziger

Jahre nahmen die auf Phosphatasen konzentrierten Studien zu. Es zeigte sich, dass diese Enzymklasse in der Regulation zellulärer Vorgänge eine den Kinasen ebenbürtige Rolle spielt. Mittlerweile ist sogar eine Reihe von Adapterproteinen bekannt, mit deren Hilfe Kinase und Phosphatase gleichzeitig an ihrem Substrat angedockt werden [9]. Die Vielfalt und Komplexizität der Phosphatasen übersteigt die der Kinasen mittlerweile bei weitem.

Aufgrund ihrer wichtigen Rolle in der Signaltransduktion sind die Phosphatasen in den letzten Jahren verstärkt Gegenstand der medizinisch-pharmazeutischen Forschung. Die bislang resultierenden Erkenntnisse haben bereits Eingang in die klinische Praxis gefunden. Mittlerweile etabliert ist beispielsweise die Serumbestimmung der als Tumormarker dienenden prostataspezifischen sauren Phosphatase (Prostatakarzinom) oder plazentaren alkalischen Phosphatase (Hoden- und Ovarialkarzinome). Eine Reihe von Onkogenen codieren Phosphatasen [10, 11], viele Krankheiten stehen mit Mutationen von Phosphatase-genen in direktem Zusammenhang [11], und erste Phosphataseinhibitoren wie Fostriecin [12] werden zur Zeit in klinischen Tests gegen diverse Krebserkrankungen und bei Diabetes mellitus eingesetzt [11].

Die bislang in Eukaryonten gefundenen reversiblen Protein-Phosphorylierungsvorgänge finden praktisch ausschließlich an den Aminosäuren Serin/Threonin (über 99 %) und Tyrosin (0,1 %) statt [4, 13]. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass säurelabile Aminosäureamidate wie Histidin-Phosphate durch die übliche Phosphoaminosäureanalytik (saure Hydrolyse der Proteine) zerstört werden. Außerdem stehen im Gegensatz zu Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphaten für Phospho-Histidin keine Antikörper zur Verfügung, da die Histidin-Phosphate im zu immunisierenden Tier schnell hydrolysiert werden. In Prokaryonten dagegen sind Histidin und auch Aspartat Gegenstand von Protein-Phosphorylierung und Dephos-phorylierung. Diese Abläufe und die sie katalysierenden Enzyme sind wesentlicher Bestandteil des sogenannten Zweikomponentensystems, welches in den letzten Jahrzehnten Ziel intensiver Forschungen war. Mit Hilfe dieses Regelsystems reagiert ein Prokaryont auf so verschiedene Umweltparameter wie osmotischer Druck, Temperatur, pH-Wert oder Anwesenheit von Nahrungs- oder Giftstoffen. In Abbildung 1 ist stellvertretend die besonders

gut erforschte Chemotaxis von *Escherichia coli* beschrieben [14–18]. Die Regelkreise für andere Messgrößen bzw. die in anderen prokaryontischen Organismen sind analog aufgebaut.

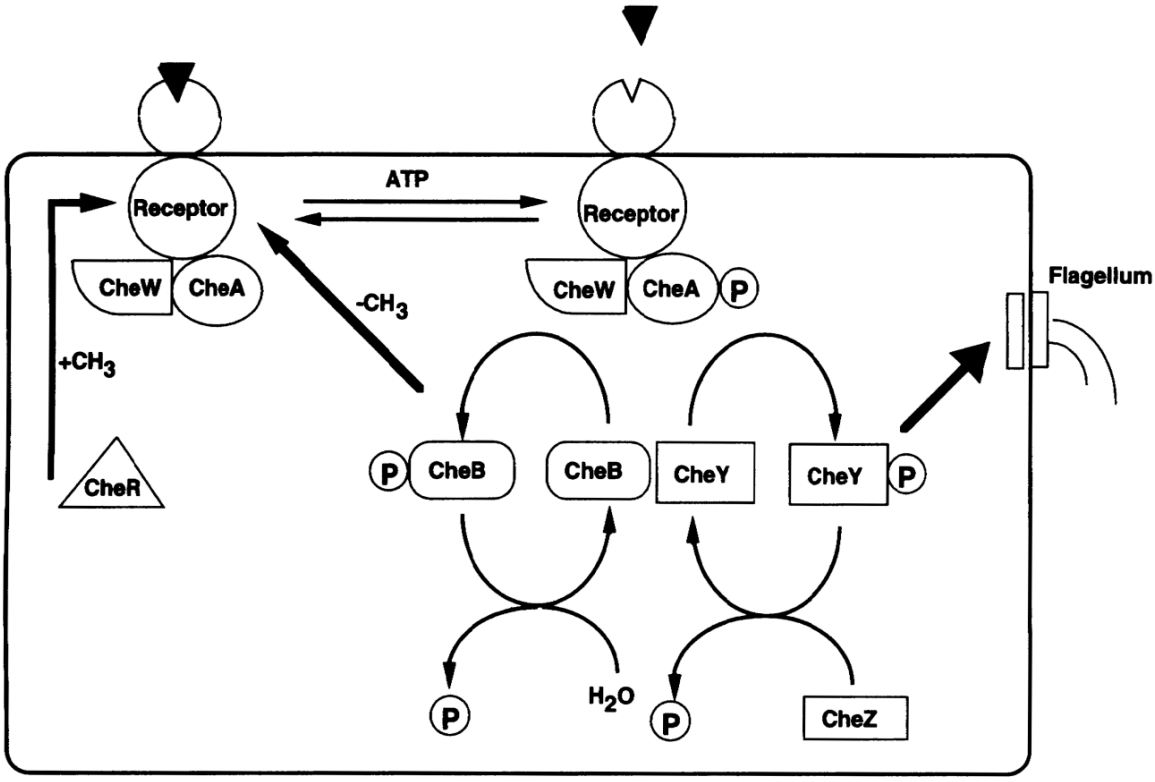


Abb. 1: Das Zweikomponentensystem am Beispiel der Chemotaxis von *E. coli*. Bei Abwesenheit des Liganden (Nährstoff) aktiviert der Rezeptor CheW-vermittelt die Histidin-Autokinase CheA, die sich an Histidin$_{48}$ phosphoryliert. CheA-P transferiert das Phosphat anschließend auf ein Aspartat der sogenannten Antwortregulator-Proteine CheB und CheY. Das so aktivierte CheY interagiert mit Flagellumproteinen und bewirkt eine Häufung von zufälligen Richtungswechseln des Bakteriums. Die Inaktivierung von CheY-P geschieht durch die Phosphatase CheZ. Das zweite Antwortregulator-Protein CheB sorgt für eine Demethylierung des Rezeptors, der so weniger aktivierend auf CheA einwirken kann (negatives Feedback, Adaption an niedrige Ligandenspiegel). CheB-P hat eine Autophosphatase-Aktivität, benötigt also keine Phosphatase zur Deaktivierung. Als Gegenspieler fungiert die Methyltransferase CheR, die via Rezeptormethylierung dessen CheA-aktivierende Eigenschaft erhöht (Adaption an hohe Ligandenspiegel). Die Abbildung ist aus [19] entnommen.

Die Phosphatasen und Kinasen der Zweikomponentensysteme erfreuen sich zur Zeit einer Beachtung seitens der pharmazeutischen Industrie. Bakterielle Strukturen, die nicht oder nur

in einer stark veränderten Form im Säuger anzutreffen sind, stellten schon immer einen guten Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer antibiotischer Mechanismen dar (z. B. Gyrasen und Ribosomen). Ein wirklich neues antibiotisches Prinzip wird in der Zukunft immer nötiger werden, da die Therapeuten schon jetzt mit einer sich verschlechternden Resistenzsituation zu kämpfen haben.

Die dogmatische Annahme, reversible Protein-Phosphorylierung in Eukaryonten finde nur an Serin, Threonin und Tyrosin, die in Prokaryonten hingegen nur an Histidin und Aspartat statt, geriet in den letzten Jahren ins Wanken. Die prokaryontischen Histidin-Kinasen und Anwortregulator-Proteine enthalten eine Reihe konservativer Domänen [19, 20]. Diese machte man sich nicht nur für die Suche nach weiteren prokaryontischen Zweikomponenten-system-Proteinen zu nutze, die Methode der Homologieklonierung führte inzwischen auch zu einigen Genen in unterschiedlichen höheren Organismen. Beschränkt sich das Wissen bei dem besser als Brotschimmel bekannten Pilz *Neurospora crassa* weitgehend auf das bloße Vorhandensein einiger Kinasedomänen im Genom [19], so gehen die Erkenntnisse bei *Dictyostelium discoideum* weiter. In diesem Schleimpilz wurden Kinase- und Antwort-regulator-Domänen im *dokA*-Gen gefunden. Mittels *dokA*-Mutanten konnte eine Rolle im Osmolaritätsregelkreis nachgewiesen werden [21]. Es wurde auch schon von einem eukaryontischen Zweikomponentensystem in einer Pflanze berichtet. Das *etr1*-Gen von *Arabidopsis thaliana* enthält sowohl Kinase- als auch Antwortregulator-Domänen, die codierten Proteine sind Bestandteil des Signalweges des für Wachstums- und Reifungs-prozesse wichtigen Pflanzenhormons Ethylen [22]. Noch weitreichender sind die Informationen über die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Gleich drei verschiedene Arbeits-gruppen fanden Stellen im Genom, die sämtlich Kinase- und teilweise auch Antwortregulator-Domänen aufweisen. Die von den Genen *sln*1 [23], *ssk*1 [24] und *skn*7 [25] stammenden Proteine sind Bausteine des Osmolaritätsmesssystems dieses Organismus. Inzwischen verdichten sich die Hinweise, dass sowohl *etr*1 als auch *sln*1 und *ssk*1 an einer Aktivierung des wichtigen MAP-Kinase-Signalwegs beteiligt sind. Dieser setzt die extrazelluläre Anwesenheit von wichtigen Wachstumshormonen wie EGF in eine Zellantwort um. Zusätzlich konnte ein anderer Arbeitskreis die Isolierung einer nicht von den drei erwähnten

Genen codierten Histidin-Protein-Kinase berichten [26]. Dieses Protein wurde unter Verwendung von Histon als Substrat gefunden. Dieses nukleäre Protein schien geeignet, da zuvor von phosphorylierten Histidinresten in Histon berichtet worden war [27, 28]. Eine Reihe weiterer Eukaryonten weisen ebenfalls Homologien zu den bakteriellen Zweikomponentensystem-Kinasen und Antwortregulator-Proteinen innerhalb ihres Genoms auf. Mit Ausnahme der erwähnten Hefe-Kinase wurden jedoch alle diese Untersuchungen überwiegend auf Genebene durchgeführt. Studien auf Proteinebene fanden nur begrenzt, auf Aktivitätsebene gar nicht statt.

Inzwischen liegt auch eine nicht unerhebliche Zahl von Publikationen vor, die von eukaryontischer Histidin-Phosphorylierung berichten, ohne dass die daran beteiligten Proteine irgendwelche Homologien zu Zweikomponentensystem-Proteinen aufweisen. Hier sind zunächst einige Stoffwechselenzyme wie die Succinyl-CoA-Synthetase, die Glucose-6-Phosphatase [29] oder die ATP-Citrat-Lyase [30] zu nennen. Diese Enzyme werden im Laufe der von ihnen katalysierten Reaktion an einem Histidin phosphoryliert. Es handelt sich aber in allen Fällen um ein Intermediat. Nach dem heutigen Stand der Kenntnisse ist nicht davon auszugehen, dass diese Phosphorylierungen unter physiologischen Bedingungen stabil sind oder gar einer Regulation dienen.
Darüber hinaus gibt es aber in Eukaryonten eine Reihe von Histidin-Phosphorylierungen durchlaufende Proteine, bei denen die Phosphorylierung nicht bloß intermediären Charakter hat. Ein prominentes Beispiel ist der über G-Proteine wirkende Signalweg. Das trimere G-Protein besteht nicht immer aus den gleichen α-, β- und γ-Untereinheiten. Vielmehr codiert das Genom eine ganze Reihe entsprechender Proteine, sodass jedes G-Protein nach dem Baukastenprinzip aus speziellen, dem Zelltyp und der Funktion gemäßen α-, β- und γ-Untereinheiten zusammengesetzt ist. Nun wurde ein Protein gefunden, welches mittels GTP, aber auch ATP an einem Histidin phosphoryliert wird. Dieses Protein wurde aufgrund spezifischer Antikörper gegen eine konservative Sequenz der β-Untereinheiten als solche identifiziert [31]. Die Phosphorylierung läuft nur bei einem vollständigen Trimer und in Anwesenheit der Zellmembranfraktion ab, was auf eine membranständige Kinase hindeutet.

Das Histidin-Phosphat für sich alleine ist stabil, in Anwesenheit einer GDP-gebundenen α-Untereinheit erfolgt jedoch in Sekunden eine Dephosphorylierung unter Bildung einer GTP-assoziierten α-Untereinheit. Dieses Protein konnte mittlerweile in vielen höheren Eukaryonten nachgewiesen werden, z. B. im Inselapparat der Ratte und in menschlichen Leukämiezellen [31]. Die dazugehörige Kinase bzw. Phosphatase ist jedoch weiterhin unbekannt. Die für die Aktivierung eines G-Proteins notwendige Bindung von GTP an die α-Untereinheit wird nach den bisherigen Erkenntnissen nur durch einen extrazellulären Liganden via Bindung an ein G-Protein-gekoppeltes Rezeptorprotein ermöglicht. Die oben erwähnten Befunde bedeuten möglicherweise die Existenz eines bisher unbekannten Mechanismus zur intrazellulären Aktivierung eines G-Proteins.

Eine Proteingruppe mit Histidin-Autokinase-Aktivität sind die Nukleosiddiphosphat-Kinasen (NDPK). In ihrer NDPK-Funktion sorgen die Proteine für ein Gleichgewicht der verschiedenen Nukleosidtriphosphate, indem sie beispielsweise folgende Reaktion katalysieren:

$$ATP + GDP \rightarrow ADP + GTP$$

(allgemein: (d)NTP + (d)NDP → (d)NDP + (d)NTP)

Dabei entsteht ein Histidin-phosphoryliertes Intermediat, welches isoliert in Abwesenheit von Mg^{2+} über längere Zeit stabil ist [32]. Die phosphorylierte NDPK ist aber auch in der Lage, das Phosphat auf eine Aminosäure im katalytischen Zentrum verschiedener anderer Enzyme zu übertragen. Als Substrate für diese Transferase-Aktivität dienen unter anderem die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase [33] und die ATP-Citrat-Lyase [30]. Kommt der Histidin-Autophosphoylierung im Zusammenhang mit der NDPK-Aktivität wahrscheinlich keine regulatorische Bedeutung zu, so sieht dies für andere bekannte Funktionen dieses Proteins, die meist nicht mit der NDPK-Aktivität korrelieren, ganz anders aus. Die *nm23*-Genfamilie codiert eine Reihe von NDPKs, von denen unter anderem das Nm23-H1 als Tumorsuppressor fungiert. In diversen Tumorgeweben wurde eine Korrelation zwischen Apoptose und Expression dieses Proteins gefunden [34], Melanomzellen wiesen deutlich geringere Konzentrationen der NDPK auf als ihre gesunden Kontrollen [35], und mit

Nm23-H1-cDNA transfizierte Karzinomzellen zeigten ein signifikant reduziertes Metastasepotential [36–39]. Diese Suppressorfunktion hängt nach den momentanen Erkenntnissen unmittelbar mit der Transferase-Aktivität zusammen, da beispielsweise in humanen Neuroblastomzellen Enzymmutanten gefunden wurden, die nur noch NDPK-, nicht aber Transferase-Aktivität zeigten [40].

In der Literatur finden sich auch Berichte über ein thrombozytäres Adhäsionsmolekül, das 140 kDa große P-Selektin. Werden die Thrombozyten mit Thrombin oder Kollagen aktiviert, so kommt es zu einer reversiblen Histidin-Phosphorylierung des P-Selektins. Dabei ist das Signal schon nach wenigen Sekunden maximal, nach zwei Minuten aber wieder verschwunden [41]. Ein ähnliches Verhalten zeigt auch die bereits erwähnte Zweikomponentensystem-Kinase CheA.

Auch die aus Rattenleber isolierten, wahrscheinlich identischen Plasmamembranproteine p38 [42, 43] und p36 [44] unterliegen einer Histidin-Phosphorylierung, und zwar – wie für p38 gezeigt werden konnte – als Antwort auf die Aktivierung des ras-Proteins p21 [45], welches ebenfalls ein Bestandteil des oben angesprochenen, unter anderem für Wachstumsprozesse wichtigen MAP-Kinase-Signalwegs ist. Es wurde von einer negativen Korrelation der Zellteilungsrate und der p38-Menge berichtet [46]. So wurden in Rattenlebertumoren und in nach partieller Hepatektomie regenerierendem Gewebe im Vergleich zu normalen Organen drastisch reduzierte p38-Spiegel gefunden. Inzwischen wurde p38 mit hoher Wahrscheinlichkeit als Ornithin-Transcarbamylase identifiziert [20]. Die membranständige Kinase wurde gut charakterisiert, die cytosolische Phosphatase hingegen kaum behandelt. Von ihr ist lediglich die Insensivität gegenüber bekannten Phosphatase-Inhibitoren und eine Magnesiumabhängigkeit dokumentiert [44].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in einer Reihe höherer Organismen Gene gefunden wurden, die die Existenz eines dem prokaryontischen ähnlichen eukaryontischen Zweikomponentensystems sehr nahe legen. Vor allem im Säuger wurden jedoch in letzter Zeit Histidin-Phosphorylierungsvorgänge bekannt, die offensichtlich nicht aus dem Zweikomponentensystem hervorgegangen sind. Allerdings konzentrieren sich diese Untersuchungen, von denen hier nur die wichtigsten erwähnt wurden, deutlich stärker auf die

Histidin-Kinasen. Die dazugehörigen Phosphatasen wurden eher am Rande behandelt, nur in einem Fall isoliert [47] und niemals sequenziert. Dies hat im Wesentlichen zwei Gründe. Zum einen ist eine Phosphorylierung ein energiefordernder Prozess, und solche laufen in Zellen fast ausnahmslos enzymkatalysiert ab. Somit ist die grundsätzliche Existenz einer entsprechenden Kinase oder mindestens einer Transferase mit dem Fund eines phosphorylierten Proteins praktisch zwingend. Das Forschen nach einer unbekannten Kinase, deren Existenz zumindest sicher ist, birgt deutlich weniger das Risiko einer erfolglosen Suche. Und genau das ist das Problem bei den Histidin-Phosphatasen. Histidin-Phosphate weisen nämlich abhängig von den sie in einem Protein umgebenden Aminosäuren oftmals nicht die Stabilität der weitverbreiteten Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Phosphate auf. Somit ist die Existenz einer Histidin-Phosphatase nicht von vorneherein zwingend: die Histidin-Dephosphorylierung eines Proteins nach Phosphorylierung durch eine Kinase kann als energiefreisetzender Prozess durchaus spontan und ohne Katalyse einer Phosphatase erfolgen. Ein Beispiel ist das CheB-P aus dem Chemotaxisregelkreis von *E. coli* (Abb. 1). So gibt es durchaus die Meinung, dass der Fund eukaryontischer Histidin-Kinasen und ihrer Substrate zwar Histidin-Phosphorylierung in höheren Organismen bestätigt, dass aber keine entsprechenden Phosphatasen existieren. Der zweite Grund für die vergleichsweise zurückhaltende Forschung auf dem Gebiet der eukaryontischen Histidin-Phosphatasen ist die Tatsache, dass die in einem Teil der Publikationen auf dem Gebiet der eukaryontischen Histidin-Phosphorylierung durchgeführten Phosphatasecharakterisierungen (Inhibitorverhalten, Abhängigkeit von zweiwertigen Metallen etc.) auf bereits bekannte Serin/Threonin-Phosphatasen hindeuten [20, 44, 48, 49]. Dies führte einige Gruppen zu dem Schluss, dass Histidin-Dephosphorylierung in Eukaryonten zwar durch Phosphatasen katalysiert wird, diese Reaktionen jedoch auf eine Nebenaktivität der Serin/Threonin-Phosphatasen zurückzuführen sind. Tyrosin-Phosphatasen hingegen gelten aufgrund ihrer räumlichen Struktur als unfähig, Histidin-Phosphate zu hydrolysieren [50].

Die zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Studien auf dem Gebiet der reversiblen eukaryontischen Histidin-Phosphorylierung hatten überwiegend Histidin-Phosphat-enthaltende Proteine und ihre Kinasen zum Inhalt. Neben den bereits erwähnten vereinzelten

und wenig Schlüsse zulassenden Charakterisierungen standen keine Informationen bezüglich Histidin-Phosphatasen zur Verfügung. Die meisten Untersuchungen, die sich direkt mit diesen Enzymen im Eukaryonten beschäftigt hatten, nutzten von bakteriellen Enzymen ausgehend den Ansatz der Homologieklonierung. Nur wenige Arbeiten gingen darüber hinaus, und keine brachte eine Histidin-Protein-Phosphatase hervor. Eine Annäherung mittels der klassischen Proteinbiochemie war noch nicht erfolgt. Prof. Dr. Susanne Klumpp hatte jedoch bei ihren 1994/95 am Caltech, Pasadena, USA durchgeführten Forschungen auf dem Gebiet der reversiblen Histidin-Phosphorylierung Hinweise auf die Existenz einer solchen Phosphatase gefunden (u. a. Dephosphorylierung des an Histidin phosphorylierten Proteins CheA durch Leberextrakte vom Säuger). Diese Befunde bildeten die Grundlage für die vorliegende Arbeit. Daraus ergaben sich die folgenden Fragestellungen: Lässt sich unter Verwendung eines gut charakterisierten Substrats ein spezifischer Histidin-Phosphatase-Aktivitätstest aufbauen, der den für eine klassische Proteinreinigung notwendigen Durchsatz hat? Ist mittels dieses Tests eine Histidin-Phosphatase-Aktivität im Säugetier detektierbar? Kann diese Aktivität unter Verwendung chromatographischer und anderer Proteinreinigungsmethoden isoliert und einem einzelnen Protein zugeordnet werden? Handelt es sich gegebenenfalls bei dem Protein um eine bekannte Serin/Threonin- oder Tyrosin-Phosphatase, ist es ein bekanntes Protein ohne bisher aufgefallene Phosphatase-Aktivität oder wird ein völlig neues Enzym gefunden?

3 Materialien

3.1 Chemikalien und Proteine

AGS, *Heidelberg*: Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 30 % (37,5 : 1)

Amersham Pharmacia Biotech, *Freiburg*: [γ-^{32}P]ATP; 2. Antikörper für Western-Blot (ganzer Antikörper gegen Kaninchen; Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt; vom Esel); ECL Detektionsreagenz für Western-Blot

Bio-Rad Laboratories, *München*: Protein Assay-Reagenz; Coomassie Brilliant Blue R-250 (Feststoff); vorgefärbte Markerproteine für SDS-PAGE (prestained standards)

Boehringer Mannheim, *Mannheim*: Markerproteine für Gelfiltration und SDS-PAGE (Combithek)

Canberra-Packard, *Dreieich*: Ultima Gold LSC-Cocktail

Merck, *Darmstadt*: DMSO; Essigsäure

Riedel-de Haën, *Seelze*: alle organischen Lösungsmittel; Salzsäure

Sigma, *Deisenhofen*: Azocoll (Azo dye impregnated collagen); Coomassie Brilliant Blue G (kolloidales Konzentrat); NDPK; alkalische Phosphatase; alle hier nicht aufgeführten Chemikalien und Proteine

Stearling Diagnostic Imaging, *Bad Homburg*: Röntgenfilmentwickler CRONEX MD; Röntgenfilmfixierer CRONEX MF-E

Upstate Biotechnology, *USA*: Protein-Phosphatase Typ 2A

3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Amersham Pharmacia Biotech, *Freiburg*: Nitrocellulose-Membran Hybond ECL; Photometer Ultrospec 1000; Spannungsquelle 2297 Macrodrive 5; FPLC-Pumpen P-500; FPLC-Controller LCC-500; FPLC-Fraktionssammler FRAC-100; FPLC-UV-Detektor 2151 CKB; alle hier nicht aufgeführten säulenchromatographischen Materialien

Amicon, *Witten*: Konzentratoren Centricon und Centriplus

Beckman Coulter, *Unterschleißheim*: Kühlzentrifuge J-21B, Rotor JA-20 (max. 48.000 g)

Braun, *Melsungen*: Glasschliff-Homogenisatoren

Bio-Rad Laboratories, *München*: Spannungsquelle Model 200/2.0; Blotter Trans-Blot SD; Geltrockner Model 583

Canberra-Packard, *Dreieich*: Flüssig-Szintilationszähler Tri-Carb 2100TR

Dr. Hielscher, *Teltow*: Ultraschallprozessor UP 200s

Eastman Kodak, *USA*: Röntgenfilm X-OMAT XAR-5

Eppendorf, *Hamburg*: Thermomixer 5436; Tischzentrifugen 5410 (12.800 g) und 5415 C (max. 15.800 g)

Fröbel Labortechnik, *Lindau*: Rundschüttelmaschine CMV

Greiner Labortechnik, *Frickenhausen*: Falcon-Gefäße (15 und 50 ml); Szintilatorgefäße (20 ml); Mini-Reaktionsgefäße (1,5 ml)

H. Hölzel, *Dorfen*: Spannungsquelle 600

Hermle Labortechnik, *Wehingen*: Kühlzentrifuge Z 323 K, Rotoren 220.59 V06 (max. 17.300 g) und 220.72 V04 (max. 4.000 g)

Johanna Ott, *Bodelshausen*: Horizontal-Schüttelmaschine KL 2

Kipp & Zonen, *Niederlande*: Zweikanalschreiber BD 41

Ingenieurbüro M. Zipperer, *Staufen*: Homogenisator CAT X620

Princeton Separations, *USA*: Zentrifugations-Gelfiltrationssäulen Centri Sep

Protec Gerätebau, *Oberstenfeld*: Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine 35 Compact

ray test, *Straubenhardt*: Geldokumentationssytem: Cybertech CS 1, Cybertech ICC/4, Thermodrucker Mitsubishi P67E, Thermodrucker-Papier Mitsubishi K61B

Schleicher & Schuell, *Dassel*: Nitrocellulose-Membran PROTRAN BA 79; PVDF-Membran WESTRAN; Blotting-Papier GB 004; Celluloseacetat-Filter OE 66

Scientific Industries, *USA*: Vortex-Genie 2-G560

UniEquip, *Martinsried*: Evaporator-Zentrifuge UNIVAPO 100 H; Aspirator-Vakuumpumpe UNIJET II

Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts der Universität, *Tübingen*: Gelgießapparatur und horizontale Elektrophoresekammer für Gelelektrophorese

WTW, *Weilheim i. OB*: pH-Meter pH 525

3.3 Puffer und Lösungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen enthielten standardmäßig 0,02 % NaN_3. Die Einstellung des pH-Werts erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung von Salzsäure oder Natronlauge. Abweichungen hiervon werden an entsprechender Stelle ausdrücklich erwähnt.

Alle für säulenchromatographische Arbeiten (FPLC-, Substrat- und Antikörpersäulen) verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße). Die zur Regenerierung der SOURCE 30Q-Säule verwendete Essigsäure und Natronlauge wurde nicht filtriert, da der extreme pH-Wert das Celluloseacetat-Filter hydrolysiert hätte.

3.3.1 Herstellung der Gewebeextrakte

Homogenisationspuffer A

30 mM TEA pH 7,5
1 mM EDTA
300 mM Saccharose
0,1 mM PMSF in DMSO
1 mM Benzamidin
0,1 % 2-ME

Homogenisationspuffer B

20 mM Tris pH 7,5
0,1 mM EDTA
300 mM Saccharose
0,1 mM PMSF in DMSO
1 mM Benzamidin
0,1 % 2-ME

3.3.2 Phosphatase-Aktivitätstests

Phosphorylierungspuffer

500 mM HEPES pH 8,0
1 mM $MgCl_2$

Testpuffer 4fach

100 mM TEA pH 7,5
0,4 % 2-ME

PNPP-Testpuffer

0,5 M Tris pH 8,0
10 mM $Mg(Ac)_2$

G-50-Puffer

50 mM TEA pH 8,0
0,1 mM EDTA
5 % Glycerin
2 mg/ml BSA
0,1 % 2-ME
0,04 % NaN_3

3.3.3 Säulenchromatographische Reinigung

Puffer A

20 mM TEA pH 7,5
1 mM EDTA
0,1 % 2-ME

FPLC-Wasser

H_2O
0,04 % NaN_3

Puffer B

20 mM TEA pH 7,5
0,1 mM EDTA
0,1 % 2-ME

3.3.4 Proteinbestimmung

Lowry-Reagenz

100 Teile 2%ige Na_2CO_3-Lösung in 0,1 M NaOH
1 Teil 2,7%ige K-Na-Tartrat-Lösung
1 Teil 1%ige $CuSO_4$-Lösung

3.3.5 Elektrophorese einschließlich Proteinfärbung

SDS-Sammelgelpuffer 4fach

0,5 M Tris pH 6,8
0,4 % SDS

SDS-Trenngelpuffer 4fach

1,5 M Tris pH 8,8
0,4 % SDS

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris
0,1 % SDS
190 mM Glycin
pH-Wert nicht einstellen!

SDS-Probenpuffer

130 mM Tris pH 6,8
10 % SDS
10 % 2-ME
20 % Glycerin
0,06 % Bromphenolblau
pH-Wert vor Bromphenolblauzugabe einstellen!

Coomassie-Färbelösung

50 % Methanol
10 % Essigsäure
0,2 % Coomassie Brillant Blue R-250
Lösung nach Herstellung filtrieren!

Coomassie-Entfärbelösung

30 % Ethanol
7,5 % Essigsäure

nativer Sammelgelpuffer 4fach

0,5 M Tris pH 6,8

nativer Trenngelpuffer 4fach

1,5 M Tris pH 8,8

nativer Laufpuffer

25 mM Tris
190 mM Glycin
pH-Wert nicht einstellen!

nativer Probenpuffer

62,5 mM Tris pH 6,8
40 % Glycerin
0,01 % Bromphenolblau
pH-Wert vor Bromphenolblauzugabe einstellen!

Histidin-Probenpuffer

15 mM Tris pH 6,8
4 % SDS
2 % 2-ME
8 M Harnstoff
10 % Saccharose
10 mM EDTA
0,01 % Bromphenolblau
pH-Wert vor Bromphenolblauzugabe einstellen!

Silberfixierer

50 % Methanol
12 % Essigsäure

3.3.6 Semidry-Blotting

Transferpuffer

25 mM Tris
190 mM Glycin
10 % Methanol
pH-Wert nicht einstellen!

3.3.7 Western-Blot

Ponceau S-Färbelösung

3 % TCA
0,2 % Ponceau S

TBST-Puffer

10 mM Tris pH 7,6
150 mM NaCl
0,1 % Tween 20

3.3.8 Antikörperreinigung

Kopplungspuffer

0,1 M $NaHCO_3$ pH 8,3
0,5 M NaCl

Säulenlagerungspuffer

100 mM Tris pH 8,0
0,5 M NaCl
0,04 % NaN_3

MCRT-Puffer

1 M Arginin pH 8,0
5 mM Citronensäure
4 % Mannit
0,01 % Tween 80

4 Methoden

4.1 Herstellung der Gewebeextrakte

4.1.1 Herstellung des Kaninchenleberextrakts

Zwei Kaninchen wurde von Mitarbeitern der Firma Chiron Behring, Marburg unter Narkose (Phenobarbital) die Leber entfernt und zur Verfügung gestellt. Der Transport und die weitere Verarbeitung erfolgten unter permanenter Eiskühlung. Nach vorsichtigem Entfernen von Bindegewebe und Gallenblase wurde das restliche Gewebe (~110 g) in kleine Stücke geschnitten, mit Homogenisationspuffer A versetzt (2 ml/g Leber) und mit dem CAT-Homogenisator zerkleinert (8–9 Zyklen à 3–4 s mit je 30 s Pause). Anschließend wurde das Homogenat zentrifugiert (1 h; 48.000 g; 4 °C). Aufgrund des sehr schwammigen Niederschlags war es nötig, den Überstand einer weiteren Zentrifugation zu unterziehen (ebenfalls 1 h; 48.000 g; 4 °C). Dieser so erhaltene zweite Überstand wurde zur Abtrennung von Fett durch mehrere Lagen Mull filtriert (ergab ~2 ml/g Leber), aliquotiert (à 20 ml) und bis zur weiteren Verarbeitung – Isolierung der Histidin-Protein-Phosphatase – bei −80 °C gelagert. Die beiden vereinigten Niederschläge (~0,7 g/g Leber) wurden mit einem engen Glasschliffhomogenisator in Homogenisationspuffer A (10 ml/g Niederschlag) resuspendiert und für eine Verteilungsuntersuchung bei −80 °C aufbewahrt.

4.1.2 Herstellung der Rattengewebeextrakte

Die Rattengewebe (vom Arbeitskreis Krieglstein zur Verfügung gestellt) wurden unmittelbar nach der Entnahme zerschnitten und mittels eines engen Glasschliffhomogenisators aufgeschlossen (~25 Stöße). Dazu wurde je nach Organbeschaffenheit 2–4 ml Homogenisationspuffer B pro g Gewebe verwendet. Die Verarbeitung verlief unter permanenter Eiskühlung. Die Homogenate wurden anschließend zentrifugiert (30 min; 17.300 g; 4 °C) und der Überstand bei −80 °C gelagert. Die beschrieben Aufarbeitung wurde von Frau Dr. Dagmar Selke und Frau Karin Rose durchgeführt.

4.2 Phosphatase-Aktivitätstests

4.2.1 Test auf Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität

4.2.1.1 [^{32}P]-Phosphorylierung von CheA

Der Ansatz zur Phosphorylierung von CheA setzte sich wie folgt zusammen (Endkonzentrationen in Klammern):

5 µl rekombinantes CheA, 1,7 mg/ml bzw. 24 µM (170 µg/ml bzw. 2,4 µM)
5 µl Phosphorylierungspuffer (50 mM HEPES und 0,1 mM $MgCl_2$)
0,5 µl 10 mM PMSF in DMSO (0,1 mM)
5 µl 10 µM ATP (1 µM)
4 MBq (108 µCi) [γ-^{32}P]ATP
H_2O ad 50 µl

Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 37 °C. Anschließend wurde das [^{32}P]-markierte CheA mittels einer Sephadex G-50-Säule (0,4 cm x 9 cm; Pasteurpipette) ohne Druck bei Raumtemperatur von unverbrauchtem [γ-^{32}P]-ATP abgetrennt. Die Fließgeschwindigkeit betrug etwa 3 ml/h. Es erwies sich als äußerst wichtig, den G-50-Puffer direkt vor der Verwendung per Vakuum zu entgasen, da die sonst sehr schnell aufgetretenen Luftblasen die Säulenpackung zerstörten. Das Eluat wurde in Fraktionen von ~100 µl (2 Tropfen) gesammelt und zur Bestimmung des [^{32}P]CheA bzw. des [γ-^{32}P]ATP-Signals nach Cerenkov vermessen. Das [^{32}P]CheA eluierte zwischen 0,6 und 1,1 ml, das [γ-^{32}P]ATP schloss sich im Bereich von 1,1 bis 1,7 ml an. Die klar vom [γ-^{32}P]-ATP getrennten, [^{32}P]CheA enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, das Gesamtvolumen bestimmt (~0,5 ml) und 10 µl davon nach Cerenkov gemessen. Die Säule wurde abschließend vor der Lagerung mit 5 ml BSA-freiem G-50-Puffer gewaschen. Die [^{32}P]-Einbaurate schwankte gewöhnlich zwischen 4–10 %. Die Substratstammlösung wurde bei 4 °C gelagert, wobei während 4 Wochen nur eine sehr geringe Hydrolyse von [^{32}P]CheA auftrat. Vor der Durchführung des Tests wurde die benötigte Menge Stammlösung mit G-50-Puffer auf 2,5 x 10^6 cpm/ml, d. h. 0,83 pmol [^{32}P]/ml eingestellt.

4.2.1.2 Messung der Histidin-Phosphatase-Aktivität

Dem Test lag standardmäßig folgender Ansatz zu Grunde (Endkonzentrationen in Klammern):

10 µl Testpuffer 4fach inkl. 40 mM $MgCl_2$ (25 mM TEA, 10 mM $MgCl_2$)
10 µl H_2O oder Testsubstanzlösung
10 µl Histidin-Protein-Phosphatase
10 µl [^{32}P]CheA (207 pM, entspricht 0,58 ng)

Die Reaktion wurde mit Substrat gestartet, es folgte eine Inkubation von 30 min bei 37 °C. Dann wurde ein Mini-Reaktionsgefäß nach dem anderen durch unmittelbar aufeinanderfolgende Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA und 150 µl Methanol/Aceton (1 + 1) gestoppt und zentrifugiert (5 min; 15.800 g; RT). 150 µl des Überstandes wurden mit 1 ml Szintilationscocktail gemischt und im Szintilationszähler vermessen. Als Bezug diente die in 10 µl Substrat gemessene Radioaktivität (R_{gesamt}), sowie ein statt Phosphataselösung (R_{Enzym}) Wasser enthaltender Blindwert (R_{blind}). Somit ergab sich die Aktivität der getesteten Enzymlösung aus folgender Gleichung:

$$\frac{(R_{Enzym} - R_{blind}) \times 0{,}83 \text{ pmol } [^{32}\text{P}]\text{CheA/ml} \times VF}{(R_{gesamt} - R_{blind}) \times 30 \text{ min}} = \text{Enzymaktivität (pmol/min x ml}^{-1}\text{)}$$

Der Verdünnungsfaktor (VF) bezieht sich auf die zu testende Enzymprobe, deren Verdünnung oftmals nötig war, damit nicht mehr als 25 % des Substrats dephosphoryliert wurden, da die Linearität des Aktivitätstests bei höheren Dephosphorylierungsraten nicht mehr gegeben war. Die weiterhin verwendete Aktivitäts-Einheit Unit (U) entspricht per Definition der Aktivität der Enzymmenge, die im vorliegenden Test ein µmol [^{32}P]CheA in einer Minute umsetzt. Wenn nicht anders angegeben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und die Ergebnisse zusätzlich durch mindestens einen weiteren Test verifiziert.

4.2.2 Test auf Serin/Threonin-Protein-Phosphatase-Aktivität

Der [^{32}P]Casein-Dephosphorylierungstest nach McGowan und Cohen [51] erfolgte unter Verwendung dieses Ansatzes (Endkonzentration in Klammern):

5 µl 30 mM $MgAc_2$ (10 mM)
5 µl H_2O
10 µl Histidin-Protein-Phosphatase
10 µl [^{32}P]Casein (1 µM)

Der Test wurde mittels Substrat gestartet und für 10 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 200 µl 20%iger TCA-Lösung gestoppt. Nach dem Abzentrifugieren (15.800 g; 5 min; RT) des ausgefällten Proteins wurden 200 µl des Überstandes mit 1 ml Szintilationscocktail versetzt und per Scintilationszähler vermessen. Zur Bestimmung des Umfangs der Substratdephosphorylierung wurde der Enzymwert (R_{Enzym}) mit einem Blindwert (Wasser statt Enzym; R_{blind}) und der in einem Testgefäß eingesetzten Gesamtradioaktivität (10 µl Substrat; R_{gesamt}) in Bezug gesetzt. Analog zum [^{32}P]CheA-Test ergab sich die Phosphatase-Aktivität aus dieser Formel:

$$\frac{(R_{Enzym} - R_{blind}) \text{ x } 3 \text{ nmol } [^{32}\text{P}]\text{Casein/ml x VF}}{(R_{gesamt} - R_{blind}) \text{ x } 10 \text{ min}} = \text{Enzymaktivität (nmol/min x ml}^{-1}\text{)}$$

4.2.3 Test auf p-Nitrophenylphosphat-Dephosphorylierung

Dieser Test diente ursprünglich zur Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase. Er baute auf folgendem Ansatz auf (Endkonzentrationen in Klammern):

10 µl PNPP-Testpuffer (50 mM Tris und 1 mM $Mg(Ac)_2$)
10 µl 5 mg/ml PNPP in H_2O (0,5 mg/ml)
10 µl Histidin-Protein-Phosphatase
H_2O ad 100 µl

Der Ansatz wurde durch Substratzugabe gestartet und bei 37 °C für 20 min inkubiert. Durch Zumischen von 25 µl 13%iger K_2HPO_4-Lösung wurde der Test gestoppt und anschließend bei 405 nm photometrisch vermessen. Unter Verwendung der spezifischen Absorption des Reaktionseduktes p-Nitrophenol (ε_{405} = 1,85 x $mmol^{-1}$ x mm^{-1}) konnte dann die Aktivität nach folgender Formel berechnet werden (Küvettendurchmesser: 1 cm):

$$\frac{\text{Absorption x 125 nmol PNPP}}{\text{18,5 x 20 min x 0,01 ml}} = \text{Enzymaktivität (nmol/min x } ml^{-1})$$

4.3 Test auf Protease-Aktivität

Dieser halbquantitative Test erfolgte durch Zugabe einer Spatelspitze kleiner Krümel Azocoll (gemahlenes Rinderleder mit kovalent gebundenem Azofarbstoff) zur Testlösung (mindestens 40 µl). Anschließend wurde über mehrere Stunden bei 37 °C inkubiert und danach zentrifugiert (5 min; 12.800 g; RT). Im Falle von vorhandener Protease-Aktivität war der Überstand rot gefärbt. Zum Vergleich wurde immer ein Blindwert mitgeführt, da teilweise schon der Puffer zu einer leichten Freisetzung des Farbstoffs führen konnte. Eine Positivkontrolle wurde durch Zusatz von etwas Bromelain durchgeführt.

4.4 Säulenchromatographische Aufreinigung der Histidin-Protein-Phosphatase

Die nachfolgend beschriebenen FPLC-Verfahren wurden sämtlich bei 4 °C durchgeführt. Mit Hilfe eines Durchflußzellen-UV-Detektors (280 nm) und eines daran angeschlossenen Schreibers wurden die Proteinprofile der einzelnen Säulenläufe dokumentiert. Zur Bestimmung der Histidin-Phosphatase-Aktivität in den einzelnen Fraktionen wurden keine

Doppelbestimmungen durchgeführt. Volumina werden folgend häufig in Säulenvolumen (SV) angegeben.

4.4.1 Anionenaustausch-Chromatographie

Säulenmaterial:	SOURCE 30Q (selbstgepackte Säule)
Säulendimensionen:	12 ml (h = 6 cm; r = 0,8 cm)
Flussrate:	1 ml/min
Fraktionsgröße:	1 ml
Äquilibrierung:	10 SV Puffer A
Auftrag:	~20 ml löslicher Extrakt (550–700 mg Protein)
Waschen:	4 SV Puffer A
Elution:	3 SV Puffer A + 200 mM NaCl
Regeneration:	2 SV 2 M NaCl
	10 SV FPLC-Wasser
	2 SV 2 M NaOH
	10 SV FPLC-Wasser
	2 SV HAc 70 %
	10 SV FPLC-Wasser

4.4.2 Gelfiltration

Säulenmaterial:	HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade (fertige Säule)
Säulendimensionen:	320 ml (h = 60 cm; r = 1,3 cm)
Flussrate:	1 ml/min
Fraktionsgröße:	3 ml
Äquilibrierung:	2 SV Puffer A + 50 mM NaCl
Auftrag:	2,0 ml $(NH_4)_2SO_4$-Fällung (60–70 mg Protein)
Elution:	250 ml Puffer A + 50 mM NaCl
Regeneration:	2 SV Puffer A + 50 mM NaCl

4.4.3 Affinitäts-Chromatographie

Säulenmaterial:	Blue Sepharose 6 Fast Flow (selbstgepackte Säule)
Säulendimensionen:	1 ml (h = 5 cm; r = 0,25 cm)
Flussrate:	1 ml/min
Fraktionsgröße:	0,8 ml
Äquilibrierung:	10 SV Puffer B + 10 mM $MgCl_2$
Auftrag:	~6 ml Gelfiltrations-Eluat (80–100 µg Protein)
Waschen:	4 SV Puffer B + 10 mM $MgCl_2$
Elution:	10 SV Puffer B + 200 mM NaCl
Regeneration:	10 SV Puffer B + 1 M NaCl
	10 SV 100 mM TEA pH 8,5 + 500 mM NaCl
	10 SV FPLC-Wasser
	10 SV 100 mM NaAc pH 4,5 + 500 mM NaCl
	10 SV FPLC-Wasser
	5 SV 6 M Harnstoff
	10 SV FPLC-Wasser

4.5 Nicht in das Reinigungsschema aufgenommene Verfahren

4.5.1 Säulenchromatographische Verfahren

Die ersten Versuche zur Anionenaustausch-Chromatographie wurden nicht mit SOURCE 30Q, sondern mit Q Sepharose Fast Flow (die bindende Gruppe ist ebenfalls ein quartärer Ammoniumrest) durchgeführt.

Es wurden auch Versuche mit dem Kationenaustauscher Mono S HR 5/5 (fertige Säule; 1 ml; h = 5 cm; r = 0,25 cm) durchgeführt. Dabei wurde mit zwei verschiedenen Puffersystemen experimentiert:

1. 20 mM HEPES pH 7,0 + 0,1 mM EDTA (Elution: 0–1 M NaCl über 10 ml)
2. 20 mM Natriumacetat pH 5,0 + 0,1 mM EDTA (Elution: 0–1 M NaCl über 10 ml)

Die nötige Umpufferung erfolgte bei der vorangehenden Gelfiltration.

Des Weiteren wurde die Verwendung von Heparin Sepharose CL-6B (selbstgepackte Säule; 5 ml; h = 6,4 cm; r = 0,5 cm) getestet. Äquilibrierung, Auftrag und Waschen erfolgte mit Puffer B, der Elutionspuffer enthielt zusätzlich 500 mM NaCl.

4.5.2 Ethanol-Fällung

1 Teil der zu fällenden Proteinlösung wurde mit 4 Teilen Ethanol (−18 °C) versetzt, gevortext und zentrifugiert (10 min; 7.000 g; 4 °C). Der Überstand (I) wurde abgegossen und verwahrt, der Niederschlag (I) unter Eiskühlung mittels eines engen Glasschliffhomogenisators in Puffer A (Volumen der Ausgangslösung) resuspendiert (20 Schläge). Diese Suspension wurde anschließend einer Zentrifugation (10 min; 48.000 g; 4 °C) unterzogen und der Überstand (II) verwendet. Der Niederschlag (II) wurden ebenfalls aufgehoben.

4.6 Proteinkonzentrierung

4.6.1 Methanol/Aceton-Fällung

1 Teil der zu konzentrierenden Proteinlösung wurde mit 4 Teilen Methanol/Aceton (1 + 1) in einem Mini-Reaktionsgefäß gemischt, für 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (15 min; 12.800 g; RT). Der Überstand wurde durch vorsichtiges Dekantieren entfernt, dann erfolgte die Trocknung des Niederschlags über 5 min bei 56 °C. Die so gefällten Substanzen wurden mit einem der weiteren Verwendung angepassten Volumen aufgenommen (vor SDS-PAGE: 10 µl Wasser + 5 µl Probenpuffer). Dies geschah durch wiederholtes Aufsaugen und Ausstoßen der Flüssigkeit an der Gefäßwand.

4.6.2 Ammoniumsulfat-Fällung (90 %)

Zwei vereinigte Eluate des Anionenaustauschers wurden vor der Gelfiltration mittels einer 90%igen Ammoniumsulfat-Fällung konzentriert. Die bei dem vorliegenden Volumen zur Erreichung einer 90%igen Sättigung nötige Menge feinkörniges $(NH_4)_2SO_4$ wurde unter ständiger Eiskühlung und Rühren langsam über einen Zeitraum von 30 min zugegeben, so dass eine lokale Übersättigung vermieden wurde. Nach der vollständigen Zugabe des $(NH_4)_2SO_4$ wurde noch 30 min weiter gerührt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (20 min; 48.000 g; 4 °C). Der Niederschlag wurde in einem engen Glasschliffhomogenisator in Puffer A resuspendiert (20 Schläge). Das dabei verwendete Volumen wurde möglichst klein gehalten. Die zur Wiederaufnahme des Niederschlags notwendige Menge lag zwischen 4,5 und 6,5 ml. Der resuspendierte Niederschlag wurde erneut zentrifugiert (3 min; 17.300 g; 4 °C) und der so erhaltene Überstand für die Gelfiltration verwendet.

4.6.3 Ultrafiltration

Die Konzentrierung größerer Volumina wurde mit Centricon oder Centriplus Zentrifugationsfiltern (2,5 bzw. 15 ml Anfangsvolumen) durchgeführt. Die Filtration mit Centricons wurde bei 4.000 g mit anschließender zweiminütiger Rezentrifugation bei 1.000 g ausgeführt. Die Centriplus wurden mit 3.000 g betrieben, die zweiminütige Rezentrifugation erfolgte bei 1.000 g. Die Temperatur lag bei 4 °C. Es wurden ausschließlich Filterröhrchen mit einer 10-kDa-Membran (grüne Codierung) verwendet. Die Zeitdauer der Filtration hing extrem von der Zusammensetzung der einzuengenden Lösung ab: bei einer Proteinkonzentration unter 1 mg/ml konnte bei Abwesenheit von viskositätserhöhenden Stoffen eine Filtrationsrate von bis zu 5 ml/h pro Centricon (bei Centriplus entsprechend mehr) erreicht werden. Lag der Proteingehalt jedoch bei einigen 10 mg/ml, oder war beispielsweise Glycerin enthalten, so fiel der Durchsatz auf unter 0,2 ml/h. Selbst diese niedrigen Filtrationsraten waren nur durch regelmäßiges Umschütteln der Filterröhrchen zu erreichen, da sich prinzipbedingt Proteine und Partikel aus der zu filtrierenden Flüssigkeit an der Membran anreicherten.

Nach Gebrauch wurden die Röhrchen sorgfältig mit Wasser gespült und 5 min zentrifugiert bzw. 2 min rezentrifugiert. Sie wurden dann in 20%igem Ethanol gelagert und wiederholt verwendet.

4.7 Proteinbestimmung

4.7.1 Bio-Rad-Methode

Diese Methode [52, 53] kam während der Reinigung zum Einsatz. Die Proteinprobe (maximal 200 µl) wurde mit Wasser auf 800 µl aufgefüllt, mit 200 µl Bio-Rad Protein Assay-Reagenz versetzt und gevortext. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Vermessung bei 595 nm. Die Eichkurve wurde mittels BSA-Bestimmungen im Bereich von 2–10 µg erstellt. Standardmäßig wurde die Bestimmung der Probe mit Doppelwerten durchgeführt.

4.7.2 Lowry-Verfahren

Dieses Verfahren (Mini-Lowry) [54] wurde bei Gewebehomogenaten und Zellaufschlüssen verwendet. Das eingesetzte Probenvolumen betrug höchstens 100 µl und wurde gegebenenfalls mit Wasser auf 100 µl ergänzt. Anschließend wurde die Lösung mit 2 ml Lowry-Reagenz gemischt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Dann erfolgte unter sofortigem Mischen die Zugabe von 100 µl Folin & Ciocalteus-Phenol-Reagenz. Die photometrische Bestimmung des Proteingehaltes (720 nm) wurde nach weiteren 30 min (RT) durchgeführt. Die Grundlage für die Eichgerade bildeten BSA-Vergleiche mit 10–60 µg. Auch bei diesem Test wurden regelmäßig Doppelmessungen der Proben ausgeführt.

4.7.3 Vergleich nach SDS-PAGE

Im Falle einer für obige Verfahren zu geringen Proteinkonzentration, oder wenn nicht genug Probenmaterial zur Verfügung stand, wurde eine SDS-PAGE mit eventuell vorangegangener Methanol/Aceton-Fällung durchgeführt. Die eigentliche Proteinbestimmung erfolgte dann durch abschätzenden Vergleich mit BSA-Standards nach einer Färbung mit Silber oder (kolloidalem) Coomassie (Abschnitt 4.8.3–4.8.5).

4.8 Elektrophorese einschließlich Proteinfärbung

4.8.1 SDS-Gelelektrophorese

Die Proteinanalyse der Proben erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE [55]. Dazu fanden selbstgegossene Minigele mit einem standardmäßigen Acrylamid/Bisacrylamid-Gehalt von 17,5 % Verwendung. Ausnahmsweise kamen auch Gele mit 10, 12,5 oder 15 % zum Einsatz. Die Gele hatten eine Ausdehnung von 9 cm x 9,5 cm x 0,5 mm (H x B x T). Dabei entfielen auf das Trenngel etwa 6,5, auf das Sammelgel rund 1 cm Laufstrecke (ohne Taschen). Die 12 Taschen hatten die Ausmaße 14 mm x 5 mm x 0,5 mm (H x B x T). Die folgende Zusammensetzung der beiden Gelschichten bezieht sich auf zehn 17,5%ige Gele. Der Anteil Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung ist bei niedrigerprozentigen Gelen zugunsten der Wassermenge entsprechend zu reduzieren.

Trenngel	Sammelgel
10 ml H_2O	24 ml H_2O
15 ml SDS-Trenngelpuffer 4fach	10 ml SDS-Sammelgelpuffer 4fach
35 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	6 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30 %
50 µl TEMED	60 µl TEMED
100 µl APS 20 %	120 µl APS 20 %

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet (Luftsauerstoff-ausschluss; Glättung der Grenzfläche zwischen Trenn- und Sammelgel). Nach 40 min erfolgte

die völlige Entfernung des Isopropanols durch Abschütten und gründliches Spülen mit Wasser. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen und sofort die Kämme eingesteckt. Nach 20 min wurde die selbstgebaute Gelgießapparatur auseinandergebaut.
Maximal 15 µl Probe wurden mit 5 µl SDS-Probenpuffer versetzt, da sich 20 µl als praktisches Maximalvolumen für den Auftrag in die Geltaschen erwiesen haben. Bei größeren Volumina wurde die Methanol/Aceton-Fällung vorgeschaltet. Die Denaturierung erfolgte für 5 min bei 95 °C (Deckel anstechen), anschließend wurde das Kondenswasser von Gefäßwand und -deckel kurz abzentrifugiert und die Proben aufgetragen. Dabei wurden ausgelassene Taschen immer mit einem Gemisch aus 5 µl Probenpuffer und 10 µl Wasser gefüllt, da dies einem schrägen, V-förmigen Bahnverlauf entgegenwirkte. Der SDS-Laufpuffer wurde sowohl als Anoden- als auch als Kathodenpuffer eingesetzt. Zu Beginn der Elektrophorese wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Mit dem vollständigen Übergang der Proben ins Trenngel wurde auf 250 V erhöht. Abschließend wurde das Gel mit Silber oder (kolloidalem) Coomassie gefärbt, ein Elektro-Blotting angeschlossen oder eine Autoradiographie durchgeführt.

4.8.2 Native Gelelektrophorese

Die nichtdenaturierende Gelelektrophorese wurde mit dem gleichen System wie die SDS-PAGE durchgeführt. Aus diesem Grunde werden hier nur die Unterschiede aufgezeigt. Die Gele wurden nach der obigen Rezeptur unter Verwendung von nativem Trenn- und Sammelgelpuffer (ohne SDS) gegossen. Die Proben wurden mit 5 µl nativem Probenpuffer (ohne SDS und 2-ME) versetzt, das Erhitzen entfiel jedoch. Als Anoden- und Kathodenpuffer kam nativer Laufpuffer (ohne SDS) zum Einsatz. Zur Färbung wurden ebenfalls Silber und Coomassie verwendet.

4.8.3 Coomassie-Färbung

Diese Färbemethode mittels Coomassie Brilliant Blue R-250 eignete sich für Proteinmengen ab ~0,5 µg/Bande. Die Proteinfixierung und die Färbung erfolgten gleichzeitig mittels einer mindestens halbstündigen Inkubation in der Coomassie-Färbelösung (mehrfach verwendbar). Anschließend wurde durch Waschen mit Coomassie-Entfärbelösung (Minuten) bzw. Wasser (Minuten bis Stunden) das überschüssige Coomassie aus dem Gel entfernt. Wasser entfärbte zwar wesentlich langsamer als die Entfärbelösung, dafür nahm aber der Hintergrund im Verhältnis zu den Banden deutlicher ab. Aus diesem Grund erfolgte zunächst eine grobe Farbstoffentfernung mit Coomassie-Entfärbelösung, danach wurde Wasser eingesetzt. Coomassie-Gele wurden bei 4 °C in Wasser oder Ethanol 10 % gelagert, wobei es bei Ethanol noch zu einer weiteren, leichten Entfärbung und Schrumpfung des Gels kam. Letztere war aber durch Waschen mit Wasser rückgängig zu machen.

4.8.4 Färbung mit kolloidalem Coomassie

Dieses Verfahren [56] färbte die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue G. Die von der normalen Coomassie-Färbung abweichende physikalische Modifikation des Farbstoffs ermöglichte noch die Anfärbung von Proteinmengen unter 100 ng/Bande. Das Gel wurde zunächst 15 min mit Silberfixierer inkubiert, dann kurz mit Wasser gewaschen und anschließend mit der fertig erhältlichen Coomassie-Lösung (nur einmal verwendbar) gefärbt. Dabei waren starke Banden schon nach 10 min sichtbar, die volle Empfindlichkeit der Methode zeigte sich aber erst nach mehreren Stunden (über Nacht), während derer der Hintergrund im Gegensatz zur normalen Coomassie-Färbung kaum zunahm. Die Entfärbung und die Lagerung unterschieden sich nicht von der mit normalem Coomassie gefärbten Gelen.

4.8.5 Silber-Färbung

Die Färbung mit Silber [57] konnte für Proteinmengen ab 50 ng/Bande eingesetzt werden. Das Elektrophoresegel wurde zunächst 3 x 15 min mit Silberfixierer behandelt und dann 15 min gewaschen (Ethanol 30 %). Nach der sich anschließenden Imprägnierung (45 s; 100 µl HCHO 35 % + 75 µl $Na_2S_2O_3$ 43 % in 150 ml H_2O) wurde 3 x 1 min mit Wasser gewaschen und für 60 min inkubiert (100 µl HCHO 35 % in 150 ml $AgNO_3$ 0,2 %). Nun wurde kurz (~15 s) mit Wasser gewaschen und danach bis zur gewünschten Färbung entwickelt (125 µl HCHO 35 % + 2,5 µl $Na_2S_2O_3$ 43 % in 250 ml Na_2CO_3 6 %). Es folgte kurzes (2–3 s) Waschen mit kaltem Wasser und Stoppen der Entwicklungsreaktion (Essigsäure 7 %; kalt). Abschließend wurde nochmals 2 x 5 min mit kaltem Wasser gewaschen. Die verwendeten Imprägnier-, Silber- und Entwicklungslösungen wurden jeweils kurz vor der Verwendung frisch hergestellt. Die Gele konnten in Ethanol 30 % bei 4 °C praktisch unbegrenzt gelagert werden, es trat lediglich die bereits bei der Coomassie-Färbung erwähnte Schrumpfung auf.

4.9 Semidry-Blotting

Die Nitrocellulosemembran und das Blotting-Papier (1,2 mm) wurden bei dieser Methode [58] auf Gelgröße zugeschnitten und wie das SDS-Page-Gel 10 min im Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde ein Sandwich zusammengebaut (Anode – drei Lagen Blotting-Papier – Membran – Gel – drei Lagen Blotting-Papier). Das feuchte Sandwich wurde durch vorsichtiges Überrollen mit einem Glasstab von eingeschlossenen Luftblasen befreit und mit etwas Transferpuffer übergossen. Abschließend wurde der Blotter durch Aufsetzen der Kathode geschlossen. Dabei wurde durch sanften Druck der feste Sitz des Sandwichs zwischen den Elektrodenplatten gewährleistet. Der Transfer erfolgte innerhalb einer Stunde bei 10 V. Nach dem Blotten wurden die Positionen der vorgefärbten Markerproteine bei noch auf der Membran liegendem Gel mit einer Nadel markiert. Wurde statt einer Nitrocellulose- eine PVDF-Membran verwendet [59] (vor der Proteinsequenzierung), so wurde diese vor der

Äquilibrierung mit Transferpuffer 5 min in Methanol eingelegt. Darüber hinaus gab es keine Verfahrensunterschiede.

4.10 Immunologische Detektionsverfahren

4.10.1 Western-Blot

Nach SDS-PAGE und Blotting wurde die Nitrocellulosemembran 10 min mit Ponceau S-Lösung zwecks Proteinfixierung und -färbung behandelt, da sonst im weiteren Verlauf über 90 % der Histidin-Phosphatase von der Membran gewaschen wurden. Nach dem Entfernen der Farbstofflösung mit Wasser wurde 30 min mit 5 % Milchpulver (in TBST-Puffer) blockiert. Es folgten Waschschritte mit TBST-Puffer (1 x 15 und 2 x 5 min) und anschließend die Inkubation (über Nacht; 4 °C) mit dem ersten Antikörper (vom Kaninchen). Der TBST-Puffer wurde vor der Antikörperzugabe mit 0,1 % BSA versetzt. Am nächsten Tag schloss sich ein weiterer Waschschritt mit TBST-Puffer an (1 x 15 und 2 x 5 min). Die nun folgende Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Peroxidase-gekoppelt; gegen Kaninchen; 1 : 2.500) wurde bei Raumtemperatur für die Dauer von einer Stunde durchgeführt. Anschließend wurde die Membran wieder mit TBST-Puffer gewaschen (1 x 15 und 2 x 5 min) und dann mit ECL-Reagenz für 1 min inkubiert. Die Membran wurde auf eine Glasplatte überführt und mit Klarsichtfolie überspannt. Es folgte die Belichtung eines Röntgenfilms durch Auflegen auf die Membran und abschließend die maschinelle Entwicklung. Das beschriebene Verfahren wurde für gereinigte Antikörper verwendet. Kamen statt dessen Seren zum Einsatz, so wurde bei der Inkubation mit dem ersten Antikörper das BSA durch 5 % Milchpulver ersetzt, da so deutlich weniger unspezifische Signale auftraten. Der vorangehende Waschvorgang wurde in solchen Fällen auf einmaliges kurzes Waschen mit TBST-Puffer beschränkt.

4.10.2 Dot-Blot

Diese Methode wurde vor allem zur Abschätzung der Peptidmenge im Säulendurchlauf bei der Herstellung einer Antigen-Säule benutzt (Abschnitt 4.11.1). Eine Nitrocellulosemembran wurde mit Wasser angefeuchtet und dann so auf die Öffnung eines Schlauches (d = 5 mm) gelegt, dass der Auftragspunkt in der Mitte der Schlauchöffnung lag. Die angeschlossene Wasserstrahlpumpe sog mit moderatem Unterdruck die aufgetragene Flüssigkeit rasch ein, die Proteine blieben aber auf der Membran. So konnte die Peptidlösung auf der Membran trotz Volumina von über 30 µl nicht weit verlaufen: die Auftragspunkte wurden nicht zu groß, die Auftragszeit hielt sich gleichzeitig in Grenzen. Des Weiteren wurde die Membran wie ein normaler Western-Blot behandelt. Das Auftragen unterschiedlicher Volumina der Test- und einer Vergleichslösung bekannter Peptidkonzentration ermöglichte die Abschätzung der unbekannten Peptidkonzentration.

4.11 Reinigung der Antikörper gegen Peptide

4.11.1 Herstellung der Antigen-Säule

Die Volumenangaben beziehen sich auf ein Bettvolumen von ~1 ml (0,28 g Trockenmaterial). Die CNBr-aktivierte Sepharose 4B [60] wurde mit 5 ml 1 mM HCl versetzt und 15 min quellen gelassen. Danach wurde das Material in die Säule (10 ml Spritze, ergibt ~8 mm Betthöhe) überführt, mit 200 ml 1 mM HCl gewaschen und mit 10 ml Kopplungspuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Sepharose mittels Pasteurpipette in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt und mit dem in 5 ml Kopplungspuffer gelöstem Liganden (siehe Abschnitt 5.9) inkubiert (über Nacht; 4 °C; Rundschüttler). Am nächsten Tag wurde diese Suspension wieder in die Säule gefüllt, der Durchlauf gesammelt und per vergleichendem Dot-Blot der Peptidgehalt bzw. der an die Säule gebundene Antigenanteil bestimmt. Nach dem Waschen mit 2 x 5 ml Kopplungspuffer erfolgte die Inkubation in 5 ml 0,1 M Tris pH 8,0 (2 h; RT; gelegentliches Resuspendieren) zur Blockierung der restlichen aktiven Gruppen des Säulenmaterials. Es folgten 4 Waschzyklen mit je 5 ml 0,1 M NaAc pH 4,0 inkl.

0,5 M NaCl und 0,1 M Tris pH 8,0 inkl. 0,5 M NaCl und abschließend die Äquilibrierung mit 0,1 M Tris pH 8,0 inkl. 0,5 M NaCl (0,04 % NaN_3). In diesem Puffer wurde die Säule auch bei 4 °C gelagert.

4.11.2 Chromatographische Reinigung der Antikörper

Die im Folgenden beschriebene Affinitäts-Chromatographie wurde ohne Druck bei 4 °C mit einer nach der oben beschriebenen Methode hergestellten Säule durchgeführt. Die Tropfgeschwindigkeit lag bei 1–2 Tropfen pro Minute. Das zweifache Säulenvolumen (SV) Antikörperserum wurde vor dem Auftragen 1 : 10 mit 10 mM Tris pH 7,5 verdünnt. Das Eluat wurde in 500-µl-Fraktionen unter Vorlage von 250 µl MCRT-Puffer gesammelt (750 µl Gesamtvolumen) und umgehend nach Beendigung der Elution gemischt.

Äquilibrierung:	10 SV 10 mM Tris pH 7,5
	10 SV 100 mM Glycin pH 2,5
	15 SV 10 mM Tris pH 8,8
	10 SV 100 mM Triethylamin pH 11,5
	15 SV 10 mM Tris pH 7,5
Auftrag:	20 SV verdünntes Antikörperserum (zweimal aufgetragen)
Waschen:	20 SV 10 mM Tris pH 7,5
	20 SV 10 mM Tris pH 7,5 inkl. 0,5 M NaCl
Elution:	10 SV 100 mM Glycin pH 2,5
Regeneration:	15 SV 10 mM Tris pH 8,8
	15 SV 10 mM Tris pH 7,5
	5 SV Säulenlagerungspuffer

Die ersten 7 Fraktionen (Verdünnung 1 : 1.000) wurden zusammen mit dem Durchlauf (1 : 100), den beiden Waschеluaten (1 : 100) und dem Serum (1 : 1.000) per Western-Blot getestet. Dabei kamen pro Bahn ~25 ng natives Kaninchenleberenzym (Gelfiltration) als Antigen zum Einsatz. Die gereinigten Antikörper wurden aliquotiert und bei −80 °C gelagert.

4.12 Dünnschicht-Chromatographie

Die verwendeten Polyethylenimin-imprägnierten (PEI) Celluloseplatten [61] arbeiteten nach dem Ionenaustausch-Prinzip. Die 10 cm hohen Platten hatten eine Laufstrecke von ~8 cm, der Abstand der Startpunkte betrug 1 cm. Die Proben wurden µl-weise aufgetragen, bei größeren Volumina kam vorsichtiges Trockenfönen zum Einsatz (ggf. Wärmestabilität der Proben bedenken; hier kein Problem). Die eigentliche Chromatographie erfolgte mit verschiedenen Fließmitteln (siehe Abschnitt 5.3.1 und 5.6.7) in einer gläsernen Standard-DC-Kammer. Nach dem Trocknen des Fließmittels wurde das Detektionsreagenz aufgetragen bzw. eine Autoradiographie durchgeführt.

4.13 Nachweis von Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität im nativen Elektrophorese-Gel

Im letzten Stadium der Aufreinigung der Histidin-Phosphatase (vor der Proteinsequenzierung) wurde das nur noch eine Hauptbande enthaltende Eluat der Blue Sepharose einer nativen PAGE unterzogen. Das Gel wurde mitten in der Blue Sepharose-Bahn zerschnitten und die eine Hälfte mit Silber gefärbt. Anschließend wurde das Gel wieder zusammengesetzt und ermöglichte so die Lokalisierung der ungefärbten Hauptbande im unbehandelten Teil des Gels. In dieser Region wurden 5 übereinanderliegende Querstreifen (5 mm x 2 mm) so ausgestanzt, dass der mittlere die Bande enthielt. Die Streifen wurden in kleine Stücke geschnitten und jeweils auf Enzymaktivität untersucht. Dazu wurden im Enzymtest die 10 µl Enzymlösung gegen die sich in 10 µl Wasser befindenden Gelstücke ausgetauscht. Als Leerwert diente ein sechster Streifen, der weit von der Enzymbande entfernt aus dem Gel geschnitten wurde.

5 Ergebnisse

5.1 Entwicklung des Histidin-Phosphatase-Aktivitätstests

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Suche und gegebenenfalls Aufreinigung sowie Charakterisierung einer Histidin-Protein-Phosphatase im Säugetier. Dabei sollte der Ansatz von der klassischen proteinbiochemischen Seite aus erfolgen (und nicht beispielsweise molekularbiologisch). Zunächst musste dafür ein neuer Test entwickelt werden, der bestimmte Kriterien zu erfüllen hatte. Neben der Forderung nach einer spezifischen Histidin-Phosphat-Dephosphorylierung sollte ein für Labormaßstäbe hoher Durchsatz erreicht werden. Nur so konnten die zahlreichen Proben (z. B. die bei der Säulenchromatographie anfallenden Fraktionen) überhaupt getestet werden. Die in der Literatur beschriebenen Verfahren konnten nicht zuletzt wegen der fast immer enthaltenen Gelelektrophorese diese Quantität nicht bieten [44, 62]. Als Ausgangspunkt diente der Mikrotest auf Serin/Threonin-Protein-Phosphatase-Aktivität nach McGowan und Cohen [51]. Die dort zum Stoppen und zur Abtrennung nicht umgesetzten Substrats verwendete Trichloressigsäure verbot sich jedoch aufgrund der Säurelabilität von Histidin-Phosphat.

Die Wahl des Substrats fiel auf das aus *E. coli* stammende Protein CheA. Dieses ist die Zweikomponentensystem-Kinase im Chemotaxis-Regelkreis des Bakteriums. Sowohl der gesamte Signaltransduktionsweg als auch das CheA selbst wurden in der Literatur sehr umfangreich charakterisiert [14–18]. Es handelt sich um eine 71 kDa große Histidin-Autokinase, die sich unter Verbrauch von ATP an $Histidin_{48}$ phosphoryliert [15]. Bei Abwesenheit seines Zweikomponentensystem-Antwortregulators ist die Phosphorylierung (bei einer Lagerung bei 4 °C) über Wochen weitgehend stabil. Zum Einsatz kam das gereinigte, in *E. coli* exprimierte Protein, welches freundlicherweise von Melvin I. Simon, Caltech, Pasadena, USA zur Verfügung gestellt wurde. Aufgrund der leichten Verfügbarkeit und vor allem der umfassenden Charakterisierung von CheA wurde der bakterielle Ursprung des Substrats bei der Suche nach einer Säugetier-Histidin-Phosphatase in Kauf genommen.

Auf der Suche nach einem geeigneten Fällungsmittel zum Stoppen des Tests wurde eine Reihe Reagenzien getestet. In Vortests wurde mittels Proteinbestimmung (Bio-Rad-Methode

bzw. SDS-PAGE) die Quantität der Fällung überprüft. Weitere Untersuchungen fanden dann im radioaktiven Testsystem statt. Die Zugabe von 0,5 Testvolumen (TV) 50%iger Polyethylenglykol 9000-Lösung führte zu einer gelben, zähen Masse, die sich nicht weiter untersuchen ließ. Das Versetzen mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (Endkonzentration: 30/50/70 %) fällte ~90 % (50/70 % $(NH_4)_2SO_4$) bzw. ~50 % (30 % $(NH_4)_2SO_4$) des Proteins aus. 4 TV Natronlauge (0,5/1/6 M) führten maximal zu einer 90%igen Fällung, der Zusatz von 4 TV der organischen Lösungsmittel Aceton, Ethanol oder Methanol erbrachte ebenfalls eine Fällung von ~90 %. Ein Gemisch von Methanol und Aceton (1 + 1) resultierte in einer fast quantitativen Fällung. Dieses Ergebnis wurde im Testsystem näher geprüft. Neben dem optimalen Volumen Fällungsreagenz wurde auch der Zusatz von BSA als Trägerprotein für die Fällung analysiert. Dabei ergab sich, dass ab 3 TV Methanol/Aceton (1 + 1) 95 % des Substrats ausgefällt wurden. Eine Erhöhung der Fällungsmittelmenge brachte keine weitere Verbesserung. BSA als Fällungsträger konnte dieses Ergebnis auf 98 % erhöhen, was eine Konzentration von 0,5 mg/ml im Test voraussetzte. Auch hier ließ sich mit einer größeren Menge kein weiterer Fortschritt erzielen.

Als Puffersubstanz kam TEA zur Anwendung. TEA ist ein tertiäres Amin, im Gegensatz zum allgemein im physiologischen pH-Bereich verwendeten Tris, welches ein primäres Amin ist. Da der Tris-Stickstoff rein theoretisch wie der zu phosphorylierende Stickstoff des Histidins eine N-O-Bindung eingehen könnte, wurde bei allen Phosphorylierungs- und den meisten Dephosphorylierungsvorgängen auf Abwesenheit von Tris geachtet. Mit dieser Maßnahme wurde von vornherein eine Artefaktbildung oder eine Histidin-Phosphatase-Hemmung durch Tris ausgeschlossen.

Wie sich bei ersten Untersuchungen am ungereinigten löslichen Leberextrakt zeigte, beeinflussen millimolare Konzentrationen von zweiwertigen Kationen die Methanol/Aceton-Fällung im Aktivitätstest massiv: trotz bestätigter Dephosphorylierung (SDS-PAGE und Autoradiogramm) war im Überstand der Fällung praktisch keine Radioaktivität vorhanden. Vermutlich wurde das abgespaltene Phosphat in Form von im organischen Überstand sehr schlecht löslichen Metallphosphaten ausgefällt. Der ursprüngliche Test auf Serin/Threonin-Protein-Phosphatase-Aktivität enthält nur rein wässrige Komponenten, weshalb dieses Problem dort nicht beschrieben wurde. Die Lösung lag in der Zugabe von EDTA, die

allerdings nach der Inkubation und vor dem Fällungsreagenz zugesetzt werden musste. Anderenfalls wäre die Untersuchung des Einflusses von zweiwertigen Kationen auf die Enzymaktivität unmöglich gewesen. Da sich EDTA nicht in Methanol/Aceton (1 + 1) löst, musste EDTA am Ende der Testzeit unmittelbar vor dem Fällungsreagenz als eigene wässrige Lösung hinzugefügt werden. Dabei ließ eine Endkonzentration von 100 mM EDTA (bezogen auf den Testansatz inkl. EDTA-Lösung) genügend Spielraum für die Untersuchung der Abhängigkeit der Enzymaktivität von Me^{2+}-Ionen.

Bei den oben erwähnten ersten Untersuchungen stellte sich eine leichte Aktivierung (etwa Faktor zwei) des Enzyms durch zweiwertige Metallionen heraus (Abschnitt 5.6.4), daher wurde der Test standardmäßig in Anwesenheit von 10 mM $MgCl_2$ durchgeführt.

Die Inkubationstemperatur des Aktivitätstest wurde auf den physiologischen Wert von 37 °C festgesetzt. Der gewählte pH-Wert war mit 7,5 ebenfalls noch physiologisch, hatte aber andererseits genügend Abstand vom sauren pH-Bereich (Säurelabilität der Histidin-Phosphate). Die Inkubationszeit von 30 min ließ auch noch die Messung von geringeren Enzymaktivitäten bzw. die Verwendung sehr kleiner Enzymvolumina zu. Das Testvolumen war mit 40 µl noch gut zu handhaben, ohne dass übermäßig große Enzym- und Substratmengen gebraucht wurden.

5.2 [^{32}P]-Phosphorylierung von CheA

In der Literatur war für CheA auch ein *in vitro*-Autophosphorylierungsansatz mittels ATP zu finden [14]. Darauf und auf Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe basierend wurde der beschriebene Phosphorylierungsansatz entwickelt, wobei einige Parameter variiert wurden. Die Anwesenheit von Magnesium erwies sich als notwendig, wobei eine Konzentration von 0,1 und 1 mM keinen Unterschied ergab. Eine Magnesiumkonzentration von 10 mM führte jedoch zur Abnahme der Einbaurate um den Faktor 10. Die Phosphorylierungszeit wurde im Bereich von 1–6 h untersucht. Die maximale Einbaurate war nach 2–3 h erreicht, eine längere Inkubation ergab keinen Vorteil.

Die Auftrennung von [^{32}P]Histidin$_{48}$-CheA und [γ-^{32}P]ATP auf der sehr kleinen Gelfiltrationssäule hatte den Vorteil einer nicht zu großen Verdünnung der Substratstammlösung. Die beiden radioaktiven Substanzen wurden allerdings so dicht hintereinander eluiert, dass sie sich in den Ausläufern der Signale minimal überschnitten. Daher war das Sammeln von kleinen Fraktionen gleicher Volumina mit anschließender Cerenkov-Vermessung zur Identifizierung der ausschließlich [^{32}P]CheA enthaltenden Fraktionen unabdingbar. Diese Fraktionen enthielten üblicherweise in einem Gesamtvolumen von 400–500 µl 4–10 % der eingesetzten Menge [^{32}P].

Bei der Lagerung kam es anfangs innerhalb eines Tages zu einem Verschwinden von bis zu 90 % der in den Fraktionen festgestellten Radioaktivität. Nähere Untersuchungen zeigten, dass das [^{32}P]CheA anscheinend durch Adsorptionsprozesse an die Wand der Kunststoff-Mini-Reaktionsgefäße gebunden wurde. In Anwesenheit von 0,5 mg/ml BSA unterblieb dieser Effekt jedoch vollkommen. Die offensichtlich unspezifische Adsorptionsfläche wurde von dem in größerer Konzentration vorliegenden BSA praktisch gesättigt, sodass auch bei längerer Lagerung kein [^{32}P]CheA mehr aus der Lösung verschwand. Aus diesem Grunde wurden die sich ursprünglich im Testpuffer 4fach befindenden 2 mg/ml BSA in den G-50-Puffer aufgenommen. Auf diese Art unterband BSA die Adsorption des [^{32}P]CheA und gelangte weiterhin als Fällungsträger in der bewährten Konzentration in den Aktivitätstest.

Eine nennenswerte Hydrolyse der Substratstammlösung war bei 4 °C auch nach einigen Wochen nicht zu verzeichnen. Die sehr viel verdünntere Substrattestlösung zeigte hingegen nach 24 h eine merkliche Freisetzung von [^{32}P]. Daher wurde die für den Tag benötigte Menge Substrattestlösung frisch durch Verdünnung der Substratstammlösung hergestellt.

Die verwendete Säule musste nicht immer neu gepackt werden. Dazu waren jedoch einige Vorkehrungen zu treffen. Die anfänglich bei der Lagerung oder gar Benutzung der Säule auftretenden Luftblasen im Säulenbett konnten durch konsequente Vakuumentgasung des Puffers am Tage der Verwendung vermieden werden. Die Konservierung der Säule während der Lagerung wurde durch Verwendung von 0,04 % NaN_3 und Entfernung des BSA nach dem Säulenlauf (Waschen mit BSA-freiem Puffer) gewährleistet. Schließlich wurde die Ansammlung von Partikeln in und auf dem Säulenbett durch Benutzung von standardmäßig

sterilfiltrierten (0,22 µm Porengröße) Puffern minimiert. So konnte die Säule bis zu 20-mal benutzt werden, bevor eine langsam abfallende Ausbeute zum Wechsel des Säulenmaterials mahnte.

5.3 Charakterisierung des Histidin-Phosphatase-Aktivitätstests

5.3.1 Identifizierung von Phosphat als Reaktionsprodukt

Zunächst galt es die im Überstand des Aktivitätstests enthaltene Radioaktivität als freies Phosphat zu identifizieren. Im Wesentlichen mussten intaktes [^{32}P]CheA sowie daraus durch Proteasen freigesetzte, das [^{32}P]Histidin$_{48}$ enthaltende Peptide ausgeschlossen werden. Die hierfür weit verbreitete Methode ist die Überführung des Phosphats in seinen Phosphomolybdokomplex und seine anschließende organische Extraktion [63]. Dieses Verfahren bedient sich jedoch einer schwefelsauren KH_2PO_4-Lösung, was zu einer Dephosphorylierung des noch intakten, aber säurelabilen [^{32}P]CheA geführt hätte. Somit konnte auf diese anderweitig etablierte Technik nicht zurückgegriffen werden. Statt dessen wurde eine Dünnschicht-Chromatographie mit Polyethylenimin-imprägnierter Cellulose und 0,8 M LiCl als Fließmittel durchgeführt (Abb. 2). In diesem System hatte freies anorganisches Phosphat einen Rf-Wert von knapp 0,5, was eine gute Trennung von am Startpunkt verbleibenden Proteinen, Peptiden und auch von ATP ermöglichte. Auf jede Bahn wurde zusätzlich zur Probe auch nicht radioaktives Phosphat aufgetragen und nach der Autoradiographie durch Besprühen mit salpetersaurer Ammoniummolybdat-Lösung sichtbar gemacht. So konnte der entsprechende, von radioaktivem Phosphat stammende Fleck auf der Autoradiographie identifiziert werden. Dies war nicht zuletzt nötig, weil das Phosphat nicht auf allen Bahnen gleich weit lief. Die geringen Unterschiede beruhen auf den unterschiedlichen pH-Werten der aufgetragenen Lösungen, da das Trennprinzip dieser DC die Ionenaustausch-Chromatographie ist. So konnte gezeigt werden, dass die im Testüberstand vorhandene Radioaktivität in der Tat freies Phosphat ist. Intaktes oder teilweise verdautes [^{32}P]CheA konnten ebenso wie [γ-^{32}P]ATP ausgeschlossen werden. Außerdem wurde dabei sicher-

gestellt, dass das als Substrat verwendete [^{32}P]CheA nicht schon vor dem Test hydrolysiert worden ist. Es waren höchstens Spuren von freigesetztem Phosphat zu sehen (< 1 %; Abb. 2).

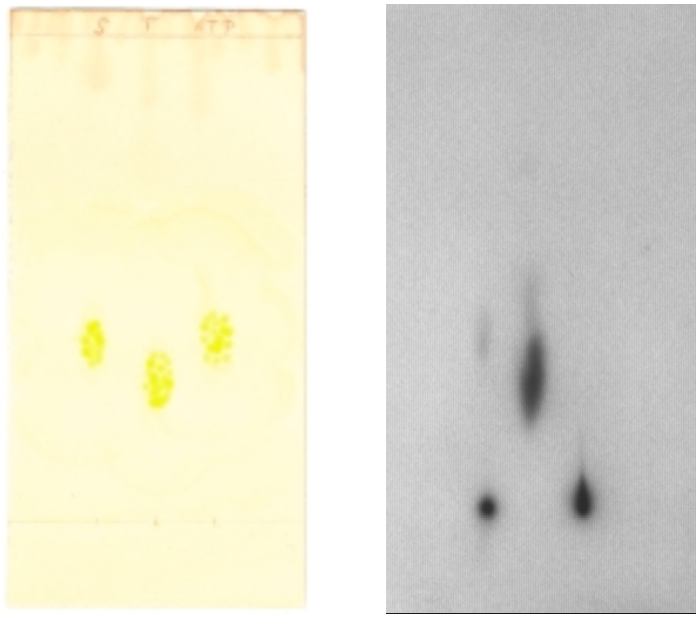


Abb. 2: Identifizierung von Phosphat im Überstand des Aktivitätstests mittels Ionenaustausch-Dünnschicht-Chromatographie.
Bahn 1: [^{32}P]His_{48}-CheA (Substrat)
Bahn 2: Reaktionsprodukt im Testüberstand
Bahn 3: [γ-^{32}P]ATP
Bahn 1-3: nicht radioaktives Phosphat (KH_2PO_4)

5.3.2 Zeitabhängigkeit der [^{32}P]CheA-Dephosphorylierung

Weiterhin war es nötig zu zeigen, dass [^{32}P]CheA im Test zeitabhängig dephosphoryliert wird. Außerdem musste die Weitergabe des Phosphats an ein anderes Protein ausgeschlossen werden, denn CheA hat eine Transferase-Aktivität für das an $Histidin_{48}$ gebundene Phosphat zu Aspartat. Dazu wurden Aktivitätstests im 15-µl-Maßstab durchgeführt und nach

unterschiedlicher Zeit mit Histidin-Probenpuffer gestoppt. Der gesamte Test wurde dann mittels 17,5%iger SDS-PAGE aufgetrennt und eine Autoradiographie ausgeführt (Abb. 3). Hiermit konnte die zeitliche Abnahme von [^{32}P]CheA dokumentiert werden. Eine Übertragung des Phosphats auch auf sehr kleine Proteine konnte aufgrund des hochprozentigen Elektrophoresegels ebenfalls ausgeschlossen werden.

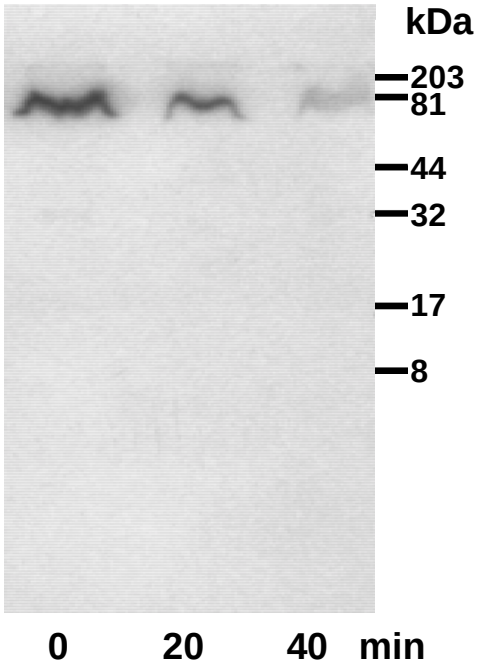


Abb. 3: Zeitabhängige Dephosphorylierung von [^{32}P]CheA.

5.3.3 Linearität des Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivitätstests

Ebenfalls zu klären war der Bereich des linearen Verlaufs des Dephosphorylierungstests. Die dazu durchgeführte Testreihe mit verschiedenen Enzymmengen zeigte, dass die Dephosphorylierung von [^{32}P]CheA im Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivitätstest mindestens bis zu einer Substratdephosphorylierung von 25 % linear verläuft (Abb. 4). Bei

sehr aktivem Enzym musste durch Verdünnung für die Einhaltung dieses Wertes gesorgt werden.

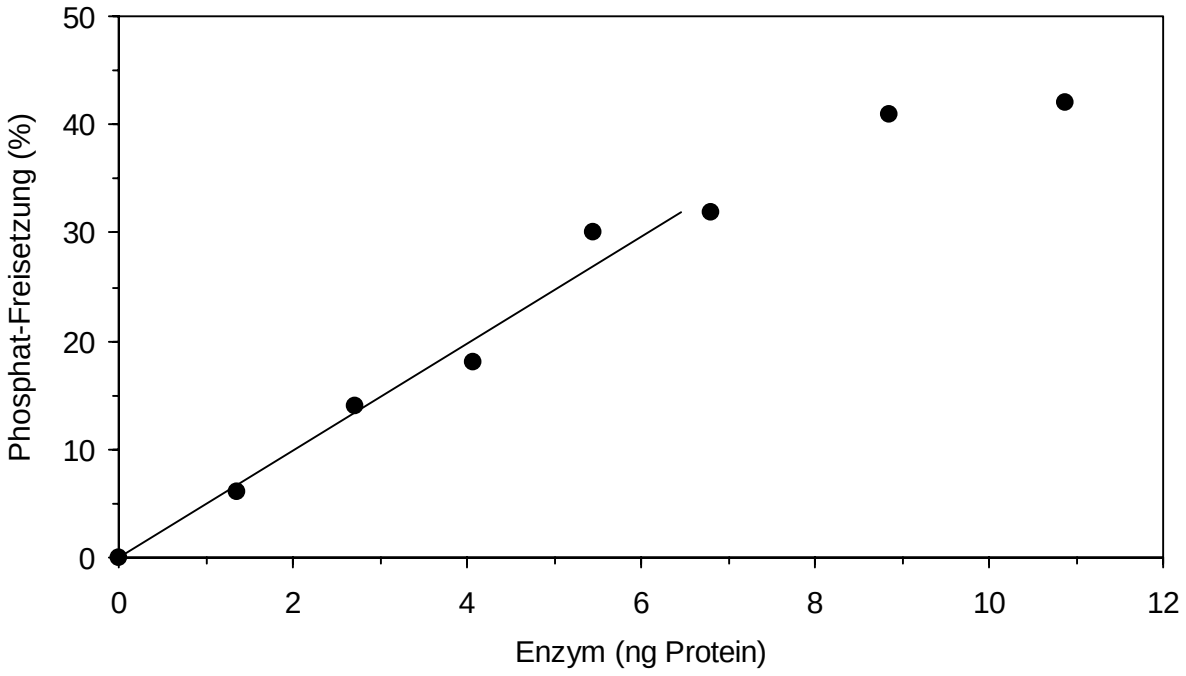


Abb. 4: Proteinabhängigkeit des Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivitätstests. Verwendet wurde aufgereinigtes natives Enzym (Blue Sepharose) mit einer spezifischen Aktivität von 13,8 pmol/min x mg^{-1} und einem Proteingehalt von 0,68 µg/ml.

5.3.4 Untersuchung anderer Phosphatasen auf [^{32}P]CheA-Dephosphorylierungs-Aktivität

Es wurde auch überprüft, ob die Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen Typ 2A (aus humanen Erythrozyten) und 2C (rekombinante α- und β-Isoform aus der Rinderretina [65]) sowie die alkalische Phosphatase in der Lage sind, [^{32}P]CheA zu dephosphorylieren. Dazu wurde jeweils ein etwas anderer Testpuffer verwendet (Endkonzentrationen):

PP2A: 10 mM Tris pH 7,0
PP2C: 10 mM Tris pH 7,0 inkl. 20 mM $MgAc_2$
alkalische Phosphatase: 50 mM Tris pH 8,0 inkl. 1 mM $MgAc_2$
Keines der Enzyme konnte [^{32}P]CheA hydrolysieren.

5.4 Reinigung der Histidin-Protein-Phosphatase

5.4.1 Verteilung der Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität

Beim Zerkleinern mit dem CAT-Homogenisator wurde das Lebergewebe sehr intensiven Scherkräften ausgesetzt, was einen praktisch völligen Aufschluss aller Zellen zur Folge hatte. Durch die anschließende Zentrifugation wurden alle partikulären Bestandteile einschließlich der Zellmembranen im Niederschlag gesammelt. Nach der Mullfiltration zur Abtrennung des Fettes enthielt der Überstand nur noch die löslichen Zellbestandteile. Der im Homogenisationspuffer A resuspendierte Niederschlag („unlöslich“) und der Überstand („löslich“) wurden hinsichtlich der Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität und des Proteingehaltes untersucht. Dabei entfielen 80 % der Gesamtaktivität auf den Überstand. Die spezifische Aktivität lag im Niederschlag bei 0,28 fmol/min x mg^{-1}, im Überstand betrug sie 1,13 fmol/min x mg^{-1}.

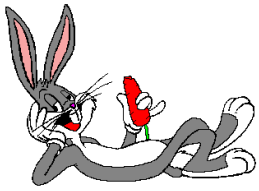
5.4.2 Ammoniumsulfat-Fällung (zur Konzentrierung vor der Gelfiltration)

Ursprünglich wurden für die Aufkonzentrierung des Anionenaustauscher-Eluats vor dem Auftragen auf die Gelfiltrationssäule Centricon bzw. Centriplus Zentrifugationsfilterröhrchen benutzt. Dabei sollten Volumina von ~35 ml (7–8 mg/ml) auf 5–6 ml (~30 mg/ml) eingeengt werden. Aufgrund der hohen Proteinkonzentration dauerte dieser Vorgang jedoch 12 h und mehr. Aus diesem Grunde wurde dieser Schritt gegen die wesentlich schnellere Ammoniumsulfat-Fällung ersetzt. Versuche mit einer fraktionierten Fällung (35/65/95 %) ergaben, dass bei 65 und 95 % jeweils nur die halbe Ausgangsaktivität gefällt und wieder in Lösung

gebracht wurde. Daher wurde eine 90%ige Fällung der Gelfiltration vorgeschaltet. Diese hatte natürlich fast keinen Reinigungseffekt und diente praktisch nur zur Konzentrierung der SOURCE 30Q-Eluate. Es fanden sich 75–85 % der Ausgangsproteine im Überstand der zweiten Zentrifugation wieder. Interessanterweise stieg die Aktivität mitunter leicht an: sie betrug in der Regel zwischen 90 und 115 % der Ausgangsaktivität, womit sich aus Protein und Aktivität ein Reinigungsfaktor von 1 bis 1,5 errechnete. Dieser geringen Aktivierung wurde aber keine große Bedeutung beigemessen, sie wurde vermutlich im Wesentlichen von einer nahezu vollständigen Ausbeute getragen. Der nicht sofort auf die Superdex 75-Säule gegebene Teil des Materials wurde ohne nennenswerten Aktivitätsverlust bei −80 °C gelagert und war über Monate stabil.

5.4.3 Säulenchromatographische Aufreinigung

Die Aufreinigung der Histidin-Protein-Phosphatase aus Kaninchenleber ging nach vorangegangener Homogenisation des Organs vom Überstand des zentrifugierten Homogenats aus (löslicher Extrakt). Eine Reinigungseinheit umfasste in der Regel 20 ml dieses Überstandes, was ungefähr 10 g Lebergewebe entsprach. Die Reinigung bestand aus drei säulenchromatographischen Schritten (FPLC; Abb. 5), die Ammoniumsulfat-Fällung diente im Wesentlichen nur der Konzentrierung des Anionenaustauscher-Eluats (SOURCE 30Q) vor der Gelfiltration (Superdex 75). Die folgenden Abbildungen der einzelnen Chromatographieschritte beruhen auf repräsentativen Säulenläufen. Es ist jeweils die (standardmäßig in Anwesenheit von 10 mM Mg^{2+}) gemessene Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität und die während des Säulenlaufs vom UV-Detektor aufgezeichnete Absorption bei 280 nm (OD_{280}) abgebildet.



Leber

↓

Löslicher Extrakt

↓

Source 30Q

↓ 200 mM NaCl

Superdex 75

↓ 15-17 kDa

Blue Sepharose

↓ 10 mM $MgCl_2$ (- - - -) 200 mM NaCl; 0 Mg

Histidin-Protein-Phosphatase

Abb. 5: Schema der Reinigung der Histidin-Protein-Phosphatase aus Kaninchenleber. Die der Gelfiltration vorgeschaltete Ammoniumsulfat-Fällung wurde nicht abgebildet, da sie nur zur Konzentrierung des Anionenaustauscher-Eluats dient. Sie leistet praktisch keinen Beitrag zur Aufreinigung.

5.4.3.1 SOURCE 30Q (Anionenaustausch-Chromatographie)

Der Überstand des Leberhomogenats wurde auf die selbstgepackte SOURCE 30Q-Säule (Abb. 6) aufgetragen. Der Durchlauf enthielt maximal 2 % der Histidin-Phosphatase-Aktivität, jedoch mit 60–70 % einen großen Teil der Fremdproteine. Gewaschen wurde mit Auftragspuffer, also ohne NaCl, da es keine NaCl-Konzentration gab, die eine erwähnenswerte Menge Fremdprotein von der Säule wusch, ohne gleichzeitig eine starke Histidin-Phosphatase-Aktivität zu eluieren. Die mit 200 mM NaCl eluierte Aktivität betrug regelmäßig 70–80 % der Ausgangsaktivität, bei guten Säulenläufen sogar bis zu 95 %.
Gleichzeitig enthielten die aktiven Fraktionen nur 15–25 % des Proteins des Ausgangsmaterials. Der Reinigungsfaktor lag somit bei 3–6. Die vereinigten aktiven Fraktionen wurden bei −80 °C gelagert. Die Weiterverarbeitung erfolgte regelmäßig am nächsten Tag, jedoch war auch nach einigen Monaten keine signifikante Abnahme der Aktivität festzustellen.
Ursprünglich wurde dieser Reinigungsschritt mit einem anderen Säulenmaterial durchgeführt. Die Q Sepharose Fast Flow enthielt die gleiche bindende Gruppe (quartäres Ammoniumion) wie die SOURCE 30Q, daher waren Bindungsverhalten und Ausbeute der Histidin-Phosphatase-Aktivität vergleichbar. Die unterschiedliche Größe und Größenverteilung der Säulenmaterialpartikel führte jedoch dazu, dass die Q Sepharose Fast Flow-Säule schon nach 3–4 ml des recht gehaltvollen löslichen Extraktes derart verstopft war, dass selbst mit einer Flussrate von 0,1 ml/min der für das Material maximal zulässige Druck überschritten wurde. Von Anfang an im löslichen Extrakt befindliche Partikel schieden aufgrund der unmittelbar vor dem Säulenlauf erfolgenden Zentrifugation und der Verwendung eines Vorfilters als Ursache aus. Dies, und die Tatsache, dass sich die Verstopfung beim Regenerieren sehr leicht auflöste, ließen vermuten, dass der hohe Proteingehalt zusammen mit sicherlich noch vorhandenen Lipiden zu der Blockierung führte. Das alternativ eingesetzte SOURCE 30Q-Material ist speziell für verhältnismäßig unreine und hochkonzentrierte Homogenate entwickelt worden. Es war damit auch nach 20 ml Auftrag keinerlei Blockierung des Fließmittelweges zu erkennen.

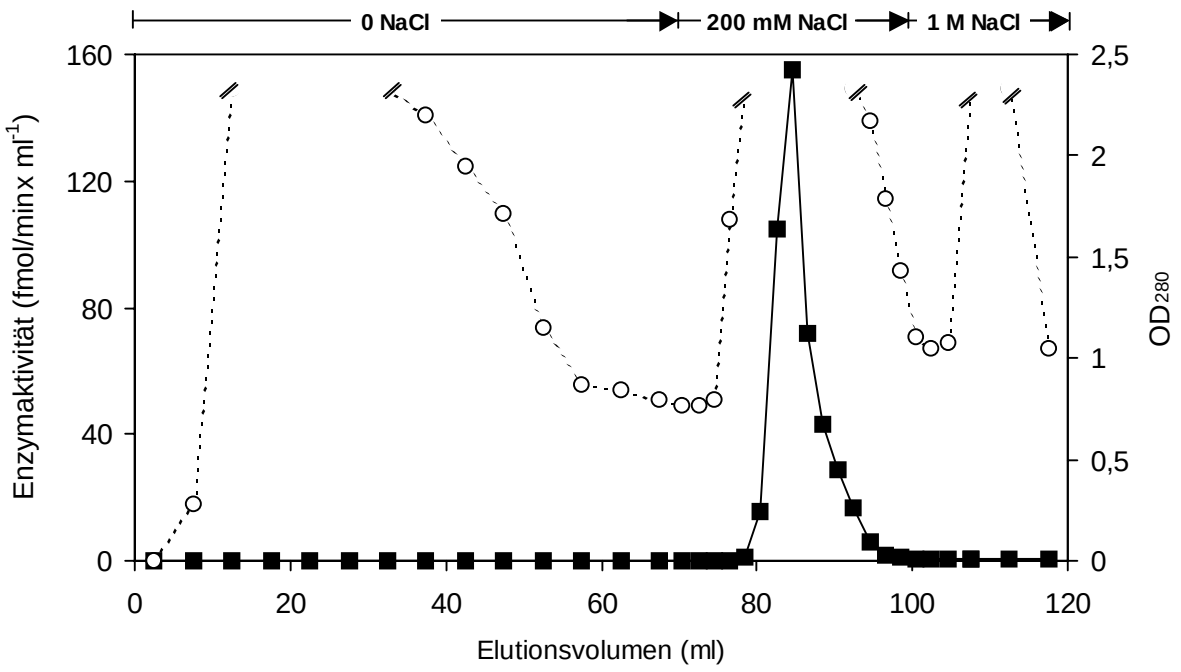


Abb. 6: SOURCE 30Q-Säulenlauf (Anionenaustausch-Chromatographie). Das Proteinprofil (○) wurde oberhalb einer Absorption von 2,3 abgeschnitten, da das verwendete UV-Detektor/Schreiber-System höhere Werte nicht mehr darstellen konnte. Die Aktivität (■) eluierte bei 200 mM NaCl in einem scharfen Signal, wobei der größte Teil des Fremdproteins abgetrennt wurde.
Auftrag: 20,0 ml; 556 mg Protein; 2,09 fmol/min x mg^{-1}
Eluat: 15,0 ml; 138 mg Protein; 7,24 fmol/min x mg^{-1}

5.4.3.2 Superdex 75 (Gelfiltration)

Die aktiven Eluate zweier SOURCE 30Q-Läufe wurden vereinigt und zur Konzentrierung einer 90%igen Ammoniumsulfat-Fällung unterworfen. Der wiederaufgenommene Niederschlag diente nach erneuter Zentrifugation zur Entfernung nicht wieder in Lösung gegangener Proteine als Auftragsmaterial für die Gelfiltration. Die für diesen Chromatographieschritt verwendete HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade-Säule (Abb. 7) ist eine vom Hersteller gepackte Gelfiltrationssäule mit einem Trennbereich von 3 bis 70 kDa. Nahezu das gesamte

Protein eluierte im Bereich von 100 bis 190 ml, die Histidin-Phosphatase-Aktivität folgte erst zwischen 200 und 230 ml. Das mittels Markerproteinen bestimmte Molekulargewicht in dieser Spanne lag zwischen 11 und 21 kDa, die maximale Aktivität eluierte bei 15 bis 17 kDa. Die Proteinmenge der aktiven Fraktionen betrug 0,5–1 % im Vergleich zum Auftrag (Ammoniumsulfat-Fällung). Die wiedergefundene Aktivität entsprach 70–80 % der eingesetzten. Somit ergab sich für den effektivsten Reinigungsschritt ein Reinigungsfaktor von 80 bis 160. Die 20–25 ml umfassenden vereinigten Fraktionen erfuhren als Ganzes bei −80 °C gelagert auch nach Wochen keinen nennenswerten Aktivitätsverlust. Aliquots von wenigen µl verloren jedoch binnen zwei Monaten bis zu 30 % Aktivität. Ein Zusatz von 5 % Glycerin vor dem Aliquotieren und Einfrieren gewährleistete dagegen über Monate Stabilität. Deshalb wurden für Charakterisierungsuntersuchungen bestimmte Säulenläufe auf diese Art

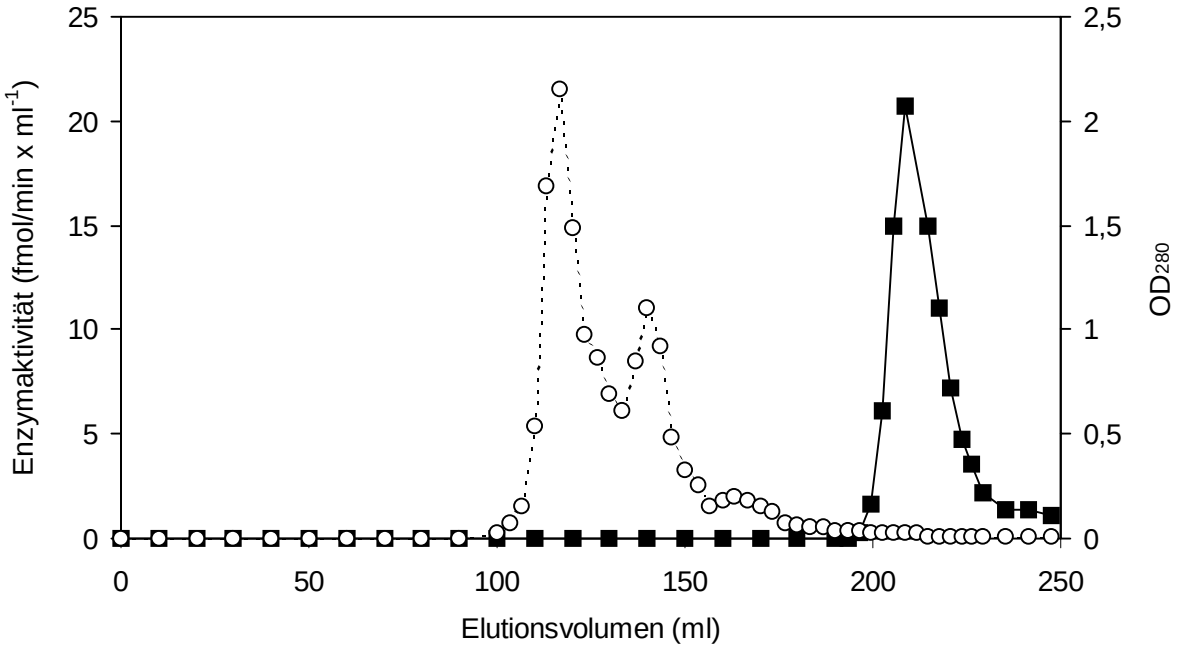


Abb. 7: Superdex 75-Säulenlauf (Gelfiltration). Dieser Schritt war mit Abstand der effektivste der ganzen Reinigung: aufgrund des ungewöhnlich niedrigen Molekulargewichtes erschien die Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität (■) sauber abgetrennt weit hinter den meisten Fremdproteinen (○).
Auftrag: 2,0 ml; 61,4 mg Protein; 6,49 fmol/min x mg^{-1}
Eluat: 20,2 ml; 515 µg Protein; 575 fmol/min x mg^{-1}

stabilisiert. Ein genereller Zusatz von 5 % Glycerin zum Gelfiltrationspuffer wurde wieder verworfen, da die Ausbeute auf unter 20 % sank. Die ursprünglich ebenfalls im Puffer A vorhandenen 50 mM NaCl wurden nicht beibehalten. Ihr Fehlen äußerte sich nur in einer minimalen Formveränderung des Schreiberprofils. Elutionsvolumen und Ausbeute der Histidin-Phosphatase wurden nicht tangiert. Dafür entfiel jedoch die Verdünnung vor dem Blue Sepharose-Säulenlauf. Diese war nötig, da das Enzym in Anwesenheit von 50 mM NaCl nur schlecht an das Affinitäts-Chromatographiematerial band.

5.4.3.3 Blue Sepharose (Affinitäts-Chromatographie)

Das bei dieser selbstgepackten Säule (Abb. 8) zum Einsatz gebrachte Material enthielt den Farbstoff Cibacron Blue F3G-A, zu dem in der Mehrzahl Enzyme mit Adenin-haltigen Cofaktoren (z. B. $NAD(P)^+$), aber auch eine Reihe anderer Proteine eine hohe Affinität zeigen. Die Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität zeigte zunächst fast keine Affinität zum Säulenmaterial und erschien nahezu vollständig im Durchlauf. Erst in Anwesenheit von 10 mM Mg^{2+} wurde die Aktivität gebunden. Die Elution mittels steigender NaCl-Konzentrationen in Anwesenheit von Mg^{2+} führte ebenso wie die Elution mit sinkendem Mg^{2+}-Gehalt in Abwesenheit von NaCl zu einem langsamen Ausbluten der Säule: über einen Bereich von mehr als 30 ml war eine praktisch gleichbleibende, kaum messbare Aktivität zu verzeichnen. Die Kombination dieser Elutionsmethoden ergab die Lösung des Problems: nach dem Waschen (wie Auftrag: 10 mM Mg^{2+}; 0 NaCl) wurde das Enzym in Abwesenheit von Mg^{2+} mit 200 mM NaCl von der Säule eluiert, wobei sich der Hauptteil der Aktivität innerhalb von etwa 5 ml wiederfand. Die aktiven Fraktionen enthielten 2–5 % des eingesetzten Proteins. Die Wiederfindungsrate der Histidin-Phosphatase-Aktivität lag bei 30–35 %. Dies ergab einen Reinigungsfaktor von 8–10. Die Lagerung von kleineren Aliquots führte ohne Zusatz von 5 % Glycerin zu großen Aktivitätsverlusten: schon nach 48 h waren 60–80 % Verlust zu verzeichnen. Mit 5 % Glycerin hingegen lag der Verlust nach drei Monaten nur bei rund 10 %. Wurde das Eluat als Ganzes und ohne Glycerin eingefroren, so fiel der Verlust etwas geringer aus: nach rund zwei Monaten fand sich noch etwa 50 %

Aktivität wieder. Es wurde ebenfalls versucht, die 5 % Glycerin schon im Blue Sepharose-Puffer zu platzieren. Dies führte jedoch analog zur Gelfiltration zu schlechten Ausbeuten von weniger als 10 %.

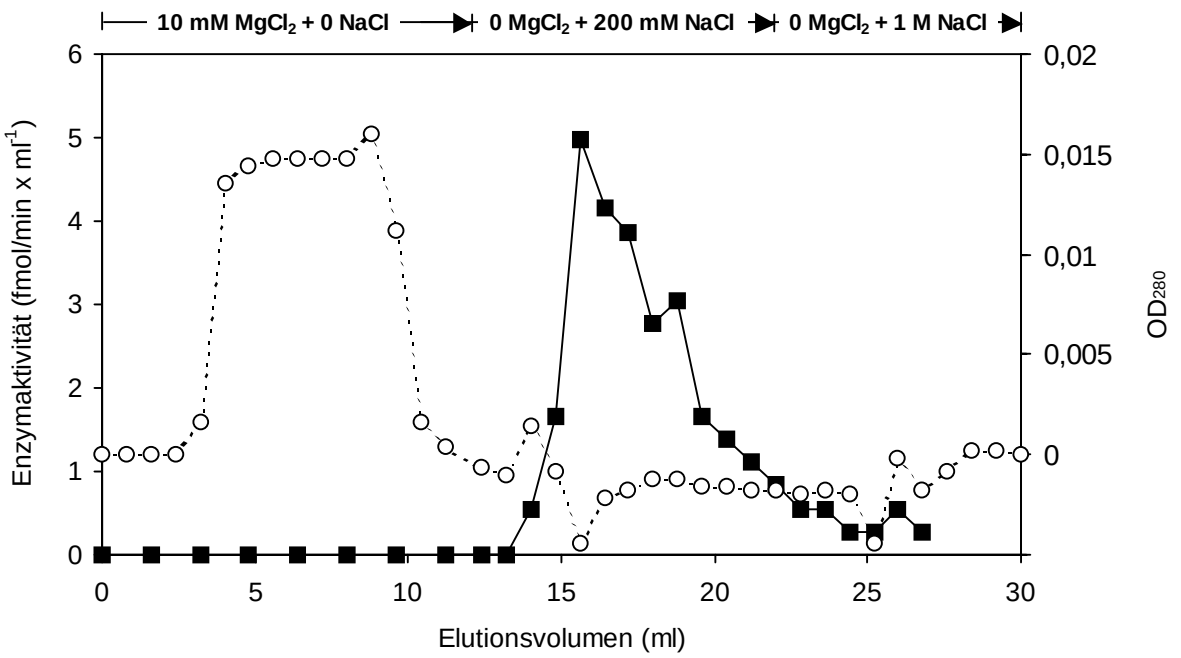


Abb. 8: Blue Sepharose-Säulenlauf (Affinitäts-Chromatographie). Dieser letzte Reinigungsschritt entfernte nochmals einen sehr großen Teil der Fremdproteine. Das OD_{280}-Profil (○) gab nach dem Durchlauf nur noch Artefakte wieder, man konnte der Aktivität (■) kein Schreibersignal zuordnen.
Auftrag: 6,4 ml; 60 µg Protein; 687 fmol/min x mg^{-1}
Eluat: 6,4 ml; 2 µg Protein; 9.407 fmol/min x mg^{-1}

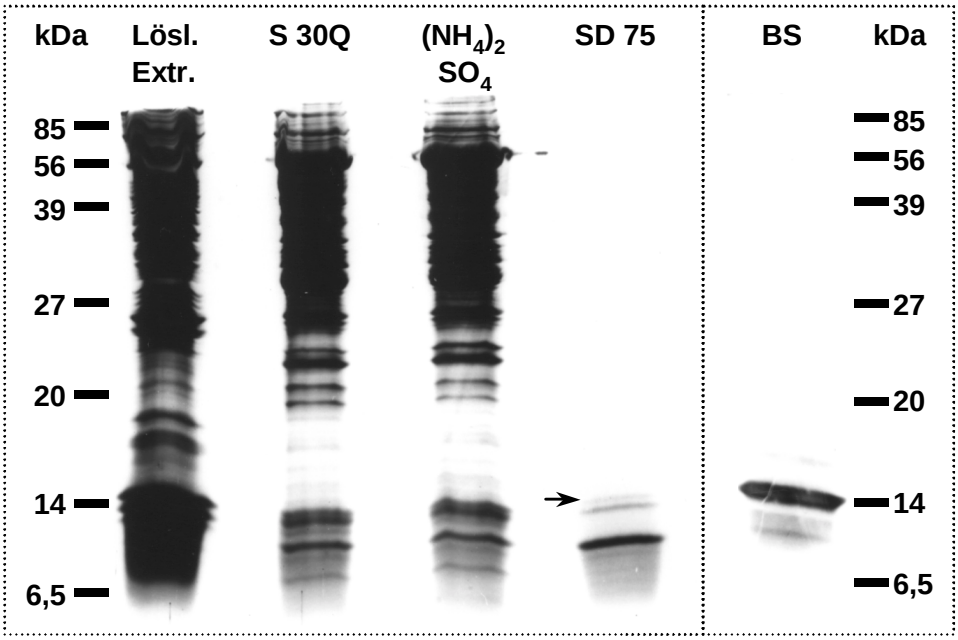
Die Vergrößerung des Reinigungsmaßstabes führte zu einem unerwarteten Problem: wurde der auf einer 1-ml-Säule entwickelte Reinigungsschritt auf eine Säule mit 10 ml Volumen übertragen, so fand sich keinerlei Aktivität wieder. Auch eine mit 3 ml deutlich kleinere Säule brachte keine Verbesserung. Als Ursache wäre eine weiterhin schleichende Elution, die die Aktivität auf der größeren Säule stärker und somit bis zur Unmessbarkeit verdünnt, denkbar. Auch könnte die durch die größere Säule bedingte längere Kontaktzeit mit dem Säulen-

material zu einer Enzyminaktivierung geführt haben. Letztere Vermutung konnte im Reagenzglas nicht bestätigt werden, die Aktivität blieb auch nach längerem Kontakt mit dem Säulenmaterial erhalten. Andererseits lässt sich solch ein „Batch“-Verfahren nicht unbedingt auf einen Säulenlauf übertragen. Eine dauerhafte Adsorption auf der Säule konnte ebenfalls nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Da dieses Problem ohne jegliche Enzymaktivität und somit ohne Hinweis auf den Verbleib des Proteins nicht geklärt werden konnte, wurde das Gelfiltrations-Eluat immer auf mehrere Blue Sepharose-Läufe mit der kleinen Säule verteilt. Zu einem späteren Zeitpunkt könnten andere Methoden (z. B. Western-Blot), die zum Zeitpunkt der Reinigungsentwicklung nicht zur Verfügung standen, Klärung bringen.
Die Aufzeichnung des Proteinprofils bereitete bei dieser Säule Probleme. Der äußerst niedrige Proteingehalt machte eine sehr empfindliche Einstellung des UV-Detektors nötig. Zeichnete sich der Durchlauf noch in Form eines klaren Signals ab, so überspielten die durch Änderung der Salzzusammensetzung des Fließmittels verursachten Effekte die Elution der gebunden Proteine völlig. Dabei reichten die Phänomene von einem kurzen Auf und Ab des Detektorsignals (innerhalb von 3–4 ml; Abb. 8) unmittelbar nach der Salzkonzentrations-änderung bis hin zu einer massiven Änderung der Basislinie. Ein weiteres ungeklärtes Problem stellte die Tatsache dar, dass sich bei manchen Säulenläufen alle Signale unter statt über der Basislinie abzeichneten. Die so erhaltenen Profile stellten quasi ein an der Basislinie gespiegeltes Bild eines normalen Schreiberprofils dar. Diese Spiegelung hing nicht mit dem Auftrag oder den verwendeten Puffern zusammen, da mit ein und denselben Chargen beide Variationen auftreten konnten. Da eine Vorhersage der Signalrichtung nicht möglich war, musste die Nulllinie in der Mitte des Schreiberpapiers eingerichtet werden.

5.4.4 Bilanzierung

Der vorgestellte Reinigungsweg (Abb. 9, Tab. 1) ist weitgehend optimiert. Lediglich das notwendigerweise kleine Säulenvolumen der Blue Sepharose und die damit verbundene hohe Zahl an Säulenläufen stellt einen Ansatzpunkt für eine Zeit- und Aufwandsrationalisierung dar. Die hohe Lagerstabilität der einzelnen Zwischenschritte gestattete eine große Flexibilität

in der zeitlichen Abfolge. Bei −80 °C war – vom Blue Sepharose-Eluat abgesehen – auch nach Monaten praktisch kein Aktivitätsverlust zu verzeichnen (Blue Sepharose: ~10 %). Dies



Reinigungsschritt	Proteinmenge (µg)	Aktivität (fmol/min)
Lösl. Extrakt	13,1	0,027
SOURCE 30Q	13,6	0,11
$(NH_4)_2SO_4$-Fällung	14,0	0,14
Superdex 75	0,20	0,28
Blue Sepharose	2	32

Abb. 9 und Tab. 1: Proteinmuster der einzelnen Reinigungsschritte (17,5%ige SDS-PAGE; Silberfärbung). Die Anionenaustausch-Chromatographie entfernte besonders im niedermolekularen Bereich viele Fremdproteine, die Ammoniumsulfat-Fällung – zur Konzentrierung eingesetzt – zeigte wie erwartet keinen Reinigungseffekt. Der hochmolekulare Fremdproteinbereich wurde bei der Gelfiltration entfernt. Das Enzym war bereits als einzelne Bande sichtbar (oberhalb der dünnen Bande, mit Pfeil markiert). Nach der Affinitäts-Chromatographie dominierte diese nun gut isolierte Bande, es waren nur noch Spuren (< 5 %) fremder Proteine vorhanden.

setzte allerdings eine Stabilisierung der Eluate der letzten beiden Reinigungsschritte mit 5 % Glycerin voraus.

Die gesamte Aktivitätsausbeute lag bei 10–15 %. Aus 20 g Leber ließen sich bis zu 25 µg der Histidin-Protein-Phosphatase weitgehend homogen aufreinigen. Dies entsprach einer etwa 12.900fachen Anreicherung und einer spezifischen Aktivität von 13,8 pmol/min x mg^{-1} (Tab. 2).

Reinigungs-schritt	**Volumen (ml)**	**Protein (mg)**	**Aktivität (pmol/min)**	**Ausbeute (%)**	**spez. Aktivität (fmol/min x mg^{-1})**	**Reinigung (n-fach)**
Homogenat	55,6	2.540	2,72	100	1,07	1
Lösl. Extrakt	36,1	1.145	2,10	77	1,83	1,7
SOURCE 30Q	26,5	202	1,40	52	6,95	6,5
$(NH_4)_2SO_4$	5,2	155	1,58	58	10,2	9,5
Superdex 75	46,9	0,703	0,584	21	831	777
Blue Sepharose	61,4	0,0245	0,337	12	13.755	12.855

Tab. 2: Bilanzierung der Reinigung der Histidin-Protein-Phosphatase aus Kaninchenleber. Die Tabelle zeigt einen repräsentativen Reinigungsdurchgang ausgehend von 19,2 g Lebergewebe (entsprach 2,54 g Protein). Dabei erfolgten einige Schritte in mehreren, hier zusammengefassten Säulenläufen: SOURCE 30Q: zwei Läufe; Superdex 75: zwei Läufe; Blue Sepharose: 10 Läufe.

5.4.5 Nachweis von Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität im nativen Elektrophorese-Gel

Mit der in Abschnitt 4.13 beschriebenen Methode wurde nach nativer PAGE des Blue Sepharose-Eluats nachgewiesen, dass die gemessene Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität

in der beschriebenen Bande (Abb. 9) enthalten war. Die beiden ersten der fünf ausgeschnittenen Gelstreifen enthielten keine, der dritte hingegen sehr viel Aktivität (vollständige Substratumsetzung). Im vierten Gelstück ließ sich eine deutlich schwächere, im fünften praktisch keine Aktivität mehr feststellen.

5.5 Nicht in das Reinigungsschema aufgenommene Verfahren

5.5.1 Säulenchromatographische Verfahren

5.5.1.1 Heparin Sepharose (Affinitäts- und Kationenaustausch-Chromatographie)

Heparin Sepharose ist ein Affinitäts-Chromatographiematerial mit zusätzlichen Kationenaustauscheigenschaften (Sulfatgruppen) [64], an das die Protein-Phosphatase Typ 1 gut bindet [65], die meisten anderen Phosphatasen jedoch nicht. Auf die selbstgepackte Säule wurde verdünntes SOURCE 30Q-Eluat (1 : 4; entsprach 50 mM NaCl) aufgetragen. Das Waschen erfolgte mit NaCl-freiem Auftragspuffer. Die Elution wurde mit 500 mM NaCl vorgenommen. Die Enzymaktivität fand sich jedoch zusammen mit über 90 % des Fremdproteins im Durchlauf. Die Ausbeute war praktisch vollständig, aber eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung zeigte keinen Unterschied im Proteinmuster von Auftrag und Eluat. Daher wurde dieses Säulenmaterial nicht weiter verfolgt.

5.5.1.2 Mono S (Kationenaustausch-Chromatographie)

Bei dieser Säule handelt es sich um eine vom Hersteller gepackte Säule mit hoher Bindungskapazität. Die notwendige Umpufferung wurde durch die vorangestellte Gelfiltration vollzogen, allerdings musste das Eluat vor Auftrag auf die Mono S-Säule verdünnt werden (1 : 3,5; entsprach 15 mM NaCl), da der Gelfiltrationspuffer zu dieser Zeit noch 50 mM NaCl enthielt. Dabei wurden drei verschiedene Säulenläufe durchgeführt:

1. Auftrag: HEPES pH 7,0; Laufpuffer: HEPES pH 7,0
2. Auftrag: NaAc pH 5,0; Laufpuffer: NaAc pH 5,0
3. Auftrag: TEA/NaAc pH 5,0; Laufpuffer: NaAc pH 5,0

Im ersten Lauf fand sich die gesamte Aktivität im Durchlauf, daher erfolgte der zweite bei niedrigerem pH-Wert. Dabei fand sich weder im Durchlauf noch im Eluat (0–1 M NaCl über 40 ml) Aktivität. Aus diesem Grunde wurde beim dritten Lauf ein Zwitterpuffer pH 7,5 bei der Gelfiltration verwendet. Die Umstellung auf pH 5,0 erfolgte erst unmittelbar vor dem Mono S-Lauf. So wurde ein möglicher lagerungsbedingter Stabilitätsverlust zwischen Gelfiltration und Affinitäts-Chromatographie verhindert. Aber auch der dritte Lauf zeigte keine Aktivität im Durchlauf oder Eluat (0–1 M NaCl über 40 ml). Daraufhin wurde die Kationenaustausch-Chromatographie nicht weiter verfolgt.

5.5.2 Ethanol-Fällung

Auf der Suche nach weiteren Reinigungsmethoden wurde auch mit einer 80%igen Ethanolfällung gearbeitet, da diese bei der Reinigung der PP1 sehr effektiv war [65]. Dabei fiel auf, dass die einzelnen Fraktionen (Überstand I und II, Niederschlag II) einzeln getestet weniger Aktivität enthielten, als wenn sie vor dem Test wieder vereinigt wurden. Daraufhin wurden die Fraktionen paarweise kombiniert und getestet. Dies ergab, dass Überstand I und Niederschlag II fast keine, Überstand II und Niederschlag II die halbe und Überstand I und II die gleiche Aktivität wie die drei gemeinsam getesteten Fraktionen enthielt.

Da die Ethanolfällung des Anionenaustauscher-Eluats sehr schlechte Ausbeuten (< 30 %) lieferte, und ein Einsatz vor der SOURCE 30Q keinen Reinigungsvorteil erbrachte (Ausbeute ~70 %), wurde dieses Verfahren nicht weiter untersucht.

5.6 Charakterisierung der Histidin-Protein-Phosphatase

5.6.1 Temperaturabhängigkeit

Die Bestimmung des Temperaturoptimums der Histidin-Protein-Phosphatase ergab keinen einheitlichen Wert: vor der Gelfiltration lag er bei 42–43 °C (Abb. 10), danach stieg er auf 53 °C (Abbildung 12). Diese offensichtliche Veränderung während des Superdex 75-Laufes schlug sich auch in den Arrheniusblots der einzelnen Reinigungsstufen nieder. Hierbei wurden die aufsteigenden Kurvenabschnitte der Temperaturabhängigkeitsuntersuchungen in der Form log v gegen 1/T aufgetragen. Die Abbildungen lieferten vor der Gelfiltration zwei Geraden bzw. Aktivierungsenergien E_A pro Reinigungsstufe (59 und 36 kJ/mol; Abb. 11, Tab. 3), danach kamen alle Werte eines Reinigungsschritts auf einer Geraden zu liegen, es ließ sich also nur eine Aktivierungsenergie pro Säule berechnen (52–55 kJ/mol; Abb. 13, Tab. 3). Dabei hatten die Geraden einen Korrelationskoeffizienten r von mindesten 0,992.

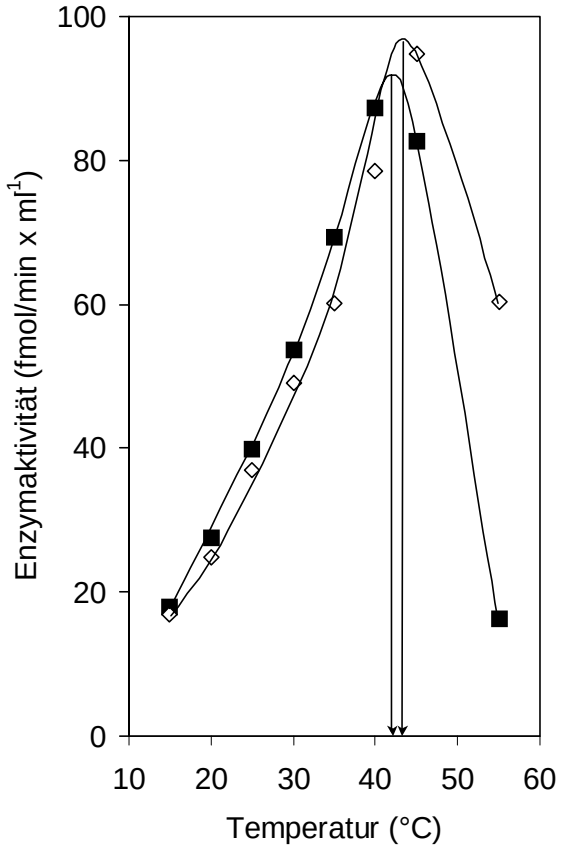


Abb. 10: Temperaturabhängigkeit der Histidin-Protein-Phosphatase im löslichen Extrakt (■) und nach dem Anionen-austauscher (◇). Die Enzymaktivität wurde im Bereich von 15–55 °C untersucht und als Volumenaktivität angegeben, da die unterschiedliche spezifische Aktivität eine vergleichende Darstellung in einem Diagramm nicht erlaubte. Der Proteingehalt betrug 27,8 mg/ml (lösl. Extrakt) bzw. 6,9 mg/ml (S 30Q). Die ermittelten Temperaturoptima waren mit 42 und 43 °C praktisch identisch.

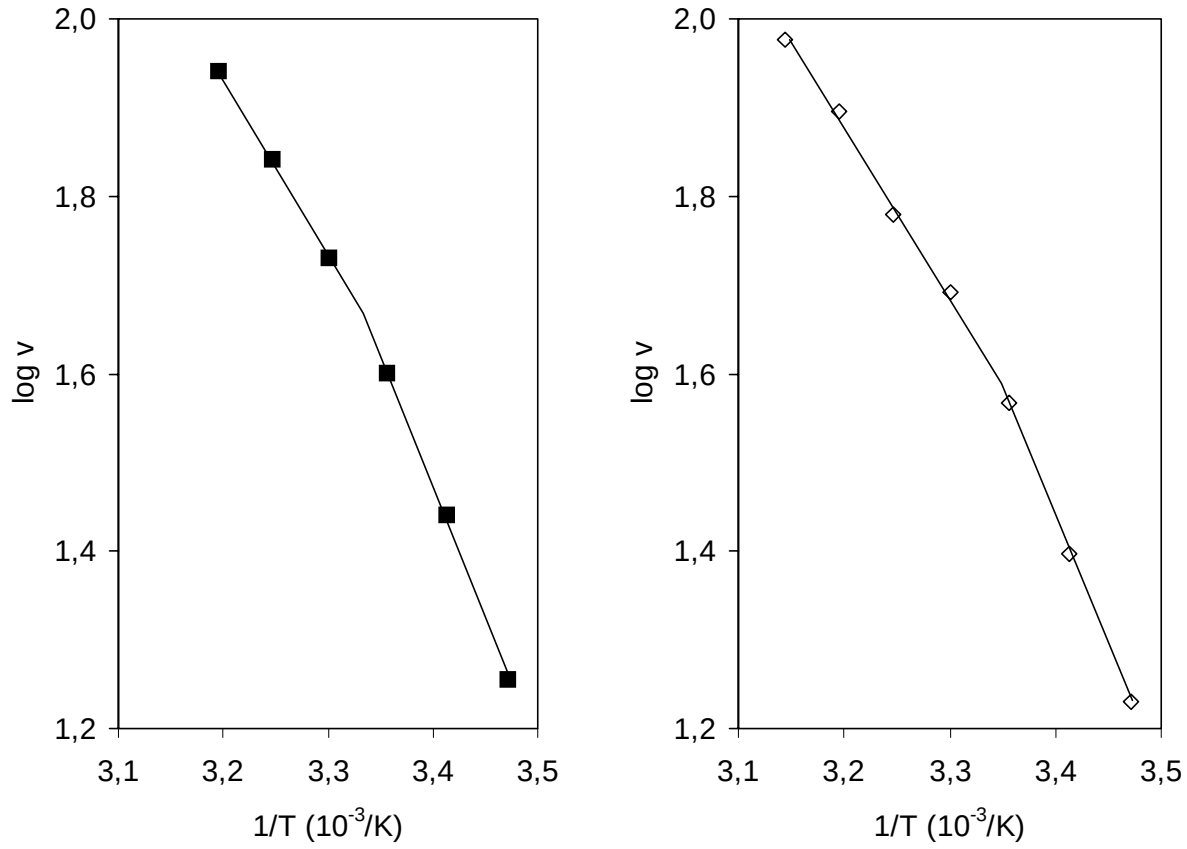


Abb. 11: Arrheniusblots der Histidin-Protein-Phosphatase im löslichen Extrakt (■) und nach dem Anionenaustauscher (◇). Eingang in die Arrheniusblots fanden jeweils die Werte zwischen 15 und 40 °C. Die beiden daraus resultierenden steilen Geraden lieferten eine Aktivierungsenergie von 59,0 kJ/mol (lösl. Extrakt; 15–25 °C; drei Messpunkte; r = 0,999) bzw. 58,9 kJ/mol (S 30Q; 15–25 °C; drei Messpunkte; r = 0,999). Für die beiden flachen Geraden hingegen ergaben sich Werte von 36,4 kJ/mol (lösl. Extrakt; 30–40 °C; drei Messpunkte; r = 0,997) bzw. 35,5 kJ/mol (S 30Q; 25–45 °C; fünf Messpunkte; r = 1,000). Weitere Daten sind in Tabelle 3 zu finden.

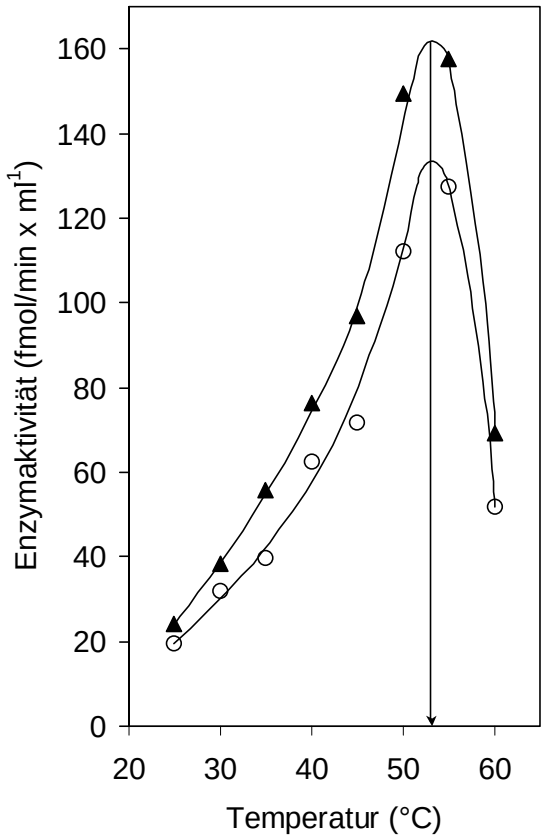


Abb. 12: Temperaturabhängigkeit der Histidin-Protein-Phosphatase nach Gelfiltration (▲) und Affinitäts-Chromatographie (○). Die im Bereich von 25–60 °C gemessene Enzymaktivität wurde analog Abbildung 10 als Volumenaktivität gegen die Temperatur aufgetragen. Die Proteinmenge war mit 25,9 µg/ml (SD 75) bzw. 2,1 µg/ml (BS) größer als normal, da für die Charakterisierung von Superdex 75 und Blue Sepharose per Centricons konzentrierte Enzymlösungen verwendet wurden. Die Temperaturoptima lagen bei 53 °C.

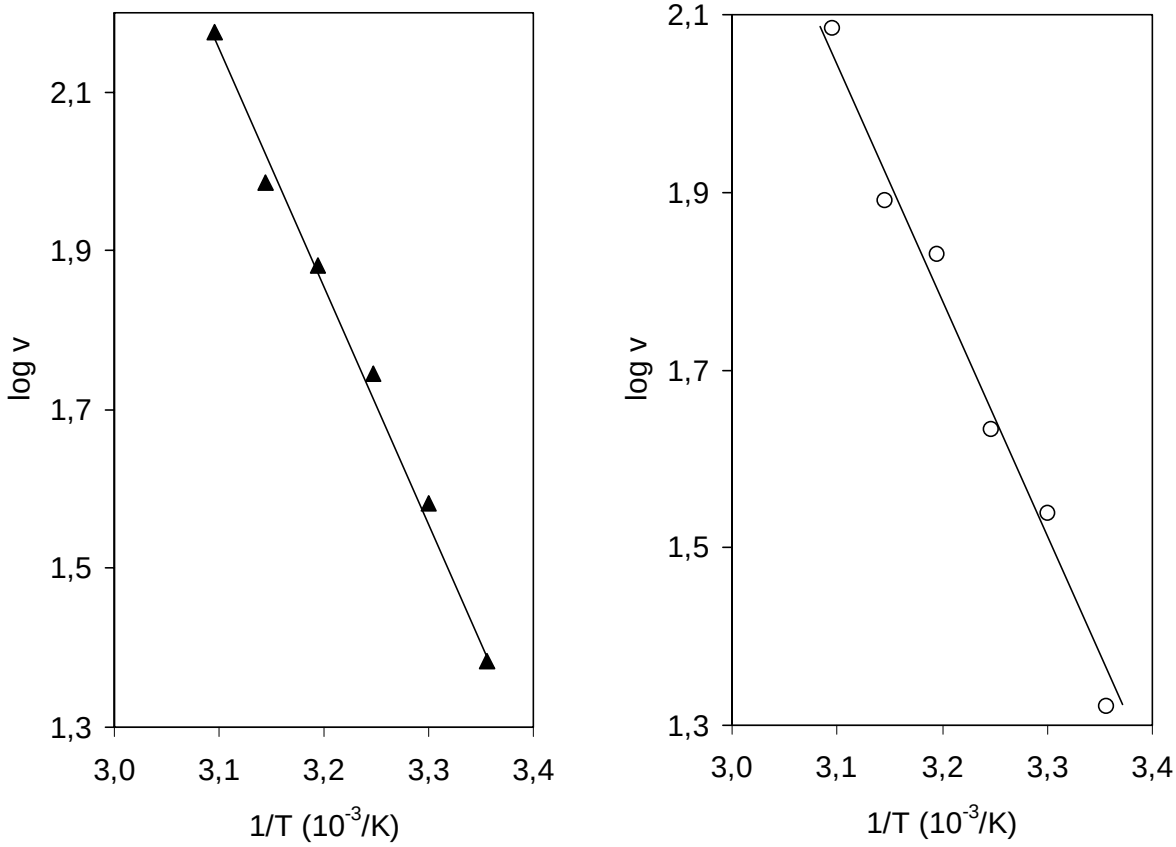


Abb. 13: Arrheniusblots der Histidin-Protein-Phosphatase nach Gelfiltration (▲) und Affinitäts-Chromatographie (○). Den Arrheniusblots wurden je sechs Wertepaare zwischen 25 und 50 °C zugrunde gelegt. Daraus errechnete sich für die Gelfiltration eine Aktivierungsenergie von 55,1 kJ/mol (r = 0,995), für die Affinitäts-Chromatographie eine von 52,4 kJ/mol (r = 0,992). Weiteres ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Reinigungsstufe	lösl. Ex.	lösl. Ex.	S 30Q	S 30Q	SD 75	BS
Gerade	steil	flach	steil	flach	steil	steil
Temperaturbereich (°C)	15–25	30–40	15–25	25–45	25–50	25–50
Steigung (10^{-3}/K)	−3,088	−1,901	−3,082	−1,855	−2,879	−2,742
Korrelationskoeffizient	0,999	0,997	0,999	1,000	0,995	0,992
E_A (kJ/mol)	59,0	36,4	58,9	35,5	55,1	52,4

Tab. 3: Grundlagen und Ergebnisse der Arrheniusblots der verschiedenen Reinigungsstufen.

5.6.2 Substratabhängigkeit

Die Substratabhängigkeit der Histidin-Protein-Phosphatase wurde bis zu einer [^{32}P]CheA-Konzentration von 2,5 nmol/l untersucht. Dabei zeigte sich, dass die im Histidin-Phosphatase-Aktivitätstest standardmäßig verwendete Substratkonzentration (0,21 nmol/l) noch deutlich im linearen Bereich des Michaelis-Menten-Diagramms lag (Abb. 14). Die Michaelis-Menten-Konstante K_M konnte genauso wenig wie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} bestimmt werden, da hierfür deutlich höhere Substratkonzentrationen nötig gewesen wären. Dies war aber mit der zur Verfügung stehenden Substratstammlösung nicht möglich. Es ließ sich jedoch eindeutig feststellen, dass V_{max} der Histidin-Phosphatase in dem eingesetzten Testsystem oberhalb einer Aktivität von 9 pmol/min x mg^{-1} lag. Dem entsprechend betrug K_m mehr als 1,1 nmol/l.

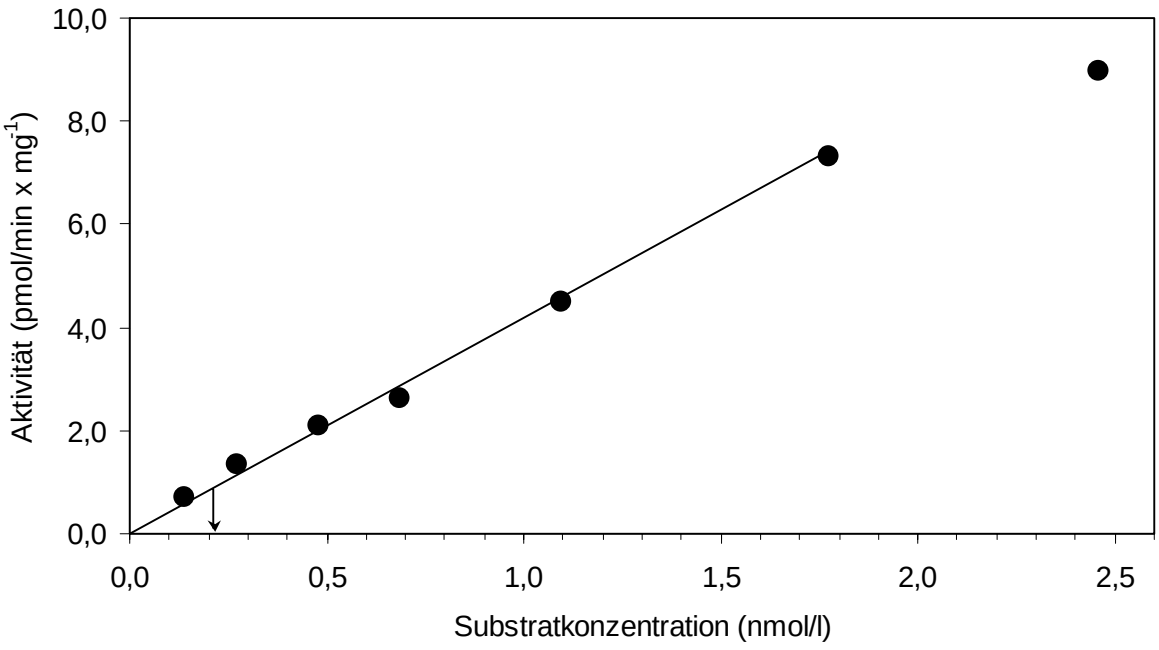


Abb. 14: Substratabhängigkeit der Histidin-Protein-Phosphatase aus Kaninchenleber. Die standardmäßig im Aktivitätstest benutzte [^{32}P]CheA-Konzentration (0,21 nmol/l) ist mittels Pfeil markiert. Es wurde bis zur Gelfiltration aufgereinigtes Enzym mit einem Proteingehalt von 25,9 µg/ml verwendet. Ein Test enthielt 43,2 ng Protein.

5.6.3 pH-Abhängigkeit

Eine Veränderung des pH-Optimums im Laufe der Reinigung wie beim Temperaturoptimum wurde nicht beobachtet. Die maximale Aktivität der Histidin-Protein-Phosphatase lag nach der Gelfiltration und der Affinitäts-Chromatographie bei allen drei in diesem Bereich verwendeten Puffersubstanzen zwischen pH 5,0 und 5,5 (Abb. 15). Bei den früheren Reinigungsstufen war höchstens eine Verschiebung auf pH 5,5 bis 6,0 zu verzeichnen.

Zur Ermittlung des pH-Optimums im untersuchten Bereich von pH 4,5 bis 9,5 wurden folgende Puffersubstanzen im pH-Bereich $pK_S \pm 1$ verwendet: Natriumacetat, N-Methyl-piperazin, bis-Tris, TEA, Tris und Glycin. Es wurde jeweils ein dem standardmäßigen

Testpuffer (4fach) analoger Puffer (4fach) hergestellt, der allerdings eine höhere Konzentration enthielt (200 statt 100 mM). Die dadurch im Test herrschende Endkonzentration von 50 mM Puffersubstanz konnte problemlos das aus dem Substrat- und

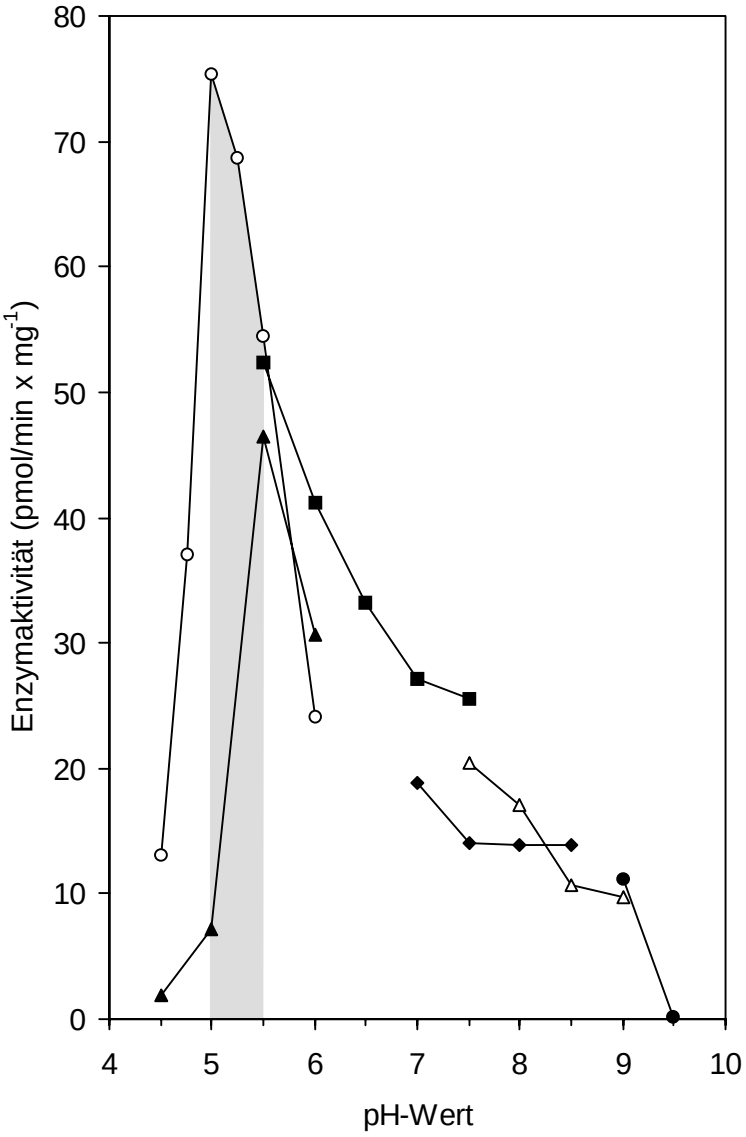


Abb. 15: pH-Abhängigkeit der gereinigten Histidin-Protein-Phosphatase (Blue Sepharose). Verwendete Puffersubstanzen: Natriumacetat (○), N-Methylpiperazin (▲), bis-Tris (■), TEA (◆), Tris (△) und Glycin (●). Je nach Puffersubstanz findet sich das Aktivitätsmaximum bei pH 5,0 bis 5,5. Die verwendete Enzymlösung hatte unter Standardbedingungen eine Aktivität von 14,1 pmol/min x mg^{-1} und einen Proteingehalt von 2,1 µg/ml.

FPLC-Puffer stammende TEA (pH 7,5–8,0; Endkonzentration maximal 17,5 mM) kompensieren. Wie erwartet stieg der Leerwert vom neutralen Bereich aus zu pH 4,5 hin um den Faktor zwei an (Säurelabilität von [^{32}P]CheA). Da die Testwerte jedoch immer ein Vielfaches des Leerwertes ausmachten, störte dies die Verlässlichkeit der Untersuchungen nicht.

Da keine größeren Stabilitätsprobleme bei der Lagerung der Histidin-Protein-Phosphatase zu verzeichnen waren, wurde auf eine Untersuchung der pH-abhängigen Lagerstabilität verzichtet.

5.6.4 Einfluss zweiwertiger Kationen

Die bis zu einer Endkonzentration von 10 mM Me^{2+} durchgeführten Untersuchungen zur Abhängigkeit der Histidin-Protein-Phosphatase von zweiwertige Kationen ergaben eine generelle Aktivierung um einen Faktor von bis zu drei (Abb. 16). Dabei aktivierten die im Körper vorkommenden Metallionen von Magnesium oder Calcium die Phosphatase genauso wie die höchstens in Spuren im Organismus vorhandenen Ionen von Barium oder Strontium (Faktor 2,3 bei 10 mM). Selbst die Anwesenheit von zweiwertigem Blei sorgte für eine Aktivierung. Auffällig war die durch Mangan bedingte Aktivitätszunahme: sie wies ein Maximum bei einer Konzentration von rund 3 mM auf (Faktor 2,8 gegenüber ~2 bei anderen Metallionen), und fiel bei 10 mM mit einer Aktivierung um den Faktor 2,3 wieder auf die Stufe der anderen Ionen zurück (Abb. 16). Die Anwesenheit von 1 mM zweiwertigem Zink hingegen führte zu einer nur noch geringen Aktivität, die bei 5 mM gänzlich verschwunden war. Untersuchungen ohne Zusatz von zweiwertigen Metallionen zeigten mit und ohne 5 mM EDTA bzw. EGTA keinen signifikanten Unterschied.

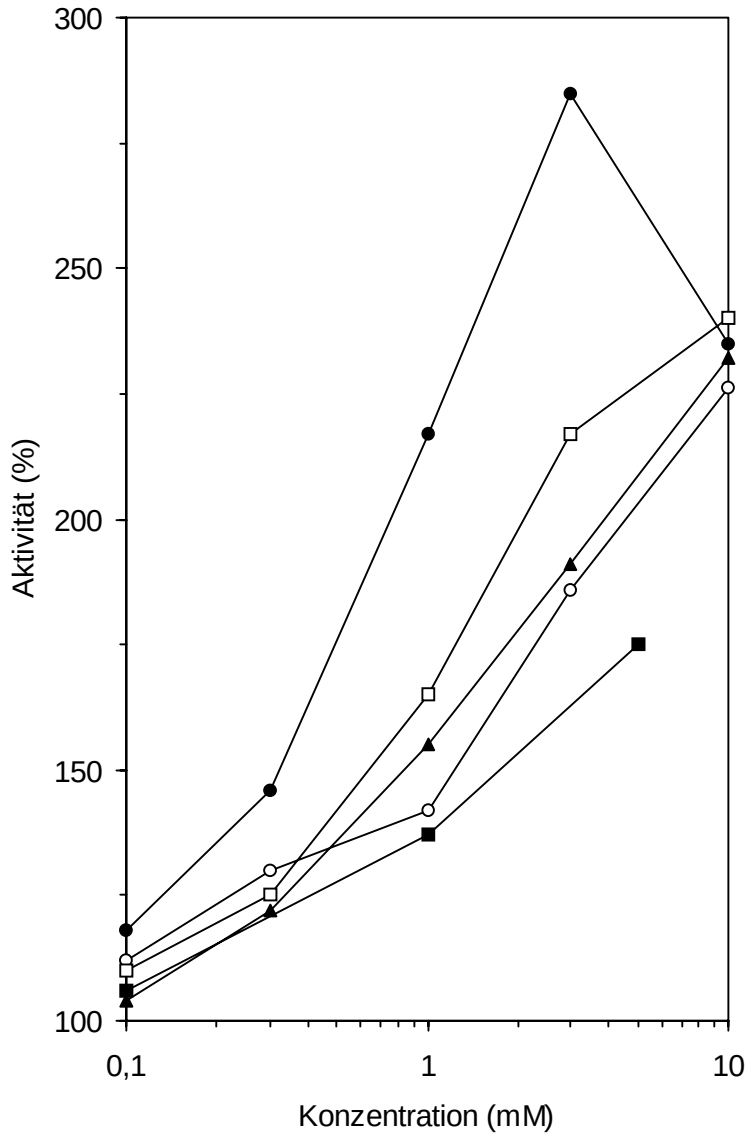


Abb. 16: Unspezifische Aktivierung der Histidin-Protein-Phosphatase durch zweiwertige Metallionen. Dargestellte Kationen: Magnesium (○), Mangan (●), Calcium (□), Barium (▲) und Blei (■). Das bei den zugrundeliegenden Tests verwendete Gelfiltrationsmaterial hatte in Abwesenheit von Metallionen eine Aktivität von 0,64 pmol/min x mg^{-1} (entsprach 100 %) und enthielt 25,9 µg/ml Protein. Ein Testansatz beinhaltete 43 ng Protein.

5.6.5 Einfluss einwertiger Kationen

Die Enzymlösungen der verschiedenen Reinigungsstufen enthielten mitunter NaCl oder $(NH_4)_2SO_4$. Daher wurde der Einfluss dieser Salze auf die Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität untersucht (Abb. 17). Gelegentlich kann bei Problemen mit NaCl-Anwesenheit dieses durch KCl erfolgreich ersetzt werden, daher wurde auch KCl getestet. Die verwendete $(NH_4)_2SO_4$-Lösung war auf den pH-Wert des Tests (pH 7,5) eingestellt.

Es zeigte sich, dass millimolare Konzentrationen NaCl oder KCl keine Hemmung verursachten, erst bei größeren Konzentrationen nahm die Enzymaktivität stärker ab. Im Falle von $(NH_4)_2SO_4$ setzte die Inhibierung früher und stärker ein, Konzentrationen deutlich unterhalb von 10 mM hatten aber keinen Einfluss.

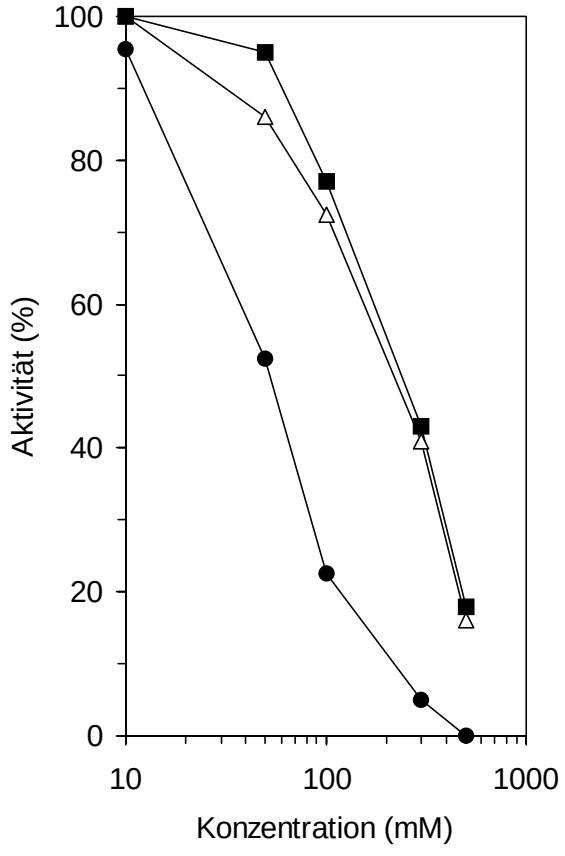


Abb. 17: Hemmung der Histidin-Protein-Phosphatase durch einwertige Kationen. Dargestellte Kationen: NaCl (▲), KCl (■) und $(NH_4)_2SO_4$ (●). Die verwendete Enzymlösung entstammt der Gelfiltration und hatte eine standardmäßige Aktivität von 1,41 pmol/min x mg^{-1} (entsprach 100 %) und einen Proteingehalt von 25,9 µg/ml.

5.6.6 Einfluss gebräuchlicher Phosphatase-Inhibitoren

Um die Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität gegenüber anderen Phosphatasen differenzieren zu können, musste der Einfluss gängiger Phosphatase-Inhibitoren untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass in den üblichen Konzentrationen keiner der Inhibitoren die Aktivität der Histidin-Protein-Phosphatase nennenswert beeinflusste (Tab. 4).

Substanz	**Konzentration**	**Histidin-Phosphatase-Aktivität (%)**	**Inhibitor von**
Phosphat	10 mM	20	*allen* Phosphatasen
Fluorid	5 mM	105	*alkalischen* Phosphatasen
Tartrat	1 mM	95	*sauren* Phosphatasen
Molybdat Vanadat Fluorid	1 mM 1 mM 5 mM	87 78 105	*Tyr*-*Protein*-Phosphatasen
			Ser/Thr-*Protein*-Phosphatasen
Okadainsäure Microcystin Tautomycin	10 µM 5 nM 0,5 nM	108 110 90	PP1, PP2A, PP2B
Inhibitorprotein I_1, I_2	1 nM	120	PP1
EDTA, EGTA	5 mM	105	PP2B, PP2C

Tab. 4: Beeinflussung der Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität durch gebräuchliche Phosphatase-Inhibitoren. Die verwendete Phosphatase-Lösung (Gelfiltration) hatte eine Aktivität von 1,37 pmol/min x mg^{-1} und enthielt 25,9 µg/ml Protein. Pro Testansatz wurden 43 ng Protein verwendet.

Die Hemmung durch Phosphat wurde in Abwesenheit von Magnesiumionen gemessen, da es ansonsten zu Testartefakten kam, die wahrscheinlich durch die Bildung von schwerlöslichen Magnesiumphosphaten ausgelöst wurden. Heparin in einer Konzentration von 3 µg/ml war ohne Effekt. Tartrat hemmte in einer Konzentration von 10 mM stark, aber das in Tabelle 4 angegebene effektlose 1 mM Tartrat lag schon über der zur Hemmung der sauren Phosphatase nötigen Menge. Molybdat und Vanadat schienen zunächst im Konzentrationsbereich um 100 µM zu hemmen, während 5 mM stark aktivierten. Nähere Untersuchungen ergaben jedoch, dass die angegebenen Konzentrationen den Blindwert erhöhten bzw. senkten. Das in Tabelle 4 angegebene 1 mM Vanadat oder Molybdat beeinflusste den Test aber nicht.

5.6.7 Einfluss von Nukleotiden

Es wurde geprüft, ob diverse Adenin- und Guaninnukleotide die Aktivität der Histidin-Protein-Phosphatase verändern. Getestet wurden die Mono-, Di- und Tri-Phosphate sowie die Cyclo-Mono-Phosphate in einer Endkonzentration von 1 mM (Tri-Phosphate: 0,5 mM). Das verwendete Enzym war bis zur Gelfiltration aufgereinigt. Es konnte keine Aktivitätsänderung festgestellt werden.

Außerdem wurde untersucht, ob die Phosphatase in der Lage ist, in An- oder Abwesenheit von 10 mM Mg^{2+} ATP zu dephosphorylieren. Dazu wurde das gleiche PEI-Cellulose-DC-Verfahren eingesetzt, das auch zur Phosphat-Identifizierung bei der Charakterisierung des Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivitätstests zur Anwendung kam. Bei dieser Methode wurde die Position des kalten anorganischen Phosphats nach Ionenaustausch-DC durch Bildung des gelben Phosphomolybdokomplexes lokalisiert und anschließend per Autoradiographie geprüft, ob an diesen Stellen heißes Phosphat aus den aufgetragenen Mikro-Aktivitätstests vorhanden war. Hierbei zeigte sich keinerlei ATPase-Aktivität.

In diesem Zusammenhang wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie auch ausgeschlossen, dass die Histidin-Protein-Phosphatase eine ATP-abhängige Autophosphorylierung durchläuft.

5.6.8 Einfluss von diversen Reagenzien

Die Histidin-Protein-Phosphatase wurde mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) bzw. Iodacetamid (IAA) behandelt und anschließend auf eine Aktivitätsveränderung getestet. IAA blockiert freies Cystein, aber auch Lysin und Serin [66]. DEPC hingegen reagiert mit Histidin und Tyrosin [67]. Die Untersuchungen ergaben, dass IAA, nicht aber DEPC, die Aktivität zum Erliegen bringt, was im Zusammenhang mit der Zn^{2+}-Inhibierung (Abschnitt 5.6.8) auf eine freie, für die Aktivität essentielle Sulfhydrylgruppe hinweist.
Zusätzlich wurden noch Phospho-Creatin und Genistein im Konzentrationsbereich von 1 µM bis 1 mM getestet. Phospho-Creatin ist ein energiereiches Stickstoff-Phosphat, das im Körper als Phosphatdonator zur schnellen Phosphorylierung von ADP zu ATP dient. Genistein ist ein Inhibitor von Tyrosin- und Histidin-Kinasen, der kompetitiv die Bindung von ATP an diese Enzyme hemmt [68]. Beide Substanzen waren ohne Effekt.
Die aus dem Baum *Ginkgo biloba* stammende Ginkgolsäure zeigte sich in der Lage, die Phosphatase zu hemmen. Dabei sank die Aktivität bei einer Konzentration von 100 µM auf 70 %, bei 10 mM auf 35 % herab. Die verwendete Lösung (vom Arbeitskreis Krieglstein zur Verfügung gestellt) enthielt drei Ginkgolsäuren mit folgenden Seitenketten an der Salicylsäure: C13 : 0, C15 : 0 und C15 : 1.
Das in der Enzymologie oft für wasserunlösliche Substanzen als Lösungsmittel verwendete DMSO führte zu einer leichten Aktivierung (auf 120–130 % bei 10 % DMSO), sodass gegebenenfalls der Vergleichswert mit DMSO versetzt werden musste.

5.6.9 Substratspezifität

Die folgenden Phosphatase-Substrate wurden mit der Histidin-Protein-Phosphatase ohne erkennbare Dephosphorylierung getestet (Tab. 5): [^{32}P]Histidin-Nukleosiddiphosphat-Kinase (NDPK), [^{32}P]Tyrosin-EGF-Rezeptor, [^{32}P]Serin/Threonin-Casein, p-Nitrophenylphosphat (PNPP) und ein der Phosphorylierungsstelle von CheA entsprechendes Peptid (15 Aa, je 7 vor und nach dem His_{48} von CheA), welches synthetisch Histidin-phosphoryliert wurde (Merck,

Darmstadt). Außerdem wurde auf ATPase- ([γ-^{32}P]ATP; siehe auch Abschnitt 5.6.7) und Protease-Aktivität (Azocoll) getestet. Die folgenden Angaben sind jeweils Endkonzentrationen.

Die Histidin-Autokinase NDPK (aus Rinderleber) wurde während einer Stunde bei 37 °C phosphoryliert (20 mM Tris pH 7,9; 5 mM $MgCl_2$; 1 µM [γ-^{32}P]ATP; 0,1 % 2-ME) [47] und anschließend per Gelfiltrations-Zentrifugationssäule von überschüssigem [γ-^{32}P]ATP befreit. Der anschließende Histidin-Phosphatase-Mikrotest wurde per SDS-PAGE und Autoradiographie ausgewertet (siehe auch Abschnitt 5.3.2). Diese Arbeiten wurden von Frau Dr. Dagmar Selke ausgeführt.

Der EGF-Rezeptor (vom Arbeitskreis Schlegel zur Verfügung gestellt) hat eine Tyrosin-Autokinase-Aktivität. Seine Phosphorylierung erfolgte bei 37 °C während 15 min (50 mM Tris pH 7,5; 1 mM $MgAc_2$; 1 µM [γ-^{32}P]ATP). Die Abtrennung von unverbrauchtem [γ-^{32}P]ATP und der Dephosphorylierungstest erfolgten analog der NDPK.

[^{32}P]Serin/Threonin-Casein (von Frau Dr. Dagmar Selke zur Verfügung gestellt) wurde nach der von McGowan und Cohen beschriebenen Methode hergestellt und auf Dephosphorylierung durch die Histidin-Phosphatase getestet [51]. Zusätzlich wurde es im Histidin-Phosphatase-Aktivitätstest als Substrat eingesetzt.

Substrat	Dephosphorylierung
[^{32}P]His-CheA	+
CheA-P-Peptid	–
[^{32}P]His-Nukleosiddiphosphat-Kinase	–
[^{32}P]Ser/Thr-Casein	–
[^{32}P]Tyr-EGF-Rezeptor	–
p-Nitrophenylphosphat	–
[γ-^{32}P]ATP	–
Azocoll	–

Tab. 5: Substratspezifität der Hisitidin-Protein-Phosphatase.

Die Untersuchung, ob die Histidin-Phosphatase PNPP hydrolysieren kann, wurde im Testsystem für die alkalische Phosphatase durchgeführt.
Das CheA-P-Peptid führte im Histidin-Phosphatase-Test selbst in einer Konzentration von 1 mg/ml nicht zu einer kompetitiven Hemmung der [^{32}P]CheA-Dephosphorylierung.
Der Test auf [γ-^{32}P]ATP-Dephosphorylierung wurde bereits beschrieben (Abschnitt 5.6.7).
Die Prüfung auf Protease-Aktivität mittels Azocoll wurde mit verschiedenen unverdünnten Reinigungsstufen über mindestens 4 Stunden durchgeführt.

5.7 Sequenzbestimmung der Histidin-Protein-Phosphatase

Etwa 1 µg des Enzyms wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren aus Kaninchenleber aufgereinigt, per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Aus der mit kolloidalem Coomassie angefärbten Membran wurde die Bande ausgeschnitten und von Dr. Roland Kellner, Merck, Darmstadt mit einem Edman-Sequenzer weiterbearbeitet. Dabei stellte sich heraus, dass das Protein am N-Terminus blockiert ist. Aufgrund der genauen Aminosäuresequenz und des exakten Molekulargewichts wurde diese N-terminale Modifizierung später indirekt als Acetylierung identifiziert. Diese befindet sich aber am Alanin (Aa 2), da das N-terminale Methionin nach der Translation abgespalten wird.
Daraufhin wurden insgesamt 10 µg Enzym isoliert, auf mehrere Bahnen verteilt einer SDS-PAGE unterzogen und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die ausgeschnittenen Gelbanden wurden von Merck eluiert und die Aminosäuresequenz mit den im Folgenden beschriebenen Methoden bestimmt.
Die Massenspektrometrie (MALDI-MS) ergab für die posttranslational modifizierte Histidin-Phosphatase aus Kaninchenleber ein Molekulargewicht von 13,76 kDa. Der Proteinverdau mit verschiedenen Proteasen lieferte einige Fragmente, die weiter mit dem Edman-Sequenzer untersucht wurden. Das blockierte N-terminale Fragment wurde zusätzlich einer Massenspektrometrie-Fragmentierung („post-source decay“) unterworfen und mit diesen Daten weiter aufgeklärt. So konnten 77 % der Aminosäuresequenz des relativ kleinen Enzyms allein proteinbiochemisch aufgeschlüsselt werden. Auf molekularbiologischem Weg wurden

schließlich unter Verwendung von cDNA-Banken die noch fehlenden Aminosäuren von Merck identifiziert. Da bei der Klonierung aus Kaninchenleber Schwierigkeiten auftraten, wurde die Histidin-Protein-Phosphatase letztlich aus Kaninchenherz kloniert. Ein Vergleich der Proteindaten aus Herz (Klonierung) und Leber (zu 77 % sequenziert; Massenspektrometrie) erbrachte keine Sequenzunterschiede.

Mit Hilfe von Datenbankrecherchen konnten Homologe in diversen Eukaryonten identifiziert werden (Abb. 18). Die EST-Datenbanken enthielten verwandte Sequenzen aus den folgenden Lebewesen (Zugriffsnummer und Homologie zum Menschen in Klammern): Mensch (AF131857), Maus (AA00868; 83 %), Zebrafisch (AI477131; 56 %), *Drosophila melanogaster* und *C. elegans* (Z81077; 36 %). Die Kaninchenphosphatase erwies sich als 84%ig identisch mit dem Enzym des Menschen, welches bei Merck kloniert wurde. In *D. melanogaster* handelt es sich sogar um duplizierte Gene: *jan A* (P20348; 41 %) und *jan B* (P20349; 28 %). Die resultierenden Proteine Janus A und Janus B sind auch in Protein-Datenbanken beschrieben. Ihre unterschiedlichen Expressionsmuster wurden bereits untersucht, ihre Funktion ist jedoch noch unbekannt [69]. Das Genom von *C. elegans* wurde inzwischen komplett aufgeklärt [2] und steht als gesicherte Information zur Verfügung.

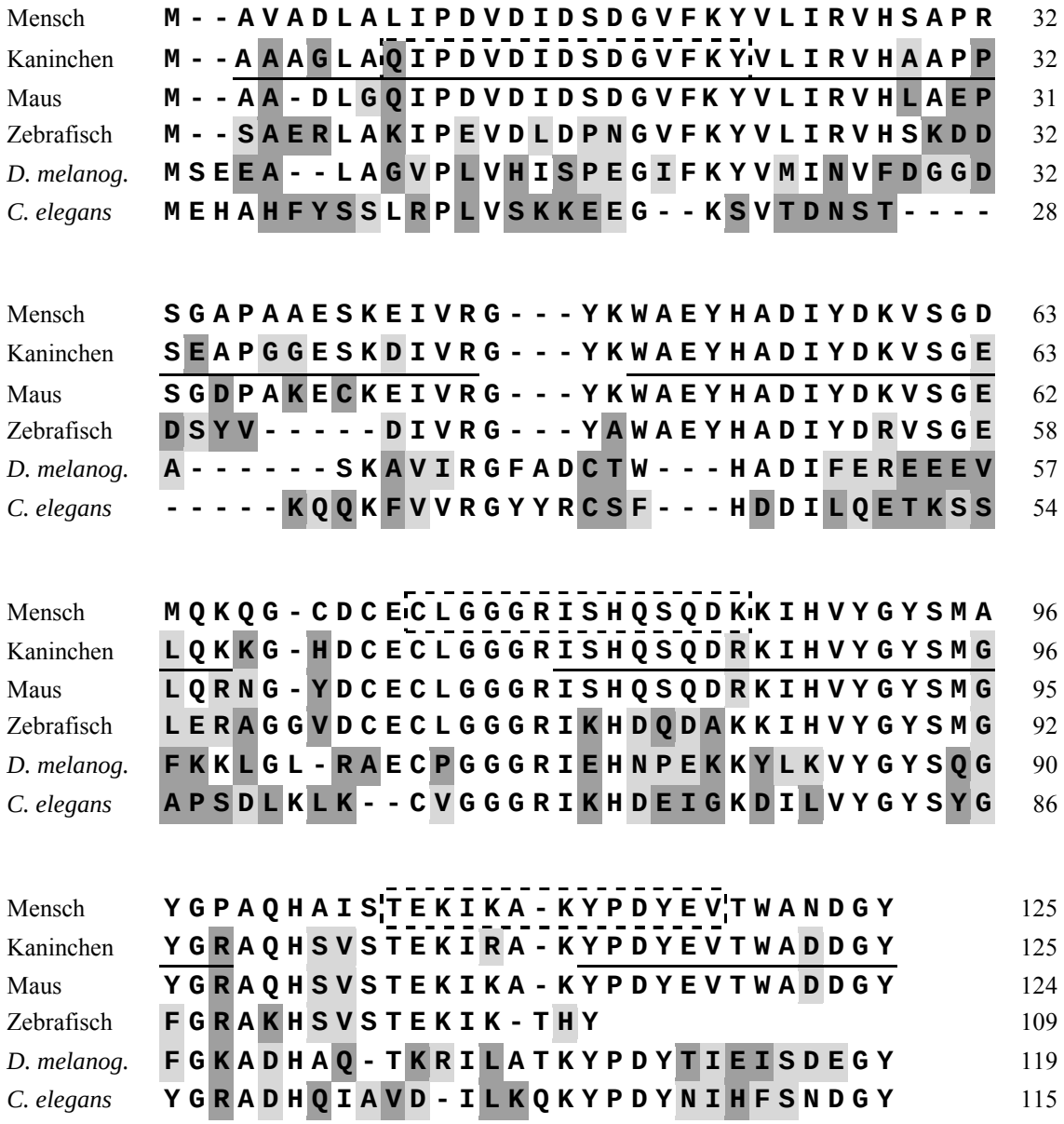


Abb. 18: Aminosäuresequenzen der aus Kaninchen isolierten Histidin-Protein-Phosphatase und ihrer Homologe. Bei der *D. melanogaster*-Sequenz handelt es sich um Janus A. Die mittels Proteinverdau und Massenspektrometrie ermittelten Sequenzteile des Kaninchenenzyms sind unterstrichen, die Erkennungssequenzen der drei Antikörper (siehe Abschnitt 5.8) gestrichelt eingerahmt. Ausgetauschte Aminosäuren – bezogen auf den Menschen – sind grau, konservativ ausgetauschte hellgrau unterlegt.

5.8 Produktion polyklonaler Antikörper gegen Peptide der Histidin-Protein-Phosphatase-Sequenz

Bei der Firma Eurogentec, Belgien wurden Antikörper gegen drei in verschiedenen Bereichen liegende Peptide in Auftrag gegeben (Abb. 18 und 19). Die von Merck synthetisierten Peptide entstammen nicht vollständig der humanen Sequenz, da zum Herstellungszeitpunkt noch nicht alle Sequenzdaten abschließend erhoben worden waren. Die Erkennungssequenz des N-terminalen Antikörpers stimmt mit der Kaninchensequenz überein. Der Unterschied zum Menschen liegt aber nur in der ersten Aminosäure. Der zentrale und der C-terminale Antikörper entsprechen völlig der humanen Sequenz. Sie unterscheiden sich aber ebenfalls nur in einer Aminosäure von der Primärstruktur des Kaninchenenzyms. Aufgrund der minimalen Abweichungen konnte man nicht nur von einer Verwendbarkeit gegen die Histidin-Phosphatase aus Mensch, Kaninchen und Maus, sondern auch gegen die aus weiteren Säugetieren ausgehen.

Die Peptide wurden zur Erhöhung der Antigenizität mit dem hierfür weit verbreiteten Träger „Keyhole limpet hemacyanin“ (KLH) gekoppelt. Dazu enthielt das C- bzw. N-terminale Peptid ein endständiges Cystein, welches nicht der Enzymsequenz entstammte. Beim zentralen Peptid musste kein zur KLH-Kopplung benötigtes Cystein angehängt werden, da dieser Sequenzabschnitt der Phosphatase ein endständiges Cystein enthielt. Die so präparierten Peptide wurden je einem Kaninchen nach einem Standardschema gespritzt und abschließend das Serum der Tiere gewonnen.

N-terminal (Aa 8–22):	**QIPDV DIDSD GVFKY C**
zentral (Aa 73–86):	**CLGGG RISHQ SQDK**
C-terminal (Aa 106–118):	**CTEKI KAKYP DYEV**

Abb. 19: Aminosäuresequenz der drei zur Kaninchenimmunisierung verwendeten Peptide. Die nicht aus der Enzymsequenz stammenden Cysteine sind grau unterlegt. Die angegebenen Aminosäurenummern gelten sowohl für die Phosphatasesequenz des Menschen als auch für die des Kaninchens.

5.9 Reinigung der Antikörper

Zunächst wurden die drei Affinitäts-Chromatographiesäulen hergestellt. Dazu wurde jeweils das zur Kaninchenimmunisierung eingesetzte Peptid mit der beschriebenen Methode (Abschnitt 4.11.1) an das CNBr-aktivierte Säulenmaterial gebunden. Der Durchlauf wurde per Dot-Blot mit der Auftragslösung verglichen, sodass eine Ausbeute von rund 80 % ermittelt werden konnte, d. h. 80 % der Peptidmenge wurde an die Säule gebunden. Für das Säulenvolumen von 1 ml erschienen aufgrund der Angaben des Säulenmaterialherstellers 400 nmol Peptid sinnvoll. Dies entsprach eine Menge von 727 µg (N-terminal), 594 µg (zentral) und 650 µg (C-terminal).

Die Seren wurden nach dem beschriebenen Verfahren auf die Säule aufgetragen, gewaschen und die Antikörper eluiert. Ursprünglich wurde kein MCRT-Puffer vorgelegt, sondern 1 M Tris. Waren die Signale direkt nach der Reinigung noch zufriedenstellend, so verloren die Antikörper bei einer Woche Lagerung bei −80 °C jegliche Antigen-Bindungs-Aktivität. Daraufhin wurde zunächst die Lagerstabilität bei 4, −18 und −80 °C mit und ohne Zusatz von BSA (1 mg/ml) bzw. Glycerin (5 %) untersucht. Ohne Stabilisierungszusatz verlor der Antikörper bei 4 °C noch schneller an Aktivität, eine Lagertemperatur von −18 °C zeigte keinen Unterschied zu −80 °C. Das Glycerin veränderte diese Befunde nicht. Bei Zusatz von BSA hingegen spielte die Lagertemperatur keine Rolle: die Signale waren nach einer Woche gleich schwach, auch wenn der Aktivitätsverlust verlangsamt wurde. Den Durchbruch brachte erst die Verwendung des MCRT-Puffers: in ihm gelagert gaben die in der Hauptsache durch das enthaltene 333 mM Arginin pH 8,0 stabilisierten Antikörper auch nach Wochen noch gute Signale. Dabei zeigte sich erneut kein Unterschied zwischen −18 und −80 °C, die Signale des bei 4 °C gelagerten Antikörpers waren hingegen etwas schwächer.

Da aufgrund dieser Ergebnisse eine anhaltende Antikörperstabilität bei einer Lagerung von einem Jahr oder länger nicht gewährleistet war, und weil noch keine ausreichenden Erfahrungen bezüglich des Aktivitätsverlustes durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren vorlagen, wurden immer nur 2 ml Serum aufgereinigt, sehr klein aliquotiert und bei −80 °C gelagert.

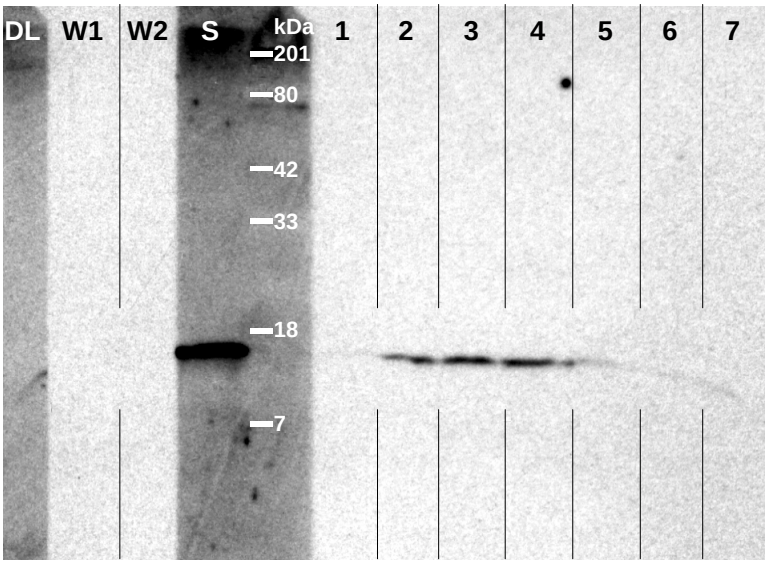


Abb. 20: Western-Blot einer Antikörperreinigung. Durchlauf (DL; 1 : 100), Waschlösungen (W1 und W2; 1 : 100), Serum, d. h. unverdünnter Auftrag (S; 1 : 1.000) und Eluatfraktionen (1-7; 1 : 1.000) einer Affinitäts-Chromatographie-Reinigung des N-terminalen Antikörpers. Etwa 25 ng Kaninchenphosphatase (Gelfiltration) dienten als Antigen.

5.10 Charakterisierung der Antikörper

Aufgrund der erwähnten Stabilitätsprobleme wurden zunächst die Seren untersucht. Als Antigen für den Western-Blot diente standardmäßig Gelfiltrationsmaterial mit etwa 25 ng Histidin-Protein-Phosphatase pro Bahn. Dabei zeigte der N-terminale Antikörper ab einer Verdünnung von 1 : 1.000, der C-terminale ab 1 : 500 ausreichende Signale. Enthielt die Antikörperverdünnung neben TBST auch 5 % Milchpulver, so waren Hintergrund und unspezifische Signale deutlich schwächer. Der zentrale Antikörper lieferte leider auch bei langer Röntgenfilmbelichtung in einer Verdünnung von 1 : 1.000 keine Signale im Molekularbereich der Histidin-Protein-Phosphatase. Eventuell bei deutlich geringerer

Verdünnung auftretende Signale waren vor dem stärkeren Hintergrund nicht auszumachen. Der Einsatz von 17,5%igen SDS-PAGE-Gelen machte bei Western-Blots die auf den Molekularbereich der Histidin-Protein-Phosphatase beschränkte Verwendung möglich. Die unspezifischen Signale traten erst oberhalb eines Molekulargewichtes von 30 kDa auf. Nach der Lösung der Lagerungsprobleme der affinitätsgereinigten Antikörper konnte auf den Einsatz der Seren verzichtet werden.

Der auch im Rohzustand effektivste N-terminale Antikörper wurde gereinigt standardmäßig 1 : 1.000, der etwas schlechtere Antikörper gegen den C-Terminus 1 : 300 verdünnt. Die Zahl der bei den Seren beobachteten Signale oberhalb von 30 kDa reduzierten sich beim N-terminalen Antikörper massiv. Lediglich im Bereich um 40 kDa blieben einige Signale erhalten (siehe auch Abb. 23). Der C-terminale Antikörper zeigte zwar deutlich weniger Signale als im Rohzustand, seine Qualität reicht aber nicht an die des N-terminalen heran. Die Durchführung eines Western-Blots ohne ersten Antikörper zeigte, dass die unspezifischen Signale im Bereich von 30–40 kDa im Wesentlichen nur vom zweiten Antikörper (gegen Kaninchen) stammen. Wie erste Versuche zeigten, eigneten sich beide Antikörper in der üblicherweise 10fach stärkeren als der für den Western-Blot verwendeten Konzentration auch für immunhistochemische Untersuchungen. Der zentrale Antikörper lieferte auch in der gereinigten Form kein Signal.

5.11 Expression der humanen Histidin-Protein-Phosphatase

Die von Merck durchgeführten Expressionsversuche in *E. coli* scheiterten, da die Zellen nach normaler Wachstumsphase mit Beginn der Expressionsphase trotz Exocytose des Proteins rasch abstarben. Schließlich gelang der unter anderem auf Proteinexpression spezialisierten Firma Eurogentec, Belgien die Einbringung des humanen Gens in Baculoviren. Mit diesem Virus konnten SF9 Insektenzellen von Merck erfolgreich transfiziert und das rekombinante Protein exprimiert werden.

5.12 Charakterisierung der rekombinanten humanen Histidin-Protein-Phosphatase

5.12.1 Allgemein

Die nur per standardmäßiger Gelfiltration teilgereinigte rekombinante humane Histidin-Protein-Phosphatase zeigte in ihren Charakteristika (z. B. Insensivität gegen Phosphatase-Inhibitoren) keine Unterschiede zum nativen Kaninchenleber-Enzym. Das Superdex 75-Eluat hatte eine Aktivität von 4,7 pmol/min x mg^{-1} und einen Proteingehalt von 1,4 mg/ml. Das Enzym war im Western-Blot problemlos zu detektieren (Abb. 21). SF9-Kontrollzellen enthielten keine Aktivität und zeigten kein Signal.

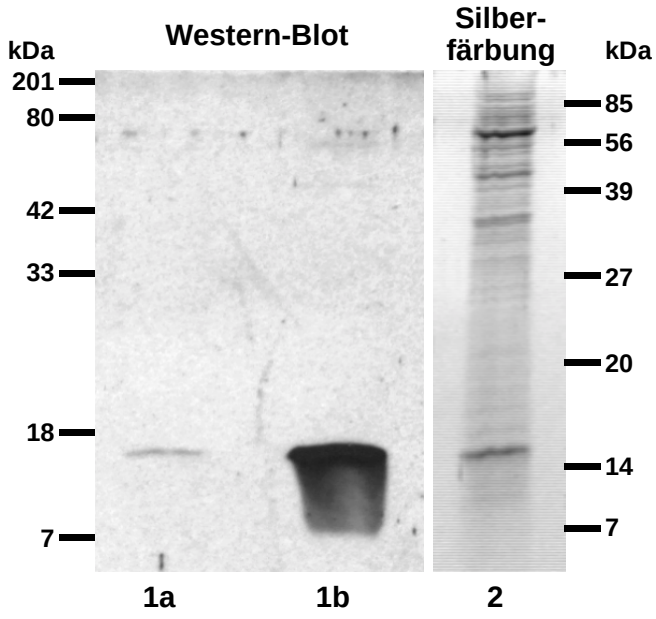


Abb. 21: Western-Blot und Silberfärbung nach 17,5%iger SDS-PAGE der rekombinanten humanen Histidin-Protein-Phosphatase. Es wurde der Überstand des SF9-Zellauf-schlußes verwendet. Für die Silberfärbung (2) wurden 11 µg, für den Western-Blot (1b) 3,3 µg Protein (nicht Phosphatase) verwendet. Als Kontrolle (1a) dienten 25 ng native Histidin-Phosphatase (Gelfiltration) aus Kaninchenleber. Der Antikörper war gegen den N-Terminus gerichtet.

5.12.2 Temperaturabhängigkeit

Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der rekombinanten menschlichen Histidin-Protein-Phosphatase ergab ein Optimum von 51 °C (Abb. 22). Dies entsprach etwa dem Temperaturoptimum des nativen Kaninchenleberenzyms nach den letzten beiden Reinigungsschritten (53°C, vorher 42–43 °C; Abschnitt 5.6.1). Der Arrheniusblot (Abb. 22) ergab eine

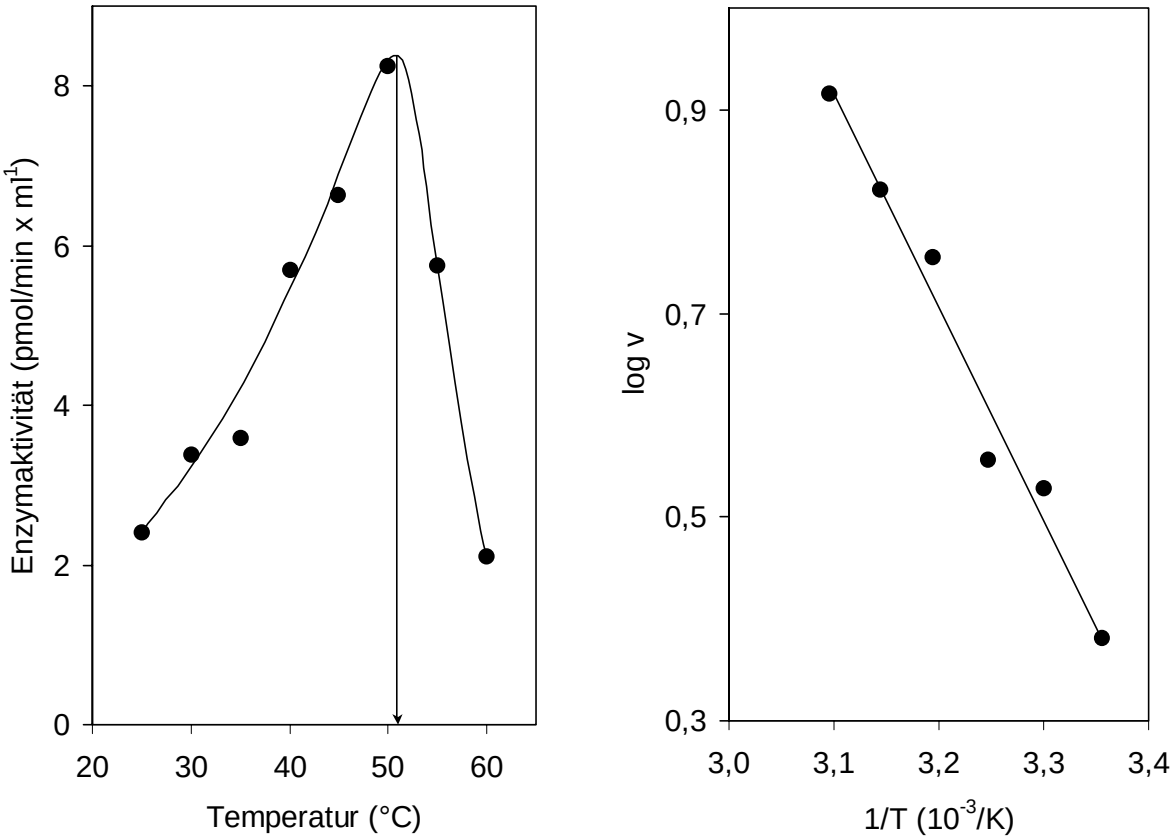


Abb. 22: Temperaturabhängigkeit und daraus resultierender Arrheniusblot der rekombinanten humanen Histidin-Protein-Phosphatase. Die im Bereich von 25–60 °C gemessene Enzymaktivität wurde wie in Abbildung 10 und 11 als Volumenaktivität gegen die Temperatur aufgetragen. Es kam nur per Gelfiltration teilgereinigtes Enzym mit einer Proteinkonzentration von 1,4 mg/ml und einer Aktivität von 4,7 pmol/min x mg^{-1} zum Einsatz. Das Temperaturoptimum lag bei 51 °C. Eingang in den Arrheniusblot fanden die Werte zwischen 25 und 50 °C. Die resultierende Gerade lieferte eine Aktivierungsenergie von 39,3 kJ/mol (6 Messpunkte; r = 0,991; Steigung = −2,053 x 10^{-3}/K).

Aktivierungsenergie E_A von 39,3 kJ/mol, was eher mit dem Verhalten der Kaninchenphosphatase zu Beginn der Reinigung übereinstimmt (~36 kJ/mol bei Temperaturen ab 25°C, ansonsten 52–59 kJ/mol; Abschnitt 5.6.1)

5.13 Gewebeverteilung der Histidin-Protein-Phosphatase

5.13.1 Bestimmung auf Proteinebene

Zur Bestimmung der gewebespezifischen Expressionsmuster der Histidin-Protein-Phosphatase wurden die löslichen Extrakte diverser Rattengewebe nach 15%iger SDS-PAGE per Western-Blot untersucht (Abb. 23; Durchführung: Frau Karin Rose). Dabei wurde der gereinigte Antikörper gegen den N-Terminus des aus Kaninchenleber stammenden Enzyms verwendet. Aufgrund der hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der Histidin-

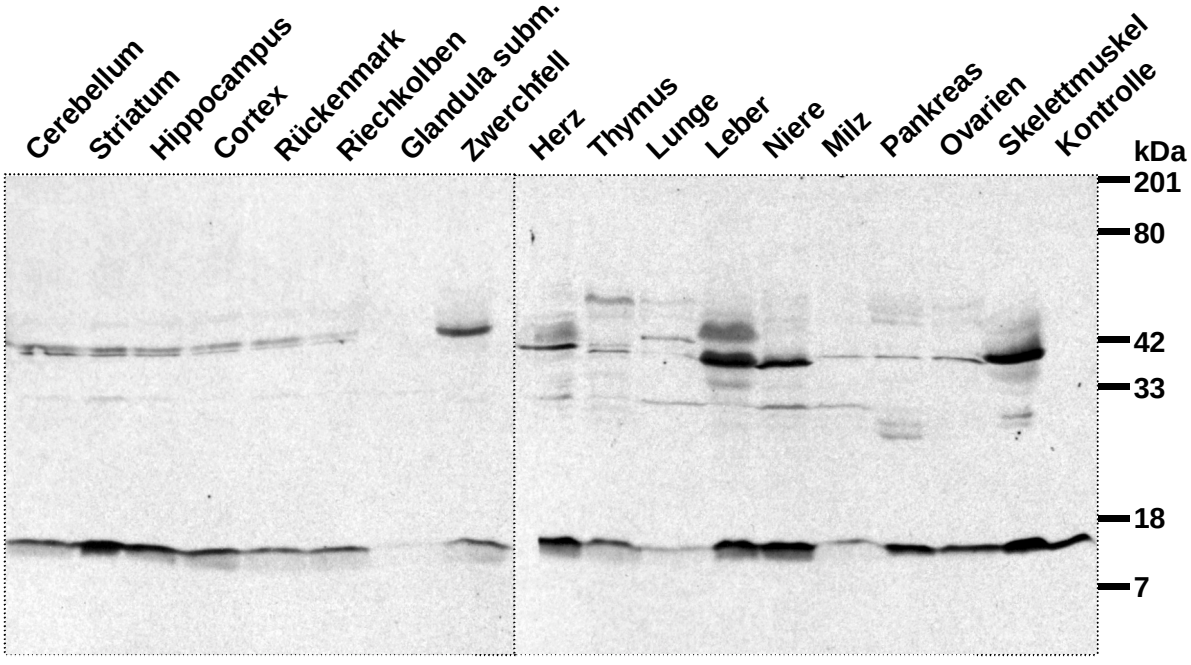


Abb. 23: Gewebeverteilung der Histidin-Protein-Phosphatase in der Ratte. Es wurden je Bahn 60 µg Protein aufgetragen. Als Kontrolle diente Gelfiltrationsmaterial mit 25 ng Kaninchenleberenzym. Der gereinigte Antikörper war gegen den N-Terminus gerichtet.

Phosphatase aus Mensch und Kaninchen war mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass auch das Rattenenzym mit den Antikörpern detektierbar ist, was sich auch bestätigte. Es zeigte sich, dass die Histidin-Phosphatase in den verschiedenen Geweben in sehr unterschiedlicher Menge vorkommt. Es fanden sich aber in jedem Fall mindestens Spuren des Enzyms.

5.13.2 Bestimmung auf Aktivitätsebene

Die löslichen Extrakte der verschiedenen Rattengewebe wurden mit dem Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivitätstest auf ihre Enzym-Aktivität hin untersucht (Tab. 6). In allen Geweben wurde Aktivität festgestellt, sie lag zwischen 2,7 und 7,7 fmol/min x mg^{-1}, unterschied sich also maximal um den Faktor drei.

5.13.3 Vergleich von Proteinmenge und Aktivität

Setzte man die in den verschiedenen Rattengeweben per Western-Blot ermittelte Menge der Histidin-Protein-Phosphatase mit der spezifischen Aktivität in Verbindung, so stellte man fest, dass der Grad der Korrelation sehr unterschiedlich war (Tab. 6). Bei einer Reihe von Geweben war eine verhältnismäßig gute Korrelation zu erkennen, andere fielen demgegenüber durch eine vergleichsweise hohe (z. B. Glandula submandibularis) oder niedrige (z. B. Leber) Enzym-Aktivität bei genau entgegegesetzter Proteinmenge auf. In jedem Fall war festzustellen, dass die Bandbreite der spezifischen Aktivität mit dem Faktor drei wesentlich geringer war als die der Enzymmenge. Die Signale des Western-Blots unterschieden sich nämlich teilweise um mehr als das Zehnfache.

Gewebe	spez. Aktivität (fmol/min x mg^{-1})	Proteinmenge (Western-Blot)
Striatum	7,6	+ + + +
Herz	7,0	+ + + +
Skelettmuskel	6,7	+ + + +
Cortex	6,2	+ + +
Niere	6,0	+ + + +
Glandula subm.	5,6	(+)
Zwerchfell	5,6	+ +
Hippocampus	5,6	+ + +(+)
Cerebellum	5,3	+ + +
Ovarien	5,3	+ + +
Pankres	4,9	+ + +(+)
Rückenmark	4,7	+ +
Riechkolben	4,3	+ +
Leber	4,0	+ + + +
Thymus	3,8	+ +
Lunge	2,8	+
Milz	2,7	+

Tab. 6: Proteinmenge und spezifische Aktivität der Histidin-Protein-Phosphatase in verschiedenen Rattengeweben. Die Tabelle ist nach absteigender spezifischer Aktivität sortiert.

6 Diskussion

6.1 Die Histidin-Protein-Phosphatase

Ziel dieser Arbeit war es, einen spezifischen Test auf Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität zu entwickeln, eine derartige Enzym-Aktivität im Säugetier zu detektieren und das Enzym mit den klassischen Methoden der Proteinbiochemie zu isolieren, charakterisieren und anschließend zu identifizieren. Dieses Vorhaben konnte erfolgreich umgesetzt werden. Die Untersuchungen lieferten die Sequenz eines aus der Kaninchenleber stammenden Proteins, das bislang ausschließlich Histidin-Phosphatase-Aktivität zeigte. Dieses wirft nun wieder die in der Einleitung formulierten Fragen auf. Handelt es sich bei dem Enzym um ein bereits bekanntes Protein oder gar um eine bereits bekannte Phosphatase? Oder besteht zumindest eine Verwandtschaft mit einer der etablierten Phosphatasefamilien, sei es zum prokaryontischen Zweikomponentensystem oder zu den eukaryontischen Serin/Threonin- oder Tyrosin-Phosphatasen?

Die Frage, ob es sich um ein bis dato unbekanntes Protein handelt, lässt sich aufgrund der Sequenzdaten klar mit ja beantworten. Die Recherchen in den Datenbanken ergaben eindeutig, dass dieses Enzym noch nicht beschrieben wurde. Die Frage nach einer eventuellen Verwandtschaft mit anderen Phosphatasen soll im Folgenden näher beleuchtet werden.

Die Proteine des prokaryontischen Zweikomponentensystems, welches bereits am Beispiel der Chemotaxis von *E. coli* vorgestellt wurde (Abb. 1), haben insgesamt fünf sehr konservative Domänen [19, 20]. Von diesen befinden sich die ersten drei im Sensorprotein(komplex), die beiden anderen im Antwortregulatorprotein(komplex). Daher auch die Bezeichnung *Zwei*komponentensystem. Die extrazelluläre Sensordomäne ist an der Registrierung des externen Reizes beteiligt, die Kinasedomäne sorgt für die Autophosphorylierung des in der dritten Domäne gelegenen Histidins. Das durch die Transferase-Aktivität phosphorylierte Aspartat befindet sich in der vierten Domäne, und die für die Interaktion mit dem zu beeinflussenden System (z. B. den Flagellen) zuständige Region bildet die fünfte Domäne. Das Vorhandensein dieser Domänen gilt als unabdingbar für die Zugehörigkeit zum Zweikomponentensystem (auch dem eukaryontischen), auch wenn in

einigen wenigen dieser Regelkreise ein oder zwei Domänen fehlen können [70]. Die aufgeklärte Histidin-Phosphatase zeigt keine Homologie zu diesen Domänen, ganz im Gegensatz zu den bereits bekannten eukaryontischen Zweikomponentensystemen [19, 22–25]. Eine evolutionäre Abstammung vom bakteriellen Zweikomponentensystem kann also ausgeschlossen werden.

Die Genfamilie der eukaryontischen PTP („Protein Tyrosine Phosphatases“) und die Subfamilie der DSP („Dual Specificity Phosphatases“) haben eine katalytisch essentielle Sequenz gemein [4]. Diese ist als „PTP signature motif“ bekannt und besteht aus 11 Aminosäuren. Sie zeichnet sich vor allem durch ein direkt von einem Histidin gefolgten Cystein sowie ein Arginin gefolgt von einem Serin oder Threonin aus. Auf die Bedeutung vor allem dieses Cysteins wird an späterer Stelle noch eingegangen. Dieses Motiv ist für die Zugehörigkeit unerlässlich und findet sich nicht in der Histidin-Phosphatase, die somit definitiv auch nicht dieser Phosphatasefamilie angehört.

Die Serin/Threonin-Phosphatasen teilen sich in zwei Genfamilien auf: die PPP-Familie („Phospho Protein Phosphatases“, z. B. PP1, PP2A und PP2B) und die PPM-Familie („Protein Phosphatases, Magnesium-dependent“, z. B. PP2C) [71]. Die PPP haben zwar höchst unterschiedliche N- und C-Termini, da diese beispielsweise für Lokalisation und Regulation wichtig sind, sie zeichnen sich aber auch durch eine gemeinsame 280 Aminosäuren umfassende katalytische Domäne aus, die fünf konservative für die Metallkoordination und die Interaktion mit der Phosphatgruppe zuständige Motive enthält [4]. Die isolierte Histidin-Phosphatase ist mit insgesamt 124 Aminosäuren nicht einmal halb so groß, es finden sich keine kleineren Teile dieser Domäne in der Sequenz des Enzyms wieder, was eine Zugehörigkeit auch zu den PPP ausschließt.

Die Gruppe der PPM steht der der PPP strukturell, aber nicht sequenziell sehr nahe [72]. Die zugehörigen Enzyme sind noch nicht so zahlreich und gut untersucht wie die magnesium-unabhängigen Phosphatasen, daher lassen sich nicht so allgemeingültige konservative Motive definieren wie bei den bereits erwähnten Familien. Betrachtet man aber den Hauptvertreter, die PP2C, so findet man je einen räumlich hochkonservativen Bereich am C- und N-Terminus [4]. Der N-terminale beinhaltet das katalytische Zentrum, hier sind auch konservative Sequenzen zu finden. Der C-Terminus hingegen beinhaltet keine konservative Primärstruktur,

seine räumliche Anordnung gilt aber als typisch für die PP2C im Säuger. Allein die Domäne am C-Terminus umfasst 90 Aminosäuren, daher ist es nicht möglich, dass die Histidin-Phosphatase diese beiden räumlichen Familienmerkmale aufweist. Zusätzlich fehlen die typischen Sequenzen im N-Terminus, die vor allem die durch alle Spezies konservierten und für die Katalyse unerlässlichen vier Aspartate enthalten. Diese Aspartate liegen räumlich, nicht aber sequenziell beieinander, wie dies für Proteine nicht ungewöhnlich ist. Ihre Lokalisation und Umgebung in der PP2C weist keine Ähnlichkeit mit den vier kumulierten Aspartaten (Mensch und Kaninchen: Aminosäure 11–17), welche beim Betrachten der Sequenz der Histidin-Phosphatase (Abb. 18) ins Auge fallen könnten, auf. Aufgrund dieser Fakten und der Tatsache, dass die Phosphatase-Aktivität nicht von Magnesiumionen abhängt, ist eine Zugehörigkeit des isolierten Enzyms zur Familie der PPP zu negieren.
Die im Verlauf dieser Arbeit identifizierte Phosphatase ist also nicht nur ein neues Protein, sondern lässt sich auch keiner der bekannten Protein-Phosphatasefamilien zuordnen. Dies wird zusätzlich durch die Ineffektivität der getesteten Phosphatase-Inhibitoren unterstrichen (Abschnitt 5.6.6), die einen Großteil der bekannten Protein-Phosphatasen hemmen würden. Außerdem wurde keines der untersuchten Substrate für die anderen Phosphatasefamilien von der Histidin-Phosphatase dephosphoryliert (Abschnitt 5.6.9).

Stellt man die Frage, ob es sich bei der gefundenen Histidin-Phosphatase um ein einzelnes Enzym oder um das erste Mitglied einer neuen Enzymfamilie innerhalb der Phosphatasen handelt, so ist die Verteilung in den einzelnen Spezies und die Verbreitung in der Evolution von besonderer Bedeutung.
Die Histidin-Phosphatase ist ein ubiquitäres Enzym, das in fast allen Geweben des Säugers nachweisbar ist. In der Ratte fanden sich in jedem untersuchten Organ und gegebenenfalls in seinen Subfraktionen mindestens Spuren, in den meisten Fällen aber große Mengen des Enzyms. Die Bandbreite der Organe reichte von stoffwechselintensiven wie Leber oder Muskel über immunkompetente wie Milz oder Thymus bis hin zu Teilen des zentralen Nervensystems wie Gehirn, Rückenmark oder Retina. Dabei korrelierte die gefundene Proteinmenge durchaus nicht immer mit der gefundenen Enzymaktivität, was auf das Vorhandensein eines Regulationsmechanismus hindeutet.

Untersucht man die evolutionäre Verbreitung der Histidin-Phosphatase, so ist diese auf die Domäne der Eukaryonten beschränkt. Proteinbiochemisch, molekularbiologisch bzw. immunologisch (Proteinsequenzierung, Genklonierung und Western-Blot) wurde das Protein in einigen „höheren" Organismen, namentlich Mensch, Rind, Kaninchen und Ratte gefunden. Die Suche in Protein- und Gendatenbanken lieferte zusätzlich Homologe in der Maus und im Zebrafisch, aber auch in „niedrigeren" Lebewesen wie *D. melanogaster* und *C. elegans*. Man findet die Histidin-Phosphatase also nur innerhalb der Metazoen, nicht aber in anderen Eukaryonten oder gar Prokaryonten. Das Vorkommen in Protostomiern (z. B. *D. melanogaster*), Deuterostomiern (z. B. Wirbeltiere) und Pseudocoelomaten (z. B. *C. elegans*) macht phylogenetisch betrachtet durchaus Sinn, da diese Gruppen einen gemeinsamen Ursprung haben. Es ist natürlich nicht auszuschließen, dass die Histidin-Phosphatase oder verwandte Enzyme noch in anderen Bereichen der eukaryontischen Klasse, beispielsweise in Pflanzen, gefunden werden. Die Gendatenbanken enthalten schließlich nur einen Bruchteil der entsprechenden Genome. Andererseits ist die Aufklärung der Erbmasse einfacher Eukaryonten wie beispielsweise *S. cerevisiae* schon weit fortgeschritten, und im Gegensatz zur Histidin-Phosphatase findet man dort die entsprechenden Gegenstücke der anderen Säugetierphosphatasen [73]. Da die bisher bekannten Phosphatasefamilien sehr alte und daher konservative Enzyme sind, spricht das Fehlen jeglicher Hinweise auf die Histidin-Phosphatase im Genom niederer Eukaryonten für eine spätere und von den bekannten Phosphatasen unabhängige Entwicklung dieses Enzyms.

Die bisher entdeckten Phosphatasen sind in den verschiedenen Geweben eines Organismus ubiquitär. Menge, Aktivität und vor allem Funktion des einzelnen Enzyms variieren jedoch je nach Zelltyp stark. Es ist nur natürlich, dass diese unterschiedlichen Aufgaben mit der Existenz einer ganzen Familie jedes einzelnen Phosphatasetyps einhergehen. Die Histidin-Phosphatase ist ebenfalls in sehr verschiedenen Organen und in diversen Mengen anzutreffen, was eher auf unterschiedliche zelltypspezifische Funktionen als auf ein „housekeeping"-Enzym hindeutet. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die Entwicklung dieser vermutlich sehr verschiedenen Funktionen in unterschiedlichen Organen nicht mit der Entstehung einer ganzen Gruppe verwandter Enzyme einhergeht. Dagegen spricht auch nicht das vergleichsweise geringe Alter der Histidin-Phosphatase, da zwischen *C. elegans*, *D. melanogaster* und

Homo sapiens immer noch eine große evolutionäre Spanne liegt. Die Postulierung einer ganzen Histidin-Phosphatasefamilie wird außerdem durch die Existenz der beiden *jan*-Gene in *D. melanogaster* gestützt. Daher ist durchaus mit der Entdeckung weiterer mit der isolierten Histidin-Phosphatase verwandten Phosphatasen zu rechnen.

Die Aufklärung des katalytischen Mechanismus der Histidin-Phosphatase ist natürlich mit den vorliegenden Daten nicht möglich, dazu sind weiterreichende Untersuchungen nötig. Mutationen von vermutlich katalytisch essentiellen Aminosäuren und Strukturanalysen wären hier vor allem zu nennen. Bringt man jedoch das Wissen über die katalytischen Mechanismen der eukaryontischen Phosphatasen mit einigen Befunden über die Histidin-Phosphatase in Verbindung, so lassen sich erste mechanistische Anhaltspunkte diskutieren. Die Serin/Threonin-Phosphatasen der PPP- und PPM-Familie komplexieren mit Ausnahme der PP1 jeweils zwei Metallionen in ihrem katalytischen Zentrum (Zn^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mg^{2+} oder Mn^{2+}) [74–76]. An der Koordination der Metallionen sind auch eine Reihe von Wassermolekülen beteiligt. Die Spaltung des Phosphoesters wird durch die Aktivierung eines dieser Wassermoleküle möglich und verläuft ohne Zwischenschritt. Es gibt keine kovalente Beteiligung einer Phosphatase-Aminosäure an der Dephosphorylierung. Dieser Mechanismus wurde zwar noch nicht für jede dieser Phosphatasen bestätigt, es gibt aber viele vor allem strukturelle Befunde, die solch einen Ablauf für fast alle PPP und PPM sehr wahrscheinlich machen [4, 77–80]. Diese Enzyme binden ihre Metallionen unterschiedlich stark. Bei einer weniger festen Komplexierung ist die Phosphatase metallionenabhängig, d. h. sie wird durch Zugabe von EDTA gehemmt. Dies trifft für die Histidin-Protein-Phosphatase nicht zu. Ein stärker assoziiertes Metallion könnte bei der Durchführung einer Massenspektrometrie entdeckt werden, auch wenn dies von Parametern wie dem pH-Wert abhängt. Die Massenspektrometrie der Histidin-Phosphatase lieferte keinen Hinweis auf ein Metallion. Die in den angesprochenen Phosphatasen die Metallionen komplexierende Domäne ist ebenfalls nicht in der Sequenz der Histidin-Phosphatase enthalten. Aus diesen Gründen liegt der beschriebene Mechanismus für die metallunabhängige Histidin-Protein-Phosphatase nicht nahe.

Ganz anders stellt sich dagegen der Ablauf der Protein-Dephosphorylierung bei den PTP dar. Das 11 Aminosäuren umfassende konservative Motiv im katalytischen Zentrum wurde zuvor bereits erwähnt. Eine ganz besondere Rolle spielt dort das Cystein, welches in allen PTP vorkommt. Es agiert während der Reaktion als Nukleophil und bildet ein Cysteinylphosphat-Intermediat aus [81–83]. Die anschließende Regenerierung des Enzyms geschieht durch Dephosphorylierung unter Beteiligung eines aktivierten Wassermoleküls und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar [84]. Dieser Mechanismus ist beispielsweise auch von den Serin- und Cystein-Proteasen wie Trypsin oder Bromelain bekannt. Vor diesem Hintergrund fallen einige Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf. So konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Histidin-Phosphatase mit IAA zu einem vollständigen Verlust der Aktivität führt. Des Weiteren führte die Anwesenheit von sehr unterschiedlichen zweiwertigen Metallionen zu einer moderaten Aktivierung (was keine Metallionen-abhängigkeit darstellt), einzig Zn^{2+} hemmte das Enzym vollständig. IAA reagiert mit Cystein, aber auch mit freien Serin- und Lysin-Gruppen [66]. Die Zn^{2+}-Inhibierung hingegen lässt sich nur auf eine freie SH-Gruppe zurückführen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Histidin-Phosphatase analog den PTP ein katalytisch essentielles Cystein enthält, welches nicht Bestandteil einer Disulfid-Brücke ist. Dies deutet natürlich nicht auf eine vorhandene Verwandtschaft zu den PTP hin, da sich so ein Cystein doch auch in anderen Enzymklassen wie den bereits erwähnten Proteasen findet. Auch muss eine wichtiger Unterschied zum Mechanismus der PTP vorliegen, da diese von Vanadat gehemmt werden, die Histidin-Phosphatase jedoch nicht. Vanadat agiert dabei als Analogon des Übergangszustands bei der Abspaltung der Phosphatgruppe. Durchsucht man die Histidin-Phosphatase-Sequenzen nach Cysteinen, so fällt das einzige durch alle Spezies konservierte Cystein auf. Das $Cystein_{73}$ (Mensch und Kaninchen) steht am Anfang einer 22 Aminosäuren umfassenden Teilsequenz, deren Grad an Konservierung in keinem anderen so großen Bereich des Enzyms erreicht wird. Mensch und Kaninchen zeigen eine 95%ige Identität, und selbst bei *H. sapiens* und *C. elegans* stimmen noch 64 % der Aminosäuren in diesem Abschnitt überein. Somit wäre diese Region ein guter Kandidat für die katalytische Domäne. Natürlich stellen diese Befunde keinen Beweis dar, das beschriebene Cystein ist aber ein hervorragender Ausgangspunkt für die Suche nach dem Mechanismus und dem katalytischen Zentrum.

Interesse weckte der Fund der Consensussequenz GxGxxG/S (Mensch und Kaninchen: Aminosäuren 75–80). Sie wird in der Literatur als Nukleotid-Bindungsstelle beschrieben [7] und liegt ebenfalls in dem oben erwähnten hochkonservativen Bereich nach dem $Cystein_{73}$. Das Vorhandensein dieser Sequenz war überraschend, da Phosphatasen für ihre Reaktion keine Energielieferanten oder Phosphatquellen wie ATP benötigen. Daher wurde eher eine Enzymregulation via Nukleotidkonzentration vermutet. Die deshalb untersuchten Nukleotide hatten jedoch keinen erkennbaren Einfluss auf die Histidin-Phosphatase. Ebenso blieb die Untersuchung von mit ATP im Zusammenhang stehenden Substanzen wie beispielsweise Genistein oder Phospho-Creatin ohne Erfolg. Die Funktion dieser Bindungsstelle konnte bislang noch nicht geklärt werden.

Die untersuchten Eigenschaften der Histidin-Phosphatase weisen einige interessante Aspekte auf. Vor allem die hohe Stabilität des Enzyms ist auffällig. Es hat mit bis zu 53 °C ein hohes Temperaturoptimum und ist sogar noch bei über 60 °C aktiv. Schätzungsweise 90 % aller Enzyme würden im Gegensatz zur Histidin-Phosphatase bei einer Ethanolfällung jegliche Aktivität verlieren. Die Lagerstabilität ist ebenfalls markant. In aufgereinigter Form reicht die Anwesenheit von 5 % Glycerin aus, um den Aktivitätsverlust auf ein Minimum zu beschränken. Im löslichen Extrakt und nach dem Anionenaustauscher ist das Enzym sogar ohne Stabilisierungszusätze bei mehrfachem Auftauen und Einfrieren stabil. Das geringe Molekulargewicht mag dabei eine Rolle spielen, da bei 14 kDa keine so komplizierte und damit in der Regel anfälligere räumliche Struktur zu erwarten ist.

Die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit brachte bis zur Gelfiltration zwei verschiedene Aktivierungsenergien E_A im oberen und unteren Temperaturbereich hervor (Grenze bei 25–30 °C). Normalerweise bedeutet dies, dass ab einer bestimmten Temperatur ein anderer Reaktionsschritt geschwindigkeitsbestimmend ist [85]. Denkt man an den oben diskutierten Mechanismus, so würde beispielsweise auf der einen Seite der Temperaturschwelle die Spaltung der N-O-Bindung, auf der anderen die Regenerierung des Enzyms die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmen. In diesem Falle wäre aber nicht erklärbar, dass nach der Gelfiltration einheitlich die höhere Aktivierungsenergie auftritt. Eine bessere Erklärung wäre

die Anwesenheit eines Aktivators oder zumindest eines Faktors, der durch Assoziation an die Histidin-Phosphatase eine leichte Aktivierung zur Folge hat, dessen eigentliche Aufgabe aber eine andere ist (z. B. Lokalisation oder Regulation). Diese These wird auch durch die Ergebnisse der Ethanolfällung gestützt. Dort war die Aktivität der kombinierten Fraktionen größer als die Summe der Einzelaktivitäten, was ebenfalls auf die Abtrennung eines Aktivators hindeutet. Dieser Faktor könnte ab einer bestimmten Temperatur *in vitro* abdissoziieren und durch die Gelfiltration endgültig von der Histidin-Protein-Phosphatase separiert werden. Da das Anionenaustauscher-Eluat nach Einengung mittels Ammonium-sulfat-Fällung nicht auf seine Temperaturabhängigkeit getestet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der postulierte Faktor schon bei dieser Fällung entfernt wurde. Da bei dieser Konzentrierung aber im Vergleich zur Gelfiltration fast kein Fremdprotein abgetrennt wird, ist dies nicht sehr wahrscheinlich. In jedem Fall bietet dieses Phänomen einen Einstieg in die Suche nach einer Untereinheit der Histidin-Phosphatase. Solche, die Lokalisation, die Regulation oder die Substratspezifität beeinflussenden Proteine sind beispielsweise für die PP1 schon zahlreich bekannt [86]. Die Existenz solcher Untereinheiten ist für das gefundene Enzym fast schon zwingend, da aufgrund der geringen Größe von nur 14 kDa kaum anzunehmen ist, dass es neben der katalytischen Funktion auch noch Regulations-mechanismen und ähnliches beherbergt. Die Wahrnehmung von verschiedenen Aufgaben in unterschiedlichen Geweben wäre ohne solche Steuerelemente unmöglich, weshalb die meisten Protein-Phosphatasen direkt oder durch eine assoziierte Untereinheit in ihrer Lokalisation, Aktivität oder einer anderen Eigenschaft beeinflussbar sind.

An diesem Punkt der Untersuchungen sind keine genauen Angaben zur intrazellulären Lokalisation der Histidin-Phosphatase möglich. Die Tatsache, dass bei der Präparation der Kaninchenleber der wesentliche Teil der Enzymaktivität im löslichen Extrakt zu finden war, schließt eine Membranständigkeit zumindest für dieses Gewebe aus. Auch in der Sehstäbchenpräparation der Rinderretina [65] fand sich die Histidin-Phosphatase in der „löslichen“ Fraktion, wenngleich eine Homogenisation und Untersuchung der abzentrifugierten Retinabestandteile nicht durchgeführt wurde, und somit keine umfassende Aussage über die Verteilung in der Netzhaut möglich ist. Die Existenz einer hypothetischen

membranständigen Lokalisationsuntereinheit in diesen Geweben ist nicht sehr wahrscheinlich, da die Bindung zwischen einer Phosphatase und so einer Untereinheit in den meisten Fällen stabil genug ist, um bei der angewendeten Homogenisationsprozedur nicht zerstört zu werden. In anderen Organen kann das Enzym aber durchaus aufgrund einer Untereinheit in der „unlöslichen“ Homogenatsfraktion erscheinen.

Die systematische Charakterisierung der Histidin-Phosphatase zeigte, dass die Anwesenheit von zweiwertigen Metallionen eine bis zu 3fache Aktivierung hervorruft. Die Tatsache, dass dies aber nicht nur für physiologische Metallionen wie Magnesium, sondern auch für giftige Schwermetallionen wie Blei gilt, lässt an einem spezifischen Mechanismus zweifeln. Außerdem erforderte der Effekt unphysiologisch hohe Konzentrationen. Die im Test verwendete Standardkonzentration von 10 mM Mg^{2+} liegt um mehr als den Faktor zehn über dem im Körper anzutreffenden Spiegel von freiem Mg^{2+}. Zu beachten ist auch, dass die Zugabe von EDTA zu keiner Inaktivierung führt. Die Histidin-Phosphatase kann also im Gegensatz zu vielen anderen Protein-Phosphatasen nicht als metallionenabhängig bezeichnet werden. Es handelt sich aber auch nicht um einen unspezifischen Salzeffekt, da NaCl, KCl und $(NH_4)_2SO_4$ keinesfalls zu einer Aktivierung führen, sondern mit steigender Konzentration die Enzymaktivität gegen Null gehen lassen. Zur Zeit ist es nicht möglich zu entscheiden, ob die Beobachtung eine physiologische Relevanz besitzt, oder ob es sich nur um einen unbedeutenden *in vitro*-Effekt handelt.

Verglichen mit den meisten anderen Phosphatasen ist die spezifische Aktivität der gereinigten Histidin-Phosphatase niedrig. Dabei gilt es aber eine Reihe von Punkten zu berücksichtigen. Zum einen liegt die im Test zum Einsatz kommende CheA-Konzentration noch im linear ansteigenden Bereich des Michaelis-Menten-Diagramms, eine Erhöhung der eingesetzten Substratmenge würde also wie bei vielen anderen Phosphatasetests zur Messung einer höheren spezifischen Aktivität führen. Zum anderen sagt die *in vitro* gemessene Aktivität wenig über selbige *in vivo* aus, da der Test ein unphysiologisches System darstellt. Außerdem kann die Aktivität durch die Abwesenheit von bislang unbekannten Aktivatoren gesenkt sein. Die PP2C beispielsweise zeigte bei der Dephosphorylierung von Casein-Phosphat über Jahre

eine deutlich niedrigere Aktivität als andere Serin/Threonin-Phosphatasen, die in vergleichbaren Testsystemen untersucht wurden. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass ungesättigte Fettsäuren in der Lage sind, die PP2C 10fach zu aktivieren [87]. Dieser Fall liefert zwei weitere Punkte, die die etwas niedrige Aktivität der Histidin-Phosphatase relativieren. Wie bei der PP2C ist das im Test verwendete Substrat nicht das physiologische, stammt CheA doch aus *E. coli*. Außerdem wurden die anderen Phosphatasen in anderen Testsystemen untersucht, und ein Vergleich der Enzymaktivitäten über die Grenzen eines Systems hinaus ist ohnehin nur von eingeschränkter Aussagekraft.

Mit den hier vorgestellten Ergebnissen ist es nicht möglich, über eine Funktion der Histidin-Phosphatase zu hypothetisieren. Zu zahlreich und verschieden sind die Vorgänge, an denen die bisher bekannten Phosphatasen beteiligt sind. Aber auch wenn somit noch nicht über eine konkrete pharmazeutisch-medizinische Bedeutung spekuliert werden kann, so lässt sich doch sagen, dass die Suche nach einem Inhibitor des bakteriellen Zweikomponentensystems als mögliches neues Antibiotikum nun in einem anderen Licht betrachtet werden muss. Es ist zwar denkbar, dass ein Inhibitor entwickelt wird, der nur die bakteriellen Histidin-Phosphatasen hemmt. Schließlich weisen die hier vorgestellten Daten nicht auf eine Verwandtschaft zwischen der identifizierten Histidin-Phosphatase und ihren bakteriellen Pendants hin. Die Bandbreite für so eine Substanz wird aber durch die Existenz der reversiblen Histidin-Phosphorylierung im Säuger deutlich eingeschränkt.

6.2 Ausblick

Die Identifizierung der ersten Histidin-Protein-Phosphatase im Säuger bietet eine Vielzahl von Ansätzen für weitere Forschungsarbeiten. Wichtige Werkzeuge dafür stellen neben dem entwickelten Test auf Histidin-Protein-Phosphatase-Aktivität das nun in rekombinanter Form zur Verfügung stehende humane Enzym und die affinitätsgereinigten Antikörper gegen Peptide dar. Diese werden in Kürze durch gegen das Gesamtprotein gerichtete Antikörper ergänzt werden. Die Auffindung eines Aktivitätsmodulators wäre für die weiteren Aktivitäts-

studien von großem Wert. Ohne einen Zufallsfund ist dies aber mit den präsentierten Kenntnissen mittelfristig nur mit großen automatisierten Tests ganzer kombinatorischer Bibliotheken möglich. Die genaue Lokalisation sowohl in den Geweben als auch in den Zellen selbst kann mit immunhistochemischen Methoden geklärt werden. Zur Isolierung eventuell vorhandener Untereinheiten würde sich Coimmunpräzipitation oder eine Affinitäts-Chromatographie unter Verwendung der rekombinanten Histidin-Phosphatase anbieten. Diese Untereinheiten könnten je nach Funktion Aufschluss über Lokalisierungs- und Regulations-mechanismen geben. Besonders interessant ist die Frage nach dem physiologischen Substrat. Zur Klärung eignen sich neben Coimmunpräzipitation und Affinitäts-Chromatographie vor allem Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsversuche, die *in vitro*, aber vor allem *in vivo* (Zellkulturen) durchzuführen wären. Erkenntnisse über Lokalisation, Regulation und Substrat würden dann ihrerseits zur Offenlegung der Funktion der Histidin-Phosphatase beitragen. Weitere für die Funktionsaufklärung wichtige Informationen würden auch Experimente mit Über- oder Unterexpression des Enzyms liefern. Dafür kämen sowohl Zellkulturen als auch komplexe Organismen in Frage (z. B. Knock-Out-Mäuse). Nicht zuletzt durch die rasante Entwicklung des „Human genome projects“ könnte die regelmäßige Überprüfung einschlägiger Datenbanken weitere Mitglieder und Splicingvarianten der vermuteten neuen Phosphatasefamilie hervorbringen. Die Suche nach Homologen mit molekularbiologischen Methoden ist ein weiterer Ansatz in dieser Richtung. Langfristig ist ebenfalls der molekulare Mechanismus der katalysierten Reaktion, aber auch der möglicher Regulationsvorgänge von großem Interesse. Dies könnte beispielsweise bei der Entwicklung eines Inhibitors oder Aktivators hilfreich sein, dessen medikamentöse Anwendung dann in ferner Zukunft durchaus denkbar wäre. Die Kristallographie und die Untersuchung von gezielt mutierten Enzymvarianten erscheinen hierfür als geeignete Methoden.

7 Zusammenfassung

Die Histidin-Protein-Phosphatase wurde aus dem löslichen Kaninchenleberextrakt isoliert und identifiziert. Die Aufreinigung erfolgte durch drei säulenchromatographische Schritte: Anionenaustausch-Chromatographie, Gelfiltration und Affinitäts-Chromatographie an Blue Sepharose. Aus 20 g Lebergewebe wurden rund 25 µg Enzym mit einer spezifischen Aktivität von 13,8 pmol/min x mg^{-1} gewonnen, was der hohen Ausbeute von 12 % und einem Anreicherungsfaktor von fast 13.000 entsprach. Die Phosphatase trat als Monomer von 16 kDa (SDS-PAGE und Gelfiltration) auf. Das bislang einzige Substrat ist [^{32}P]CheA. Übliche Phosphatase-Inhibitoren zeigten keine Wirkung. Das Enzym hat sein Aktivitäts-optimum bei pH 5,0–5,5 und bei 43 bzw. 53 °C. Es ist nicht metallionenabhängig (keine Hemmung durch EDTA), auch wenn zweiwertige Metallionen einen leichten aktivierenden Effekt haben. Die Sequenzierung und Klonierung führte zu einem tatsächlichen Molekular-gewicht von 14 kDa. Datenbankrecherchen ergaben, dass es sich um ein neues Protein handelt, das zwar keine Homologie zu anderen Phosphatasen zeigt, aber in einer Reihe höherer Eukaryonten einschließlich des Menschen vorkommt. Das menschliche Enzym wurde kloniert und in SF9-Zellen exprimiert. Dabei konnte kein Unterschied zwischen dem rekombinanten menschlichen und dem nativen Protein aus Kaninchen festgestellt werden. Es wurden drei gegen Peptide des menschlichen Enzyms gerichtete Antikörper produziert und gereinigt, die die Histidin-Phosphatase auch in anderen Spezies detektieren können. Es konnte in der Ratte eine breite, aber uneinheitliche Gewebeverteilung des Enzyms gezeigt werden, die deutlich stärker variierte als die entsprechende Enzymaktivität.

Angaben zur detaillierten subzellulären Lokalisation, der Regulation und dem physiologischen Substrat können noch nicht gemacht werden, aber es fanden sich für weitere Untersuchungen diverse Ansätze wie das essentielle Cystein (Mechanismus oder Regulation) oder Hinweise auf ein mögliches Bindeprotein (Aktivierungsenergieänderung im Reinigungs-verlauf, synergistische Aktivität der vereinigten Ethanolfällungsfraktionen: Regulation oder Lokalisation).

8 Literatur

1. Information for authors. *Eur J. Biochem.* **251**, 1–7 (1998)

2. The *C. elegans* Sequencing Consortium: Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012–2018 (1998)

3. Hunter T.: Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225–236 (1995)

4. Barford D.: Colworth Medal lecture. Structural studies of reversible protein phosphorylation and protein phosphatases. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 571–766 (1999)

5. Krebs E. G., Fischer E. H.: The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 150–157 (1959)

6. Erikson R. L., Colett M. S., Erikson E., Purchio A. F.: Evidence that the avian sarcoma virus transforming gene product is a cyclic AMP-independent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6260–6264 (1979)

7. Hunter T.: A thousand and one protein kinase. *Cell* **50**, 823–829 (1987)

8. Krebs E. G., Beavo J. A.: Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 923–959 (1979)

9. Faux M. C., Scott J. D.: More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem. Sci.* **8**, 312–315 (1996)

10. Eng C.: The role of PTEN, a phosphatase gene, in inherited and sporadic nonmedullary thyroid tumors. *Recent Prog. Horm. Res.* **54**, 441–453 (1999)

11. Hunter T.: Signaling – 2000 and beyond. *Cell* **100**, 112–127 (2000)

12. Walsh A. H., Cheng A., Honkanen R. E.: Fostriecin, an antitumor antibiotic with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases types 1 (PP1) and 2A (PP2A), is highly selective for PP2A. *FEBS Lett.* **416**, 230–234 (1997)

13. Hunter T., Sefton B. M.: Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1311–1315 (1980)

14. Hess J. F., Bourret R. B., Simon M. I.: Phosphorylation Assays for proteins of the two-component regulatory system controlling chemotaxis in Escherichia coli. *Methods Enzymol.* **200**, 188–204 (1991)

15. Bourret R. B., Davagnino J., Simon M. I.: The carboxy-terminal portion of the CheA kinase mediates regulation of autophosphorylation by transducer and CheW. *J. Bacteriol.* **175**, 2097–2101 (1993)

16. Swanson R. V., Schuster S. C., Simon M. I.: Expression of CheA fragments which define domains encoding kinase, phosphotransfer, and CheY binding activities. *Biochemistry* **32**, 7623–7629 (1993)

17. Swanson R. V., Bourret R. B., Simon M. I.: Intermolecular complementation of the kinase activity of CheA. *Mol. Microbiol.* **8**, 435–441 (1993)

18. Alon U., Surette M. G., Barkai N., Leibler S. : Robustness in bacterial chemotaxis. *Nature* **397**, 168–171 (1999)

19. Alex L. A., Simon M. I. : Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet.* **10**, 133–138 (1994)

20. Matthews H. R.: Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacol. Ther.* **67**, 323–350 (1995)

21. Schuster S. S., Noegel A. A., Oehme F., Gerisch G., Simon M. I.: The hybrid histidine kinase DokA is part of the osmotic response system of Dictyostelium. *EMBO J.* **15**, 3880–3889 (1996)

22. Chang C., Kwok S. F., Bleecker A. B., Meyerowitz E. M.: Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**, 539–544 (1993)

23. Ota I. M., Varshavsky A.: A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* **262**, 566–569 (1993)

24. Maeda T., Wurgler-Murphy S. M., Saito H.: A two-component system that regulates an osmosensing MAP Kinase cascade in yeast. *Nature* **369**, 242–245 (1994)

25. Brown J. L., North S., Bussey H.: SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall β-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *J. Bacteriol.* **175**, 6908–6915 (1993)

26. Huang J., Wei Y., Kim Y., Osterberg L., Matthews H. R.: Purification of a protein histidine kinase from the yeast Saccharomyces cerevisiae: the first member of this class of protein kinases. *J. Biol. Chem.* **266**, 9023–9031 (1991)

27. Chen C. C., Smith D. L., Bruegger B. B., Halpern R. M., Smith R. A.: Occurrence and distribution of acid-labile histine phosphates in regenerating rat liver. *Biochemistry* **13**, 3785–3789 (1974)

28. Chen C. C., Bruegger B. B., Kern C. W., Lin Y. C., Halpern R. M., Smith R. A.: Phosphorylation of nuclear proteins in rat regenerating liver. *Biochemistry* **16**, 4852–4855 (1977)

29. Pan C.-J., Lei K.-J., Annabi B., Hemrika W., Chou J.Y.: Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase. *J. Biol. Chem.* **273**, 6144–6148 (1998)

30. Wagner P. D., Vu N.-D.: Phosphorylation of ATP-citrate lyase by nucleoside diphosphate kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 21758–21764 (1995)

31. Wieland T., Nürnberg B., Ulibarri I., Kaldenberg-Stasch S., Schultz G., Jakobs K. H.: Guanine nucleotide-specific phosphate transfer by guanine nucleotide-binding regulatory protein beta-subunits. Characterization of the phosphorylated amino acid. *J. Biol. Chem.* **268**, 18111–18118 (1993)

32. Wallet V., Mutzel R., Troll H., Barzu O., Wurster B., Veron M., Lacombe M. L.: Dictyostelium nucleoside diphosphate kinase highly homologous to Nm23 and Awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and Drosophila development. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1199–1202 (1990)

33. Engel M., Seifert M., Theisinger B., Seyfert U., Welter C.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and Nm23-H1/nucleoside diphosphate kinase A. *J. Biol. Chem.* **273**, 20058–20065 (1998)

34. Volm M., Mattern J., Koomagi R.: Association between nm23-H1 expression, prolifertion and apoptosis in non-small cell lung carcinomas. *Clin. Exp. Metastasis* **16**, 595–602 (1998)

35. Steeg P. S., Bevilacqua G., Kopper L., Thorgeirsson U. P., Talmadge J. E., Liotta L. A., Sobel M. E.: Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J. Natl. Cancer Inst.* **80**, 200–204 (1988)

36. Leone A., Flatow U., King C. R., Sandeen M. A., Margulies I. M., Liotta L. A., Steeg P. S.: Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell* **65**, 25–35 (1991)

37. Leone A., Flatow U., VanHoutte K., Steeg P. S.: Transfection of human nm23-H1 into the human MDA-MB-435 breast carcinoma cell line: effects on tumor metastatic potential, colonization and enzymatic activity. *Oncogene* **8**, 2325–2333 (1993)

38. Kantor J. D., McCormick B., Steeg P. S., Zetter B. R.: Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells. *Cancer Res.* **53**, 1971–1973 (1993)

39. Parhar R. S., Shi Y., Zou M., Farid N. R., Ernst P., al-Sedairy S. T.: Effects of cytokine-mediated modulation of nm23 expression on the invasion and metastatic behavior of B16F10 melanoma cells. *Int. J. Cancer* **60**, 204–210 (1995)

40. Freije J. M. P., Blay P., MacDonald N. J., Manrow R. E., Steeg P. S.: Site-directed mutation of Nm23-H1. *J. Biol. Chem.* **272**, 5525–5532 (1997)

41. Crovello C. S., Furie B. C., Furie B.: Histidine phosphorylatin of P-Selektin upon stimulation of human platelets: a novel pathway for activation-dependant signal transduction. *Cell* **82**, 279–286 (1995)

42. Hegde A. N., Das M. R.: ras proteins enhance the phosphorylation of a 38 kDa protein (p38) in rat liver plasma membrane. *FEBS Lett.* **217**, 74–80 (1987)

43. Matthews H. R., Pesis K. H., Hegde A. N., Sharma S. K., Das M. R.: Protein histidine phosphorylation in eukaryotes. *The Physiol.* **36**, A–12 (1993)

44. Motojima K., Goto S.: Histidyl phosphorylation and dephosphorylation of P36 in rat liver extract. *J. Biol. Chem.* **269**, 9030–9037 (1994)

45. Hegde A. N., Das M. R.: Glucagon and p21 ras enhance the phosphorylation of the same 38-kilodalton membrane protein from rat liver cells. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2468–2474 (1990)

46. Hegde A. N., Swamy C. V., Krishna B. M., Das M. R.: Negative correlation with liver cell division of a 38 kilodalton protein whose phosphorylation is enhanced by ras and G-Proteins. *FEBS Lett.* **333**, 103–107 (1993)

47. Hiraishi H., Yokoi F., Kumon A.: Bovine liver phosphoamidase as a protein histidine/lysine phosphatase. *J. Biochem. (Tokyo)* **126**, 368–374 (1999)

48. Kim Y., Huang J., Cohen P., Matthews H.R.: Protein phosphatases 1, 2A and 2C are protein histidine phosphatases. *J. Biol. Chem.* **268**, 18513–18518 (1993)

49. Kim Y., Pesis K. H., Matthews H.R.: The histidine phosphatase activity of protein phosphatases 1, 2A and 2C. *Biochim. Biophys. Acta* **1268**, 221–228 (1995)

51. McGowan C. H., Cohen P.: Protein phosphatase-2C from rabbit skeletal muscle and liver: an Mg^{2+}-dependent enzyme. *Meth. Enzymol.* **159**, 416–426 (1988)

50. Barford D., Flint A. J., Tonks N. K.: Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* **263**, 1397–1404 (1994)

52. Bradford M. M.: 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 (1976)

53. Bio-Rad Laboratories: Instructions for the Bio-Rad Protein Assay. *Instruction Manual* (1994)

54. Lowry O. H., Rosebrough N. S., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951)

55. Lämmli U. K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **327**, 680–685 (1970)

56. Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W.: Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255–262 (1988)

57. Blum H., Beier H., Gross H. J.: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**, 93–99 (1987)

58. Bio-Rad Laboratories: Trans-Blot® SD Semi-Dry electrophoretic transfer cell. *Instruction Manual*

59. Matsudaira P.: Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinyliden difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**, 10035–10038 (1987)

60. Axen R., Porath J., Ernback S.: Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature* **214**, 1302–1304 (1967)

61. Randerath K., Randerath E.: Ion-exchange chromatography of nucleotides on poly-(ethyleneimine)-cellulose thin layers. *J. Chromatogr*. **16**, 111–125 (1964)

62. Kameshita I., Ishida A., Okuno S., Fujisawa H.: Detection of protein phosphatase activities in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel using peptide substrates. *Anal. Biochem.* **245**, 149–153 (1997)

63. Antoniv J. W., Cohen P.: Separation of two phosphorylase kinase phosphatases from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **68**, 45–54 (1976)

64. Kjellen L., Lindahl U.: Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 443–475 (1991)

65. Selke D., Anton H., Klumpp S.: Serine/threonine protein phosphatases type 1, 2A and 2C in vertebrate retinae. *Acta Anat. (Basel)* **162**, 151–156 (1998)

66. Bernhard W.R.: Differential modification of metallothionein with iodoacetamide. *Methods Enzymol.* **205**, 426–433 (1991)

67. Leonard N.J., McDonald J.J., Reichmann M.E.: Reaction of diethyl pyrocarbonate with nucleic acid components. I. Adenine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 93–98 (1970)

68. Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y.: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **262**, 5592–5595 (1987)

69. Yanicostas C., Ferrer P., Vincent A., Lepesant J. A.: Separate cis-regulatory sequences control expression of serendipity beta and janus A, two immediately adjacent *Drosophila* genes. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 549–560 (1995)

70. Parkinson J. S., Kofoid E. C.: Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 71–112 (1992)

71. Cohen P. T. W.: Nomenclature and chromosomal localization of human protein serine/threonine phosphatase genes. *Adv. Prot. Phosphatases* **8**, 371–376 (1994)

72. Das A. K., Helps N. R., Cohen P. T. W., Barford D.: Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 A resolution. *EMBO J.* **15**, 6798–6809 (1996)

73. Cohen P. T. W.: Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 245–251 (1997)

74. Egloff M. P., Cohen P. T. W., Reinemer P., Barford D.: Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J. Mol. Biol.* **254**, 942–959 (1995)

75. King M. M., Huang C. Y.: The calmodulin-dependent activation and deactivation of the phosphoprotein phosphatase, calcineurin, and the effect of nucleotides, pyrophosphate, and divalent metal ions. Identification of calcineurin as a Zn and Fe metalloenzyme. *J. Biol. Chem.* **259**, 8847–8856 (1984)

76. Yu L., Haddy A., Rusnak F.: Evidence that calcineurin accomodates an active site binuclear metal center. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 10147–10148 (1995)

77. Strater N., Klabunde T., Tucker P., Witzel H., Krebs B.: Crystal structure of a purple acid phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active site. *Science* **268**: 1489–1492 (1995)

78. Mueller E. G., Crowder M. W., Averill B. A., Knowles J. R.: Purple acid phosphatase: a diiron enzyme that catalyses a direct phospho group transfer to water. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 2974–2975 (1993)

79. Martin B. L., Graves D. J.: Isotope effects on the mechanism of calcineurin catalysis: kinetic solvent isotope and isotope exchange studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1206**, 136–142 (1994)

80. Adler E., Donella-Deana A., Arigoni F., Pinna L. A., Stragler P.: Structural relationship between a bacterial developmental protein and eukaryotic PP2C protein phosphatases. *Mol. Microbiol.* **23**, 57–62 (1997)

81. Cho H., Krishnaraj R., Kitas E., Bannwarth W., Walsh C. T., Anderson K. S.: Isolation and structural elucidation of a novel phosphocysteine intermediate in the LAR protein tyrosine phosphatase enzymatic pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 7296–7298 (1992)

82. Guan K. L., Dixon J. E.: Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J. Biol. Chem.* **266**, 17026–17030 (1991)

83. Pot D. A., Woodford T. A., Remboutsika E., Haun R. S., Dixon J. E.: Cloning, bacterial expression, purification, and characterization of the cytoplasmic domain of rat LAR, a receptor-like protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* **266**, 19688–19696 (1991)

84. Denu J. M., Stuckey J. A., Saper M. A., Dixon J. E.: Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* **87**, 361–364 (1996)

85. Segel I. H.: Enzyme kinetics. *Wiley-Intersience publication, New York* (1975)

86. Aggen J. B., Nairn A. C., Chamberlin R.: Regulation of protein phosphatase-1. *Chem. Biol.* **7**, R13–R23 (2000)

87. Klumpp S., Selke D., Hermesmeier J.: Protein phosphatase type 2C active at physiological Mg^{2+}: stimulation by unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* **437**, 229–232 (1998)

Anhang

Veröffentlichungen

Orginalarbeiten

Klumpp S., Selke D., Hermesmeier J.: Protein phosphatase type 2C active at physiological Mg^{2+}: stimulation by unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* **437**, 229–232 (1998)

Abstracts

Hermesmeier J., Klumpp S.: Histidine phosphatase activity in vertebrates. Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e. V. (DPhG) in Freiburg i. Br. (1999)

Hermesmeier J., Kellner R., Klumpp S.: Histidine protein phosphatase in mammals. EMBO Conference ”Protein Phosphorylation and Protein Phosphatases“ in De Panne, Belgien (1999)

Poster

Hermesmeier J., Selke D., Kellner R., Klumpp S.: Histidine protein phosphatase in mammals. EMBO Conference ”Protein Phosphorylation and Protein Phosphatases“ in De Panne, Belgien (1999)

Teilnahme an Kongressen

15. bis 17. September 1997	Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e. V. (GBM) in Tübingen
11. bis 13. März 1999	Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e. V. (DPhG) in Freiburg i. Br.
15. bis 19. September 1999	EMBO Conference ”Protein Phosphorylation and Protein Phosphatases“ in De Panne, Belgien
23. bis 28. Juli 2000	FASEB Summer Research Conference ”Protein Phosphatases” in Copper Mountain, Colorado, USA

Lebenslauf

27. Juli 1971	Als einziges Kind des Architekten Dieter Heinrich Hermesmeier und der Apothekerin Karin Ingeborg Hermesmeier geb. Dawid in Salzkotten geboren
1978 bis 1982	Besuch der Grundschule St. Josef in Paderborn-Schloß Neuhaus
1982 bis 1991	Besuch des Gymnasium Schloß Neuhaus in Paderborn-Schloß Neuhaus
14. Juni 1991	Abitur mit allgemeiner Hochschulreife
Juli bis September 1991	Ableistung des Grundwehrdienstes (vorzeitige Entlassung aus der Bundeswehr wegen einer dort zugezogenen Rückenverletzung)
Oktober 1991 bis Dezember 1995	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg Intensive Fachschaftsarbeit und Mitarbeit im Bundesverband der Pharmaziestudierenden in Deutschland (FVP)
Dezember 1995 bis Dezember 1996	Praktische Ausbildung in der Königsau-Apotheke in Lippstadt
27. Januar 1997	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
12. Februar 1997	Erteilung der Approbation als Apotheker
Mai 1997 bis Mai 2000	Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation „Identifizierung und Charakterisierung der ersten Histidin-Protein-Phosphatase in Mammalia“ am Institut für Pharmazeutische Chemie, Abteilung Biochemie der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Susanne Klumpp