

zu Wassermolekülen mit Donor-Akzeptor-Abstand 2.94 Å beziehungsweise 2.72 Å angegeben werden. Eines der Wassermoleküle wird wiederum vom Peptid-NH und von der Carbonylgruppe von Thrζ'47 an das Proteingerüst gebunden, das zweite wird von einer der Carboxylatgruppen von Gluζ'116 gehalten.

In der $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit, die kein Sulfat-Ion gebunden hält, weist Glu ϵ 12 zwei unterschiedliche Konformationen auf. Zwar sind die unterschiedlichen Positionen der Seitenkettenatome in der Elektronendichte eindeutig erkennbar, von einer Verfeinerung in alternativen Konformationen wurde aber aufgrund der niedrigen Auflösung (2.30 Å) abgesehen, da eine Konvergenz der abwechselnden Verfeinerung von B-Wert und Besetzung hier nicht zu erwarten war. Beide Positionen bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu der Guanidiniumgruppe von Argζ158 aus. Die Position mit schwächerer Elektronendichte ist gleich zur Konformation des Glu ϵ 12 im Wild-Typ Protein und bildet starke Wasserstoffbrücken aus. Die Wasserstoffbrückenbindungen der dominanten Konformation sind verlängert (Donor-Akzeptor-Abstand: 3.25 Å bzw. 3.36 Å). Die Konformation des Argζ158 weicht in der K46A Mutante nicht von der im Wild-Typ Protein ab.

Zusätzlich weist Argζ206 in der $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit der K46A-Mutante eine andere Konformation als die vergleichbare Seitenkette des Wild-Typ Proteins. Die Guanidiniumgruppe ist jedoch an der gleichen Position. In der $\epsilon'_1\zeta'_1$ besitzt Argζ206 im mutierten und im Wild-Typ Protein die gleiche Konformation.

11 Die ζ(R171S) Mutante

Die Quartärstruktur dieses mutierten Proteinkomplexes, in dem das Argζ171 zu einem Serin verändert wurde, zeigt keine signifikante Abweichung vom Wild-Typ Protein. Eine Superposition der beiden Strukturen ergab eine mittlere quadratische Abweichung von 0.26 Å für alle C α -Positionen des Proteinrückgrats des $\epsilon_2\zeta_2$ -Proteinkomplexes und 0.44 Å für alle Proteinatome. Selbst das Proteinrückgrat der Schleifenregion zwischen Proζ166 und Proζ174 ist von der Mutation unbeeinflusst. Eine Überlagerung der C α Positionen der Schleifenregion ergab in der $\epsilon_1\zeta_1$ Untereinheit eine mittlere Abweichung der kleinsten Fehlerquadrate von 0.218 Å, in $\epsilon'_1\zeta'_1$ ist diese 0.195 Å.

Eine erfolgreiche Klonierung des Gens $\zeta(R171S)$ allein ohne *in vivo* Gegenwart von Gen ε war nicht möglich. Die Ergebnisse der Sequenzierung von vier Konstrukten ergaben neben der gewünschten Punktmutation immer eine zweite, spontane Punktmutation. Im ersten Konstrukt wurde Ser ζ 95 zu Tyrosin mutiert. Ser ζ 95 liegt in Helix E. Bei einer Mutation zu Tyrosin würde die Seitenkette mit β -Strang 2 kollidieren. Folglich muss es in der Struktur des spontan mutierten Proteins in diesem Bereich zu Verschiebungen des Proteinrückgrats kommen, sodass die katalytisch wichtige Seitenkette von Asp ζ 67 in β -Strang 2 nicht mehr an ihrer ursprünglichen Stelle liegen kann.

Im zweiten, spontan entstandenen Konstrukt wurde Gly ζ 118 zu einem Aspartatrest ausgetauscht. Da Gly ζ 118 in Nachbarschaft zu Glu ζ 116 liegt, das vermutlich ein Magnesiumion bindet, würde ein Aspartatrest an dieser Stelle ein zusätzliches attraktives Potential zur Bindung des Mg $^{2+}$ darstellen. Eine solche Beteiligung an der Koordination würde die Position des Mg $^{2+}$ aus dem katalytischen Zentrum verschieben.

Im spontan entstandenen, dritten Konstrukt wurde Leu ζ 203 zu Prolin mutiert. Diese "starre" Aminosäure würde inmitten des β -Strangs 5 zu einem anderen Verlauf führen und damit auch die C-terminal folgende Schleife mit dem funktionell wichtigen Arg ζ 206 verschieben.

Im vierten, spontan entstandenen Konstrukt wurde der Leserahmen von Arg ζ 245 zu einem Stopkodon mutiert und damit der C-terminal nachfolgende Bereich abgeschnitten.

All diese Mutationen führten zu löslichen Proteinen. Deshalb kann die verringerte Toxizität nicht als Folge einer Ausscheidung in Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) erklärt werden, sondern ist eine intrinsische Eigenschaft der Tertiärstruktur ζ .

Die spontan aufgetretenen Nebenmutationen legen die Annahme nahe, dass die gewollte Mutation (R171S) nicht zu einem vollständig inaktiven Protein führt. Alle spontanen Mutationen liegen in der Nähe von funktionell wichtigen Aminosäuren. Deshalb ist anzunehmen, dass es einer zweiten zusätzlichen Mutation bedarf, um die Toxizität von ζ vollständig auszuschalten. *E. coli* ist offenbar nach der Infektion mit dem $\zeta(R171S)$ -Gen in der Lage, spontane Mutationen auszubilden und zu selektionieren. Wenngleich es zu Nebenmutationen bei der Klonierung des Gens ζ kam, war eine Klonierung des Wild-Typ Gens in *E. coli* bis jetzt noch nicht gelungen. Es muss daher angenommen werden, dass es bei einer Infektion des Bakteriums mit dem Wild-Typ Gen sofort zum Zelltod kommt.