

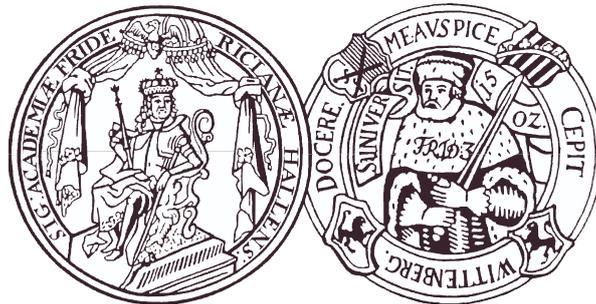
**Kinetische und strukturelle Untersuchung der
Katalysemechanismen ausgewählter Kofaktor-abhängiger Enzyme -
Implikationen für die Decarboxylierung von α -Ketosäuren durch
Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von **Danilo Meyer**

geboren am 14. August 1980 in Salzwedel

Gutachter:

1. Professor Dr. Kai Tittmann
2. Professor Dr. Milton T. Stubbs
3. Professor Dr. Michael Müller

Tag der öffentlichen Verteidigung: 27. November 2009

"According to the philosopher, Ly Tin Wheedle, chaos is found in greatest abundance wherever order is being sought. It always defeats order, because it is better organized."

"Man findet immer dort besonders viel Chaos, wo man nach Ordnung sucht. Das Chaos besiegt die Ordnung, weil es besser organisiert ist."

Terry Pratchett

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	14
1 Einleitung	17
1.1 Identifizierung des reaktiven Zentrums in ThDP	17
1.2 Die Aktivierung des Kofaktors im enzymatischen System	19
1.3 Kovalente Katalyse von ThDP und Reaktionsspektrum beim Umsatz von α -Ketosäuren	22
1.4 Mögliche Mechanismen der ThDP-vermittelten Katalyse	24
1.5 Aktuelle Entwicklungen in der Thiaminforschung	28
1.6 Zielstellung der Arbeit	30
2 Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Chemikalien	33
2.1.2 Geräte	35
2.2 Expression und Reinigung	36
2.2.1 Expression und Reinigung von <i>ZmPDC</i> Wt	37
2.2.2 Expression und Reinigung von <i>ZmPDC</i> E473D und E473Q	37
2.2.3 Expression und Reinigung von <i>LpPOX</i> Wt und diverser Varianten	38
2.2.4 Expression und Reinigung von <i>PpBFDC</i> Wt-His, <i>PpBFDC</i> S26A-His, <i>PfBAL</i> Wt-His und <i>PfBAL</i> A28S-His	39
2.3 Generierung der <i>LpPOX</i> -Varianten M561A und S562A	40
2.4 Strukturelle Arbeiten an <i>LpPOX</i>	41
2.4.1 Kristallisation	41
2.4.2 <i>Soaking</i> -Bedingungen zur Akkumulation distinkter Reaktionsintermediate	41
2.4.3 Datenaufnahme und Prozessierung	44
2.5 Kinetische und thermodynamische Methoden	45
2.5.1 Aktivitätstests	45
2.5.1.1 Decarboxylierung von α -Ketosäuren im optisch gekoppelten Test	45
2.5.1.2 Aktivitätstest unter Verwendung von 2,6-Dichlorphenolindophenol	47
2.5.2 $^1\text{H-NMR}$ gestützte Intermediatanalyse	48
2.5.3 Verwendung von substratanalogen Phosphonaten und Phosphinaten	49
2.5.3.1 Ermittlung des apparenten K_D durch CD-Titration	50
2.5.3.2 Ermittlung der Bindungsgeschwindigkeit durch <i>stopped flow</i> Kinetiken	51

2.6	Untersuchungen zur Carboligationskompetenz von <i>ZmPDC</i> E473Q.....	53
2.6.1	Bestimmung der Substratoptima der PAC-Bildung durch CD-Spektroskopie	53
2.6.2	Untersuchung der Produktverteilung durch ¹ H-NMR	55
2.6.3	Säulenchromatographische Analyse von Carboligationsprodukten und Bestimmung der enantiomeren Reinheit.....	55
2.7	Untersuchung der thermischen Stabilität von <i>ZmPDC</i>	56
2.7.1	Thermisch induzierte Übergangskurven	56
2.7.2	Bestimmung der thermischen Stabilität aus Entfaltungskinetiken	57
3	Ergebnisse und Diskussion	61
3.1	Strukturelle und mechanistische Untersuchungen an Pyruvatoxidase aus <i>Lactobacillus plantarum</i>	61
3.1.1	Einführung	61
3.1.1.1	Vorkommen und Relevanz von Pyruvatoxidasen.....	61
3.1.1.2	Struktur und Mechanismus von Pyruvatoxidase aus <i>Lactobacillus plantarum</i>	62
3.1.2	Röntgenkristallographische Untersuchung von <i>LpPOX</i> in Komplex mit verschiedenen Reaktionsintermediaten	64
3.1.2.1	Vorüberlegungen zur Auswahl der <i>LpPOX</i> Variante F479W	64
3.1.2.2	Kristallisation von <i>LpPOX</i> F479W.....	66
3.1.2.3	Analyse der Kristallstrukturen von <i>LpPOX</i> F479W in Komplex mit verschiedenen Reaktionsintermediaten.....	66
3.1.2.3.1	Das aktive Zentrum der <i>LpPOX</i> ist für die Bindung von L-ThDP in perpendicularer Orientierung optimiert.....	67
3.1.2.3.2	Das post-Decarboxylierungsintermediat wird als Enamin stabilisiert.....	68
3.1.2.3.3	Phosphat wird vor Beginn des Elektronentransfer im aktiven Zentrum orientiert	69
3.1.2.3.4	Die Bindung von Pyruvat führt zu einer Distorsion des Thiazoliumrings.....	69
3.1.2.3.5	Während des Katalysezyklus sind keine Änderungen an der Protein-Komponente sichtbar	70
3.1.2.3.6	Identifizierung einer sekundären Substratbindestelle.....	71
3.1.2.4	Strukturelle Implikationen für die Decarboxylierung von L-ThDP	72
3.1.3	Der Einfluss von Glu 483 auf die Katalyse in <i>LpPOX</i>	76
3.1.3.1	Einfluss des Glu 483 auf die Umsetzung von Pyruvat.....	76
3.1.3.2	Einfluss des Glu 483 auf die Bindung des Pyruvatanalogons MAP.....	85
3.1.3.2.1	Bestimmung der Affinität durch CD-Titration	87
3.1.3.2.2	Bestimmung der Bindungsgeschwindigkeit durch <i>stopped flow</i> Absorptionsmessungen.....	88
3.1.3.3	Einfluss des Glu 483 auf die Phosphatbindung.....	90
3.1.3.4	Zusammenfassung: Einfluss des Glu 483 auf die Katalyse in <i>LpPOX</i>	94

3.2	Untersuchungen an Pyruvatdecarboxylase aus <i>Zymomonas mobilis</i>	97
3.2.1	Einführung	97
3.2.1.1	Vorkommen und Relevanz von Pyruvatdecarboxylasen	97
3.2.1.2	Struktur und Mechanismus von Pyruvatdecarboxylase aus <i>Zymomonas mobilis</i>	98
3.2.2	Mechanistische Untersuchungen an Pyruvatdecarboxylase aus <i>Zymomonas mobilis</i>	100
3.2.2.1	Der Einfluss von Glu 473 auf die Katalyse in <i>ZmPDC</i>	100
3.2.2.2	Vergleich der Funktionen von Glu 483 in <i>LpPOX</i> und Glu 473 in <i>ZmPDC</i>	103
3.2.2.3	Spektroskopische Charakterisierung der enzymgebundenen Intermediate L-ThDP und HE-ThDP (Carbanion/Enamin).....	104
3.2.2.3.1	Qualitative Beschreibung der CD-Spektren.....	104
3.2.2.3.2	Ein Versuch der Bandenzuordnung.....	108
3.2.3	Untersuchung der Carboligationskompetenz der <i>ZmPDC</i> Variante E473Q	113
3.2.3.1	Verwendung von Pyruvatdecarboxylasen für Carboligationsreaktionen	113
3.2.3.2	Abhängigkeit von Geschwindigkeit und Menge der (<i>R</i>)-PAC-Bildung von den Substratkonzentrationen – CD-basierter Ansatz zur Ermittlung der Substratoptima	115
3.2.3.3	Produktverteilung	118
3.2.3.4	Alternative durch <i>ZmPDC</i> E473Q katalysierte Carboligationsreaktionen	120
3.2.3.5	Untersuchung der thermischen Stabilität von <i>ZmPDC</i> Wt und E473Q	121
3.2.3.6	Zusammenfassung: Die <i>ZmPDC</i> -Variante E473Q – eine effiziente Carboligase	123
3.3	Vergleichende Untersuchungen an Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Pseudomonas putida</i> und Benzaldehydlyase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	125
3.3.1	Einführung	125
3.3.1.1	Vorkommen und Relevanz von Benzoylformiatdecarboxylase und Benzaldehydlyase	125
3.3.1.2	Struktur und Mechanismus von <i>PpBFDC</i> und <i>PfBAL</i>	127
3.3.2	Mechanistische Untersuchungen an <i>PpBFDC</i> Wt	128
3.3.2.1	Umsetzung des chromophoren Substrats para-Nitro-Benzoylformiat	128
3.3.2.2	Umsetzung des nativen Substrats Benzoylformiat	130
3.3.2.3	Bindung des Substratanalogon MBP	134

3.3.3	Vergleichende Untersuchungen an <i>Pp</i> BFDC Wt, <i>Pp</i> BFDC S26A, <i>Pf</i> BAL Wt und <i>Pf</i> BAL A28S.....	138
3.3.3.1	Umsetzung des nativen Substrats Benzoylformiat.....	138
3.3.3.2	Bindung des Substratanalogon MBP.....	140
3.3.4	Zusammenfassung: Decarboxylierung von Benzoylformiat durch <i>Pp</i> BFDC und <i>Pf</i> BAL.....	143
4	Zusammenfassung.....	145
5	Ausblick.....	149
6	Literaturverzeichnis	151
7	Anhang	161

Tabellenverzeichnis

1.1	Vergleich einiger Geschwindigkeitskonstanten der Thiaminkatalyse in Lösung und im enzymatischen System	21
2.1	Zusammensetzung der Medien und Puffer für die Enzympräparationen	36
2.2	Sequenzen der Mutagenesprimer für <i>LpPOX</i> M561A und S562A	40
3.1	Konstanten für die Umsetzung von Pyruvat durch <i>LpPOX</i>	81
3.2	Konstanten für die Umsetzung von Phosphat durch <i>LpPOX</i>	87
3.3	Konstanten für die Umsetzung von Pyruvat durch <i>ZmPDC</i>	96
3.4	Vergleich der Produktbildung bei verschiedenen Carboligationsreaktionen	118
3.5	Kinetische Parameter bei der Umsetzung von Benzoylformiat durch <i>PpBFDC</i> und <i>PfBAL</i>	135
3.6	Parameter der MBP-Bindung an <i>PpBFDC</i> und <i>PfBAL</i>	137

Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktur und Nomenklatur von Thiamindiphosphat.....	17
1.2	Vorgeschlagene Mechanismen der ThDP-Katalyse.....	18
1.3	V-Konformation von ThDP in <i>LpPOX</i>	20
1.4	Mechanismus der Aktivierung von ThDP.....	20
1.5	ThDP-vermittelte Reaktionen beim Umsatz von Pyruvat.....	23
1.6	Prinzip des <i>uniform binding</i> Konzepts.....	25
1.7	Schematische Darstellung des <i>ground state destabilisation</i> Mechanismus.....	26
1.8	Ladungsverteilungen bei der Decarboxylierung einer zu Laktyl-ThDP analogen Verbindung.....	27
1.9	Domänenstruktur von ThDP-abhängigen Enzymen.....	28
1.10	Positionierung der für die Arbeit relevanten Reste im aktiven Zentrum	31
2.1	Prinzip des optisch gekoppelten Test.....	45
2.2	Prinzip des DCPIP-Test.....	47
2.3	Struktureller Vergleich von α -Ketosäuren, Phosphonaten und Phosphinaten.....	49
2.4	Abhängigkeit des k_{obs} -Wertes der zweiten Phase bei der Phosphonatbindung.....	52

3.1	Röntgenkristallstruktur von <i>LpPOX</i>	63
3.2	Reaktionsmechanismus von <i>LpPOX</i>	64
3.3	Kinetischer Vergleich von <i>LpPOX</i> Wt und F479W.....	65
3.4	Strukturen der Reaktionsintermediate in <i>LpPOX</i> F479W.....	67
3.5	Mögliche Zustände des post-Decarboxylierungsintermediats.....	69
3.6	Vergleich der aktiven Zentren von <i>LpPOX</i> F479W in Komplex mit verschiedenen Intermediaten.....	71
3.7	Bindung von Pyruvat in der sekundären Bindetasche.....	72
3.8	Vergleich der Strukturen von (S)-PL-Th in Lösung und (S)-L-ThDP in <i>LpPOX</i> F479W.....	74
3.9	Pyruvatumsetzung durch <i>LpPOX</i> im DCPIP-Test.....	77
3.10	Reduktion des FAD in <i>LpPOX</i> Wt und den Glu483-Varianten.....	79
3.11	Absorptionsspektren von MAP und PL-ThDP in <i>LpPOX</i> Wt.....	83
3.12	CD-Titration von MAP in <i>LpPOX</i> Wt und Varianten.....	84
3.13	Geschwindigkeit der MAP-Bindung an <i>LpPOX</i> Wt und Glu483-Varianten.....	85
3.14	Titration von Phosphat zu <i>LpPOX</i> Wt und Glu483-Varianten.....	88
3.15	Bildung radikalischer Flavinspezies in <i>LpPOX</i> E483Q.....	90
3.16	Vergleich der aktiven Zentren von <i>LpPOX</i> und <i>EcPOX</i>	92

3.17	Struktur und Mechanismus von <i>ZmPDC</i>	95
3.18	Funktionen von Glu 473 im Reaktionsmechanismus von <i>ZmPDC</i>	97
3.19	Absorptionsspektren von L-ThDP und HE-ThDP (Carbanion/Enamin).....	101
3.20	CD-Spektren von <i>ZmPDC</i> E473D und E473Q in Komplex mit Intermediaten und bei verschiedenen pH-Werten.....	102
3.21	Decarboxylase- und Carboligasereaktion in <i>ZmPDC</i>	109
3.22	Auswahl einiger aus Acyloinen gewonnener Produkte.....	110
3.23	Die biotechnologische Herstellung von (-)-Ephedrin.....	110
3.24	Vergleich der Acetoin- und PAC-Bildung in <i>ZmPDC</i> Wt und E473Q.....	112
3.25	Substratoptima der (<i>R</i>)-PAC-Bildung in <i>ZmPDC</i> Wt und E473Q.....	113
3.26	Produktverteilung bei der Umsetzung von Pyruvat und Benzaldehyd durch <i>ZmPDC</i> Wt und E473Q.....	116
3.27	Vergleich der Bildung verschiedener Carboligationsprodukte durch <i>ZmPDC</i> Wt und E473Q.....	117
3.28	Thermische Entfaltung von <i>ZmPDC</i> Wt und E473Q.....	119
3.29	Schematische Darstellung der Umsetzung von Pyruvat und Benzaldehyd durch <i>ZmPDC</i> Wt und E473Q.....	121
3.30	Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus von <i>PpBFDC</i>	124
3.31	Kompetition zwischen Protonierung und Fragmentierung von HBz-Thiamin in Lösung.....	125

3.32	Umsetzung von NBF durch BFDC Wt.....	127
3.33	Intermediatverteilung von <i>Pp</i> BFDC Wt beim Umsatz von Benzoylformiat	129
3.34	Orientierung von Mandelat im aktiven Zentrum von <i>Pp</i> BFDC Wt.....	130
3.35	Titration von MBP zu <i>Pp</i> BFDC Wt.....	131
3.36	Kinetik der MBP-Bindung an <i>Pp</i> BFDC Wt (<i>stopped flow</i>).....	132
3.37	Untersuchung der Kinetik der MBP-Bindung an <i>Pp</i> BFDC Wt durch ¹ H-NMR.....	133
3.38	Umsetzung von Benzoylformiat durch BFDC und BAL.....	136
3.39	Vergleich der MBP-Bindung an BFDC und BAL.....	138

Abkürzungsverzeichnis

AP	Aminopyrimidin-Form des ThDP
APyr	Aminopyrimidinring
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriophosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	Circular Dichroismus
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol (oxidiert)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	<i>enantiomeric excess</i>
GC	Gaschromatographie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPP	2-Hydroxypropiofenon
IP	Iminopyrimidin-Form des ThDP
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
LB	<i>lysogeny broth</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NAD	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PAC	Phenylacetylcarbinol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	Proteinstruktur-Datenbank (<i>protein data bank</i>)
SDS	<i>sodium dodecylsulfat</i>
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTC	2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid
UV	Ultraviolett
VIS	Visuell
WHO	<i>world health organization</i>

Kofaktoren, Intermediate und Analoga

Ac-ThDP	2-Acetyl-ThDP
AcPho	Acetyl-Phosphinat
BePho	Benzoyl-Phosphinat
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
FMN	Flavinmononukleotid
HBz-ThDP	2-(1-Hydroxybenzyl)-ThDP
HE-ThDP	2-(1-Hydroxyethyl)-ThDP
L-ThDP	2-Laktyl-ThDP
M-ThDP	2-Mandelyl-ThDP
MAP	Methyl-Actyl-Phosphonat
MBP	Methyl-Benzoyl-Phosphonat
MPP	Methyl-Propionyl-Phosphonat
NBF	para-Nitro-Benzoylformiat
PL-ThDP	α -(Methyl)Phosphono-L-ThDP
PM-ThDP	α -(Methyl)Phosphono-M-ThDP
PrPho	Propionyl-Phosphinat
Th	Thiamin
ThDP	Thiamindiphosphat

Enzyme

ACK	Acetatkinase
ADH	Alkoholdehydrogenase
AHAS	Acetohydroxysäuresynthase
BAL	Benzaldehydlyase
BFDC	Benzoylformiatdecarboxylase
GCL	Glyoxylatcarboligase
PDC	Pyruvatdecarboxylase
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PFOR	Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase
POX	Pyruvatoxidase
TK	Transketolase

1 Einleitung

Thiamindiphosphat (ThDP, Abb. 1.1), das biologisch aktive Derivat des Vitamin B1, ermöglicht als Kofaktor in vielen Enzymen die Umsetzung von Carbonylverbindungen. Da in den letzten 80 Jahren Struktur und Katalyse des Kofaktors umfangreich untersucht wurden, stellt ThDP derzeit einen der am besten verstandenen Kofaktoren dar (Kluger 1987, Schellenberger 1998, Jordan 2003, Frank *et al.* 2007, Kluger und Tittmann 2008). Die im Laufe vieler Jahre angehäuften Erfahrungen zur chemischen Synthese von ThDP-Intermediaten erlauben es, die Reaktivität dieser Intermediate in Lösung direkt mit den enzymatisch katalysierten Reaktionen zu vergleichen. Damit ergibt sich für die ThDP-vermittelte Katalyse die seltene Möglichkeit, die Beschleunigungsfaktoren der Enzyme für verschiedene Einzelschritte direkt zu ermitteln.

1.1 Identifizierung des reaktiven Zentrums in ThDP

Obwohl die Struktur des Kofaktors bereits in den 1930ern gelöst wurde (Williams 1936), nahm es weitere 20 Jahre in Anspruch den genauen Ort der kovalenten Katalyse zu identifizieren. Langenbeck und Mitarbeiter postulierten bereits vor der Kenntnis der Struktur, dass die Reaktionen des „Cocarboxylase“ (später ThDP) genannten Kofaktors der „Carboxylase“ (später PDC) durch ein primäres Amin realisiert werden (Langenbeck und Hutschenreuther 1930, Langenbeck 1932, siehe Abb. 1.2a). Grundlage dieser Annahme war die

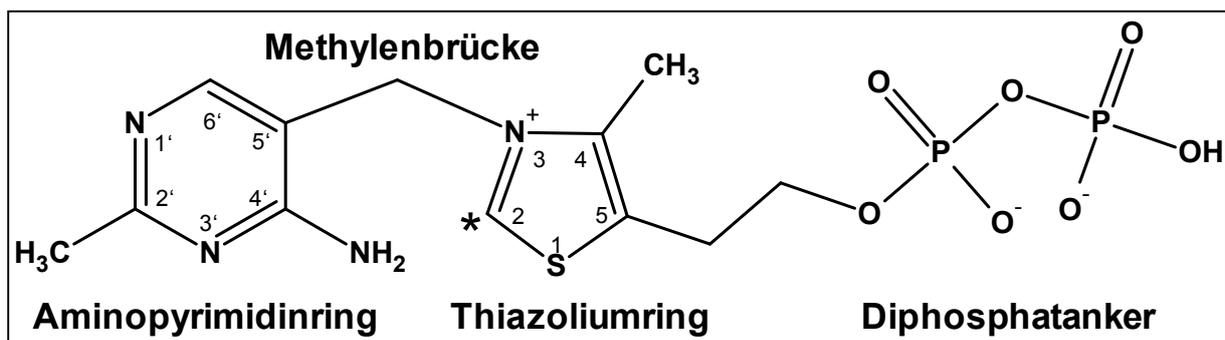


Abb. 1.1: Struktur und Nomenklatur von Thiamindiphosphat

Beobachtung, dass primäre Amine (genau wie die Cocarboxylase) Acetaldehyd und CO₂ aus Pyruvat freisetzen. Zusätzlich tritt in beiden Systemen eine Produkthemmung auf und es kommt in einer Nebenreaktion zur Bildung von Acetoin. Die Reaktionen der Cocarboxylase sollten in diesem Mechanismus über die intermediäre Bildung einer Schiff'schen Base verlaufen. Nachdem 1936 die Struktur der Cocarboxylase gelöst (Williams 1936) und das Vorhandensein einer primären Aminogruppe gezeigt wurde, schien das Vorliegen des Langenbeck-Zyklus als gesichert. Stern und Mitarbeiter konnten diesen allerdings 1939 widerlegen indem sie

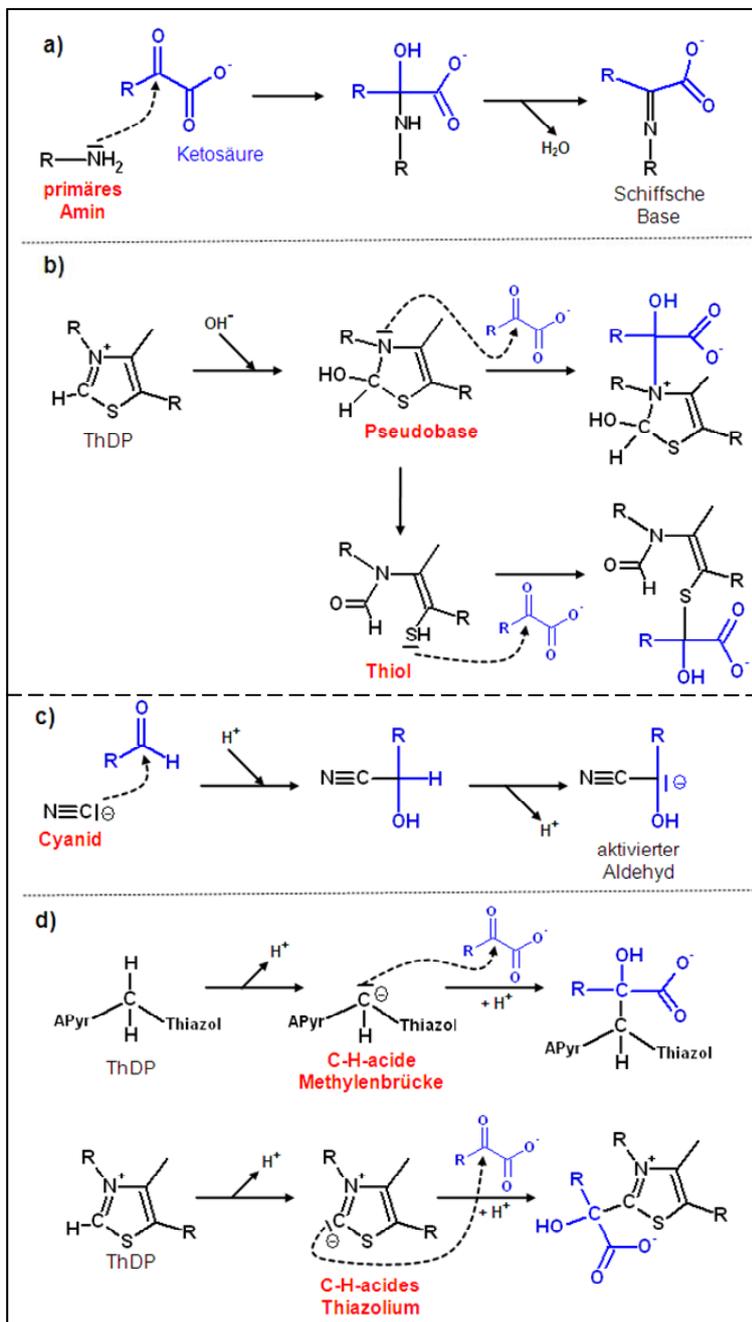


Abb. 1.2: Verschiedene vorgeschlagene Mechanismen der Wirkungsweise des ThDP auf Ketosäuren;

a) Bildung einer Schiff'schen Base durch nukleophilen Angriff eines primären Amins – der Langenbeck-Mechanismus;

b) Bildung eines reaktiven Heteroatoms durch Hydroxylierung des Thiazoliumrings, nucleophiler Angriff der Pseudobase (nach Mizuhara) oder des nach Ringspaltung gebildeten Thiols (nach Karrer);

c) erste Schritte der Cyanid-katalysierten Kondensation von Aldehyden;

d) nucleophiler Angriff eines C-H-aciden Kohlenstoffs, der tatsächlich vorliegende Breslow-Mechanismus beginnt mit der Deprotonierung am C2 des Thiazoliumrings; dargestellt sind jeweils die ersten Schritte der Reaktion; schwarz = Katalysator, blau = Substrat

zeigten, dass die Aminogruppe des Thiamins auf Grund der Konjugation zum Pyrimidinring nicht die typischen Eigenschaften einer primären Aminogruppe aufweist und unreaktiv ist (Stern *et al.* 1939). Damit war die Frage nach dem Reaktionsmechanismus des ThDP wieder offen. In den folgenden Jahren wurde zunächst erfolglos versucht, einen modifizierten Langenbeck'schen Mechanismus auf den Thiazoliumring zu übertragen. Dabei wurde sowohl der Angriff einer Pseudobase (Mizuhara 1954, Abb. 1.2b) als auch das Vorliegen eines gespaltenen Thiazoliumrings diskutiert (Karrer 1947, Abb. 1.2b). Nachdem auch diese Mechanismen ausgeschlossen waren, wurde 1956 erstmals die Möglichkeit einer Carbanion-Katalyse in Betracht gezogen. Das organisch-chemische Pendant zu dieser Reaktion lieferte die Cyanid-katalysierte Benzoinkondensation (Abb. 1.2c). Breslow schlug zunächst den Methylenkohlenstoff als Ort der Katalyse vor (Abb. 1.2d). Die Flankierung durch den Thiazoliumring (mit dem formal positiv geladenen N3) und den Aminopyrimidinring (mit seinen induktiven Effekten) sollte zu einer verhältnismäßig leichten Dissoziierbarkeit der C-H-Bindung führen. Das dadurch gebildete Ylid sollte in Analogie zum Cyanidion das Carbonylsubstrat nukleophil angreifen. Allerdings wurde in Deuteriumaustausch-Experimenten keine Dissoziation des Methylenkohlenstoffs gefunden, so dass dieser Mechanismus ebenfalls ausgeschlossen werden konnte. 1957/58 konnte wiederum Breslow dann mit Hilfe von Thiazolium-Modellsubstanzen die nunmehr 30jährige Suche abschließen und das C2 des Thiazoliumringes als eigentlichen Ort der Katalyse identifizieren (Breslow 1957 und 1958, Abb. 1.2d). Wie bereits zuvor für den Methylenkohlenstoff postuliert, stellt die Dissoziation der C2-H-Bindung den ersten Schritt der Katalyse dar. Das dadurch erhaltene Ylid ist die eigentliche aktive Form des Kofaktors und initiiert die Katalyse durch einen nukleophilen Angriff auf das Carbonyl-Substrat.

1.2 Die Aktivierung des Kofaktors im enzymatischen System

Der gefundene hohe pK_a -Wert des C2-Atom von ThDP in Lösung (~ 18 , Kemp und O'Brien 1970, Washabough und Jencks 1988) und der dadurch bedingte geringe Anteil an Ylid bei physiologischem pH (etwa 1 von 10^{11} Teilchen bei pH 7) warf nun

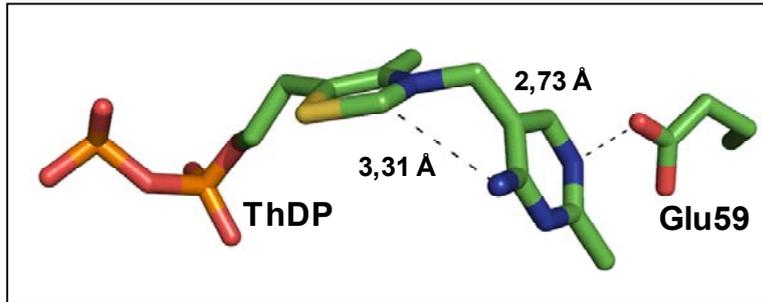


Abb. 1.3: V-Konformation von ThDP und Interaktion zum konservierten Glutamat in LpPOX, für den Aktivierungsprozess relevante H-Brücken sind eingezeichnet (PDB-Code: 1POW)

wiederum die Frage auf, wie die hohen Umsatzraten in Enzymen gewährleistet werden. Diese Frage konnte erst in den 1990ern zufriedenstellend beantwortet werden. Anhand der Anfang der 1990er Jahre gelösten Kristallstrukturen mehrerer ThDP-abhängiger Enzyme wurde deutlich, dass der Kofaktor im aktiven Zentrum auf charakteristische Weise gebunden ist (Lindqvist *et al.* 1992; Dyda *et al.* 1993; Muller und Schulz 1993; Muller *et al.* 1993). Dabei wird im Gegensatz zur Struktur des freien Kofaktors in Lösung nicht die F-Konformation (Shin *et al.* 1993), sondern die energetisch ungünstigere V-Konformation realisiert. Diese Konformation bringt die 4'-Aminogruppe des Aminopyrimidinringes in räumliche Nähe zum C2 des Thiazoliumringes und wurde bereits 1967 von Schellenberger postuliert (Schellenberger 1967). Zusätzlich wurde ein hoch konserviertes Glutamat gefunden,

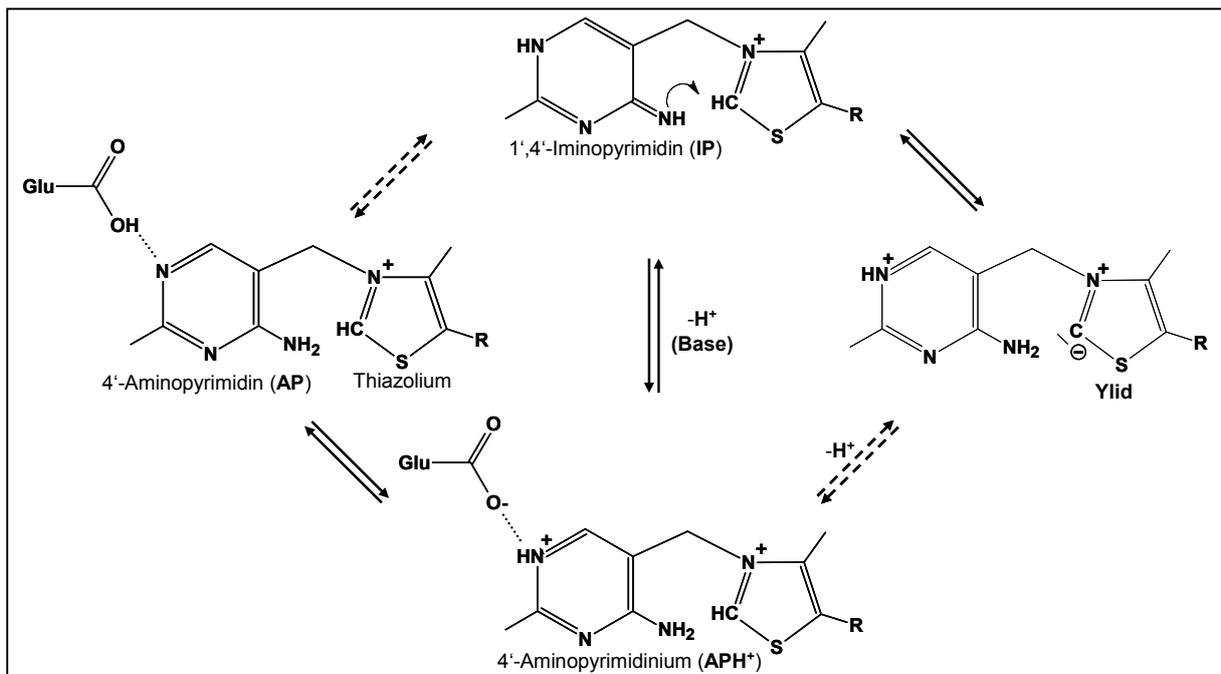


Abb. 1.4: Mechanismus der Aktivierung von ThDP, R = (CH₂)₂-Diphosphat, der wahrscheinliche Reaktionsverlauf ist durch durchgezogene Pfeile gekennzeichnet, Abbildung modifiziert nach Nemeria *et al.* 2007

welches mit dem N1' interagiert (Abb. 1.3). Auf der Grundlage dieser Befunde und durch den kombinatorischen Einsatz von kofaktoranalogen Verbindungen sowie einer $^1\text{H-NMR}$ -basierten Methode zur Messung der Deprotonierungsgeschwindigkeit des C2 in Enzymen (Kern *et al.* 1997), konnte schließlich ein für alle ThDP-abhängige Enzyme geltender Mechanismus der Kofaktoraktivierung abgeleitet werden (Abb. 1.4). Demnach werden im Kofaktor verschiedene Protonierungszustände durchlaufen (AP, APH^+ , IP und Ylid). Das N1' des Aminopyrimidinrings wird durch das konservierte Glutamat protoniert. Die dadurch gebildete iminotautomere Form des Kofaktors katalysiert die Deprotonierung des reaktiven C2 im benachbarten Thiazoliumring. Das entstehende Ylid kann nun ein entsprechendes Substrat angreifen. Interessanterweise liegt der Kofaktor auch im enzymgebundenen Zustand nahezu vollständig protoniert vor (Kern *et al.* 1997). Es

Tab. 1.1: Vergleich einiger Geschwindigkeitskonstanten der Thiaminkatalyse in Lösung und im enzymatischen System

	System	Geschwindigkeitskonstante (s^{-1})	Referenz
Kofaktoraktivierung (bei 4 °C)	freies ThDP (pH 6,0)	$9,5 * 10^{-4}$	Kern <i>et al.</i> 1997
	ZmPDC (pH 6,0)	110 (17) ⁽¹⁾	Kern <i>et al.</i> 1997
	LpPOX (pH 6,0)	314 (2) ⁽¹⁾	Tittmann <i>et al.</i> 1998
Decarboxylierung von Laktyl-ThDP	nicht-enzymatisch (pH 4,0)	$1,1 * 10^{-4}$	Kluger <i>et al.</i> 1981
	nicht-enzymatisch (pH 7,0)	$4 * 10^{-5}$	Kluger <i>et al.</i> 1981
	ZmPDC (pH 6,0)	400	Tittmann <i>et al.</i> 2003
	LpPOX (pH 6,0)	112	Tittmann <i>et al.</i> 2000
Decarboxylierung von Mandelyl-ThDP	nicht-enzymatisch ⁽²⁾ (pH 6,0, 25 °C)	$3,1 * 10^{-4}$	Hu und Kluger 2002
	PpBFDC (pH 6,0)	> 240 ⁽³⁾	Polovnikova <i>et al.</i> 2003

⁽¹⁾ in Klammern ist zum Vergleich der k_{cat} der Enzyme bei 4 °C angegeben; ⁽²⁾ bezieht sich auf die Decarboxylierung von Mandelyl-Thiamin; ⁽³⁾ angegeben ist der ermittelte k_{cat} für die Umsetzung von Benzoylformiat, da noch keine Werte für die Decarboxylierung von Mandelyl-ThDP zur Verfügung standen

konnte aber gezeigt werden, dass die Wirkungsweise der Proteinkomponente auf einer etwa 10^5 -fachen Beschleunigung der Deprotonierungsreaktion basiert (Tab. 1.1). Diese Beschleunigung stellt den ersten Mechanismus dar, nach dem in allen ThDP-abhängigen Enzymen eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Reaktion in Lösung gewährleistet wird (Vergleich Kapitel 1.4).

1.3 Kovalente Katalyse von ThDP und Reaktionsspektrum beim Umsatz von α -Ketosäuren

Die strukturelle Ähnlichkeit des Ylids zum Cyanidion spiegelt sich im Reaktionsspektrum von ThDP-abhängigen Enzymen wieder. Zum umfangreichen chemischen Repertoire des Kofaktors zählen unter anderem C-C-bindungsbildende (Transketolase – TK; Acetohydroxysäuresynthase – AHAS; Benzaldehydlyase – BAL; Glyoxylatcarboligase – GCL) und C-C-bindungspaltende (α -Ketosäure-decarboxylasen wie Pyruvatdecarboxylase – PDC; Pyruvatoxidasen – POX; α -Ketosäuredehydrogenasen wie Pyruvatdehydrogenase – PDH) Reaktionen. Diese Reaktionen entsprechen teilweise den durch Cyanid katalysierten Umpolungsreaktionen und machen die Enzyme auch für den Einsatz als Katalysatoren in chemoenzymatischen Prozessen interessant (Pohl *et al.* 2004 und Kapitel 3.2.3 und 3.3.1.1). Die Proteinkomponente des jeweiligen Enzym-Kofaktor-Komplexes legt durch die Generierung eines hoch selektiven Mikromilieus (stereoelektronische Umgebung, Präsentation eventueller Akzeptorsubstrate oder Elektronenakzeptoren) sowohl die Substratspezifität als auch den Reaktionsverlauf fest.

Eine typische Reaktion ist die Decarboxylierung von α -Ketosäuren wie Pyruvat (Abb. 1.5a). Nach der in verschiedenen Enzymen gemeinen Bindung des Substrats wird ein tetrahedrales Intermediat gebildet (Laktyl-ThDP oder L-ThDP bei Pyruvat). Die enzymatisch katalysierte Decarboxylierung dieses Intermediats verläuft um sechs bis sieben Größenordnungen schneller als die unkatalysierte Reaktion (Tab. 1.1). Diese dramatische Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit muss durch die Enzymkomponente ermöglicht werden. Das Schicksal des resultierenden post-Decarboxylierungsintermediates (Hydroxyethyl-ThDP, HE-ThDP in der nicht-

protonierten Form als Enamin/Carbanion) variiert dagegen und stellt einen wichtigen Verzweigungspunkt in der Thiamin-katalysierten Umsetzung von α -Ketosäuren dar. Auf Grund der hohen Reaktivität des Carbanions/Enamins können eine Vielzahl von Reaktionen durchlaufen werden (Abb. 1.5b). Im einfachsten Fall kommt es zur Protonierung und Acetaldehyd wird freigesetzt (PDC). Alternativ dazu kann das Carbanion eine weitere Carbonylkomponente nukleophil angreifen. Diese Reaktion ist die Grundlage für eine Vielzahl von Carboligationsreaktionen welche durch Enzyme wie AHAS und BAL (nativ) oder PDC und BFDC (in einer Nebenreaktion) katalysiert werden. Neben diesen nicht-oxidativen Reaktionen kann das Carbanion/Enamin aber auch oxidativ umgesetzt werden. Dabei können zum Einen

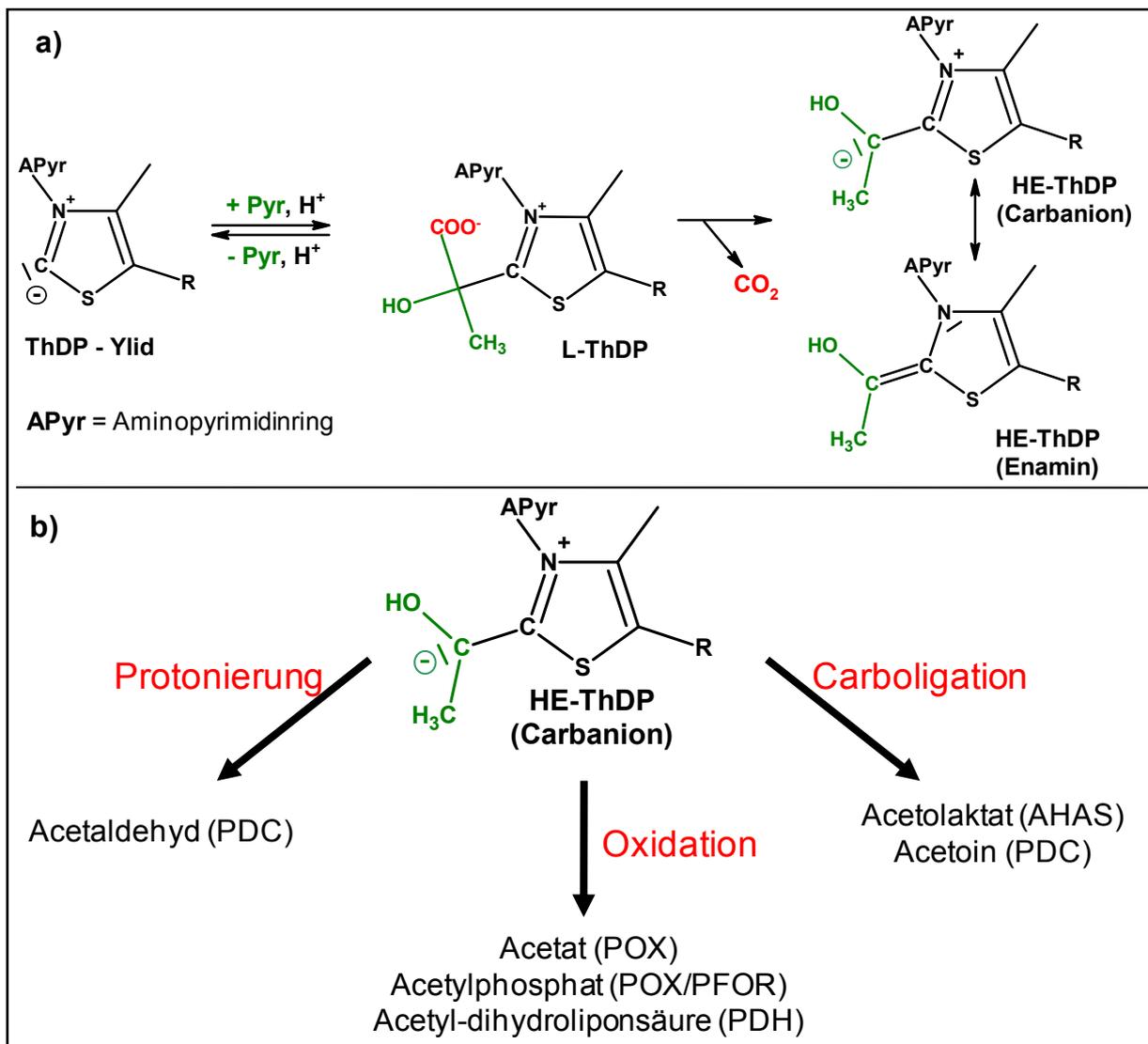


Abb. 1.5: ThDP-vermittelte Reaktionen beim Umsatz von Pyruvat, a) die in allen Enzymen gemeinen Schritte der Substratbindung und Decarboxylierung von L-ThDP, b) einige enzymespezifische Reaktionen des zentralen Carbanion-Intermediats

unter der formalen Bildung von Acetyl-ThDP (Ac-ThDP) Elektronen auf einen Akzeptor übertragen werden (FAD in Pyruvatoxidase und ein Eisen-Schwefel-Cluster in Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase). In PDH wird die Oxidation des Carbanionintermediats dagegen mit der Bildung einer C-S-Bindung gekoppelt. Die Energie für diese Reaktion stammt aus der Spaltung der Disulfidbindung im gespannten Dithiolanring der Liponsäure. So können aus der Umsetzung von Pyruvat unter Durchlaufen der beiden gemeinsamen kovalenten Intermediate (L-ThDP und HE-ThDP Carbanion) so verschiedene Produkte wie Acetaldehyd, Acetylphosphat, Acetat, Acetoin, Acetolaktat, Acetohydroxybutyrat oder Acetyl-dihydroliponsäure resultieren. Die Aufgabe der Enzymkomponente besteht darin, durch Präsentation des jeweiligen Akzeptorsubstrates die Reaktion in die gewünschte Richtung zu leiten und durch Vermeidung von Nebenreaktionen die Effizienz der gewünschten Produktbildung zu erhöhen.

1.4 Mögliche Beiträge der Protein-Komponente zur Beschleunigung von ThDP-abhängigen Reaktionen

In Lösung wird die Decarboxylierung von Pyruvat nur unter relativ harten Bedingungen ermöglicht (150 °C mit verdünnter Schwefelsäure oder 100 °C an Platin; Langenbeck und Hutschenreuther 1930). In Anwesenheit von Thiamin wird dagegen bereits bei Raumtemperatur eine Reaktion beobachtet (Kluger *et al.* 1981). Die Fähigkeit des Thiazoliumrings zur Ladungsdelokalisation ist hauptsächlich für die katalytische Wirkung des Kofaktors in Lösung verantwortlich. Sowohl die Ladung des C2-Carbanion (Ylid) als auch die des post-Decarboxylierungsintermediats (HE-ThDP Carbanion/Enamin) können durch Delokalisation im aromatischen System stabilisiert werden. Interessanterweise fungiert dabei nicht, wie durch die chemischen Grenzformeln impliziert, der formal positiv geladene Stickstoff (N3) als Elektronenakzeptor. Quantenchemische Berechnungen konnten zeigen, dass dieser auf Grund seines großen Elektronegativitäts-Wertes tatsächlich bereits im Grundzustand des Kofaktors eine negative Ladung trägt (DuPrè und Wong 2005). Der Beitrag des N3 zur Ladungskompensation in den Carbanionstrukturen ist daher gering. Stattdessen ist der gut polarisierbare Schwefel für die Stabilisierung der Carbanionen verantwortlich. Im enzymatischen System wird die katalytische

Kompetenz des ThDP noch um einige Größenordnungen gesteigert. Dabei können folgende Faktoren eine Rolle spielen:

- 1) die Aktivierung des Kofaktors,
- 2) die Bindung und Orientierung des Substrats,
- 3) die Polarität des aktiven Zentrums und
- 4) die spezifische Umsetzung des post-Decarboxylierungsintermediats.

Die Punkte 1) und 4) wurden bereits in den vorherigen Kapiteln angesprochen und werden hier nicht weiter erörtert. Ein generelles Prinzip, nach dem Enzyme eine Erhöhung der katalytischen Effizienz erwirken, liegt in der passgenauen Bindung des Substrates. Albery und Knowles haben das Konzept des *uniform binding* für enzymatische Prozesse definiert (Albery und Knowles 1977). Demnach wirkt sich eine Optimierung des aktiven Zentrums für die Bindung des Substrates in erster Linie positiv auf die Affinität zu allen auftretenden Intermediaten (und auch Übergangszuständen) aus (Abb. 1.6). Ursache dafür ist die zumeist große strukturelle Ähnlichkeit der während der Reaktionssequenz auftretenden Spezies. Der hauptsächliche Effekt der Substratbindung liegt in der Verringerung der Reaktionsordnung des ersten kovalenten Reaktionsschrittes. Dafür wird die freiwerdende Energie bei der Substratbindung genutzt, um die Affinität zu diesem zu erhöhen. Die Reaktanden (in unserem Falle ThDP und Pyruvat) werden vororientiert und die eigentliche Reaktion läuft als quasi-intramolekulare Reaktion bereits bei

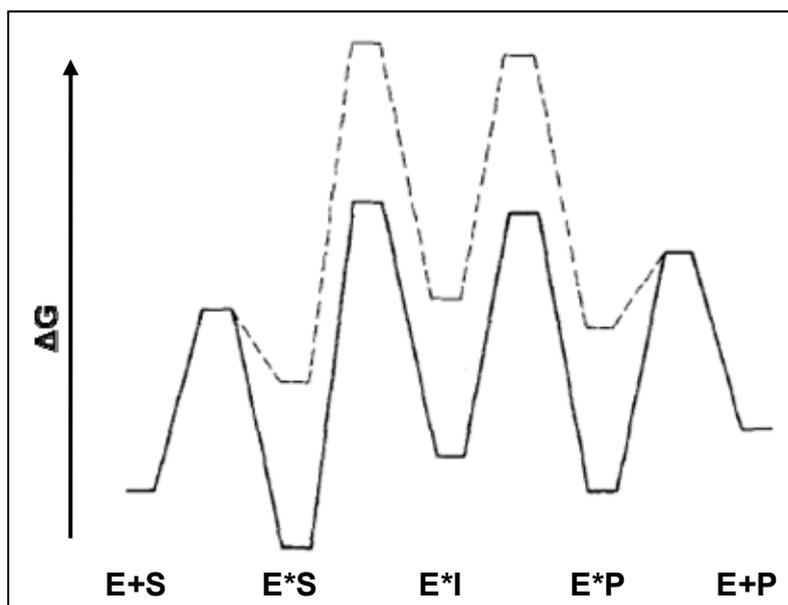


Abb. 1.6.: Einfluss des *uniform binding* auf das Reaktionsprofil einer enzymatisch katalysierten Reaktion, durch die Bindung des Substrats im Enzym (—) werden alle Reaktionsintermediate und Übergangszustände im Vergleich zur Reaktion in Lösung (----) stabilisiert. E = Enzym, S = Substrat, I = Intermediat, P = Produkt; Abbildung modifiziert nach Albery und Knowles 1977

geringen Substratkonzentrationen ab. In ThDP-abhängigen Decarboxylasen könnte das Substrat zusätzlich derart gebunden sein, dass die abzuspaltene Carboxylatgruppe perpendicular zum Thiazoliumring ausgerichtet ist. Diese Orientierung erlaubt die Stabilisierung der im Carbanion entstehenden Ladung durch Delokalisation im Thiazoliumring ohne die Notwendigkeit einer Rotation (*least-motion maximum-overlap mechanism*, Turano *et al.* 1982, Kluger 1987, Friedemann und Breitkopf 1996).

Die Bindungsenergie des Substrats kann nicht nur für die Erhöhung der Affinität genutzt werden (für eine Übersicht über die Nutzung von Bindungsenergie sei auf (Jencks 1987) verwiesen). Ein Teil dieser Energie kann verwendet werden, um reaktive Gruppen des Enzyms umzuorientieren (*induced fit*). Das Enzym ist demnach im Grundzustand inaktiv und nur teilweise zum Substrat komplementär. Die Bindung eines Teils des Substrats bewirkt eine konformationelle Änderung, welche wiederum eine vollständige Bindung des Substrats hervorruft. Erst in dieser Konformation sind die aktiven Gruppen des Enzyms derart ausgerichtet, dass eine Katalyse erfolgen kann. Da nach solch einem Mechanismus die aktive Form des Enzyms erst in Gegenwart des korrekten Substrats vorliegt, werden unerwünschte Nebenreaktionen (z. B. mit Wasser) ausgeschlossen. Die Energie der Substratbindung wird also beim *induced fit* Mechanismus zu Gunsten der Reaktionsspezifität verbraucht.

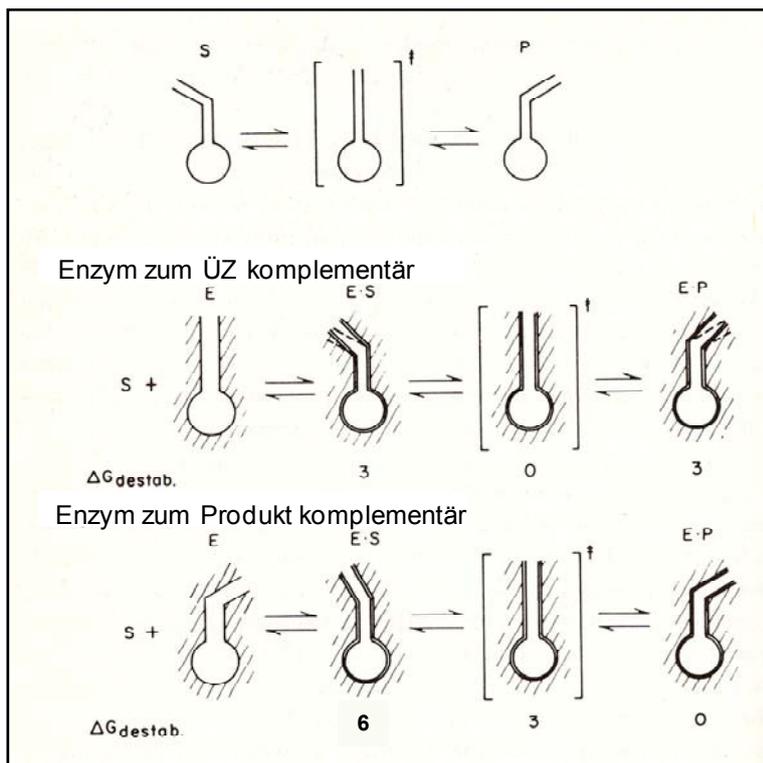


Abb. 1.7: Schematische Darstellung des *ground state destabilisation* Mechanismus am Beispiel der Isomerisierung des Substrates (S) in das Produkt (P). Ist das Enzym zum Übergangszustand komplementär, so werden S und P gleichermaßen destabilisiert – die Reaktion ist in beide Richtungen schnell. Eine hohe Komplementarität zu P führt dagegen zu einer starken Destabilisierung von S und damit zu einer effizienten vorwärtsgerichteten Katalyse. Abbildung modifiziert nach (Jencks 1987)

Demgegenüber kann ein Teil der Bindungsenergie des Substrats auch zur Destabilisierung desselben genutzt werden. Ist die Bindetasche des Enzyms beispielsweise dem Übergangszustand (oder gar dem Produkt) komplementärer als dem Substrat, so kann dies bei der Bindung des Substrates zu einer Destabilisierung einer zu spaltenden Bindung führen (*ground state destabilisation*, Abb. 1.7). Ein Teil der Bindungsenergie wird dann für eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit aufgewendet. Allerdings geschieht dies zum Einen auf Kosten der Substrataffinität. Zum Anderen kann die Produktabspaltung zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden und es ist mit Produkthemmung zu rechnen. In dem Zusammenhang ist interessant, dass PDC durch sein Produkt Acetaldehyd inhibiert werden kann. Im Kontext des Metabolitflusses ist diese Hemmung aber im Allgemeinen nicht von Nachteil, da durch die schnelle Entfernung des Reaktionsproduktes eine effiziente vorwärtsgerichtete Katalyse gewährleistet werden kann. Beispiele sind die weit verbreitete Spaltung von Pyrophosphat, welche ATP-gestützte Reaktionen treibt oder aber auch die Reduktion von Acetaldehyd durch die Alkoholdehydrogenase im Zuge der alkoholischen Gärung.

Die Polarität des aktiven Zentrums stellt einen weiteren möglichen Faktor zur Optimierung der Effizienz speziell von Decarboxylierungs-Reaktionen dar. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Decarboxylierung von Thiazolium-Modellsubstanzen (Crosby und Lienhard 1970) als auch von Laktyl-Thiamin (Kluger 1981) in weniger polaren Lösungsmitteln schneller ablaufen als in Wasser. Als Ursache wird diskutiert, dass im Übergangszustand (und auch im Produkt) weniger lokalisierte Ladungen vorliegen, als im Ausgangszustand (Abb. 1.8). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass ThDP-abhängige Enzyme zur Erhöhung der Decarboxylierungsgeschwindigkeit eine hydrophobe Umgebung anbieten. Die

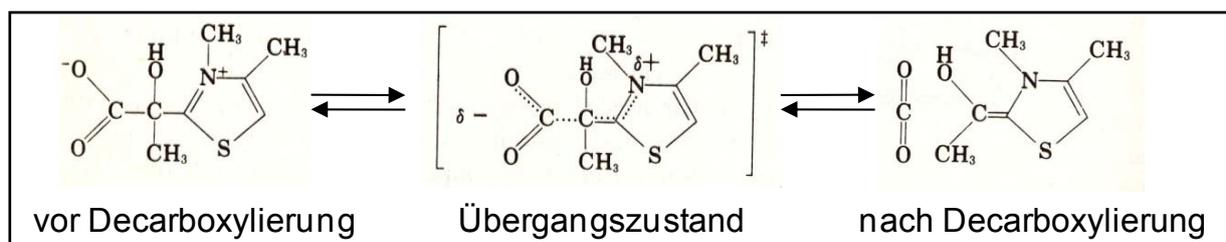


Abb. 1.8: Ladungsverteilungen bei der Decarboxylierung einer zu Laktyl-ThDP analogen Verbindung, Abbildung modifiziert nach (Jencks 1987)

experimentell ermittelte Dielektrizitätskonstante im aktiven Zentrum von ScPDC unterstützt diese Theorie. Mit einem Wert von etwa 13 – 15 kann sie zwischen 1-Pentanol und 1-Hexanol eingeordnet werden (Jordan *et al.* 1999).

1.5 Aktuelle Entwicklungen in der Thiaminforschung

Die zurückliegenden 10 Jahre der ThDP-Forschung waren durch methodische Fortschritte und einige überraschende Erkenntnisse geprägt. Die strukturelle Charakterisierung der Enzymklasse schritt weiter voran, so dass mittlerweile über 100 Strukturen von 17 verschiedenen ThDP-abhängigen Enzymen aus unterschiedlichen Organismen in der Protein Datenbank des *Research Collaboratory for Structural Biology* hinterlegt sind (<http://www.rcsb.org>). Von einigen dieser Enzyme konnten Strukturen im Komplex mit Inhibitoren oder gar Reaktionsintermediaten gelöst werden. Die strukturellen Informationen wurden kürzlich für die Erstellung eines evolutionären Stammbaums genutzt (Costelloe *et al.* 2007). Obwohl die Sequenzidentität zwischen verschiedenen

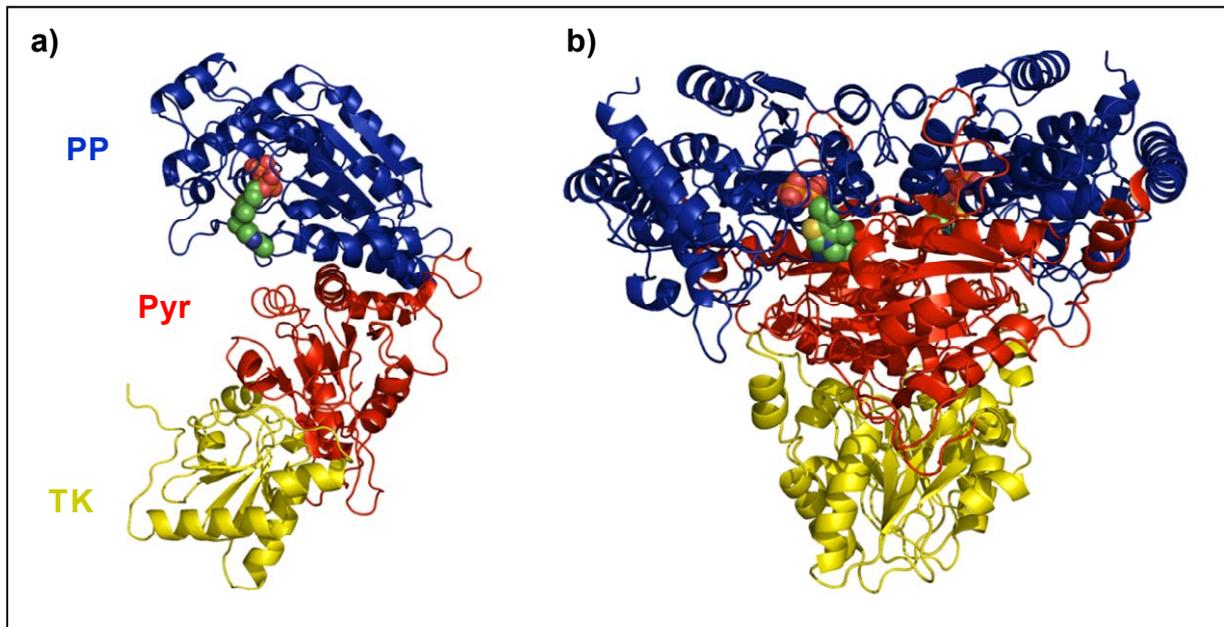


Abb. 1.9: Domänenstruktur von ThDP-abhängigen Enzymen am Beispiel von Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae*, a) Domänenstruktur eines Monomers mit den konservierten PP- und Pyr-Domänen und der TK-spezifischen Domäne, b) Assemblierung zweier Monomere zum aktiven Dimer, die aktiven Zentren werden an der Kontaktfläche zwischen PP- und Pyr-Domäne gebildet; Atome des Kofaktor sind als Sphären dargestellt (PDB-Code: 1TRK)

Enzymen sehr gering ist (zumeist unter 20 %), sind die Tertiärstrukturen stark konserviert. Das deutet darauf hin, dass die Enzyme divergent aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein evolviert sind. Alle ThDP-abhängigen Enzyme besitzen eine Pyr-Domäne (für Aminopyrimidin) und eine PP-Domäne (für Pyrophosphat) (Abb. 1.9a). Die Bindung des Kofaktors erfolgt an der Kontaktfläche dieser zwei Domänen, die zumeist von zwei separaten Polypeptidketten stammen. Ein Homodimer mit zwei aktiven Zentren stellt daher die katalytisch aktive Minimaleinheit dar (Abb. 1.9b). Die Quartärstrukturen der einzelnen Enzyme reichen allerdings von einem Dimer (Transketolase) über Homo- (Pyruvatdecarboxylase) und Heterotetramere (Acetohydroxysäuresynthase) bis hin zu Multienzymkomplexen (Pyruvatdehydrogenase-Komplex).

Auf mechanistischer Seite war die Etablierung einer Methode zur Detektion kovalenter Reaktionsintermediate impulsgebend (Tittmann *et al.* 2003). Dadurch war erstmals die Möglichkeit gegeben, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt einer Reaktionssequenz direkt zu bestimmen und die Geschwindigkeitskonstanten von Einzelschritten zu ermitteln. Desweiteren gelang der spektroskopische Nachweis der postulierten iminotautomeren Form des Kofaktors im enzymgebundenen Zustand (Nemeria *et al.* 2004). Kürzlich konnten auf dieser Grundlage erstmals pK_a -Werte von ThDP in den aktiven Zentren verschiedener Enzyme ermittelt werden (Nemeria *et al.* 2007a). Für die E1-Komponente des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes wurde eine kinetische Asymmetrie der aktiven Zentren innerhalb eines Dimers nachgewiesen („Halbseitenreaktivität“, Sugden und Randle 1978; Seifert *et al.* 2006). Es wurde vorgeschlagen, dass das für die Aktivierung des Kofaktors notwendige Proton über ein H-Brückennetzwerk zwischen den beiden ThDP-Molekülen ausgetauscht wird (Frank *et al.* 2004). Die dadurch bewirkte alternierende Arbeitsweise der beiden aktiven Zentren könnte für die Koordination von Reaktionssequenzen in Multienzymkomplexen eine Rolle spielen. Eine zur Protonenkanaltheorie alternative Möglichkeit stellt der sogenannte „Flip-Flop-Mechanismus“ dar. Dieser postuliert als Ursache der Halbseitenreaktivität eine konformationelle Änderung während der Katalyse (Ciszak *et al.* 2003). Am bemerkenswertesten war die Entdeckung, dass in Glyoxylatcarboligase das für die Kofaktoraktivierung als absolut essentiell eingestufte Glutamat durch Valin ersetzt ist (Kaplan *et al.* 2008). Durch Einführung einer Carboxylatgruppe an dieser Position

wurde zwar wie erwartet eine Beschleunigung der Kofaktoraktivierung erwirkt. Allerdings kam es gleichzeitig zu einer Störung im letzten Schritt der Katalyse. Dieser Befund zeigte, dass in Enzymen die Verlangsamung eines Reaktionsschrittes zu einer Beschleunigung der Gesamtreaktion führen kann, und dass auch auf gut untersuchten Gebieten mechanistische Überraschungen nicht ausgeschlossen sind.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Wie bereits erwähnt, sind Substratbindung und Decarboxylierung des ersten kovalenten Intermediats universelle Schritte bei der Umsetzung von α -Ketosäuren durch ThDP-abhängige Enzyme. Diese sind dabei einerseits für die Bildung unterschiedlicher Produkte aus dem gleichen Intermediat (Carbanion/Enamin) optimiert. Gleichzeitig muss aber auch eine effiziente Beschleunigung der gemeinsamen Decarboxylierungsreaktion gewährleistet sein. Vier verschiedene Enzyme wurden in dieser Arbeit untersucht – Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* (*ZmPDC*), Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum* (*LpPOX*), Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* (*PpBFDC*) und Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* (*PfBAL*).

Die *ZmPDC* stellt den Prototyp der ThDP-abhängigen Enzyme dar und überträgt ein Proton auf das gebildete Carbanion/Enamin. Drei saure Seitenketten (His 113, Asp 27 und Glu 473) scheinen für die Reaktion von Relevanz zu sein (Chang *et al.* 1999). Asp 27 und Glu 473 könnten in ihrer Carboxylatform durch unattraktive Wechselwirkungen („elektrostatistischer Stress“ durch Ladungsabstoßung) mit der Carboxylatgruppe des L-ThDP die Abspaltung des CO_2 erzwingen. Außerdem wird für diese Reste eine Funktion als Protonenrelaysystem für die Protonierung des Carbanion/Enamin diskutiert (Tittmann *et al.* 2003). Das aktive Zentrum der *LpPOX* ist dagegen vorwiegend durch hydrophobe Reste ausgekleidet (Muller und Schulz 1993). Die hydrophobe Umgebung könnte einerseits die Protonierung des Carbanion/Enamin verhindern und andererseits die Abspaltung des ebenfalls hydrophoben CO_2 begünstigen. Die einzige saure Seitenkette im aktiven Zentrum (Glu 483) ist möglicherweise an der Substratbindung und Ausrichtung des L-ThDP beteiligt. *PpBFDC* setzt in einer zur *ZmPDC* äquivalenten Reaktion

Benzoylformiat zu Benzaldehyd und CO_2 um. Diesem Enzym fehlt allerdings die katalytische Triade. Ein Serin (Ser 26) ersetzt das Aspartat 27 aus der *ZmPDC* und ist für die Katalyse essentiell (Kneen *et al.* 2005). Die verwandte *PfBAL* ist dagegen nicht in der Lage, Benzoylformiat zu decarboxylieren. Stattdessen katalysiert sie die Kondensation von zwei Benzaldehydmolekülen zu Benzoin. Ersetzt man in ihr das dem Serin 26 in *PpBFDC* homologe Alanin 28 durch Serin erhält *PfBAL* die Fähigkeit, Benzoylformiat zu decarboxylieren (Kneen *et al.* 2005).

Der Einfluss der Aminosäurereste Glu 473 (*ZmPDC*), Glu 483 (*LpPOX*), Ser 26 (*PpBFDC*) und Ala 28 (*PfBAL*) auf die Katalyse der jeweiligen Enzyme war Bestandteil dieser Arbeit. Wie in Abbildung 1.10 zu erkennen ist, interagieren diese Reste direkt mit der Carboxylatgruppe des Substrats. Demnach wäre eine Beteiligung an Bindung des Substrates und Decarboxylierung des ersten kovalenten Adduktes denkbar. Unter Verwendung des aktuellen Methodenrepertoires ($^1\text{H-NMR}$ gestützte Intermediatanalyse, CD- und UV/VIS-Spektroskopie, Bindung von substratanalogen Phosphonaten, Kryokristallografie) sollte der Einfluss von Mutationen dieser Reste auf Einzelschritte der Katalyse detailliert untersucht werden. Dabei war der Fokus insbesondere auf den Decarboxylierungsschritt gelegt. Auf Grund der sehr unterschiedlichen aktiven Zentren, und der Notwendigkeit das post-Decarboxylierungsintermediat auf verschiedene Weise umzusetzen (Protonierung, Elektronentransfer oder Carboligation), war zu erwarten, dass abweichende Faktoren bei der Decarboxylierung in den jeweiligen Enzymen eine Rolle spielen.

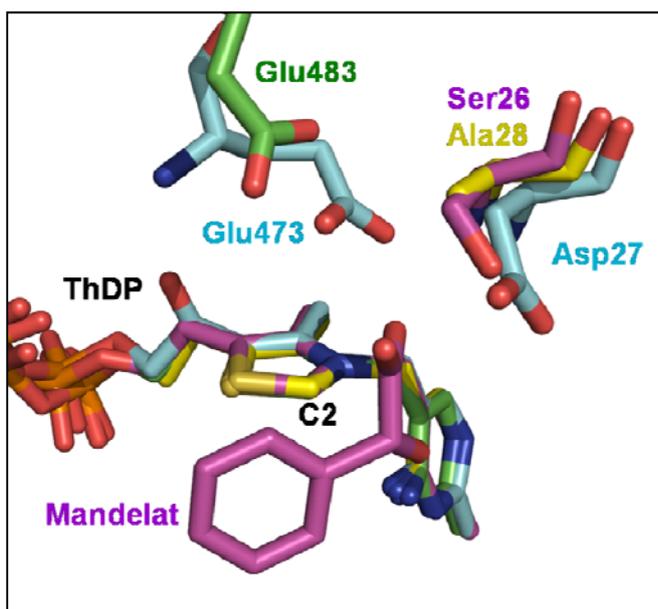


Abb. 1.10: Positionierung der für die Arbeit relevanten Reste, die mögliche Beteiligung der jeweiligen Reste an Substrat-Bindung und Decarboxylierung wird durch die Orientierung zur Carboxylatgruppe des BFDC-Inhibitors Mandelat deutlich. Dieser weist wahrscheinlich einen dem nativen Intermediat Mandelyl-ThDP ähnlichen Bindungsmodus auf. grün: *LpPOX* (PDB-Code 1POW), cyan: *ZmPDC* mit modifiziertem ThDP (1ZPD), violett: *PpBFDC* in Komplex mit Mandelat (1MCZ), gelb: *PfBAL* (2UZ1); die einzelnen Strukturen wurden anhand der Thiazolium- und Aminopyrimidinringe des ThDP mit dem Programm PyMOL übereinander gelagert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acetaldehyd	Fluka GmbH, Buchs
Acrylamid 4k Mix (30%)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agar-Agar	Carl Roth GmbH&Co
Alkoholdehydrogenase	
aus Hefe	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
aus Pferdeleber	Fluka GmbH, Buchs
Ammoniumperoxodisulfat	Serva Electrophoresis GmbH
Ammoniumsulfat	VWR International GmbH, Darmstadt
Ampizillin (Natriumsalz)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Benzaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Benzoylformiat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Borsäure	VEB Laborchemie Apolda
Bromphenolblau	Merck KGaA
BSA	AppliChem GmbH, Darmstadt
Coomassie-Brilliantblau G-250	AppliChem GmbH, Darmstadt
Deuteriumoxid (99,9 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
2,6-Dichlorphenolindophenol	Merck KGaA
DNase I	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dpn I	New England Biolabs GmbH
EDTA	VWR International GmbH, Darmstadt
Essigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethanol (vergällt)	VWR International GmbH, Darmstadt
Flavinadenindinukleotid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Flavinmononukleotid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
β -D-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glukoseoxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glyzerol (87%)	VWR International GmbH, Darmstadt

Glycin	Carl Roth GmbH&Co
Harnstoff	VEB Laborchemie Apolda
Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Darmstadt
Imidazol	AppliChem GmbH, Darmstadt
IPTG	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat (III)	VEB Laborchemie Apolda
Kaliumhydroxid	VWR International GmbH, Darmstadt
Kanamyzinsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
α -Ketobutyrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Laktose (Monohydrat)	Merck KGaA
Magnesiumchlorid	VEB Laborchemie Apolda
Magnesiumsulfat (Heptahydrat)	Merck KGaA
MES	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH&Co
NADH	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid	VWR International GmbH, Darmstadt
Phosphorsäure (85%)	VWR International GmbH, Darmstadt
iso-Propanol	Carl Roth GmbH&Co
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Pyruvat (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Salzsäure (37%)	VWR International GmbH, Darmstadt
SDS	Serva Electrophoresis GmbH
Streptomyzinsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TCA	Carl Roth GmbH&Co
TEMED	Merck KGaA
Thiamin (Hydrochlorid)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Thiaminpyrophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt

Die substratanalogen Phosphonate MAP, MPP und MBP wurden durch PD Dr. Ralph Golbik synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Geräte

Thermocycler	T-Gradient	Biometra
Autoklav	3870M	Tuttnauer
Homogenisator	Gaulin	APV Homogenizer GmbH
HPLC-System	Äkta Purifier	GE Healthcare
Zentrifugen	L8-60M	Beckman
	J2-HC	Beckman
	RC 5B	Sorvall
	EBA 12	Hettich
UV/VIS-Spektrometer	Jasco V-560	Jasco Corporation
	Uvikon 940	Kontron Instruments
Spektropolarimeter	Jasco J-810	Jasco Corporation
	Chirascan	Leatherhead
<i>stopped flow-</i> Spektrophotometer	SX-18MV	Applied Photophysics
<i>rapid quenched flow</i>	RQF-3	Kintek
NMR-Spektrometer	Avance ARX 400	Bruker

2.2 Expression und Reinigung

Alle Enzyme und Varianten wurden in *E. coli* heterolog überexprimiert und über Fällungs- und Chromatographieschritte zur Homogenität aufgereinigt. Die Reinigungsstrategien sind im Folgenden kurz zusammengefasst. Alle Schritte der Enzympräparationen wurden auf Eis oder im Kühlraum (10 °C) durchgeführt. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE dokumentiert. Die Zusammensetzungen der Medien und Puffer sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Der Lagerpuffer entsprach in den meisten Experimenten dem jeweiligen Messpuffer.

Tab. 2.1: Zusammensetzung der Medien und Puffer für die Enzympräparationen

Enzym	<i>ZmPDC</i>	<i>LpPOX</i>	<i>PpBFDC</i> / <i>PfBAL</i>
Medium	2YT 16 g/l Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl	TBY 10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 100 mM KH ₂ PO ₄ 100 µm MgSO ₄	LB 10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl
Niedrigsalzpuffer	10 mM MES 100 µM ThDP 1 mM MgSO ₄ pH 6,5 1 mS/cm ²	20 mM Phosphat 100 µM ThDP 1 mM MgSO ₄ pH 6,0 1-2 mS/cm ²	50 mM Phosphat 100 µM ThDP 2,5 mM MgSO ₄ 20 mM Imidazol pH 7,0 (BFDC) / pH 7,6 (BAL)
Hochsalzpuffer	10 mM MES 100 µM ThDP 1 mM MgSO ₄ 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 6,5 12 mS/cm ²	500 mM Phosphat 100 µM ThDP 1 mM MgSO ₄ pH 6,0 30 mS/cm ²	50 mM Phosphat 100 µM ThDP 2,5 mM MgSO ₄ 250 mM Imidazol pH 7,0 (BFDC) / pH 7,6 (BAL)
Lagerpuffer	50 mM MES 100 µM ThDP 1 mM MgSO ₄ pH 6,0	200 mM Phosphat 100 µM ThDP 1 mM MgSO ₄ pH 6,0	50 mM Phosphat 200 µM ThDP 2,5 mM MgSO ₄ pH 6,5 (BFDC) / pH 7,6 (BAL)

2.2.1 Expression und Reinigung von ZmPDC Wt

Das Plasmid pZY134b (bereitgestellt von PD Dr. Martina Pohl, FZ Jülich) enthielt das Gen für ZmPDC Wt und wurde in *E.coli* SG13009 transformiert. Die Kultivierung erfolgte in 6 * 1,2 l 2YT-Medium in Anwesenheit von 100 µg/ml Ampizillin und 50 µg/ml Kanamycin bei 30 °C. Bei einer OD von 0,5 bis 0,8 wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und für 14 bis 17 Stunden exprimiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (20 min, 4000 g, 4 °C) und bei -70 °C gelagert. Die Ausbeute betrug 10 bis 15 g.

Die Zellen wurden in Niedrigsalz-Puffer resuspendiert und mittels *french press* aufgeschlossen. Nach Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation (59000 g) wurde DNA mit 0,8 % (w/v) Streptomyzinsulfat gefällt oder durch DNase-Verdau (5 µg/ml DNase) entfernt. Durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (20 % und 43 % (w/v)) erfolgte eine erste Aufreinigung des Enzyms. Das Pellet der zweiten Ammoniumsulfatfällung wurde in etwa 10 ml Niedrigsalz-Puffer aufgenommen und 2 mal gegen 700 ml des selben Puffers dialysiert. Das Protein wurde auf 50 ml mit Wasser und Puffer verdünnt (maximale Leitfähigkeit 0,7 mS/cm²) und auf einen Anionenaustauscher (Fractogel[®] EMD TMAE (S), Merck KGaA, 30 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Die Säule wurde mit etwa 100 ml Niedrigsalz-Puffer gespült und das Protein über einen linearen Gradienten (0 bis 40 % Hochsalzpuffer in 150 ml, Fraktionsgröße = 2 ml) eluiert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und PDC-haltige Fraktionen wurden vereinigt und auf 2 ml aufkonzentriert. Im letzten Schritt wurde die konzentrierte Proteinlösung über eine Gelfiltration (Superdex 200 16/60, Amersham, 120 ml Säulenvolumen, mit Lagerpuffer äquilibriert) getrennt und gleichzeitig in den Lagerpuffer umgepuffert. Aus 7,2 l Kulturlösung wurden typischerweise 50 bis 100 mg sauberes Enzym erhalten.

2.2.2 Expression und Reinigung von ZmPDC E473D und E473Q

Das Plasmid pPLZM (bereitgestellt von Prof. Ronald G. Duggleby, University of Queensland, Brisbane) enthielt die Gene für ZmPDC E473Q und E473D. Für die Expression der Varianten wurde der *E.coli*-Stamm JM109 verwendet. Die Kultivierung erfolgte in 6 * 1,2 l 2YT-Medium in Anwesenheit von 100 µg/ml Ampizillin

bei 37 °C. Die Gene der Varianten stehen unter der Kontrolle eines Hitze-induzierbaren Promotors. Daher wurde die Expression bei einer OD von 0,5 bis 0,8 durch Erhöhung der Temperatur auf 42 °C induziert (Dauer 3 bis 4 Stunden). Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (20 min, 4000 g, 4 °C) und bei -70 °C gelagert. Die Ausbeute betrug 8 bis 14 g.

Der weitere Reinigungsverlauf entsprach der des Wt. Aus 7,2 l Kulturlösung wurden etwa 100 mg E473D und 20 mg E473Q erhalten. Ursache für die geringe Ausbeute an E473Q ist deren Lokalisation in *inclusion bodies*. Durch Zugabe von 50 mg/l Thiamin zur Kulturlösung konnte die Ausbeute an löslichem Protein in einigen Präparationen verdoppelt werden. Eine Rückfaltung der Variante aus den *inclusion bodies* gelang zwar (rückgefaltetes Material war zur Bildung von (R)-PAC befähigt, Daten nicht gezeigt). Allerdings war das erhaltene Enzym äußerst instabil und für weitere Untersuchungen unbrauchbar. Die Instabilität von renaturierter ZmPDC wurde bereits früher beschrieben (Pohl *et al.* 1994).

2.2.3 Expression und Reinigung von LpPOX Wt und diverser Varianten

Die Plasmide pBP200 mit den Genen für LpPOX Wt, E483A, E483Q, M561A oder S562A wurden in *E.coli* C600 transformiert. 200 ml einer Vorkultur (Wachstum über Nacht bei 37 °C) wurden pelletiert und in 6 ml Medium resuspendiert. Jeder Kolben der Hauptkultur (6 * 0,7 l TBY-Medium, 100 µg/ml Ampizillin) wurde mit 1 ml dieser Zellsuspension angeimpft. Um die Ausbeute an aktivem Enzym zu erhöhen, wurden dem Medium Kofaktorvorstufen zugesetzt (37 mg/l Thiamin, 30 mg/l FMN). Die Expression wurde durch Zugabe von 15 g/l Laktose induziert. Die Kultivierung erfolgte für 14 bis 16 Stunden bei 28 °C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (20 min, 4000 g, 4 °C) und bei -70 °C gelagert. Die Ausbeute betrug 10 bis 16 g.

Die Zellen wurden in Niedrigsalz-Puffer resuspendiert und mittels *french press* aufgeschlossen. Nach Entfernung der Zelltrümmer (59000 g) wurde DNA in 0,2 % (w/v) Protaminsulfat gefällt. Durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (23 % und 35 % (w/v)) erfolgte eine erste Aufreinigung des Enzyms. Das Pellet der zweiten Ammoniumsulfatfällung wurde in etwa 10 ml Niedrigsalz-Puffer aufgenommen und zwei mal gegen 700 ml desselben Puffers dialysiert. Das Protein

wurde auf 50 ml mit Wasser und Puffer verdünnt (maximale Leitfähigkeit 5 mS/cm²) und auf einen Anionenaustauscher (Fractogel[®] EMD TMAE (S), Merck KGaA, 30 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Die Säule wurde mit etwa 100 ml Niedrigsalz-Puffer gespült und das Protein über einen linearen Gradienten (0 bis 100 % Hochsalz-Puffer in 150 ml, Fraktionsgröße = 2 ml) eluiert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert, LpPOX-haltige Fraktionen wurden vereinigt und auf 2 ml aufkonzentriert. Die konzentrierte Proteinlösung wurde über eine Gelfiltration (Superdex 200 16/60, Amersham, 120 ml Säulenvolumen, mit Lagerpuffer äquilibriert) getrennt und in den Lagerpuffer umgepuffert. Die Ausbeuten aus 4,2 l Kulturlösung betragen etwa 100 mg (Wt, M561A und S562A) und 60 mg (E483A und E483Q).

2.2.4 Expression und Reinigung von PpBFDC Wt-His, PpBFDC S26A-His, PfBAL Wt-His und PfBAL A28S-His

Die Gene dieser Enzyme lagen auf dem Plasmid pKK233-2 vor. Als Expressionsstamm wurde *E.coli* SG13009 verwendet. Die Stämme wurden in 6 * 1,0 l LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD von 0,5 bis 0,8 kultiviert und die Expression durch Zugabe von IPTG induziert (1 mM IPTG, 30 °C bei BFDC; 0,5 mM IPTG, 24 °C bei BAL). Nach 14 bis 17 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (20 min, 4000 g, 4 °C) und bei -70 °C gelagert. Die Ausbeute betrug 15 bis 30 g für BFDC und 16 bis 22 g für BAL.

Die Zellen wurden in Niedrigimidazol-Puffer resuspendiert und mittels *french press* aufgeschlossen. Nach Entfernung der Zelltrümmer (59000 g) wurde die DNA durch DNaseI-Verdau (5 µg/ml DNaseI, 30 min) entfernt. Da diese Proteine mit einem Hexahistidin-*tag* versehen waren, wurde die Proteinlösung direkt auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen (Ni-NTA Superflow, Qiagen, 35 ml Säulenvolumen). Die Säule wurde mit 100 ml Niedrigimidazol-Puffer gespült und das Protein mit 100 % Hochimidazol-Puffer eluiert (2 ml Fraktionen). Enzymhaltige Fraktionen wurden vereinigt, auf <10 ml aufkonzentriert und mittels Größenausschlusschromatographie (HiPrep[™] Sephadex[™] G-25 Fine, Amersham) in den Lagerpuffer umgepuffert. Die Ausbeuten lagen in allen Varianten bei 100 bis 200 mg.

2.3 Generierung der *LpPOX*-Varianten M561A und S562A

Als Ausgangsplasmid diente pBP200 *LpPOX* Wt. Die Mutationen wurden über zielgerichtete Mutagenese mit einem kommerziellen Kit (*QuickChange[®] site directed mutagenesis Kit*, Stratagene) eingeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Zur Amplifikation der mutagenisierten Plasmide wurden diese durch Elektroporation in *E. coli* XL-1 *blue* transformiert. Positive Klone wurden durch Wachstum auf Ampizillin-haltigem LB-Agar selektiert. Zur Extraktion der Plasmide wurde das *QIAprep[®] Spin Miniprep Kit* (Qiagen) eingesetzt. Der Erfolg der Mutagenesen wurde durch Sequenzierung (MWG AG Biotech) verifiziert.

Für den Expressionstest wurden die Plasmide mittels Elektroporation in den *E. coli*-Stamm C600 transformiert. Die Selektion erfolgte auf Ampizillin- und Kanamycin-haltigem LB-Medium. Die Expression in 1 ml Kulturlösung wurde bei einer OD von 0,6 mit 1 mM IPTG induziert. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen pelletiert und in SDS-Gel Probenpuffer resuspendiert. Der Erfolg der Expression wurde über SDS-PAGE kontrolliert.

Tab. 2.2: Sequenzen der Mutageneseprimer zur Generierung der *LpPOX* Varianten M561A und S562A. Zum Vergleich ist die Sequenz von *LpPOX* Wt angegeben. Die mutierten Triplets sind hervorgehoben.

Bezeichnung	Sequenz	Schmelztemperatur
Sequenz <i>LpPOX</i> -WT 1660 - 1707	5'- AAG CTT CGT TTA GAT TCG GCA ATG AGT TCG GCA GCT GAT ATT GAA GCA -3'	
M561Afw	5'- G CTT CGT TTA GAT TCG GCA GCG AGT TCG GCA GCT G -3'	79,7 °C
M561Arev	5'- C AGC TGC CGA ACT AGC TGC CGC ATC TAA ACG AAG C -3'	79,7 °C
S562Afw	5'- CGT TTA GAT TCG GCA ATG GCT TCG GCA GCT GAT ATT G -3'	77,8 °C
S562Arev	5'- C AAT ATC AGC TGC CGA AGC CAT TGC CGA ATC TAA ACG -3'	77,8 °C

2.4 Strukturelle Arbeiten an LpPOX

2.4.1 Kristallisation

Zur Kristallisation wurde die Methode der Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen angewendet. In die Kavitäten von 24-Loch-Zellkulturplatten wurden 500 µl Reservoirlösung vorgelegt. Die Reservoirlösung enthielt 1 bis 2 M Ammoniumsulfat als Präzipitant, welche durch die Kombination von LpPOX Gelfiltrationspuffer (200 mM Phosphat, 100 µM ThDP, 1 mM MgSO₄, pH 6,0) und 3 M (NH₄)₂SO₄ eingestellt wurde. Auf Deckplättchen wurden 2 µl Proteinlösung (10 bis 30 mg/ml in Gelfiltrationspuffer) mit 2 µl der jeweiligen Reservoirlösung gemischt. Die Deckplättchen wurden mit mittelviskoser Baysilone-Paste (GE Bayer Silicons GmbH & Co. KG, Leverkusen) luftdicht auf den Kavitäten fixiert. Über die Gasphase kommt es im Laufe der Zeit zum Konzentrationsausgleich zwischen dem Kristallisationstropfen und der Reservoirlösung. Auf Grund der geringeren Konzentration an Präzipitant im Kristallisationstropfen nimmt dessen Volumen ab. Die damit einhergehende Erhöhung der Proteinkonzentration begünstigt die Bildung von Kristallen. Alle Kristallisationsansätze wurden im Kühlraum bei 8 bis 12 °C durchgeführt.

2.4.2 Soaking-Bedingungen zur Akkumulation distinkter Reaktionsintermediate

Für die Lösung der Kristallstrukturen mit gebundenen Intermediaten wurde die Variante F479W verwendet. Um die diversen Reaktionsintermediate in den Kristallen zu akkumulieren, wurden diese in verschiedenen Kryolösungen inkubiert. Die jeweiligen Bedingungen wurden aus dem bekannten Reaktionsmechanismus und mit Hilfe der genauen Kenntnis der kinetischen Parameter der Variante abgeleitet (Meyer 2004).

Grundzustand der Variante

Kryolösung: 115 mM Phosphat, 1,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 % (v/v) Glyzerol, pH 5,8

Inkubationszeit: 30 s

Akkumulation von L-ThDP

Aus vorhergehenden Untersuchungen war bekannt, dass die Variante F479W im *steady state* L-ThDP akkumuliert (Meyer 2004). Auf Grund der geringen Konzentration an gelöstem Sauerstoff sind *steady-state*-Bedingungen aber nur für wenige Sekunden gegeben so dass der Kristall nur für kurze Zeit inkubiert werden durfte.

Kryolösung: 115 mM Phosphat, 1,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 % (v/v) Glyzerol, pH 5,8
+ 200 mM Pyruvat

Inkubationszeit: ca. 2 s

Akkumulation von PL-ThDP

PL-ThDP entsteht nach der Bindung von MAP und gilt als stabiles Analogon des L-ThDP. Daher konnte die Inkubationszeit des Kristalls in der *soaking*-Lösung ausgedehnt werden.

Kryolösung: 115 mM Phosphat, 1,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 % (v/v) Glyzerol, pH 5,8
+ 100 mM MAP

Inkubationszeit: 90 s

Akkumulation von HE-ThDP (post-Decarboxylierungsintermediat)

HE-ThDP entsteht als stabiles Intermediat, nachdem der gelöste Sauerstoff verbraucht ist. Nach vollständiger Reduktion des gebundenen FAD kann ein weiteres Pyruvatmolekül gebunden und decarboxyliert werden. In Ermangelung eines Elektronenakzeptors endet die Reaktion auf HE-ThDP-Ebene. Da FAD in der oxidierten Form im Gegensatz zum reduzierten FADH_2 eine intensive Gelbfärbung

aufweist, konnte anhand der Entfärbung des Kristalls der Zeitpunkt der vollständigen Reduktion des Flavin abgeschätzt werden.

Kryolösung: 115 mM Phosphat, 1,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 % (v/v) Glyzerol, pH 5,8
+ 200 mM Pyruvat
Inkubationszeit: 90 s

Akkumulation von Ac-ThDP

Ac-ThDP entsteht als nicht natives Intermediat beim Umsatz von Pyruvat in Abwesenheit von Phosphat. Auf Grund der geringen Hydrolyserate von Ac-ThDP in *LpPOX* wird dieses Intermediat im *steady state* der phosphatfreien Reaktion akkumuliert. Um gebundenes Phosphat aus dem Kristall zu entfernen, wurde dieser zuerst in MES-Puffer gewaschen und danach nochmals in frischem Puffer mit Substrat inkubiert. Die *soaking*-Lösung enthielt zusätzlich $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ als alternativen Elektronenakzeptor um die Dauer des *steady state* zu verlängern.

Kryolösung: 115 mM MES, 1,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 % (v/v) Glyzerol, pH 5,8
+ 200 mM Pyruvat, + 10 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
Inkubationszeit: 15 s

Alle *soaking*-Experimente wurden im Kühlraum (8 – 12 °C) durchgeführt. Die Kristalle wurden nach der Inkubation in der jeweiligen Kryolösung in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.4.3 Datenaufnahme und Prozessierung

Die Aufnahme der Daten erfolgte an den Messplätzen X13 und BW7B des Doppel-Ring Synchrotron (DORIS) am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg. Die Prozessierung der Daten wurde mit DENZO/SCALEPACK durchgeführt. Die Bestimmung initialer Phasen erfolgte über *molecular replacement* (Programm MOLREP) unter Verwendung der *LpPOX* Wt Struktur (PDB-Code: 1POW). Die erhaltenen Datensätze wurden in mehreren Zyklen mittels REFMAC und COOT verfeinert und überprüft. Die Statistiken zu den einzelnen Datensätzen sind im Anhang zusammengefasst (Tab. A1). Die Datensätze wurden in der Protein Datenbank des *Research Collaboratory for Structural Biology* (<http://www.rcsb.org>) unter folgenden PDB-Codes hinterlegt:

<i>LpPOX</i> F479W Grundzustand	2EZ4
<i>LpPOX</i> F479W + L-ThDP	2EZ8
<i>LpPOX</i> F479W + PL-ThDP	2EZ9
<i>LpPOX</i> F479W + HE-ThDP	2EZT
<i>LpPOX</i> F479W + Ac-ThDP	2EZU

Die Aufnahme der Daten und deren Prozessierung wurden von Dr. Georg Wille durchgeführt.

2.5 Kinetische und thermodynamische Methoden

2.5.1 Aktivitätstests

2.5.1.1 Decarboxylierung von α -Ketosäuren im optisch gekoppelten Test

Die Decarboxylierung von α -Ketosäuren kann theoretisch absorptionspektroskopisch direkt im Bereich von 300 bis 400 nm verfolgt werden. Auf Grund der geringen Extinktionskoeffizienten des $n \rightarrow \pi^*$ Übergangs der α -Ketosäuren (Pyruvat: $\epsilon_{333} = 17,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, Schloss *et al.* 1985; Benzoylformiat: $\epsilon_{343} = 79 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, Kluger und Yu 2006) sind allerdings hohe Proteinkonzentrationen und große Substratumsätze notwendig, um signifikante Signaländerungen zu erhalten. Im Verlauf der Reaktion ändert sich daher die Substratkonzentration im Ansatz beträchtlich. Da es außerdem zur Bildung von großen Mengen an Aldehyden kommt, kann dort die Decarboxylase-Aktivität durch die Bildung von Carbolygationsprodukten beeinträchtigt sein. Diese Probleme werden umgangen, wenn die Decarboxylierung der α -Ketosäuren mit der Reduktion der entstehenden Aldehyde gekoppelt wird (Abb. 2.1). Dafür wird dem Reaktionsansatz Alkoholdehydrogenase (ADH) und NADH hinzugefügt. Der gebildete Aldehyd wird unter Oxidation von NADH nahezu verzögerungsfrei in den Alkohol überführt und dadurch eine Produkthemmung ausgeschlossen. Der Verbrauch an NADH kann optisch verfolgt werden. Auf Grund des großen Extinktionskoeffizienten von NADH bleibt die Substratkonzentration im gekoppelten Test im Verlauf der Messung nahezu konstant (30 μM Umsatz entsprechen einer Extinktionsänderung von etwa 0,1). Die aus den

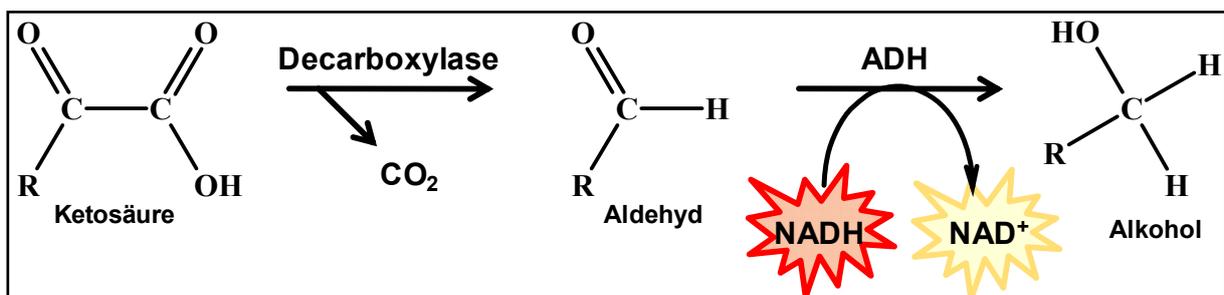


Abb. 2.1: Prinzip des optisch gekoppelten Tests

Anfangsanstiegen der Progresskurven ermittelten Extinktionsänderungen wurden mit Gleichung (1) in die spezifische Aktivität umgerechnet:

$$A_{\text{spez}} = \frac{\Delta E/\text{min} \cdot 1000}{\epsilon \cdot d \cdot c} \quad (1)$$

- A_{spez} = spezifische Aktivität (U/mg)
 ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH ($3400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 366 nm)
 d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)
 c = Konzentration an Enzym im Ansatz (in mg/ml)

Standardansatz zur Decarboxylierung von Pyruvat:

- 50 mM MES, 100 μM ThDP, 1 mM MgSO_4 , pH 6,0
- 0,3 mM NADH, 0,15 U/ml ADH
- 30 °C, $\lambda = 366 \text{ nm}$, 1 cm Küvette
- 0 bis 50 mM Pyruvat

Standardansatz zur Decarboxylierung von Benzoylformiat:

Der aus der Decarboxylierung von Benzoylformiat resultierende Benzaldehyd kann von der Hefe-ADH nur schlecht umgesetzt werden. Daher wurde das besser geeignete Enzym aus Pferdeleber (*horse liver* oder *hl-ADH*) für die Versuche mit der *PpBFDC* und *PfBAL* verwendet. Die Messungen wurden am pH-Optimum (Iding *et al.* 2000, Janzen *et al.* 2006) der Enzyme durchgeführt.

- 50 mM Phosphat, 200 μM ThDP, 2,5 mM MgSO_4
- 0,12 mM NADH, 0,1 U/ml hlADH
- 30 °C, $\lambda = 366 \text{ nm}$, 1 cm Küvette
- 0 bis 50 mM Benzoylformiat
- *PpBFD*: pH 6,5 *PfBAL*: pH 7,6

2.5.1.2 Aktivitätstest unter Verwendung von 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP)

In diesem Test dient 2,6-Dichlorphenolindophenol als alternativer Elektronenakzeptor (Abb. 2.2a). Diese Verbindung zeigt in oxidiertem Form eine blaue Färbung. Durch die Übertragung von Elektronen vom FADH_2 (oder vom HE-ThDP Carbanion/Enamin) auf DCPIP kommt es zu einer Abnahme der Absorption bei 600 nm, welche direkt verfolgt werden kann (Abb. 2.2b). Ein Standardansatz zur Untersuchung der Pyruvatabhängigkeit in *Lp*POX setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 200 mM Phosphat, 100 μM ThDP, 1 mM MgSO_4 , pH 6,0
- 100 μM DCPIP
- 25 °C, $\lambda = 600$ nm, 1 cm Küvette
- 0,1 bis 50 mM Pyruvat
- ca. 1 $\mu\text{g/ml}$ Enzym (Wt)

Die Auswertung der Progresskurven erfolgte nach Gleichung (1). Der Extinktionskoeffizient für DCPIP bei 600 nm beträgt $17700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

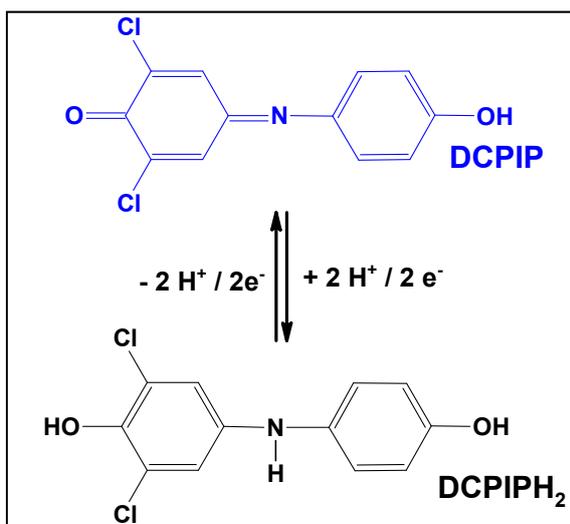


Abb. 2.2a: Redoxgleichgewicht von DCPIP

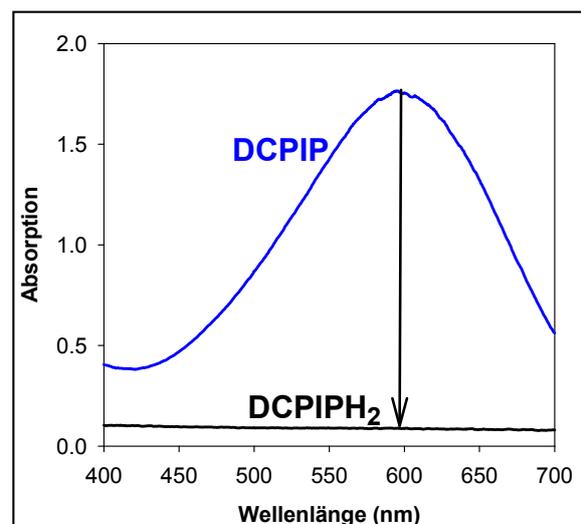


Abb. 2.2b: Absorptionsspektren von 100 μM DCPIP vor und nach Reduktion durch *Lp*POX

2.5.2 ¹H-NMR gestützte Intermediatanalyse

Mit Hilfe der ¹H-NMR gestützten Intermediatanalyse ist es möglich Aussagen über Einzelschritte von ThDP-abhängigen Enzymen zu erhalten (Tittmann *et al.* 2003). Dazu wird das Enzym zusammen mit dem jeweiligen Substrat inkubiert und die Reaktion im *steady state* durch Zugabe von Säure abgestoppt. Das denaturierte Protein wird entfernt und die in der Lösung verbliebenen und säurestabilen Reaktionsintermediate werden über ¹H-NMR analysiert und quantifiziert. Die eindeutige Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von synthetisierten Referenz-Substanzen. Neben den nativen Intermediaten können mit dieser Methode auch Intermediatanaloga (PL-ThDP, PM-ThDP; para-Nitro-M-ThDP) detektiert werden.

Probenbereitung

Freies ThDP würde das Ergebnis der Intermediatanalyse verfälschen. Deshalb wurden die Proteine und Substrate in kofaktorfreiem Puffer vorgelegt. Das Enzym (12 bis 15 mg/ml) wurde im Verhältnis 1 : 1 mit der Substratlösung gemischt. Die Inkubationsdauer wurde anhand der jeweiligen kinetischen Parameter abgeleitet. Dabei musste zum Einen gewährleistet werden, dass die Katalyse bereits im *steady state* verläuft. Andererseits musste darauf geachtet werden, dass es bei zu langen Inkubationszeiten zur Akkumulation von Produkten und damit zur Rückreaktion oder zu Nebenreaktionen (Carboligation) kommen kann. Für Inkubationszeiten unter 2 s wurde eine *rapid quenched-flow* RQF-3 Apparatur (Kintek) eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 12,5 % (w/v) TCA und 1 M DCI abgestoppt. Der pH der Lösung wurde dadurch auf etwa 0,75 eingestellt. Das denaturierte Protein wurde abzentrifugiert und der filtrierte Überstand mittels ¹H-NMR analysiert. Aus der Verteilung der Intermediate im *steady state* und dem k_{cat} der Gesamtreaktion können unter optimalen Bedingungen Geschwindigkeitskonstanten für Einzelschritte bestimmt werden. Eine genauere Beschreibung findet sich ab Seite 80.

2.5.3 Verwendung von substratanalogen Phosphonaten und Phosphinaten

In den substratanalogen Verbindungen Methylacetylphosphonat (MAP), Methylpropionylphosphonat (MPP) und Methylbenzoylphosphonat (MBP) ist die Carboxylatgruppe des Substrates durch eine Phosphonatgruppe ersetzt worden (Abb. 2.3). Da die eingeführte C-P-Bindung im Gegensatz zur C-C-Bindung nicht durch ThDP-abhängige Enzyme gespalten werden kann, erlauben diese Substanzen eine separate Betrachtung des jeweiligen Substratbindeschrittes. Das aus der Bindung des Analogen resultierende tetraedrale Intermediatanalogon (Phosphonolaktyl-ThDP oder PL-ThDP bei MAP, Phosphonopropionyl-ThDP oder PP-ThDP bei MPP, Phosphonomandelyl-ThDP oder PM-ThDP bei MBP) verschiebt wahrscheinlich das Gleichgewicht zwischen Imino- und Aminoform des ThDP. Von Nemeria *et al.* wurde vorgeschlagen, dass tetraedrale Intermediate an ThDP-abhängigen Enzymen grundsätzlich in der Iminoform vorliegen (Nemeria *et al.* 2004). In Modellstudien konnte gezeigt werden, dass diese Form des Kofaktors ein Absorptionsmaximum bei ungefähr 300 nm aufweist (Jordan *et al.* 2002). Tatsächlich kann nach Zugabe der Phosphonate zu den Enzymen das Auftreten einer Absorptionsbande in diesem Bereich beobachtet werden. Sowohl die chirale Umgebung im Enzym, als auch die vorliegende V-Konformation des Kofaktors erlauben die Detektion der eigentlich nicht chiralen Iminoform auch mittels CD-Spektroskopie.

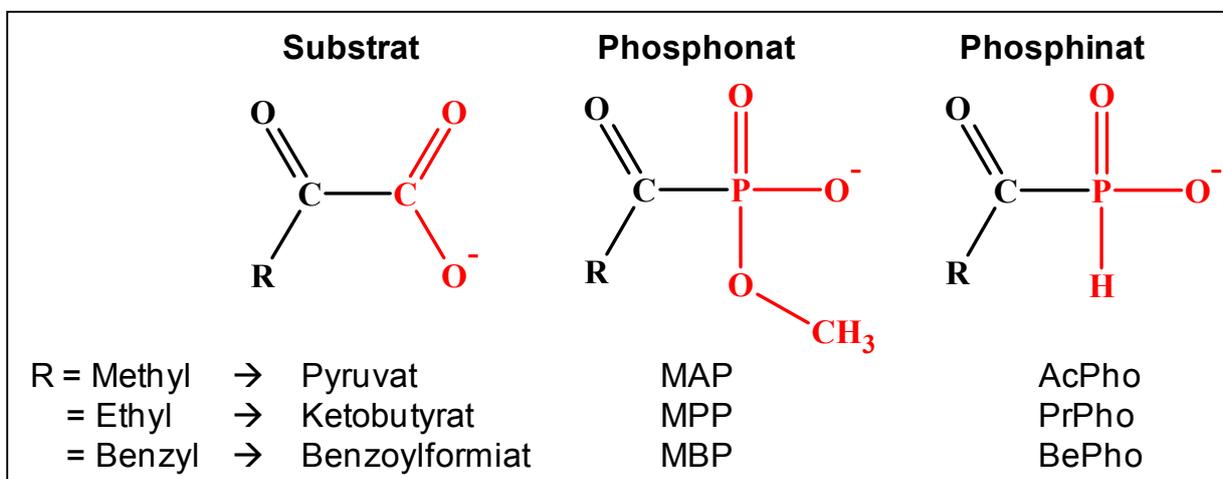


Abb. 2.3: Struktureller Vergleich von α -Ketosäuren, Phosphonaten und Phosphinaten

Die Bindung der Substratanaloga kann generell in zwei verschiedenen Ansätzen untersucht werden. So ist einerseits der apparente K_D -Wert durch Titration der jeweiligen Enzyme mit dem Analogon zugänglich (CD-Spektroskopie). Zum Anderen kann mittels *stopped-flow* Absorptionsspektroskopie die Geschwindigkeit der Analogonbindung ermittelt werden. Es sei noch angemerkt, dass die Phosphonate auf Grund des im Vergleich zur Carboxylatgruppe größeren Volumens keine idealen Substratanaloga darstellen. Auch der Fakt, dass in diesen Verbindungen gerade der Teil des Substrates ausgetauscht ist, mit dem die hier untersuchten Reste der einzelnen Enzyme interagieren, sollte bei der Bewertung der Experimente nicht vergessen werden. Da aber in Kristallstrukturen zu sehen ist, dass die Phosphonate auf die gleiche Art im Enzym gebunden sind wie die nativen Substrate, sollten durch den direkten Vergleich der Varianten mit dem jeweiligen Wt dennoch sinnvolle Aussagen zur Beteiligung einzelner Reste an der Substratbindung möglich sein. Phosphinate sind auf Grund der kleineren Endgruppe geeigneter, als die Phosphonate. Diese Verbindungen standen allerdings nur begrenzt zur Verfügung.

2.5.3.1 Ermittlung des apparenten K_D durch CD-Titration

Die Dissoziationskonstanten (K_D) der Phosphonate und Phosphinate wurden in Titrationsexperimenten bei 20 °C bestimmt. Dazu wurden 150 µl Protein in Puffer vorgelegt und das entsprechende Substratanalogon in 1 µl Schritten hinzutitriert. Nach ausreichender Inkubationszeit wurden CD-Spektren der Ansätze aufgenommen. Die Spektren wurden nullpunkt- und pufferkorrigiert und die Amplituden am jeweiligen Maximum des Signales (etwa 300 bis 310 nm) ermittelt. Der K_D -Wert wurde durch Anpassung an eine hyperbole Gleichung ermittelt. Wenn der ermittelte K_D kleiner als die Konzentration an aktiven Zentren im Ansatz war, wurde Gleichung (2) verwendet. Das erhaltene CD-Signal musste dafür auf die vorhandene Konzentration an aktiven Zentren normiert werden:

$$EX = \frac{1}{2} * (E_0 + X_0 + K_D) - \left[\frac{1}{4} * (E_0 + X_0 + K_D)^2 - E_0 * X_0 \right]^{0.5} \quad (2)$$

E_0 = Gesamtkonzentration an aktiven Zentren im Ansatz

EX = Konzentration an Enzym-Analogon-Komplex im Ansatz

$$\text{mit } K_1 = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad (7)$$

Inwiefern in den Progresskurven auch tatsächlich beide Phasen detektierbar sind, ist vor allem von den einzelnen Geschwindigkeiten abhängig. Kann aus messtechnischen Gründen nur bei Konzentrationen gemessen werden, bei denen der erste Schritt der Reaktion nicht gesättigt ist ($K_1 \gg [X]$), so wird auch eine lineare Abhängigkeit des k_{obs}^2 von der Phosphonat-Konzentration erwartet (Vergleich auch Abb. 2.4):

$$k_{\text{obs}}^2 = \frac{k_2}{K_1} * [X] + k_{-2} \quad (8)$$

Unter diesen Bedingungen können die Progresskurven einphasig verlaufen, da die Gesamtreaktion von der Geschwindigkeit des ersten Schritts dominiert und der zweite Schritt maskiert wird. Unter Sättigungsbedingungen ($X \gg K_1$) ist die Geschwindigkeit der zweiten Phase dagegen vom ersten Schritt (und damit von der Phosphonat-Konzentration) unabhängig:

$$k_{\text{obs}}^2 = k_2 + k_{-2} \quad (9)$$

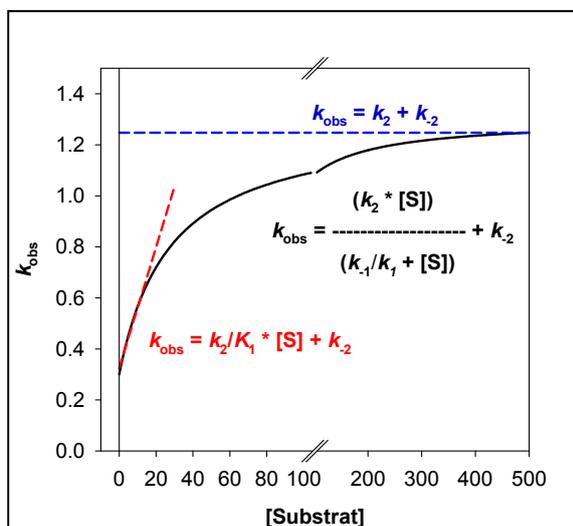


Abb. 2.4: Abhängigkeit des k_{obs} -Wertes der zweiten Phase von der Konzentration an Analogon bei Vorliegen eines Zwei-Schritt-Mechanismus (nach Gleichung (3)). Je nach messtechnisch zugänglichem Konzentrationsbereich können für diesen Prozess eine hyperbole, lineare oder keine Abhängigkeit beobachtet werden. Die Achsenskalierungen sind willkürlich gewählt.

2.6 Untersuchungen zur Carboligationskompetenz von ZmPDC E473Q

2.6.1 Bestimmung der Substratoptima der PAC-Bildung durch CD-Spektroskopie

Mittels CD-Spektroskopie wurden die optimalen Substratkonzentrationen hinsichtlich der Produktbildungsgeschwindigkeit und Produktmenge ermittelt. Auf die Zugabe von Lösungsvermittlern wie DMSO wurde verzichtet, so dass lediglich bis 60 mM Benzaldehyd gemessen werden konnte. Zum Start der PAC-Bildungskinetiken wurden 190 µl Substratlösung (Pyruvat und Benzaldehyd in 50 mM Phosphat, 100 µM ThDP, 1 mM MgSO₄, pH 6,0) mit 10 µl Enzym (im gleichen Puffer) versetzt. Nach Mischung befanden sich 0 bis 200 mM Pyruvat, 0 bis 60 mM Benzaldehyd und 1,5 mg/ml Enzym im Ansatz. Auf Grund der starken Absorption von Benzaldehyd und Protein wurde bei 300 nm, und nicht am Maximum des Produkt-Signales von 280 nm, gemessen. Nach Ablauf der Reaktion wurden Spektren des Ansatzes aufgenommen, um die gebildete Produktmenge abzuschätzen. Die Mess- und Geräteparameter sind im Folgenden zusammengefasst:

Gerät	Jasco J-810 Spektropolarimeter
Küvettenbreite	1 mm
Messtemperatur	30 °C
Bandenweite	1 nm

	<u>Kinetiken</u>	<u>Spektren</u>
Wellenlänge	300 nm	270 – 330 nm
Datenintervall	2 sek	0,5 nm
<i>Response</i>	2 sek	1 sek
Scangeschwindigkeit	-----	200 nm/min

Fehlereinschätzung des CD-basierten Assays:

Da der CD-basierte Ansatz zur Bestimmung der PAC-Bildung durch die simultane Bildung von Acetoin fehlerbelastet ist, soll hier eine kurze Einschätzung des zu erwartenden Fehlers erfolgen. Die Acetoinbildung führt nur im Wt, und dort vor allem bei hohen Pyruvat- und niedrigen Benzaldehydkonzentrationen, zu Komplikationen. So werden einerseits die PAC-Bildungsgeschwindigkeiten überschätzt, da die jeweilige Maximalgeschwindigkeit erst nach einer langen Anlaufphase (bis zu 30 min) erreicht wird. Während dieser *lag*-Phase wird neben PAC der Großteil an Acetoin synthetisiert. Die erhaltenen Endwerte (als Maß für die produzierte Menge an PAC) werden dagegen unterschätzt. Der Fehler ist im Ansatz mit 5 mM Benzaldehyd und 200 mM Pyruvat am größten. Dort muss theoretisch das ermittelte Signal (- 21 mdeg) um das vom Kontrollansatz mit 200 mM Pyruvat (+ 15 mdeg durch Bildung von Acetoin) auf - 36 mdeg korrigiert werden. Damit entspricht der ermittelte Wert lediglich 58 % des tatsächlichen Signales. Bei den in der Substratmatrix „benachbarten“ Ansätzen steigt dieser Wert aber bereits auf 79 % (5 mM Benzaldehyd / 100 mM Pyruvat) bzw. 77 % (10 mM Benzaldehyd / 200 mM Pyruvat) an. Bei 60 mM Benzaldehyd und 200 mM Pyruvat beträgt der Fehler noch maximal 5 %. Zusätzlich nimmt die Menge an gebildetem Acetoin, und damit auch der tatsächlich zu subtrahierende Wert, mit steigender Benzaldehydkonzentration auf Grund erhöhter PAC-Bildung ab, so dass die zuvor berechneten Fehler als Maximalwerte angesehen werden können.

2.6.2 Untersuchung der Produktverteilung durch $^1\text{H-NMR}$

Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurde die Verteilung von Substraten (Pyruvat, Benzaldehyd) und Produkten (Acetaldehyd, Acetoin, PAC) nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die Ansätze entsprachen weitgehend denen der CD-spektroskopischen Untersuchungen (Substrate in 50 mM Phosphat, 100 μM ThDP, 1 mM MgSO_4 , pH 6,0, 1,5 mg/ml Enzym). Zusätzlich enthielten die Ansätze 20 % D_2O . Die Aufnahme der Spektren erfolgte am $^1\text{H-NMR}$ Spektrometer ARX 400 Avance FT-NMR (Bruker) bei 300 K. Als Standard wurde $d_4\text{-TSP}$ eingesetzt. Das Wassersignal wurde durch Verwendung einer Vorabsättigungstechnik unterdrückt. Für die Aufnahme eines Spektrums wurden 200 Datensätze akkumuliert. Die Verweildauer zwischen zwei Datensätzen zur Relaxation des Systems in die Ausgangslage betrug 2,3 Sekunden.

2.6.3 Säulenchromatographische Analyse von Carboligationsprodukten und Bestimmung der enantiomeren Reinheit

Alle chromatographischen Analysen der Carboligationsprodukte wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „Pharmazeutische und Medizinische Chemie“ an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt. Zur Produktbildung wurden 0,3 mg/ml Enzym (in 50 mM Phosphat, 100 μM ThDP, 2,5 mM MgSO_4 , pH 6,0) mit jeweils 18 mM Substrat versetzt. Die Ansätze wurden je nach gebildeter Produktmenge für mindestens 15 h bei 30 °C inkubiert und die Produkte mit Ethylacetat oder CDCl_3 extrahiert. Die Analyse von Produktmenge und Enantiomerenreinheit erfolgte je nach Substanz über GC, GC-MS, HPLC oder chirale HPLC. Auch die verwendeten Säulenmaterialien, Laufmittel und Laufbedingungen wurden den jeweiligen Produkten spezifisch angepasst.

2.7 Untersuchung der thermischen Stabilität von ZmPDC

2.7.1 Thermisch induzierte Übergangskurven

Die Denaturierung von ZmPDC Wt und der Variante E473Q wurde bei 208 nm mittels CD-Spektroskopie detektiert. Die Parameter für die Aufnahme der Heizkurven am Jasco J-810 CD-Spektropolarimeter sind im Folgenden zusammengestellt:

- 0,1 mg/ml Enzym in 50 mM MES, 100 μ M ThDP, 1 mM MgSO₄, pH 6,0
- Heizrate 1 °C / min
- Datenintervall 0,5 °C
- Sensitivität 100 mdeg
- *Response* 8 s
- Weglänge 1 mm
- Wellenlänge 208 nm

Der Mittelpunkt des thermischen Übergangs wurde durch Anpassung an Gleichung (10) bestimmt (Pace *et al.* 1998):

$$y = \frac{(y_f + m_f \cdot T) + (y_u + m_u \cdot T) \cdot \exp\left[\frac{(\Delta H_m / (R \cdot T)) \cdot (T - T_m)}{T_m}\right]}{1 + \exp\left[\frac{(\Delta H_m / (R \cdot T)) \cdot (T - T_m)}{T_m}\right]} \quad (10)$$

- y = CD-Signal bei 208 nm
- T = Temperatur in K
- T_m = Mittelpunkt des thermischen Übergangs
- R = ideale Gaskonstante
- ΔH_m = Enthalpieänderung der Entfaltung an T_m
- y_f, m_f = Parameter der Basislinie des gefalteten Proteins
- y_u, m_u = Parameter der Basislinie des ungefalteten Proteins

Diese Gleichung gilt für reversibel faltende Proteine. Die thermisch induzierten Übergangskurven von irreversibel faltenden Proteinen sind von der Heizrate und Verweildauer bei den Temperaturen abhängig. Da die thermische Denaturierung der ZmPDC jedoch irreversibel verläuft, kann aus den aufgenommenen Übergangskurven keine tatsächliche Übergangstemperatur bestimmt werden. Diese Methode lässt aber beim direkten Vergleich zumindest eine qualitative Aussage über die Stabilitäten des Wt und der Variante zu.

2.7.2 Bestimmung der thermischen Stabilität aus Entfaltungskinetiken

Zur Bestimmung der thermischen Stabilität wurden Entfaltungskinetiken von ZmPDC Wt und der Variante E473Q bei verschiedenen Temperaturen (338 bis 353 K) aufgenommen. Auch für diese Messungen wurde der Abfall des CD-Signales bei 208 nm während der Entfaltung genutzt. Die Bedingungen sind im Folgenden zusammengestellt:

- 0,1 mg/ml Enzym in 25 mM MES, 50 μ M ThDP, 0,5 mM MgSO₄, pH 6,0
- Sensitivität 100 mdeg
- Datenintervall 2 s
- *Response* 2 s
- Weglänge 1 mm
- Wellenlänge 208 nm
- Temperaturen 65, 70, 75 und 80 °C

Die Progresskurven wurden an eine einfach exponentielle Gleichung angepasst:

$$CD_t = CD_0 + CD_{max} * (1 - \exp(-k * t)) \quad (11)$$

CD_t = Signal zum Zeitpunkt t

CD_0 = Startpunkt der Messung

CD_{max} = Amplitude der Messung

k = Geschwindigkeitskonstante in s⁻¹

t = Zeit in s

Die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Temperatur wurde nach Eyring ausgewertet:

$$k = (R \cdot T / N \cdot h) \cdot \exp(-\Delta H^* / (R \cdot T)) \cdot \exp(\Delta S^* / R) \quad (12)$$

- k = Geschwindigkeitskonstante in s^{-1}
- N = Avogadrozahl ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
- h = Planck'sches Wirkungsquantum ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$)
- R = universelle Gaskonstante ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
- ΔH^* = Enthalpieänderung
- ΔS^* = Entropieänderung
- T = Temperatur in K

Durch Logarithmieren und Umstellen erhält man daraus:

$$\ln(k/T) = -(\Delta H^* / R) \cdot 1/T + ((\Delta S^* / R) + \ln(R/(N \cdot h))) \quad (13)$$

Aus dem Anstieg der Auftragung von $\ln(k/T)$ gegen $1/T$ kann die thermische Stabilität des Enzymes (ΔH^*) ermittelt werden.

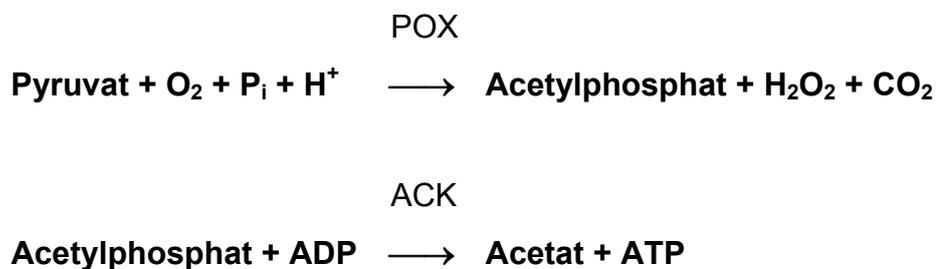
3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Strukturelle und mechanistische Untersuchungen an Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum*

3.1.1 Einführung

3.1.1.1 Vorkommen und Relevanz von Pyruvatoxidasen

Pyruvatoxidasen (POX, EC 1.2.3.3) sind Bestandteil des Energiemetabolismus in gram-positiven Milchsäurebakterien wie zum Beispiel *Lactobacillus plantarum* (Sedewitz *et al.* 1984 a/b) und *Streptococcus pneumoniae* (Spellerberg *et al.* 1996). Diese Organismen gewinnen den größten Teil ihrer Energie aus der anaeroben Fermentierung von Kohlenhydraten unter Bildung von Laktat. Unter aeroben Bedingungen können sie zusätzliche Energie aus der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat gewinnen:



Dabei wird im ersten Schritt die aus der Oxidation des Pyruvat gewonnene Energie in einer energiereichen Phosphatesterbindung konserviert. Auf Grund des im Vergleich zum ATP höheren Gruppenübertragungspotentials kann das erhaltene Acetylphosphat von der Acetatkinase (ACK, EC 2.7.2.1.) für die Bildung von ATP verwendet werden.

Auch für den Menschen haben die Pyruvatoxidasen in den letzten Jahren Bedeutung erlangt. So werden sie als Bestandteil von Biosensoren eingesetzt (Rahman *et al.* 2006, Arai *et al.* 1999). Mit diesen Sensoren können sowohl

Konzentrationen an Pyruvat (klinische Diagnostik, Fermentationsüberwachung) als auch Phosphat (klinische Diagnostik, Lebensmittelanalyse, Wasseranalyse) bestimmt werden. Außerdem wurde die Pyruvatoxidase als möglicher Virulenzfaktor in *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken) identifiziert (Spellerberg *et al.* 1996). Diese Lactobazillen besiedeln den Respirationstrakt vor allem bei Kleinkindern und älteren Menschen. Die WHO schätzt, dass *S. pneumoniae* jährlich für den Tod von etwa 1,6 Millionen Menschen - davon bis zu 1 Million Kinder - verantwortlich ist¹. Die häufigsten Erkrankungen sind dabei Lungenentzündung, Sepsis und Meningitis. Zusätzlich stieg in den letzten Jahren der Anteil an gegenüber üblichen Antibiotika resistenten Infektionen stetig an. Spellerberg *et al.* konnten zeigen, dass Mutationen im Gen für die Pyruvatoxidase (*spxB*) die Fähigkeit der Pneumokokken zur Zelladhäsion einschränken. Damit einhergehend sinkt auch die Virulenz im Tiermodell. Als Ursache diskutieren sie einen Einfluss des Acetatlevels der Zelle auf die Produktion von Adhäsinen. Auch wird angenommen, dass durch POX produziertes H₂O₂ Zellschäden induziert und somit die Schwere der Krankheit erhöht. Daher stellt die Pyruvatoxidase ein mögliches Ziel für die Herstellung von neuen Antibiotika zur Behandlung von Pneumokokken-Infektionen dar.

3.1.1.2 Struktur und Mechanismus von Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum*

Die Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum* (LpPOX) ist ein homotetrameres Enzym mit einem Molekulargewicht von etwa 66 kDa (603 Aminosäuren) je Untereinheit. Neben ThDP und einem zweiwertigen Metallion (physiologisch Mg²⁺) bindet sie FAD als Kofaktor. Die Kristallstruktur konnte bereits 1993 gelöst werden (Muller und Schulz 1993). Wie viele andere ThDP-abhängige Enzyme kann die tetramere Struktur als Dimer von Dimeren beschrieben werden. Die 4 aktiven Zentren sind dabei an der Kontaktstelle zwischen zwei Monomeren lokalisiert (Abb. 3.1a). Das aktive Zentrum wird vorwiegend durch hydrophobe Reste ausgekleidet (Abb. 3.1b). Eine hydrophobe Umgebung stellt, wie in der Einleitung erörtert, eine Möglichkeit dar, um Decarboxylierungsreaktionen zu beschleunigen. Die beiden polaren Reste (Gln 122 und Glu 483) sind wahrscheinlich über H-Brücken an der Bindung und Ausrichtung des Substrates beteiligt.

¹ WHO „Weekly epidemiological record“ vom 23.03.2007; No. 12, 2007, 82, 93–104, <http://www.who.int/wer>

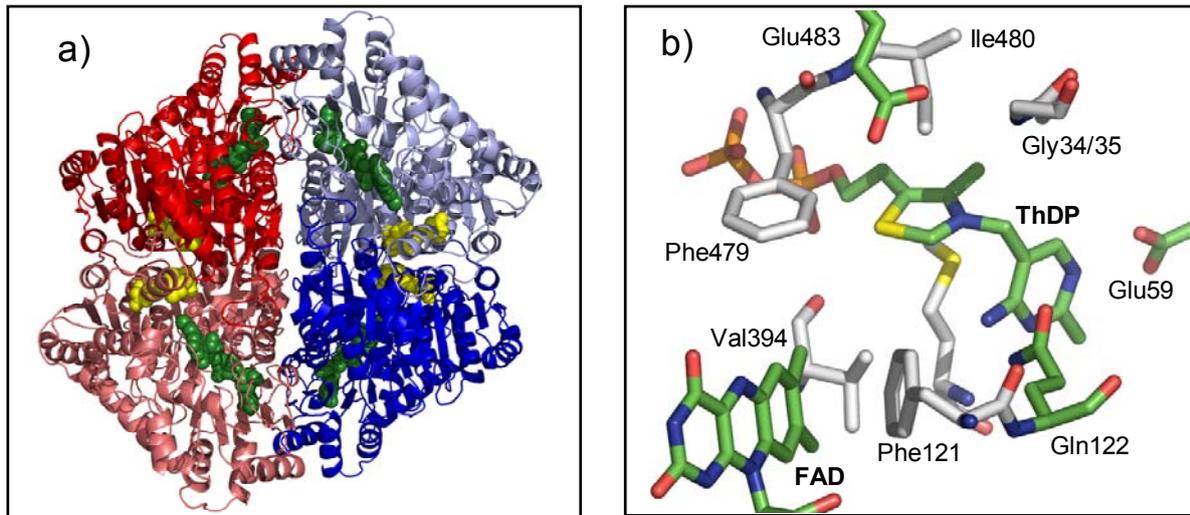


Abb. 3.1: Röntgenkristallstruktur von *LpPOX*, a) tetramere Gesamtstruktur bestehend aus 4 gleichen Untereinheiten, die Kofaktoren sind in gelben (ThDP) und grünen (FAD) Sphären dargestellt; b) Struktur des aktiven Zentrums, neben den überwiegend hydrophoben Resten (weiße C-Atome) befinden sich lediglich zwei polare Gruppen (grüne C-Atome) in der Nähe des C2. Verwendeter PDB-code 1POW

Der Reaktionsmechanismus des Enzymes ist in Abb. 3.2 dargestellt. Nach Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat werden zwei Elektronen vom HE-ThDP auf FAD übertragen. Diese Elektronenübertragung verläuft in zwei Einzelschritten, so dass es intermediär zur Bildung von radikalischen Thiamin- und Flavinspezies kommt (Tittmann *et al.* 2000 und 2005a). In Abwesenheit von Phosphat wird das gebildete Acetyl-ThDP (Ac-ThDP) in einer Nebenreaktion hydrolytisch gespalten. Diese Reaktion bietet in *LpPOX* keine Möglichkeit zur Energiekonservierung und wird daher vom Enzym unterdrückt (Hydrolyse von Ac-ThDP in Lösung etwa $0,2 \text{ s}^{-1}$ (Gruys *et al.* 1989), in *LpPOX* etwa $0,03 \text{ s}^{-1}$ (Tittmann *et al.* 2000)). Für die Bildung des physiologischen Produktes Acetylphosphat ist eine phosphorolytische Spaltung notwendig. In Modellstudien konnte gezeigt werden, dass chemisch synthetisiertes Acetylphosphat zwar hydrolytisch zu ThDP und Acetat gespalten werden kann. Eine Phosphorolyse ist allerdings nicht möglich (Lienhard 1966; Gruys *et al.* 1987). Zum Einen ist die Nukleophilie des Phosphates zu gering. Zum Anderen wäre selbst nach Bildung eines Phosphat-Ac-ThDP-Adduktes die Rückreaktion bevorzugt, da Phosphat eine bessere Abgangsgruppe als das ThDP-Ylid darstellt. Um dennoch die Synthese von Acetylphosphat zu ermöglichen, wird im enzymatischen System die Phosphorolyse an den radikalischen Elektronentransfer gekoppelt (Tittmann *et al.* 2005a). Ac-ThDP stellt also kein natives Intermediat im Reaktionszyklus dar.

und unmodifizierter Kofaktor vor, so dass selbst unter optimalen *soaking*-Bedingungen mit einer Mischung verschiedener Intermediate zu rechnen ist (Abb. 3.3b). Zusätzlich beträgt die Dauer des *steady state* im Wt (Messung in Lösung, 1 mg/ml Protein, 50 mM Pyruvat, 25 °C, aerobe Bedingungen) lediglich einige Millisekunden. In der Variante F479W konnte dagegen gezeigt werden, dass im *steady state* 90 % des Kofaktors in Form von L-ThDP vorliegen (Meyer 2004). Auch die Dauer des *steady state* ist in dieser Variante auf mehrere Sekunden ausgedehnt (Vergleich Abb. 3.3a). Daher schien die Variante für die durchzuführenden *soaking*-Experimente geeigneter als der Wt. Zusätzlich sollten Kristalle mit dem Substratanalogon MAP inkubiert werden, um die Struktur des ebenfalls tetrahedralen PL-ThDP zu erhalten. In Kontrollexperimenten konnte eine schnelle und stabile Bindung von MAP an *LpPOX* nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Es sei noch erwähnt, dass die Ergebnisse aus in Lösung durchgeführten Experimenten nicht direkt auf die Zustände im Kristall übertragen werden können. So führt die dichte Packung von Proteinen im Kristall zu sehr hohen lokalen Konzentrationen an Enzym. Außerdem können diffusionsbedingt Unterschiede in den Substrat- und Produktkonzentrationen innerhalb des Kristalls auftreten. Dennoch wurden die Lösungsexperimente als einzige zur Verfügung stehende Orientierungshilfen zur Konzipierung der *soaking*-Experimente herangezogen.

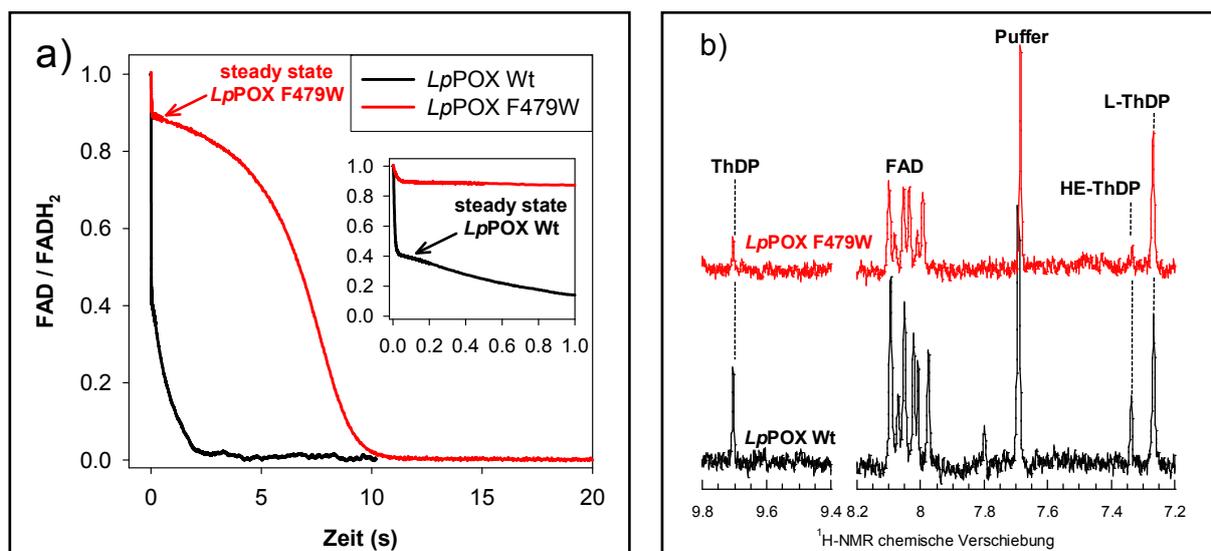


Abb. 3.3: Kinetischer Vergleich von *LpPOX* Wt und F479W, a) Die Verlängerung des *steady state* in F479W ist an Hand der Progresskurven der FAD-Reduktion unter aeroben Bedingungen ersichtlich. b) Verteilung der kovalenten Reaktionsintermediate im *steady state*.

3.1.2.2 Kristallisation von *Lp*POX F479W

*Lp*POX kristallisiert in zwei verschiedenen Formen. Prismatische Kristalle, welche vorwiegend bei 1,5 bis 2 M Ammoniumsulfat erhalten werden, eignen sich auf Grund hoher Mosaizität nicht zur Datensammlung. In vorhergehenden Untersuchungen (Meyer 2004) konnte gezeigt werden, dass niedrige Konzentrationen an Präzipitant die Ausbildung von nadelförmigen Kristallen fördern. Diese Kristallform zeichnet sich durch sehr gute Werte für Mosaizität und erreichbare Auflösung aus. Optimale Bedingungen für die Bildung von großen, einheitlichen Nadeln wurden bei 1,3 bis 1,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 7,5 mg/ml Protein im Tropfen gefunden. Erste Nadeln konnten bereits nach 1 bis 2 Wochen beobachtet werden.

3.1.2.3 Analyse der Kristallstrukturen von *Lp*POX F479W in Komplex mit verschiedenen Reaktionsintermediaten

Alle *soaking*-Experimente konnten erfolgreich durchgeführt und die Kristallstrukturen von *Lp*POX F479W in Komplex mit L-ThDP, PL-ThDP, HE-ThDP und Ac-ThDP gelöst werden. Die Ergebnisse wurden publiziert (Wille *et al.* 2006) und sind im Folgenden zusammengefasst. Die Einführung der Mutation hat keinen Effekt auf die Gesamtstruktur des Proteins, wie durch Vergleich der Positionen aller Hauptkettenatome von *Lp*POX Wt (PDB: 1POW) und F479W (PDB: 2EZ4) mit dem Programm PyMol gezeigt werden konnte. Die mittlere Abweichung der Atome voneinander betrug 0,461 Å, so dass die Struktur der Variante der des Wt entspricht. Demnach können die Ergebnisse aus den nachfolgenden *soaking*-Experimenten mit der Variante auch auf das native Enzym übertragen werden.

3.1.2.3.1 Das aktive Zentrum der *Lp*POX ist für die Bindung von *L*-ThDP in perpendicularer Orientierung optimiert

In den tetrahedralen Addukten (*L*-ThDP, PL-ThDP) konnte eine perpendicularare Ausrichtung des Carboxylat- bzw. Phosphonatrestes relativ zur Ringebene des Thiazoliumrings beobachtet werden (Abb. 3.4a und 3.4b). Die Kristallstrukturen implizieren, dass diese Orientierung über eine 3-Zentren-Bindung durch Wechselwirkungen mit der Proteinkomponente realisiert wird (stereoelektronischer *lock*). Der Carboxylatrest des *L*-ThDP interagiert mit der auf Grund der hydrophoben Umgebung wahrscheinlich undissoziierten Carboxylgruppe des Glu 483 und mit der Amidbindung des Gly 35. Die Hydroxylgruppe des Intermediates wird durch Kontakte zur Seitengruppe des Gln 122 und der Aminogruppe des Aminopyrimidinringes des Kofaktors positioniert. Der Methylrest des *L*-ThDP befindet sich in einer kleinen, hydrophoben Tasche, welche durch Seitenketten von Phe 122, Val 394 und Trp 479 (Phe 479 im *Wt*) sowie einem Teil des FAD gebildet wird. Das aktive Zentrum der *Lp*POX scheint also für die Bindung von *L*-ThDP in perpendicularer Ausrichtung optimiert zu sein. Für die Carboxylatgruppe in *L*-ThDP konnte nur ein Besetzungsgrad von etwa 80 % gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass ein Teil des Intermediats bereits decarboxyliert wurde (siehe Abb. A1 im Anhang).

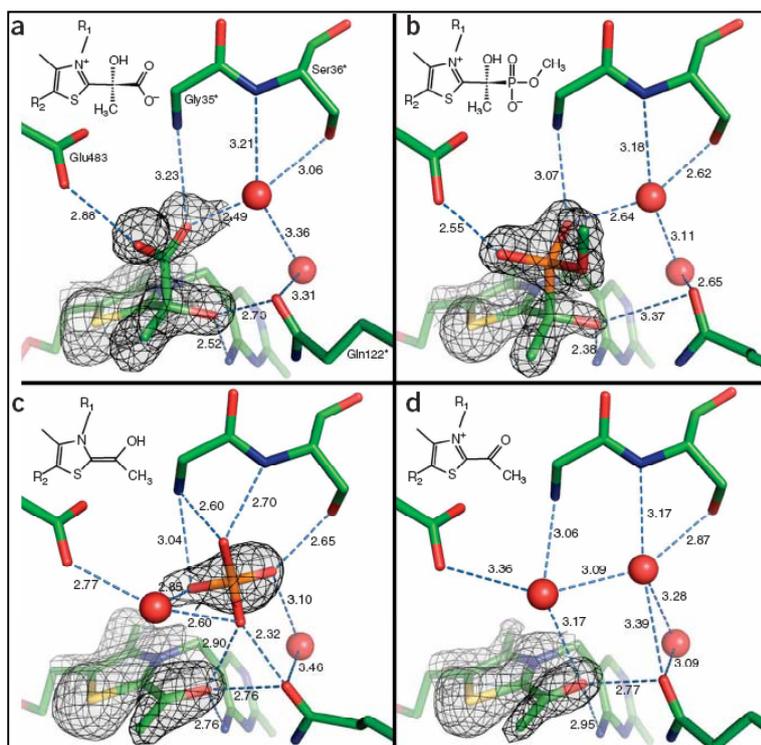


Abb. 3.4: Strukturen der Reaktionsintermediate in *Lp*POX F479W mit den entsprechenden Elektronendichten;

a) *L*-ThDP (1,0 σ), PL-ThDP (1,8 σ), HE-ThDP in der Enaminform mit benachbartem Phosphat (1,5 σ), c) Ac-ThDP in der Ketoform (1,8 σ); Erklärungen sind im Text zu finden, Abbildung übernommen aus Wille *et al.* 2006

Das durch *soaking* mit MAP erhaltene PL-ThDP wird trotz der größeren Kopfgruppe auf ähnliche Weise wie L-ThDP orientiert (Abb. 3.4b). Die zusätzliche Methoxygruppe zeigt in Richtung der Öffnung des aktiven Zentrums, und bewirkt keine Änderung in der Position von Aminosäureseitenketten. Diese Beobachtung zeigt, dass PL-ThDP tatsächlich als L-ThDP-analoge Verbindung angesehen werden kann.

In Abb. 3.8b wird deutlich, dass die Ausrichtung des Laktyl-Restes in *Lp*POX F479W nicht perfekt ist. Der Rest wird durch den Kontakt zum Tryptophanring um etwa 15° um die C2-C α -Bindung gedreht. Diese leichte Drehung könnte die Erklärung dazu liefern, warum in der Variante die Decarboxylierung im Vergleich zum Wt langsamer verläuft (280 s⁻¹ im Wt, 8,5 s⁻¹ in F479W).

3.1.2.3.2 Das post-Decarboxylierungsintermediat wird als Enamin stabilisiert

Für das post-Decarboxylierungsintermediat sind drei unterschiedliche Formen denkbar. Diese Formen sind das sp³-hybridisierte Carbanion, das mit dem Thiazoliumring optimal konjugierte und planare Enamin sowie das protonierte und ebenfalls sp³-hybridisierte HE-ThDP (Abb. 3.5). Das Vorliegen der protonierten Form galt in *Lp*POX als unwahrscheinlich, da für die nachfolgende Reduktion ein echter Elektronentransfer (vom Carbanion oder Enamin) und kein Hydridtransfer (wie er vom HE-ThDP erfolgen würde) nachgewiesen wurde (Tittmann *et al.* 1998). In der Kristallstruktur wurde eine planare Form gefunden, so dass für *Lp*POX das Vorliegen des mesomeriestabilisierten Enamin angenommen werden kann (Abb. 3.4c).

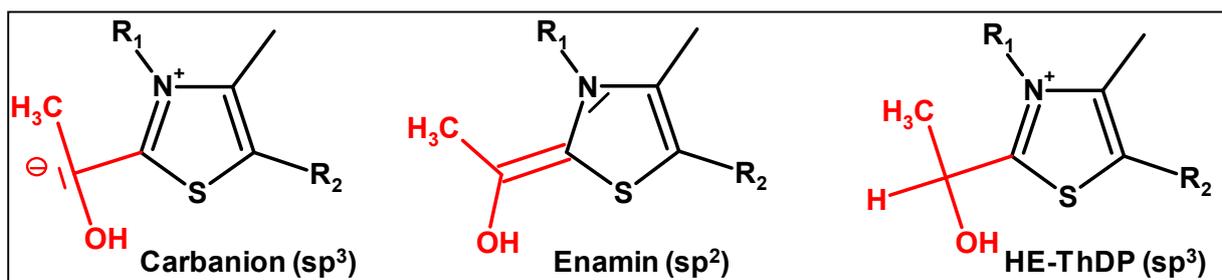


Abb. 3.5: Mögliche Zustände des post-Decarboxylierungsintermediats und die entsprechenden Hybridisierungszustände des C α -Atoms. R₁ = Aminopyrimidin, R₂ = -(CH₂)₂-PP

3.1.2.3.3 *Phosphat wird vor Beginn des Elektronentransfer im aktiven Zentrum orientiert*

In der Struktur mit gebundenem Enamin wurde zusätzliche Elektronendichte im aktiven Zentrum detektiert (Abb. 3.4c). In diese Dichte könnten sowohl Phosphat, als auch das ebenfalls im Kristallisationsansatz enthaltene Sulfat hineinmodelliert werden. Da Phosphat ein Substrat für *Lp*POX darstellt und für Sulfat kein inhibitorischer Effekt auf die Katalyse gefunden wurde, ist das Vorliegen von Phosphat wahrscheinlich. Dieses wird durch Hauptkettenatome von Gly 35 und Ser 36 sowie durch Interaktionen zum Gln 122 und Glu 483 (über ein Wassermolekül) positioniert. Auf Grund der für diese Struktur angesetzten langen *soaking*-Dauer (90 s), sollte das gebundene Flavin bereits vollständig reduziert vorliegen. Dies konnte auch aus der Entfärbung des ursprünglich gelben Kristalls geschlossen werden. Eine Oxidation des im zweiten Reaktionszyklus gebildeten HE-ThDP ist nicht möglich. Demnach wird das Phosphat bereits vor Beginn des ersten Elektronentransferschrittes vom Enamin zum FAD gebunden und für die radikalische Phosphorolyse prä-orientiert. Diese prä-Orientierung ist wahrscheinlich notwendig, um eine optimale Kopplung zwischen Elektronentransfer und Phosphorolyse zu gewährleisten und um die Bildung von Ac-ThDP zu unterdrücken.

3.1.2.3.4 *Die Bindung von Pyruvat führt zu einer Distorsion des Thiazoliumrings*

In allen Strukturen mit gebundenem Intermediat kommt es im Vergleich zur Grundstruktur zu einer Auslenkung des Thiazoliumteils des Kofaktors (Abb. 3.6a). Diese Auslenkung ist in den tetrahedralen Intermediaten (11° bei L-ThDP und PL-ThDP) etwa doppelt so stark ausgeprägt, wie in den planaren Intermediaten (5° bei HE-ThDP und Ac-ThDP). Zusätzlich liegt die C2-C α -Bindung oberhalb der Ebene des Thiazoliumringes (5° Auslenkung bei L-ThDP und PL-ThDP, 1,5° bei HE-ThDP und Ac-ThDP). Die durch die Proteinkomponente aufgezwungene V-Konformation des Kofaktors bringt die Hydroxylgruppe der jeweiligen Intermediate in räumliche Nähe zur exozyklischen Aminogruppe des benachbarten Aminopyrimidinrings. Der dadurch induzierte sterische Stress ist maßgeblich für die Auslenkung des C2-C α -Bindungswinkels verantwortlich.

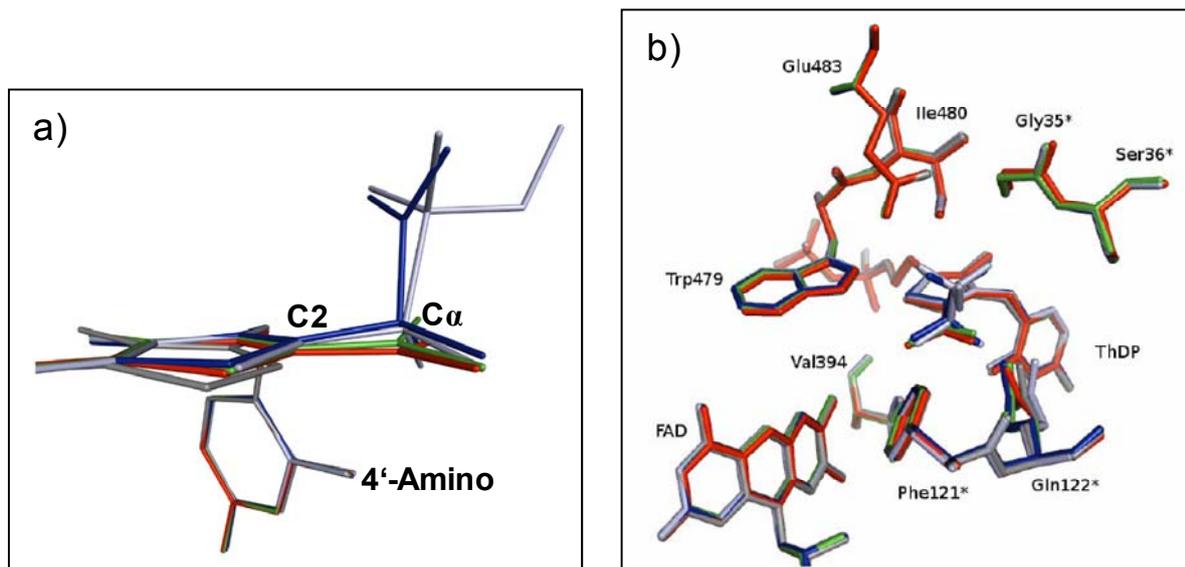


Abb. 3.6: Vergleich der aktiven Zentren von *Lp*POX F479W in Komplex mit verschiedenen Intermediaten; a) Distorsion des Thiazoliumringes und der C2-C α -Bindung; b) Struktur der aktiven Zentren; grau ohne Intermediat, blau mit L-ThDP, hellblau mit PL-ThDP, rot mit HE-ThDP Enamin, grün mit Ac-ThDP in der Ketoform. Abbildungen modifiziert übernommen aus Wille *et al.* 2006

3.1.2.3.5 Während des Katalysezyklus sind keine Änderungen der Protein-Komponente sichtbar

In keiner der gelösten Strukturen waren deutliche Änderungen in der Position von Aminosäuren oder Sekundärstrukturelementen detektierbar (Abb. 3.6b). Die Substratbindung scheint also keine Reorientierung von katalytisch relevanten Resten entsprechend eines *induced fit* Mechanismus zu bewirken. Allerdings kann diese Schlußfolgerung nur in begrenztem Maße erfolgen. Die aus den Kristallstrukturen erhaltenen Positionen der Atome sind über viele Moleküle gemittelte Werte. Geringe Änderungen der Positionen, welche durchaus einen beträchtlichen Einfluss auf Einzelschritte der Katalyse haben können, sind bei den erhaltenen Auflösungen prinzipiell nicht detektierbar. Außerdem fehlt in allen gelösten Kristallstrukturen der C-terminale Teil (AS 594 bis 603), was auf dessen hohe Flexibilität hinweist. In anderen ThDP-abhängigen Enzymen wurde diversen Bereichen (inklusive dem C-terminalen Teil in *Zm*PDC, Chang *et al.* 2000) eine Funktion beim Verschließen des aktiven Zentrums während der Katalyse zugeordnet. Eine solche Funktion des C-terminalen Teils wäre auch für *Lp*POX denkbar und könnte durch die Analyse entsprechender Enzymvarianten verifiziert werden.

3.1.2.3.6 Identifizierung einer sekundären Substratbindestelle

In allen mit Substrat inkubierten Kristallen war ein zusätzliches Molekül Pyruvat in einer Entfernung von etwa 23 Å vom aktiven Zentrum entfernt gebunden (Abb. 3.7). Bei dieser zuvor unbekannten sekundären Substratbindestelle könnte es sich um ein regulatorisches Zentrum der *LpPOX* handeln. Da in den mit dem Substratanalogon MAP inkubierten Kristallen an der Bindestelle keine Elektronendichte detektiert wurde, scheint diese sehr spezifisch für Pyruvat zu sein (über die Affinität kann allerdings keine Aussage getroffen werden, da in den *soaking*-Ansätzen mit 200 mM eine hohe Pyruvatkonzentration vorlag). Allerdings gaben die bisherigen kinetischen Untersuchungen keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines regulatorischen Zentrums in der *LpPOX*. Um zu klären, inwiefern die sekundäre Substratbindestelle von Relevanz für die Katalyse ist, wurden zwei an der Bindung des Pyruvat beteiligte Aminosäuren (Met 561, Ser 562) durch Alanin ersetzt und die resultierenden Mutanten gereinigt und kinetisch charakterisiert. Es konnten keine Änderungen der kinetischen Parameter (K_M für Pyruvat, k_{cat} , Reduktion des FAD, Intermediatverteilung, Daten nicht gezeigt) gefunden werden, so dass eine Funktion dieser Bindestelle für die Katalyse ausgeschlossen werden kann. Möglicherweise stellt diese Bindestelle ein rudimentäres regulatorisches Zentrum eines durch Substrat aktivierten evolutionären Vorläuferproteins dar.

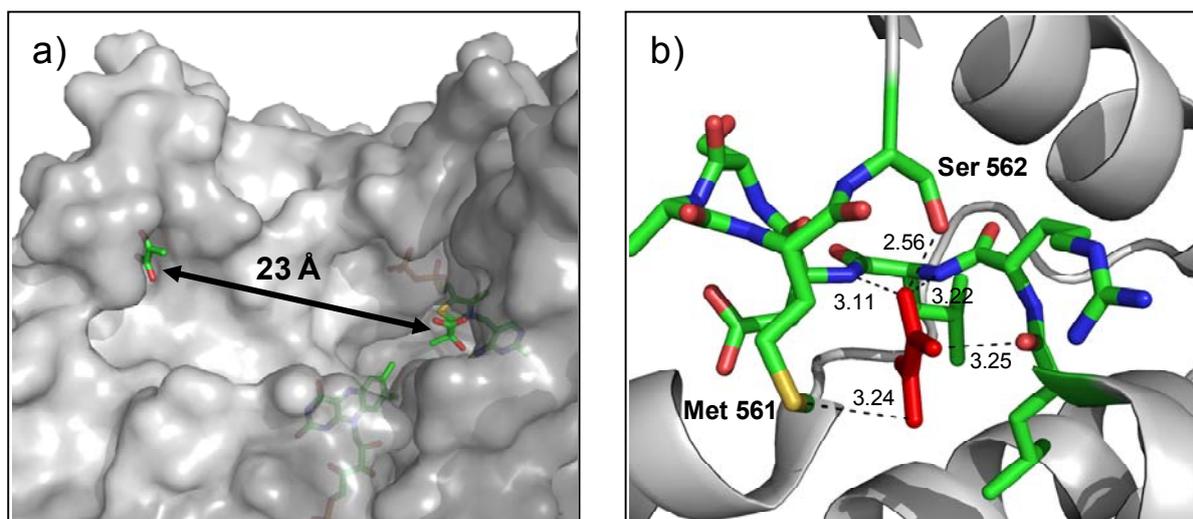


Abb. 3.7: Bindung von Pyruvat in der sekundären Bindestasche von *LpPOX*; a) Lokalisation der Bindestasche relativ zum aktiven Zentrum, b) Interaktion von Pyruvat (rot) mit Aminosäuren in der Bindestasche; verwendet wurde die Struktur mit L-ThDP (PDB-Code: 2EZ8)

3.1.2.4 Strukturelle Implikationen für die Decarboxylierung von L-ThDP

Die Strukturen der *Lp*POX-Variante mit gebundenem L-ThDP und dem analogen PL-ThDP erlauben erstmalig direkte Einsichten in den Bindungsmodus eines enzymgebundenen Prä-Decarboxylierungsintermediats. In Zusammenhang mit aus der Literatur entnommenen Beobachtungen lassen sich Prinzipien ableiten, mit denen in ThDP-abhängigen Enzymen die beobachteten Geschwindigkeitserhöhungen der Decarboxylierung von L-ThDP gewährleistet werden könnten.

Der Befund, dass Thiamin im Gegensatz zu ThDP nicht im aktiven Zentrum von PDC bindet, liefert einen ersten Hinweis (Schellenberger 1998). Die bei der Rekombination freiwerdenden Wechselwirkungsenergien des Thiamin genügen nicht, um die notwendigen Rotationensenergien der beiden aromatischen Ringsysteme um die Methylenbrücke zu kompensieren². Erst die zusätzliche Nutzung der Bindungsenergie des Pyrophosphatanteils erlaubt die Bildung der energetisch ungünstigen V-Konformation. Wie in den zuvor beschriebenen Strukturen gezeigt, bewirkt diese Konformation neben der Aktivierung des ThDP eine Auslenkung des C2-C α -Bindungswinkels in L-ThDP durch sterischen Stress zwischen der 4'-Aminogruppe des Kofaktors und der C α -OH-Gruppe des Substrates. Die beobachtete Entspannung beim Übergang vom tetrahedralen L-ThDP (11° Auslenkung des Thiazoliumrings) in die planare Enaminform (5° Auslenkung) könnte zu einer Beschleunigung der Decarboxylierungsreaktion beitragen.

Neben der V-Konformation des ThDP trägt auch die perpendiculare Ausrichtung der Carboxylatgruppe zum Thiazoliumring zur Torsion der C2-C α -Bindung bei. Die Organisation des aktiven Zentrums ermöglicht eine Bindung des Substrates nur in dieser Konformation (3-Zentren-Bindung). Die Bindungsenergie des Substrates muss zumindest teilweise für dessen Desolvatisierung und die Erhöhung der Affinität (Verringerung des K_M -Wertes) genutzt werden. Somit bleibt als Quelle für die Auslenkung des Thiazoliumrings aus dem Grundzustand vorwiegend die Energie, welche bei der Bildung der C2-C α -Bindung freigesetzt wird. Die Lösung einer

² ThDP liegt in Lösung in der F- oder S-Konformation, nicht aber in der reaktionskompetenten V-Konformation vor. Siehe Kapitel 1.2

Kristallstruktur mit gebundenem Substrat in der *docking-site* wäre in diesem Zusammenhang interessant. Dafür könnte man *LpPOX* mit einem unreaktiven ThDP-Analogon (z. B. N3'-Pyridyl-ThDP oder deaza-ThDP) rekombinieren und nach dessen Kristallisation mit Substrat *soaken*. Da mit diesen Kofaktoranaloga keine C-C-Bindungsbildung möglich ist, sollte Pyruvat in der *docking-site* verbleiben. Entsprechend der oben getroffenen Annahme, dass die Distorsion des Thiazoliumrings vorwiegend durch die Bindungsbildungsenergie erwirkt wird, sollte das Substratmolekül ähnlich im aktiven Zentrum orientiert sein, wie der Laktyl-Rest des kovalenten Intermediats. Für den Thiazoliumring (bzw. Thiophenring) wird dagegen eine dem Grundzustand des Kofaktors entsprechende entspannte Konformation postuliert. Die selben Kofaktoren könnten genutzt werden, um über isothermale Titrationskalorimetrie die freiwerdende Bindungswärme des Pyruvat zu bestimmen³.

Die durch die 3-Zentren-Bindung realisierte perpendiculare Ausrichtung im L-ThDP ist noch aus einem weiteren Grund interessant. Diese Orientierung wurde seit langem für L-ThDP postuliert, da sie die Abspaltung des CO₂ begünstigen sollte. Ursache dafür ist, dass in dieser Konformation nach erfolgter Decarboxylierung die Elektronen der gespaltenen Bindung bereits so ausgerichtet sind, dass sie in Konjugation zu den Ringelektronen des Thiazoliumrings treten können (*least-motion maximal-overlap mechanism*, Turano *et al.* 1982). Die im Laufe der Reaktion gebildete negative Ladung kann somit bereits im Übergangszustand durch Delokalisation stabilisiert werden. Turano *et al.* konnten 1982 die Struktur von Phosphonolaktyl-Thiamin (PL-Th) in Lösung bestimmen⁴. Wie im Thiamin befinden sich die beiden aromatischen Ringe des Kofaktors nicht in V-Konformation zueinander (Abb. 3.8). Beachtlich war der Befund, dass der PL-Rest eine perpendiculare Ausrichtung zum Thiazoliumring aufwies. Allerdings war sie der in *LpPOX* F479W gefundenen Konformation des L-ThDP genau entgegengesetzt. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum chemisch synthetisiertes L-ThDP nicht in

³ Dieses Experiment wäre auch hinsichtlich der Untersuchung der sekundären Pyruvatbindestelle interessant.

⁴ Der nachfolgende Vergleich der Struktur von chemisch synthetisiertem PL-Th mit der im Enzym vorliegenden Struktur des L-ThDP sollte mit Vorsicht betrachtet werden, da die synthetisierte Substanz bezüglich des C α als racemisches Gemisch vorlag. Nur das (S)-Enantiomer ist im Kristall zu finden. Strukturell entspricht es dem (R)-L-ThDP, wohingegen im Enzym die (S)-Form dieses Intermediats realisiert wird.

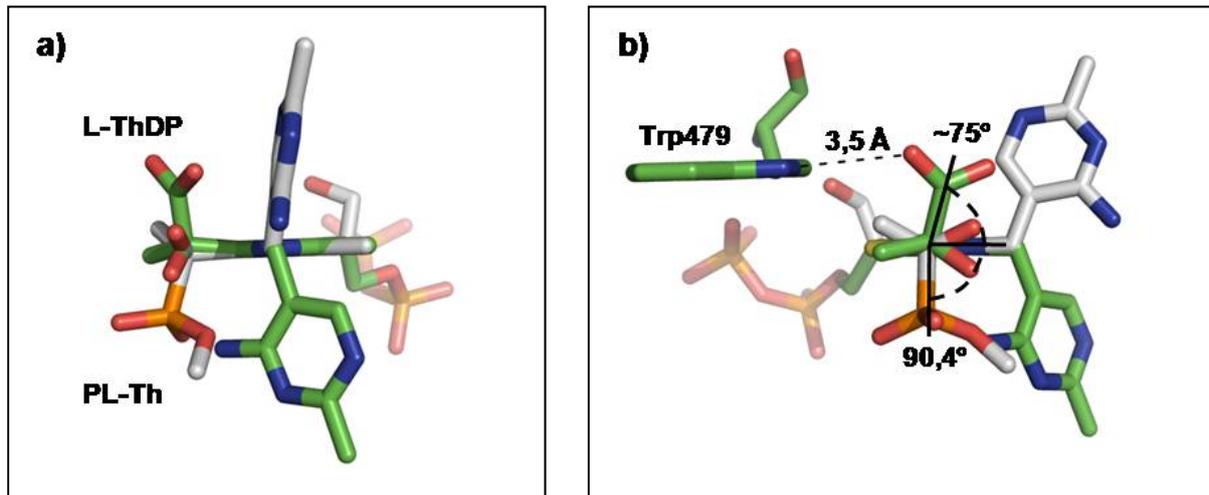


Abb. 3.8: Vergleich der Struktur von (S)-PL-Th in Lösung (weiße C-Atome) und (S)-L-ThDP in *Lp*POX F479W (grüne C-Atome); Sowohl der Aminopyrimidinring als auch der Laktyl-Rest (bzw. Phosphonolaktyl-Rest) nehmen in Lösung eine andere Konformation relativ zum Thiazoliumring ein, als im enzymgebundenen Zustand. a) Blick entlang der Methylenkohlenstoff-N3-Bindung; b) Blick entlang der C2-C α -Bindung, der Laktyl-Rest wird in *Lp*POX F479W scheinbar durch den Kontakt zum Tryptophanring um etwa 15° aus der idealen perpendicularen Lage ausgelenkt; die Strukturen von PL-Th (Turano *et al.* 1982) und L-ThDP (PDB-Code: 2EZ8) wurden anhand des Thiazoliumrings übereinandergelagert

PDC gebunden wird. Um eine Bindung im aktiven Zentrum zu gewährleisten, müssen die Energien zur Rotation der aromatischen Systeme um die Methylenbrücke (V-Konformation), zur Rotation des Laktyl-Restes um die C2-C α -Bindung (korrekte peripendiculare Ausrichtung) und zur Auslenkung des C2-C α -Bindungswinkels aufgebracht werden. Demgegenüber stehen die freiwerdenden Bindungsenergien des Kofaktor (inklusive des Pyrophosphatrestes) und des Laktyl-Restes (welches strukturell dem Substrat Pyruvat sehr ähnlich ist). Im Vergleich zum ThDP, welches problemlos gebunden werden kann, müsste also bei der Bindung von freiem L-ThDP ein energetischer Mehrbetrag für die Rotation des Laktyl-Restes aufgebracht werden. Diese Rotation ist in der im Enzym realisierten V-Konformation auf Grund der Wechselwirkung zwischen der Aminogruppe des Kofaktors und der Hydroxylgruppe des Laktyl-Restes energetisch aufwendiger, als für die frei in Lösung befindliche Struktur. Außerdem fehlt der Energiebetrag der C-C-Bindungsbildung, welcher wie oben postuliert die Distorsion der C2-C α -Bindung ermöglicht.

Zusammenfassend kann also geschlussfolgert werden, dass der im Enzym gewährleistete Bindungsmodus von Kofaktor und Substrat zu einer Destabilisierung des Grundzustandes der Decarboxylierungsreaktion führt. Dabei wird sowohl bei der Bindung des Kofaktors als auch des Substrats ein Teil der Bindungsenergie für die

Realisierung einer energetisch ungünstigen aber reaktionskompetenten Konformation genutzt. Ein solcher Mechanismus kann als Modifizierung von Jenck's Circe-Mechanismus aufgefasst werden (Jencks 1987: „*The ,Circe effect' refers to the utilization of strong attractive forces to lure a substrate into a site in which it undergoes an extraordinary transformation of form and structure*“). Das aktive Zentrum ist dem Übergangszustand (bzw. dem planaren Enamin-Produkt) der Reaktion komplementärer, als dem Ausgangszustand (tetrahedrales L-ThDP). Dies bewirkt eine Geschwindigkeitserhöhung der vorwärtsgerichteten Reaktion. Zusätzlich bewirkt die perpendiculare Ausrichtung der Carboxylatgruppe entsprechend der *least-motion maximal-overlap* Theorie eine weitere Beschleunigung der Decarboxylierung. Diese Ausrichtung wird durch ein 3-Zentren-Bindungsmotiv gewährleistet (stereo-elektronischer *lock*).

3.1.3 Der Einfluss von Glu 483 auf die Katalyse in *Lp*POX

Die Kristallstrukturen von *Lp*POX in Komplex mit den verschiedenen Reaktionsintermediaten erlauben Einblicke in die Interaktionen zwischen Proteinkomponente und den Intermediaten. Das aktive Zentrum wird vorwiegend durch hydrophobe Reste ausgekleidet. Lediglich zwei polare Gruppen – Gln 122 und Glu 483 – sind im aktiven Zentrum lokalisiert. Glu 483 interagiert sowohl mit der Carboxylatgruppe des L-ThDP als auch (über ein Wassermolekül) mit dem Phosphat. Demnach könnte Glu 483 entscheidend an der Bindung von Pyruvat und Phosphat beteiligt sein. Desweiteren wäre eine Funktion für die perpendiculare Ausrichtung des Laktyl-Carboxylates – und damit bei der Decarboxylierungsreaktion – vorstellbar. Um den Einfluss des Glutamat 483 auf die einzelnen Schritte der Katalyse zu untersuchen, wurde es durch Alanin und Glutamin ersetzt. Die Plasmide zur Expression der entsprechenden Varianten wurden von Dr. Georg Wille zur Verfügung gestellt.

3.1.3.1 Einfluss des Glu 483 auf die Umsetzung von Pyruvat

Die Varianten E483A und E483Q weisen im DCPIP-Test eine im Vergleich zum Wt verringerte Aktivität auf (8fach in E483A, 25fach in E483Q; Abb. 3.9). Jedoch ist in beiden Varianten der K_M für Pyruvat niedriger als im Wt. Dies scheint zunächst auf eine erhöhte Affinität der Varianten zum Substrat hinzuweisen. Allerdings ist der K_M -Wert eine komplexe Konstante, welche sowohl von der Affinität des Enzyms zum Substrat (K_D), als auch von den Geschwindigkeitskonstanten nachfolgender Schritte abhängig ist. Für den irreversiblen Umsatz eines Substrates (S) in ein Produkt (P) durch das Enzym (E) kann folgende, vereinfachte Reaktionssequenz formuliert werden:



(14)

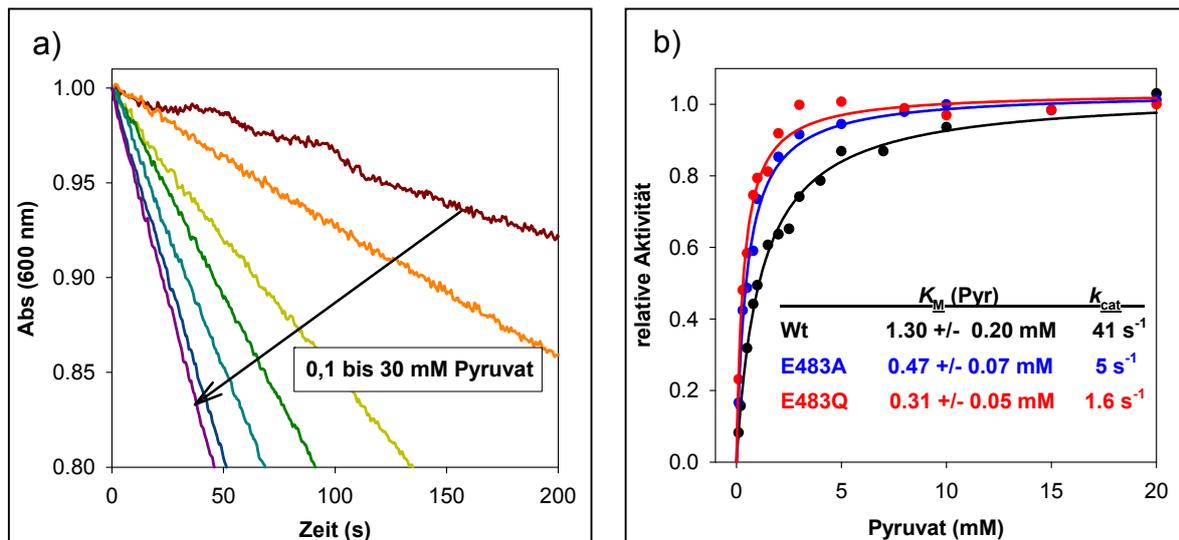


Abb. 3.9: Umsetzung von Pyruvat im DCPIP-Test durch *LpPOX* Wt und Glu483-Varianten, a) ausgewählte Progresskurven von *LpPOX* Wt. Die Startwerte der Reaktionen sind aus Übersichtsgründen auf 1 gesetzt. b) Vergleich der v-S-Charakteristiken von Wt und den Varianten.

Der Quotient k_{-1}/k_1 entspricht dabei der Dissoziationskonstante (K_D) des Enzym-Substratkomplexes (ES). Die Geschwindigkeitskonstante k_2 fasst alle der Substratbindung nachgelagerten Schritte zusammen und entspricht näherungsweise dem unter Substratsättigung erhaltenen k_{cat} -Wert der Reaktion. Aus dieser Reaktionssequenz folgt eine hyperbole Abhängigkeit der Aktivität (v) von der Substratkonzentration mit:

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{S + K_M} \quad (15)$$

Die Michaelis-Konstante (K_M) setzt sich aus allen Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion zusammen:

$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1 \quad (16)$$

Auch wenn die dargestellte Reaktionssequenz nur eine äußerst grobe Näherung der in *LpPOX* vorliegenden Situation darstellt⁵, ist ersichtlich, dass eine Verringerung der Michaelis-Konstante sowohl aus einer schlechteren Substratbindung (höherer K_D),

⁵ k_2 setzt sich in *LpPOX* aus der quasi irreversiblen Decarboxylierung des L-ThDP, dem Elektronentransfer und der Produktabspaltung zusammen. Zusätzlich gehen noch 2 weitere Produkte (Phosphat und Sauerstoff) in die Reaktion ein.

als auch einer Verringerung von k_2 resultieren kann. Die in den E483-Varianten gefundenen niedrigen k_{cat} -Werte sind also wahrscheinlich hauptsächlich für die Verringerung von K_M verantwortlich.

Der DCPIP-Test stellt einerseits eine schnelle und sensitive Methode zur Aktivitätsmessung in *LpPOX* dar. Allerdings ist die Verwendung von DCPIP als artifiziellen Elektronenakzeptor nicht ganz unproblematisch, da der Farbstoff Elektronen sowohl vom Flavin, als auch vom Enamin/Carbanion aufnehmen kann (Tittmann *et al.* 2000). Die Hydrolyse des dabei entstehenden, nicht physiologischen Intermediates Ac-ThDP kann zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion werden, und damit eine geringere Gesamtaktivität des Enzymes hervorrufen. Dieses Problem kann umgangen werden, wenn das gebundene Flavin direkt als Sonde genutzt wird (siehe dazu Tittmann *et al.* 2000). Unter anaeroben Bedingungen⁶ resultieren verhältnismäßig einfache Progresskurven, aus denen ebenfalls ein K_M -Wert für Pyruvat sowie die Geschwindigkeitskonstante der reduktiven Halbreaktion gewonnen werden kann. Die während des Pyruvatumsatzes ablaufende Reduktion des enzymgebundenen FAD zum FADH₂ kann direkt bei 457 nm verfolgt werden (Abb. 3.10a). Dabei durchläuft das Enzym lediglich eineinhalb Umsätze. Nach Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat werden Elektronen auf FAD übertragen und Acetylphosphat freigesetzt. Daraufhin kann zwar ein zweites Pyruvatmolekül decarboxyliert werden. In Ermangelung eines Elektronenakzeptors bleibt die Reaktion allerdings auf Stufe von HE-ThDP und FADH₂ stehen. Die Reduktion des FAD wurde in Abhängigkeit von der Pyruvatkonzentration unter Standardbedingungen (200 mM Phosphat, 100 μ M ThDP, 1 mM MgSO₄, 25 °C, pH 6,0) im *stopped flow* Photospektrometer detektiert (Abb. 3.10c). Die Progresskurven wurden an eine 2- oder 3-fach exponentielle Gleichung angepasst. Die initiale *lag*-Phase wird durch der Reduktion vorgelagerte Schritte verursacht. Die zweite Phase beschreibt die eigentliche reduktive Halbreaktion und wird im folgenden als Einzige genauer betrachtet. Die dritte Phase konnte nur bei einigen Progresskurven beobachtet werden und kann durch kleine Mengen an in Lösung verbliebenem Sauerstoff oder aber auch durch eine Entkopplung von Elektronentransfer und Phosphorolyse (Vergleich Abb. 3.15b) verursacht werden. In Abbildung 3.10d sind die Geschwindigkeitskonstanten der

⁶ Entfernung von Sauerstoff aus der Lösung durch β -D-Glukose und Glukoseoxidase.

reduktiven Halbreaktion von *LpPOX* Wt und den Glu483-Varianten in Abhängigkeit von der Pyruvatkonzentration aufgetragen. Wie bereits im DCPIP-Test sind die Aktivitäten der Varianten im Vergleich zum Wt verringert (ca. 8fach in E483A, ca. 5fach in E483Q). Auch eine Verringerung des K_M -Wertes für Pyruvat kann hier wieder beobachtet werden. Die im Vergleich zum DCPIP-Test erhöhten Maximalgeschwindigkeiten können dadurch erklärt werden, dass zum Einen in der reduktiven Halbreaktion nicht alle Schritte der Katalyse betrachtet werden (die Reoxidation des $FADH_2$ durch O_2 und die Produktabspaltung entfallen). Zum Anderen kann, wie bereits erwähnt, die Hydrolyse des artifiziellen Intermediats Ac-ThDP im DCPIP-Test zu geringeren Aktivitäten führen. Da in der reduktiven Halbreaktion lediglich die C-C-Bindungsbildung, die Decarboxylierung des Laktyl-

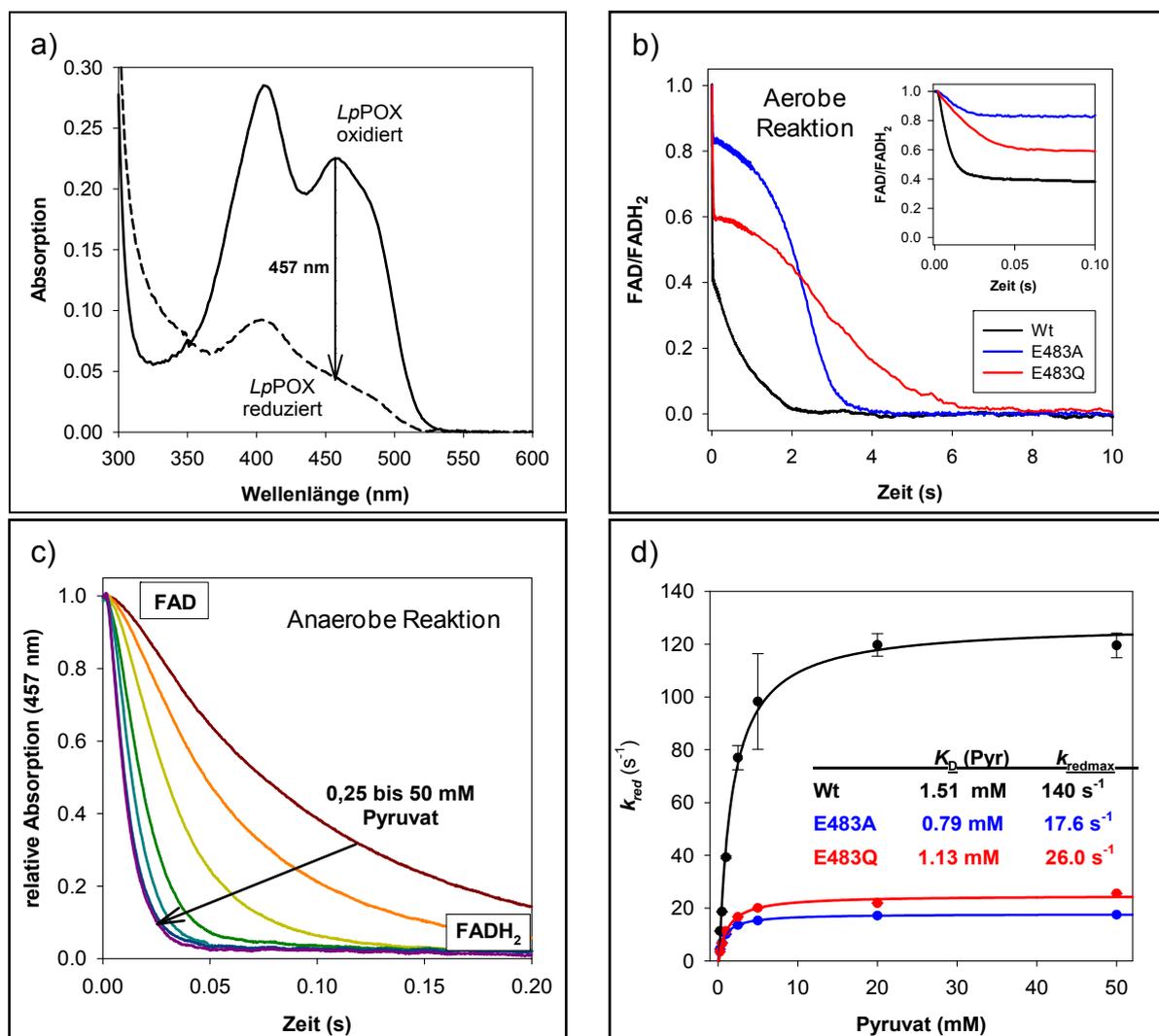


Abb. 3.10: Reduktion des FAD in *LpPOX* Wt und den Glu483-Varianten, a) Spektren von enzymgebundenem Flavin in oxidiert und reduzierter Form (1,2 mg/ml *LpPOX* Wt). b) Reduktion des FAD unter aeroben Bedingungen mit 1 mg/ml Enzym. c) Progresskurvenschar der reduktiven Halbreaktion in *LpPOX* Wt mit verschiedenen Pyruvatkonzentrationen. d) Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der reduktiven Halbreaktion in *LpPOX* Wt und den Varianten. Erklärungen siehe Text.

ThDP und die Reduktion des FAD eine Rolle spielen, kann aus diesen Experimenten auf eine Beteiligung des Glu 483 an mindestens einem dieser Schritte geschlossen werden.

Um zu zeigen, welche Schritte der Katalyse in den Varianten besonders beeinträchtigt sind, wurde eine *rapid-quench*-¹H-NMR-Intermediatanalyse durchgeführt. Diese Methode ermöglicht eine Bestimmung der Mengenverhältnisse von kovalenten Reaktionsintermediaten im *steady state* einer Reaktion (Tittmann *et al.* 2003). In erster Näherung werden diejenigen Intermediate im *steady state* populiert, deren Umsatzraten für die Gesamtreaktion limitierend sind. Ein Vergleich der Intermediatverteilung einer Enzymvariante mit der des entsprechenden Wildtyps erlaubt es daher, Rückschlüsse auf die Beteiligung bestimmter Aminosäurereste an definierten Schritten der Katalyse zu ziehen. Unter idealen Bedingungen können aus den relativen Anteilen der Intermediate in Kombination mit dem in konventionellen Methoden ermitteltem k_{cat} -Wert des Enzyms Geschwindigkeitskonstanten für Einzelschritte der Reaktion berechnet werden. Dabei müssen allerdings einige Punkte berücksichtigt werden. Für *ZmPDC*, welche in Kapitel 3.2 behandelt wird, gestaltet sich die Berechnung auf Grund eines vergleichsweise einfachen Reaktionszyklus relativ unproblematisch und wird in (Tittmann *et al.* 2003) beschrieben. Zwei Faktoren müssen dabei in diesem Enzym berücksichtigt werden:

- a) Das nach der Decarboxylierung resultierende Carbanion/Enamin wird unter den vorliegenden sauren Reaktionsbedingungen zum HE-ThDP protoniert. Damit ist eine Separation von Protonierungsschritt und Produktabspaltung nicht möglich.
- b) Das Produkt Acetaldehyd kann unter Bildung von HE-ThDP wieder am Enzym gebunden werden, so dass das Verhältnis der Intermediate verfälscht werden kann. Zusätzlich nimmt mit steigender Acetaldehydkonzentration die Carbolygations-Seitenreaktion zu. Die Reaktionszeit für die Intermediatanalyse muss also so gewählt werden, dass einerseits das *steady state* erreicht wird, andererseits aber noch keine nennenswerten Mengen an Produkt vorliegen. Dies ist für *ZmPDC* problemlos realisierbar.

In *LpPOX* ist die Bestimmung von Einzelschrittgeschwindigkeitskonstanten in höherem Maße fehleranfällig, als in *ZmPDC*:

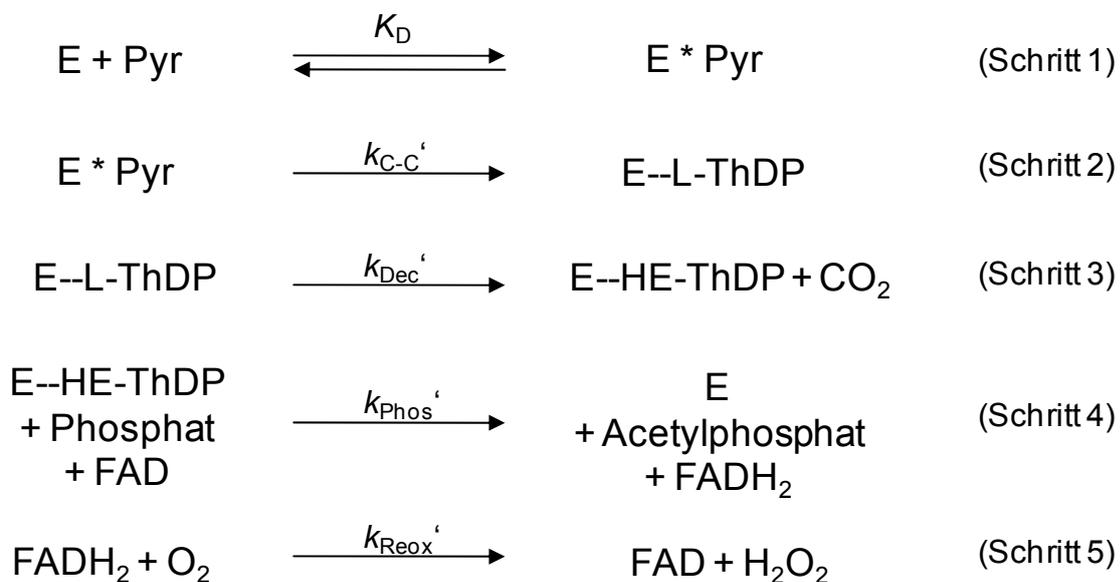
- a) In *LpPOX* sind nicht alle Reaktionsintermediate unter den vorliegenden Bedingungen stabil. Vor allem die radikalischen Addukte sollten in kurzer Zeit zu Ac-ThDP zerfallen sein. Ac-ThDP liegt in saurem Milieu in drei verschiedenen Formen vor (Tittmann *et al.* 2003), was in einer Aufspaltung des mitunter ohnehin schon schwachen Signals resultiert. Auch ist Ac-ThDP einer langsamen Hydrolyse unterworfen. Die zum Zeitpunkt der Spektrenaufnahme ermittelte Konzentration dieses Intermediats müsste also mit Hilfe der bekannten Halbwertszeit (Gruys *et al.* 1989) auf den tatsächlichen Wert am Zeitpunkt der Reaktion rückgerechnet werden. Erschwerend kommt hinzu, dass Ac-ThDP eigentlich kein Intermediat im Katalysezyklus von *LpPOX* ist, sondern lediglich in einer Nebenreaktion gebildet wird.

- b) Im komplexen Reaktionsmechanismus von *LpPOX* werden insgesamt drei Substrate umgesetzt. Für zwei dieser Substrate (Pyruvat, Phosphat) können im Allgemeinen Sättigungsbedingungen realisiert werden. Für Sauerstoff ist das dagegen nicht der Fall. Die unter den Messbedingungen vorliegende gelöste Konzentration ($\sim 250 \mu\text{M}$) entspricht in etwa dem K_M -Wert in *LpPOX*. Hinzu kommt, dass während der Reaktion hohe Enzymkonzentrationen (etwa $100 \mu\text{M}$ aktive Zentren) eingesetzt werden müssen, um zufriedenstellende Signalstärken der Intermediate zu gewährleisten. Es besteht also eine vergleichsweise große Gefahr, dass es auf Grund des Sauerstoffverbrauchs zu einer vermehrten Bildung von HE-ThDP kommt. Die Reaktion muss also kurz nach Erreichen des *steady state* abgestoppt werden. Der optimale Zeitpunkt dafür kann aus *stopped flow* Experimenten unter aeroben Bedingungen abgeleitet werden (Tittmann *et al.* 2000, Vergleich Abb. 3.3a und Abb. 3.10b).

Zusätzlich zu diesen spezifischen Problemen gilt es noch eine allgemeine mögliche Fehlerquelle in Betracht zu ziehen. Da überschüssiger Kofaktor eine Verfälschung der Intermediatverteilung bewirken würde, muss dieser vor der Reaktion entfernt

werden. Einige Enzyme (wie *LpPOX* und *ZmPDC*) binden ThDP fest, so dass diese Prozedur problemlos durchgeführt werden kann. In Enzymen, welche eine geringe Affinität zum Kofaktor aufweisen, stellt sich allerdings ein Gleichgewicht zwischen enzymgebundenem und freiem Kofaktor ein. Der während der Intermediatanalyse detektierte Anteil an unreaktiertem Kofaktor wird dadurch künstlich erhöht. Die Bestimmung des K_D -Wertes für ThDP in diesen Enzymen ermöglicht aber auch hier eine Korrektur. Unter Berücksichtigung der angesprochenen Problempunkte und durch Anwendung entsprechender Korrekturen lassen sich letztlich adäquate Geschwindigkeitskonstanten für Einzelschritte berechnen.

In (Tittmann *et al.* 2005a) wird die Prozedur zur Ermittlung von Einzelschrittkonstanten in *LpPOX* beschrieben. Für den Vergleich der Varianten mit dem Wt wird hier ein etwas vereinfachtes Verfahren angewendet. Dazu wird der Reaktionszyklus in folgende Schritte eingeteilt:



Die Geschwindigkeitskonstanten beschreiben dabei die netto vorwärtsgerichteten Reaktionen. E entspricht dem Holoenzym mit gebundenem ThDP. Unter Substratsättigung sollte der erste Schritt (Bildung des Michaelis-Komplexes mit Pyruvat) nicht geschwindigkeitsbestimmend sein, so dass eine Akkumulation von ThDP im *steady state* auf Schritt 2 zurückzuführen ist. Die Geschwindigkeitskonstanten der Schritte 2 bis 4 sind dann über folgendes Gleichungssystem mit den Intermediatkonzentrationen verknüpft:

$$\frac{\text{L-ThDP}}{\text{ThDP}} = \frac{k_{\text{C-C}'}}{k_{\text{Dec}'}} = a \quad (17)$$

$$\frac{\text{HE-ThDP}}{\text{L-ThDP}} = \frac{k_{\text{Dec}'}}{k_{\text{Phos}'}} = b \quad (18)$$

$$\frac{1}{k_{\text{Red}'}} = \frac{1}{k_{\text{C-C}'}} + \frac{1}{k_{\text{Dec}'}} + \frac{1}{k_{\text{Phos}'}} \quad (19)$$

Mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstante der reduktiven Halbreaktion ($k_{\text{Red}'}$, siehe oben) können die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten berechnet werden:

$$k_{\text{C-C}'} = k_{\text{Red}'} * (1 + a + a*b) \quad (20)$$

$$k_{\text{Dec}'} = k_{\text{Red}'} * (1 + a + a*b) / a \quad (21)$$

$$k_{\text{Phos}'} = k_{\text{Red}'} * (1 + a + a*b) / a*b \quad (22)$$

Die noch fehlende Geschwindigkeitskonstante der Reoxidation ($k_{\text{Reox}'}$) des Flavin kann aus aeroben Messungen erhalten werden. Im *steady state* der Reaktion laufen reduktive und oxidative Halbreaktion mit gleicher Absolutgeschwindigkeit ab (Gleichung 23) und es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen oxidiertem und reduziertem Flavin ein (siehe Abb. 3.10b). Dieses Gleichgewicht hängt vom Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten beider Halbreaktionen ab und erlaubt die Berechnung von $k_{\text{Reox}'}$ nach Gleichung 24:

$$k_{\text{Reox}}' * \text{FADH}_2 = k_{\text{Red}}' * \text{FAD} \quad (23)$$

$$k_{\text{Reox}}' = k_{\text{Red}}' * \frac{\text{FAD}}{\text{FADH}_2} \quad (24)$$

Die derart ermittelten Konstanten sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst und die Spektren der Intermediatverteilung im Anhang gezeigt (Abb. A2). Auf Grund der Kristallstrukturen wurde für Glu 483 eine Beteiligung an der Decarboxylierung des L-ThDP postuliert. Dementsprechend wurde erwartet, dass der gefundene Aktivitätsverlust der Varianten vorwiegend auf einer geringeren Umsatzrate dieses Intermediats beruht ($k_{\text{C-C}}$). Dies konnte allerdings nicht beobachtet werden. Vielmehr scheinen alle Teilschritte der Reaktion durch den Austausch betroffen zu sein. Die Beeinträchtigung der C-C-Bindungsbildung kann relativ leicht erklärt werden. Wenn Glu 483 an der Bindung und Orientierung von Pyruvat beteiligt ist, so könnte ein Austausch des Restes zumindest zu kleinen Änderungen in der Positionierung des Substrates im aktiven Zentrum führen. Dies könnte eine Entfernung des C α (Pyruvat) vom C2 (ThDP) und damit eine verschlechterte C-C-Bindungsbildung zur Folge haben. Die Beeinträchtigung der radikalischen Phosphorolyse (k_{Phos}) ist weniger verständlich. Da aber in den Kristallstrukturen auch Interaktionen zum Phosphat erkennbar sind, könnte an dieser Stelle bereits spekuliert werden, dass die

Tab. 3.1: Konstanten für die Umsetzung von Pyruvat durch *LpPOX* Wt und E483-Varianten

	Wt	E483A	E483Q
k_{cat} (DCPIP)	41 s ⁻¹	5 s ⁻¹	1,6 s ⁻¹
K_{M} (DCPIP) (<i>stopped flow</i>)	1,30 mM 1,51 mM	0,47 mM 0,79 mM	0,31 mM 1,13 mM
k_{Red}'	140 s⁻¹	17,6 s⁻¹	26 s⁻¹
$k_{\text{C-C}}$	560 s ⁻¹	38 s ⁻¹	~ 86 s ⁻¹
k_{Dec}	280 s ⁻¹	57 s ⁻¹	~ 104 s ⁻¹
k_{Phos}	560 s ⁻¹	68 s ⁻¹	~ 57 s ⁻¹
k_{Reox}	106 s ⁻¹	86 s ⁻¹	42 s ⁻¹

suboptimale Ausrichtung von Phosphat zu einer Beeinträchtigung dieses Schrittes führt. Die Akkumulation von Ac-ThDP im *steady state* von E483Q ist mit dieser These konsistent. Sie weist auf eine Entkopplung von Elektronentransfer und Produktabspaltung in dieser Variante hin. In E483Q war auf Grund des Auftretens von Ac-ThDP die Abschätzung von k_{Phos} zusätzlich erschwert. Das Integral von Ac-ThDP wurde für die Berechnung zum Integral von HE-ThDP addiert. Die komplexe Konstante k_{Phos} beinhaltet also zusätzlich die nicht-physiologische Hydrolyse von Ac-ThDP. Der Einfluss der Mutationen auf die Phosphatbindung wird in Kapitel 3.1.3.3 ausführlich behandelt.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass ein Austausch des Glu 483 einen Einfluss auf nahezu jeden Schritt der Katalyse hat. Der beobachtete Aktivitätsverlust fiel allerdings geringer aus als erwartet. Die Varianten besitzen noch 5 bis 20 % Restaktivität und weisen damit eine um sechs Größenordnung schnellere Decarboxylierung von L-ThDP auf, als die unkatalysierte Reaktion. Ein Austausch des ähnlich positionierten Restes Glu 473 in *ZmPDC* resultierte dagegen in Varianten mit lediglich 0,1 % Restaktivität (Vergleich Kapitel 3.2.2.1).

3.1.3.2 Einfluss des Glu 483 auf die Bindung des Pyruvatanalogons MAP

In den zuvor geschilderten Experimenten konnte eine Beteiligung des Glu 483 an nahezu jedem Teilschritt der *LpPOX*-Katalyse nachgewiesen werden. Aussagen über die Affinität des Enzyms zu Pyruvat konnten allerdings nur in eingeschränktem Maße erfolgen, da die unter *turnover*-Bedingungen erhaltenen K_M -Werte komplexe Konstanten darstellen.

Das nicht-decarboxylierbare Pyruvatanalogon MAP ermöglicht dagegen die separate Untersuchung der Substratbindung (siehe Kapitel 2.5.3). Dieser Schritt kann generell in zwei Teilschritte untergliedert werden – die Bindung des Substrates im aktiven Zentrum unter Bildung des Michaelis-Komplexes und die Bildung der kovalenten C-C-Bindung zwischen Substrat und Kofaktor (siehe Gleichung (3)).

Zunächst wurde mittels Differenz-Absorptionsspektroskopie geprüft, ob MAP von der *LpPOX* gebunden wird. Durch Zugabe von MAP zu *LpPOX* Wt wird die Bildung eines Signales bei 310 nm induziert (Abb. 3.11). Dieses Signal wurde der Iminoform des Kofaktors zugeordnet (Jordan *et al.* 2002 und Nemeria *et al.* 2004). Aus der Signalstärke und der bekannten Konzentration an aktiven Zentren (4,87 mg/ml *LpPOX* Wt entsprechen 74 μM aktive Zentren) konnte mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ein Extinktionskoeffizient von ca $3000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für die postulierte Iminoform des PL-ThDP errechnet werden. Dieser Wert ist allerdings abhängig vom tatsächlich vorliegenden Verhältnis zwischen Amino- und Iminoform und der Umgebung im aktiven Zentrum.

Überraschend war das Auftreten leichter Änderungen im Bereich der Flavinabsorption. Fehlerhafte Spektrensubtraktion oder Verdünnungseffekte können dafür als Ursache ausgeschlossen werden, da dadurch Abweichungen bei allen Wellenlängen hervorgerufen werden würden. Möglicherweise führt die Bindung von MAP zu einem *quenching* der Flavinabsorption.

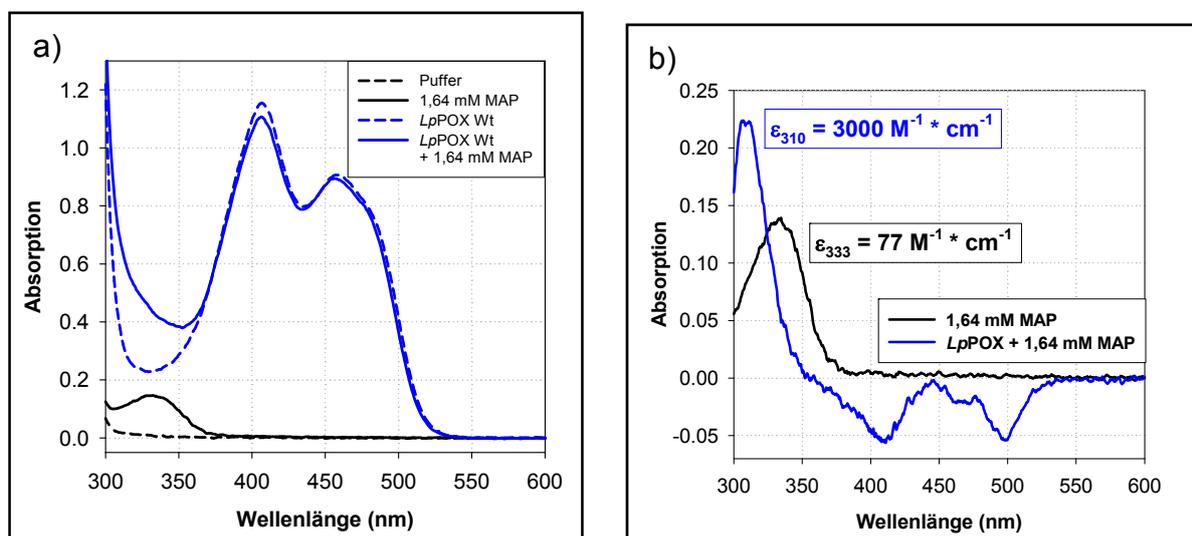


Abb. 3.11: Absorptionsspektren von *LpPOX* Wt (74 μM akt. Zentren) und MAP (1,64 mM) in Puffer (a) und Differenzspektren von MAP und enzymgebundenem PL-ThDP (b), die Spektren wurden in 200 mM Phosphat, 100 μM ThDP, 1 mM MgSO_4 , pH 6,0 aufgenommen; für die Differenzspektren wurde das Puffersignal (für MAP, schwarz) bzw. das Signal von Puffer, MAP und Protein (für PL-ThDP, blau) subtrahiert

3.1.3.2.1 Bestimmung der Affinität durch CD-Titration

Das CD-Spektrum der *LpPOX* weist im Bereich von 290 – 600 nm mehrere Banden auf (Abb. 3.12a). Die Signale bei 390 und 465 nm stammen vom gebundenen FAD. Die Signale bei 305 und 330 nm können dagegen dem ThDP zugeordnet werden und werden auch in anderen ThDP-abhängigen Enzymen beobachtet. Nach Zugabe von MAP steigt das Signal bei etwa 305 nm an. Entsprechend des Vorschlages von Jordan *et al.* stammt diese Bande von der Iminoform des ThDP, deren Bildung durch die Bindung von MAP induziert wird. Die im Laufe der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente mit *ZmPDC*-Varianten wurden dagegen so interpretiert, dass das detektierte Signal auf eine *charge-transfer* Interaktion zwischen Aminopyrimidinring und dem (modifizierten) Thiazoliumring zurückzuführen ist (siehe Kapitel 3.2.2.3). Der tatsächliche molekulare Ursprung dieses Signals ist bei der Ermittlung von Dissoziationskonstanten für die Phosphonate allerdings irrelevant. Die Affinität der Glu 483 Varianten zum Substratanalogen ist im Vergleich zum Wt etwa 10 bis 20fach verringert, so dass für diesen Rest eine Beteiligung an der Substratbindung angenommen werden kann (Abb. 3.12b). Erstaunlicherweise bewirkte der Austausch des Glutamat gegen das isosterische Glutamin einen größeren Effekt, als die vollständige Deletion der Seitengruppe (Austausch gegen Alanin). Welcher der beiden Teilschritte aus Gleichung (3) in den Varianten

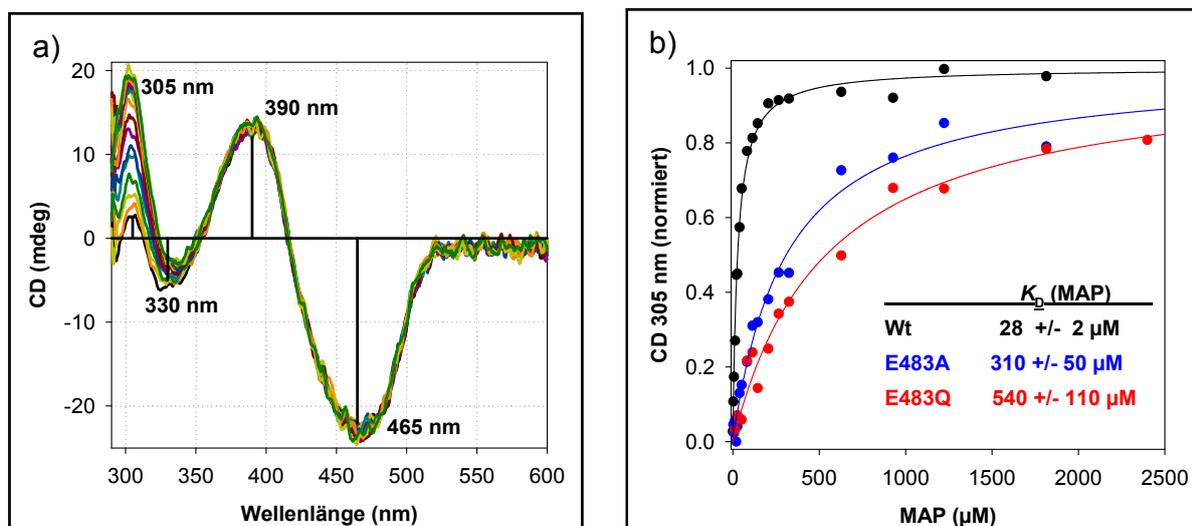


Abb. 3.12: Titration von MAP zu *LpPOX* Wt und Varianten, a) CD-Spektren von 2,4 mg/ml *LpPOX* Wt mit unterschiedlichen Konzentrationen an MAP (0 bis 1800 μM). b) Ermittlung des apparenten K_D -Wertes in Wt und Varianten

beeinflusst ist, kann hier nicht ermittelt werden. Allerdings ist eine Änderung der freiwerdenden chemischen Energie der C-C-Bindungsbildung eher unwahrscheinlich, so dass primär von einer Änderung in der Bindungsenergie für MAP ausgegangen werden kann.

3.1.3.2.2 Bestimmung der Bindungsgeschwindigkeit durch stopped flow Absorptionsmessungen

Die Geschwindigkeit der MAP-Bindung stellt neben dem K_D -Wert als Maß für die Affinität einen weiteren wichtigen Parameter dar, um den Einfluss des Glu 483 auf die Substratbindung einzuschätzen. Die Progresskurven der Bindung von MAP an *LpPOX* (Abb. 3.13a) konnten an eine einfach exponentielle Gleichung angepasst werden. Die aus den Amplituden der Reaktionen erhaltenen K_D -Werte korrelieren mit denen aus den CD-Titrationsen (nicht gezeigt). Auch hier zeigt sich eine verminderte Affinität für MAP in den Varianten. Zusätzlich ist die Geschwindigkeit der MAP-Bindung in den Glu483-Varianten verringert (Abb. 3.13b).

Die lineare Abhängigkeit der k_{obs} -Werte von der MAP-Konzentration weist darauf hin, dass im untersuchten Konzentrationsbereich die Bildung des Michaelis-Komplexes

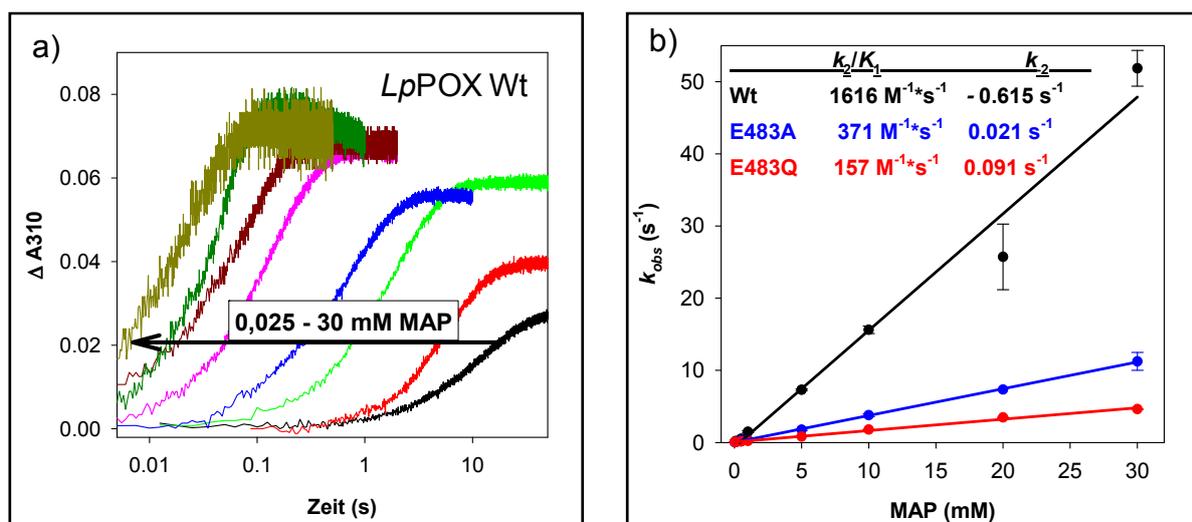


Abb. 3.13: Geschwindigkeit der MAP-Bindung an *LpPOX* Wt und Glu483-Varianten, a) Progresskurven der MAP-Bindung an *LpPOX* Wt (1,91 mg/ml). Die Zeitachse wurde aus Übersichtsgründen logarithmisch dargestellt. b) Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten in Wt und den Glu483-Varianten. Die Auswertung erfolgte nach Gleichung (8).

geschwindigkeitsbestimmend und das vorgelagerte Gleichgewicht nicht gesättigt ist ($K_1 > [\text{MAP}]$, Vergleich Abb. 2.4). Demgegenüber liegt der apparente K_D -Wert für alle Varianten zwischen 30 und 500 μM und damit weit unter der eingesetzten maximalen MAP-Konzentration in den *stopped-flow*-Ansätzen (30 mM). Nach Umformung von Gleichung (4) in Gleichung (25) und unter der Annahme, dass $K_1 \geq 30 \text{ mM}$, kann der Wert für K_2 in *LpPOX* Wt abgeschätzt werden:

$$K_D = (K_1 * K_2) / (1 + K_2) \quad (4)$$

$$K_2 = (K_D) / (K_1 - K_D) \quad (25)$$

Damit ergibt sich $K_2 = k_{-2}/k_2 \leq 1 * 10^{-3}$. Die C-C-Bindungsbildung scheint also nahezu irreversibel zu verlaufen. Dies spiegelt sich auch in den Ordinatenschnittpunkten der erhaltenen Geschwindigkeitsabhängigkeiten wieder (k_{-2}). Auf Grund des geringen Wertes von k_{-2} ist eine exakte Bestimmung aus den Ordinatenschnittpunkten nicht möglich. In *LpPOX* Wt gibt ein freier Fit beispielsweise einen negativen Zahlenwert (Abb. 3.13b). Es kann aber abgeschätzt werden, dass k_{-2} kleiner als $0,1 \text{ s}^{-1}$ ist. Da mit 30 mM MAP k_2 noch nicht geschwindigkeitsbestimmend ist, muss dieser Wert in *LpPOX* Wt weit über dem k_{obs} von etwa 50 s^{-1} liegen. Die C-C-Bindungsbildung ist damit mindestens 500fach schneller, als die Spaltung.

Der Vergleich mit den Glu483-Varianten zeigt, dass k_{-2} scheinbar nicht signifikant geändert ist (etwa gleicher Ordinatenschnittpunkt, Abb. 3.13b). Der Anstieg der Geraden ist in den Varianten dagegen etwa 5 bis 10fach geringer als im Wt. Dies kann entweder durch eine Verringerung von k_2 (C-C-Bindungsbildung) oder aber durch eine Erhöhung von K_1 (Dissoziationskonstante des Michaelis-Komplexes) verursacht werden (Vergleich Gleichung (8)). Wahrscheinlich sind beide Prozesse betroffen. So könnte der Austausch des Glu 483 zu einer geringeren Affinität des Enzyms zu MAP und einer leicht veränderten Orientierung des Analogons in der Bindestelle führen. Die dadurch geänderte relative Positionierung von Substrat-Carbonyl und Kofaktor-C2 könnte wiederum die Geschwindigkeit der C-C-Bindungsbildung beeinflussen.

3.1.3.3 Einfluss des Glu 483 auf die Phosphatbindung

Die Ergebnisse aus den Kristallstrukturen und der Intermediatanalyse weisen auf eine Beteiligung von Glu 483 an der Phosphatbindung hin. Daher wurden die Varianten auch hinsichtlich der Umsetzung dieses Substrates untersucht. Der K_M -Wert für Phosphat wurde zunächst im DCPIP-Test unter Pyruvatsättigung bestimmt (Tab. 3.2). Dabei konnte in den Varianten nur eine leichte Erhöhung dieses Wertes gefunden werden. Diese Untersuchungen waren allerdings durch Ionenstärkeeffekte verkompliziert. So wurde ohne Ionenstärkeausgleich bis etwa 300 mM Phosphat eine hyperbole Abhängigkeit der Aktivität von der Phosphatkonzentration gefunden. Bei höheren Konzentrationen kam es unerwartet zu einer weiteren Aktivitätssteigerung (Daten nicht gezeigt). Da sich die Ionenstärke des Reaktionsansatzes im untersuchten Konzentrationsbereich um 560 mM ändert, wurden auch Messungen unter Ausgleich der Ionenstärke durchgeführt. Dabei zeigte sich aber, dass das verwendete Salz (NaCl) einen inhibierenden Effekt auf die *LpPOX* ausübt. Dieser Effekt war in den Glu483-Varianten stärker ausgeprägt, als im Wt. Außerdem konnte bei Ausgleich der Ionenstärke kein K_M -Wert für Phosphat bestimmt werden.

Tab. 3.2: Konstanten für die Umsetzung von Phosphat durch *LpPOX*

	Wt	E483A	E483Q
K_M (DCPIP)	13 mM	24,3 mM	37,1 mM
K_D (CD)	26,7 mM	2,3 mM	10,7 mM
H-D-Austausch (ohne Phosphat)	20 s ⁻¹	314 s ⁻¹	-----
H-D-Austausch (mit Phosphat)	270 s ⁻¹	397 s ⁻¹	-----

Auf Grund der Komplikationen im DCPIP-Test wurde nach einer weiteren Methode gesucht, mit der man den Einfluss der Mutationen am Glu 483 auf die Phosphatbindung analysieren kann. Die CD-Spektroskopie erwies sich dafür als geeignet. Im Gegensatz zum DCPIP-Test erlaubten die durchgeführten Titrationsexperimente eine isolierte Betrachtung der Phosphatbindung (Abb. 3.14a und 3.14b). Die erhaltenen K_D -Werte für Phosphat sprechen zunächst gegen eine essentielle Funktion des Glu 483 bei der Phosphatbindung (Tab. 3.2). Ein Austausch dieses Restes führt sogar zu einer Verringerung des K_D und damit zu einer erhöhten Affinität (Abb. 3.14c). Bei genauerer Betrachtung der Spektren fallen aber einige interessante Aspekte auf. So treten in Abwesenheit von Phosphat in *LpPOX* Wt neben den Flavin-Banden (390 und 465 nm) zwei Signale bei etwa 300 und 330 nm auf. Bei Zugabe von Phosphat kommt es zur Abnahme der Signalstärke dieser beiden Banden. Die in den CD-Spektren beobachteten Signale spiegeln wie bereits

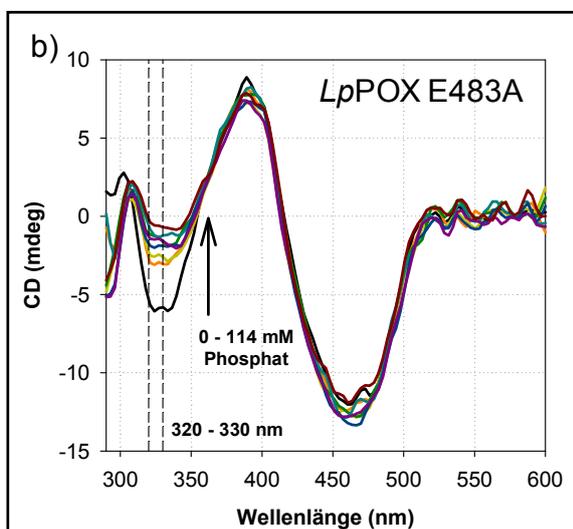
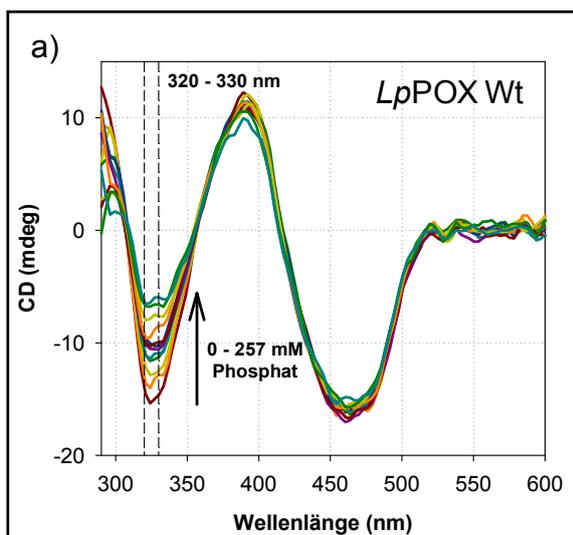
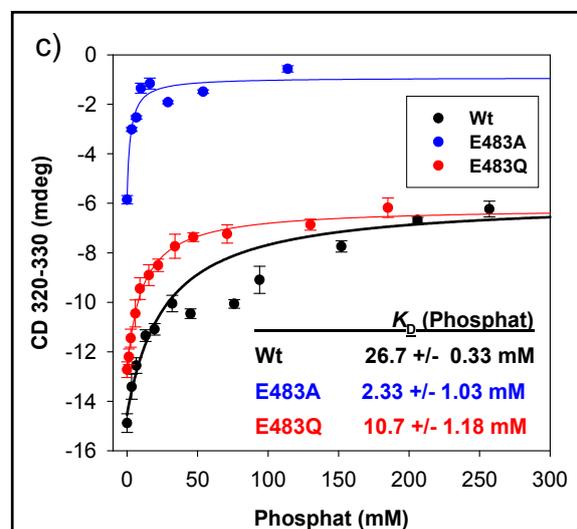


Abb. 3.14: Titration von Phosphat zu *LpPOX* Wt und den Glu483-Varianten, a) CD-Spektren von 2,56 mg/ml Wt in 50 mM MES, 100 μ M ThDP, 1 mM $MgSO_4$, pH 6 mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen. b) CD-Spektren von 2,47 mg/ml E483A mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen. c) Abhängigkeit der Signale bei 320-330 nm von der Phosphatkonzentration



erwähnt wahrscheinlich verschiedene Dissoziations- und Tautomerenzuständen des ThDP wieder. Die Bindung von Phosphat scheint also einen Einfluss auf den Zustand des Kofaktors im aktiven Zentrum auszuüben. Die Spektren von Wt und E483Q sehen sich sehr ähnlich. E483A unterscheidet sich aber deutlich vom Wt, so dass in dieser Variante möglicherweise Protonierungsgleichgewichte des Kofaktors gestört sind. Das Spektrum dieser Variante in Abwesenheit von Phosphat scheint dabei dem Spektrum des Wt unter Phosphatsättigung zu entsprechen. Wie in Kapitel 1.2 erwähnt, ist die Lage der Dissoziations- und Tautomerengleichgewichte in ThDP-abhängigen Enzymen vor allem bei der Aktivierung des Kofaktors von Bedeutung. Daher wurde mittels H/D-Austausch untersucht, inwiefern sich das Aktivierungsverhalten der Variante E483A in An- und Abwesenheit von Phosphat von der des Wt unterscheidet. Bereits 1998 wurde festgestellt, dass Phosphat die Aktivierung des Kofaktors im Wt beschleunigt (Tittmann *et al.* 1998, Tab. 3.2). Für die Variante E483A konnte dagegen jetzt gefunden werden, dass Phosphat keinen signifikanten Einfluss auf die Dissoziationsgeschwindigkeit des C2-H hat. Vielmehr ist der Kofaktor in dieser Variante auch in Abwesenheit von Phosphat nahezu vollständig aktiviert. Die Daten der H/D-Austauschexperimente legen die Vermutung nahe, dass Glu 483 in *LpPOX* Wt die Aktivierung des C2 inhibiert (Vergleich Wt und E483A ohne Phosphat). In Anwesenheit von Phosphat wird dieser inhibierende Einfluss aufgehoben. Wie allerdings ein solcher Inhibierungsmechanismus ablaufen könnte, ist auf Grund der großen Distanz von 8,5 Å zwischen Glu483-Carboxylatgruppe und der für die Aktivierung notwendigen 4'-Aminogruppe schwer zu erklären. Auch ist die Bedeutung der Phosphat-vermittelten Aktivierung im Wt unklar, da die Geschwindigkeit des H/D-Austauschs auch in Abwesenheit von Phosphat die beobachtete Umsatzrate des Enzymes um eine Größenordnung übersteigt ($k_{\text{cat}} = 2 \text{ s}^{-1}$ bei 4 °C, Tittmann *et al.* 1998). Dennoch wird aus den gezeigten Ergebnissen deutlich, dass in *LpPOX* ein diffiziles und feinreguliertes Protonenrelaysystem bestehend aus Glu 483, Phosphat und dem Kofaktor ThDP vorliegt. Dabei ist in erster Linie die Fähigkeit des Restes 483 als H-Brückendonator oder Akzeptor zu fungieren für dieses System von Bedeutung.

Einen weiteren Hinweis auf die Funktion des Glu 483 brachten Untersuchungen zur Flavinreduktion in An- und Abwesenheit von Phosphat. Kürzlich wurde beschrieben, dass zur Bildung von Acetylphosphat Phosphorolyse und Elektronentransfer

gekoppelt ablaufen müssen (Tittmann *et al.* 2005a, siehe Kapitel 3.1.1.2). Dabei werden diverse Flavinradikalspezies durchlaufen, welche theoretisch bei Wellenlängen um 500 bis 700 nm detektiert werden können (Abb. 3.15a). Im Wt können diese radikalischen Intermediate lediglich dann beobachtet werden, wenn kein Phosphat im Ansatz vorliegt (Tittmann *et al.* 2000). In der Variante E483Q werden dagegen auch in Anwesenheit von Phosphat radikalische Flavinspezies populiert (Abb. 3.15b). Dies spricht für eine Störung des nukleophilen Angriffs von Phosphat auf das HE-ThDP-Radikal (Vergleich Abb. 3.2). Diese Beobachtung würde auch die Populierung von Ac-ThDP im *steady state* dieser Variante erklären, da wie bereits erwähnt das HE-ThDP Radikal während der *quenching*-Prozedur zu Ac-ThDP zerfallen sollte. Merkwürdigerweise konnten in E483A keine Radikale beobachtet werden, obwohl beim Austausch des Glutamat zum Alanin ausgeprägtere Effekte zu erwarten wären, als beim relativ konservierten Austausch gegen Glutamin. Außerdem entsprach das Verhalten von E483Q in den CD-spektroskopischen Untersuchungen zur Phosphatbindung eher dem Wt, wohingegen E483A eine Störung im Protonierungsgleichgewicht und Aktivierungsverhalten des Kofaktors aufwies.

Die Funktion des Glu 483 bezüglich des Phosphates kann folgendermaßen zusammengefasst werden. Aus den K_D -Werten ist ersichtlich, dass die Affinität zu Phosphat in den Varianten nicht schlechter ist, als im Wt. Die eigentliche Bindung

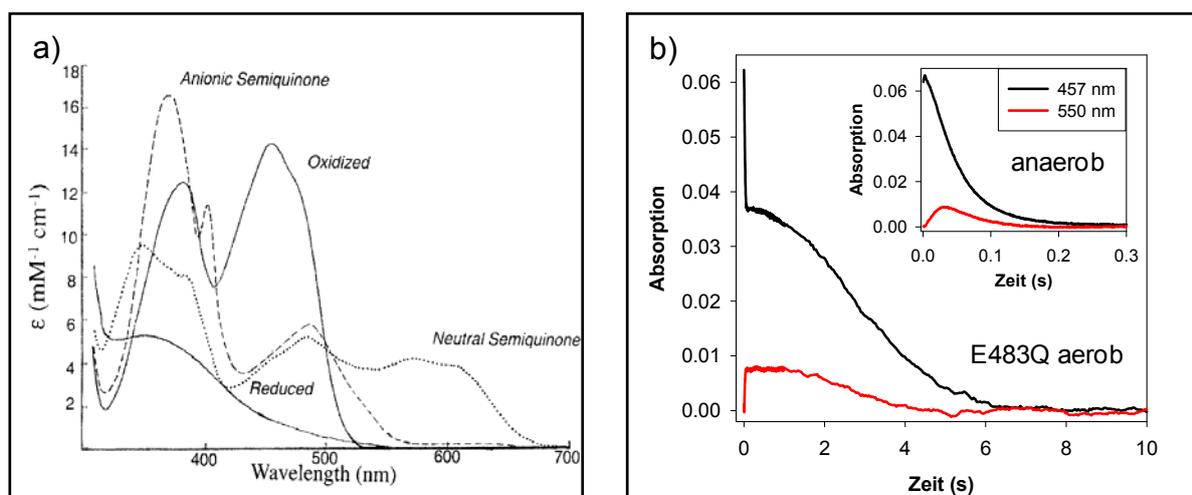


Abb. 3.15: Bildung radikalischer Flavinspezies in *LpPOX* E483Q, a) Absorptionsspektren verschiedener Flavinspezies in Glukoseoxidase aus (Massey 2000). b) Verlauf der Flavinreduktion in *LpPOX* E483Q bei 457 und 550 nm in Anwesenheit von 200 mM Phosphat unter aeroben und anaeroben (*inset*) Bedingungen. Bei 550 nm kann in dieser Variante selbst unter Phosphatsättigung die Bildung von radikalischen Flavinspezies beobachtet werden.

des Substrates wird demnach wahrscheinlich hauptsächlich über andere Teile des Enzyms (Gly 35 und Ser 36) realisiert. Allerdings ist Glu 483 für die Reaktivität des Phosphates (durch korrekte Ausrichtung) im Zuge der radikalischen Produktsplaltung entscheidend. Die genaue Wirkweise des Glu 483 ist schwer zu erklären, insbesondere da die komplette Entfernung der Carboxylatgruppe in E483A scheinbar geringere Auswirkungen hat, als der konservative Austausch gegen eine Säureamidgruppe in E483Q. Andererseits scheint in E483A sowohl der Protonierungsgrad des Kofaktors, als auch dessen phosphatvermittelte Aktivierung gestört zu sein. Da diese Störungen in der Variante E483Q nicht gefunden wurden, scheint in *Lp*POX Wt die Fähigkeit des Glu 483 zur H-Brückenbildung (und nicht die Dissoziierbarkeit) für den korrekten Ablauf dieser Prozesse verantwortlich zu sein.

3.1.3.4 Zusammenfassung: Einfluss des Glu 483 auf die Katalyse in *Lp*POX

Anhand der Kristallstrukturen der *Lp*POX-Variante F479W in Komplex mit verschiedenen Intermediaten wurde vermutet, dass Glu 483 sowohl eine Rolle bei der Bindung der Substrate Pyruvat und Phosphat, als auch der Decarboxylierung von L-ThDP spielt. Der Einfluss des Restes auf die Substratbindung konnte tatsächlich nachgewiesen werden, wenn auch ein Austausch von Glu 483 gegen Alanin oder Glutamin nur vergleichsweise geringe Änderungen im k_{cat} zur Folge hatte. Außerdem schien die Decarboxylierung von L-ThDP nahezu unverändert zu sein. Allerdings konnte eine Beeinträchtigung von allen anderen Schritten der Katalyse beobachtet werden. Dabei können die Beeinträchtigung der C-C-Bindungsbildung und des radikalischen Elektronentransfers auf eine suboptimale Orientierung der Substrate zurückgeführt werden. Der Einfluss auf die Phosphat-vermittelte Kofaktoraktivierung und dessen physiologische Relevanz bleiben allerdings ungeklärt.

Ein Vergleich mit den Strukturen anderer Pyruvatoxidasen zeigt, dass Glu 483 keinen konservierten Rest darstellt. Im Enzym aus *Escherichia coli* weist Asp 27 die gleiche räumliche Positionierung auf, wie Glu 483 in *Lp*POX so dass von ähnlichen Funktionen dieser beiden Reste im Reaktionszyklus ausgegangen werden kann (Neumann *et al.* 2008, Abb. 3.16). Allerdings stammt dieser Rest von einer anderen Untereinheit, als Glu 483 in *Lp*POX. Die Orientierung des Asp 27 bedingt eine im

Vergleich zu *Lp*POX verringerte Größe der Phosphatbindestelle. Dies verhindert möglicherweise eine Bindung von Phosphat, wenn HE-ThDP in *Ec*POX vorliegt. In dem Zusammenhang ist interessant, dass in *Ec*POX keine phosphorolytische Spaltung des HE-ThDP erfolgen muss, da der Energie konservierende Schritt in diesem Enzym in der Übertragung der Elektronen vom reduzierten Flavin auf ein Ubichinon besteht. Eine korrekte Orientierung von Phosphat ist in diesem Enzym also unnötig, wenn nicht sogar unerwünscht.

Eine weitere Vergleichsmöglichkeit bietet die Röntgenkristallstruktur des Enzyms aus *Aerococcus viridans*, welches wie *Lp*POX auf eine phosphorolytische Spaltung des HE-ThDP angewiesen ist (Juan *et al.* 2007). In diesem Enzym befindet sich weder ein Glutamat, noch ein Aspartat an der entsprechenden Position im aktiven Zentrum. Stattdessen nimmt Lys 478 die Position von Glu 483 in *Lp*POX ein. Dies kann als Hinweis darauf aufgefasst werden, dass die hauptsächliche Aufgabe des Restes darin besteht, als H-Brücken-Donor bei der Substratorientierung zu wirken, und dass Glu 483 in *Lp*POX in undissoziierter Form vorliegt.

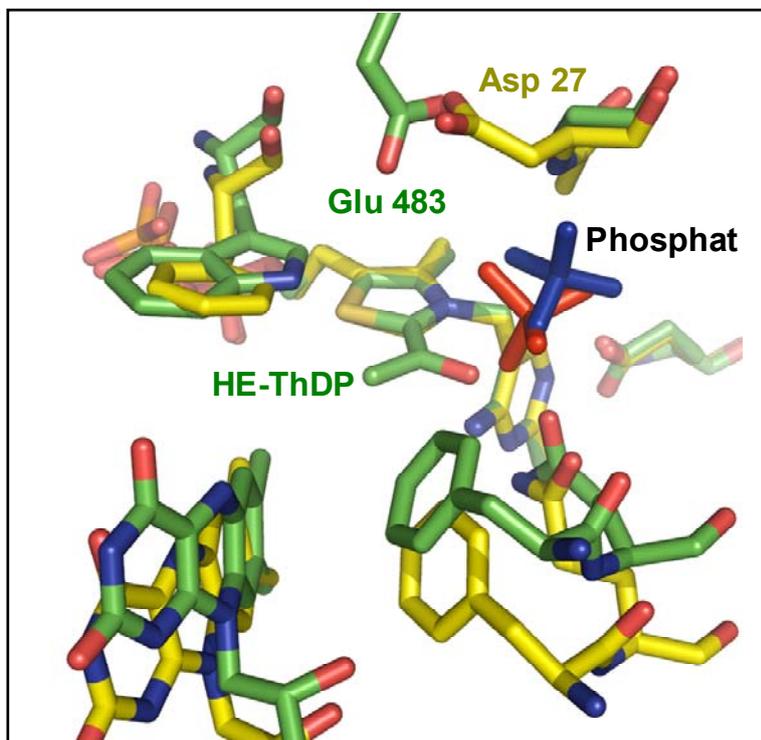


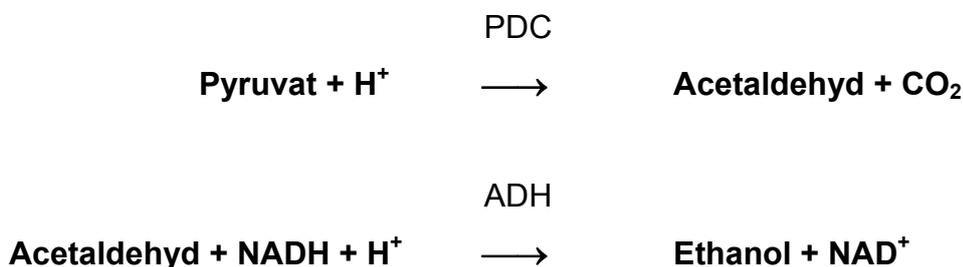
Abb. 3.16: Vergleich der aktiven Zentren von *Lp*POX und *Ec*POX, Glu 483 in *Lp*POX ist in *Ec*POX durch Asp 27 von einem gegenüberliegenden *loop* ersetzt. Die Phosphate in *Lp*POX (blau) und *Ec*POX (rot) weisen unterschiedliche Orientierungen zum HE-ThDP auf. Verwendete Strukturen: *Lp*POX F479W in Komplex mit HE-ThDP (PDB-code 2EZT), protolytisch aktivierte *Ec*POX (PDB-code: 3EYA)

3.2 Untersuchungen an Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*

3.2.1 Einführung

3.2.1.1 Vorkommen und Relevanz von Pyruvatdecarboxylasen

Pyruvatdecarboxylasen (PDC, EC 4.1.1.1) katalysieren die nicht-oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd und CO₂ als Teil der alkoholischen Gärung. Die Bedeutung dieser Reaktion liegt in der Oxidation von NADH, welches in fermentativen Organismen in großem Maße im Zuge der Glykolyse gebildet wird. Dazu wird Acetaldehyd durch Alkoholdehydrogenase (ADH, EC 1.1.1.1) unter Verbrauch von NADH zu Ethanol reduziert. Das frei werdende NAD⁺ kann wieder in die Glykolyse eingehen:



PDC-Aktivität wurde in Hefeextrakten bereits 1911 nachgewiesen und stellt damit eines der am längsten bekannten Enzyme dar. Das Enzym oder eine entsprechende DNA-Sequenz konnte in vielen Pflanzen (z. B. Mais, Erbse, Reis und Baumwolle) und Hefen (z. B. *Saccharomyces*-, *Kluyveromyces*- und *Aspergillus*-Spezies) sowie in wenigen Bakterien (z.B. *Zymomonas mobilis*) gefunden werden (Candy und Duggleby 1998).

Die alkoholische Gärung ist wahrscheinlich der älteste durch den Menschen genutzte biotechnologische Prozess. Bereits im Gilgamesch-Epos, dem im dritten Jahrtausend vor Christus in Mesopotamien entstandenen ersten großen Epos der Weltliteratur, wird Bier als Nahrungsmittel erwähnt. Heute werden in gemäßigten Breiten überwiegend Brauhefen, in wärmeren Gebieten vorwiegend das Bakterium

Zymomonas mobilis zur Herstellung von Alkohol verwendet. Neben dem Einsatz in der Lebensmittelindustrie rückt seit kurzem auch die Produktion von Bioethanol als Energieträger in den Fokus der Forschung (Goldemberg 2007, Stephanopoulos 2007). *Zymomonas mobilis* stellt dabei den am häufigsten eingesetzten Organismus speziell in der Zuckerrohrfermentation dar. In Brasilien werden auf diesem Wege jährlich 16 Mrd. Liter Bioethanol produziert. Allerdings besteht der Nachteil von *Z. mobilis* in einem relativ geringen Spektrum an fermentierbaren Zuckern. Ein großes Substratspektrum ist aber unabdingbar, um eine effiziente Umwandlung von Biomasse (z.B. aus heterogenen landwirtschaftlichen Abfällen) in Ethanol zu gewährleisten. Vor diesem Hintergrund wurde kürzlich *E. coli*, welches ein weitaus größeres Substratspektrum aufweist, mit den Genen für PDC und ADH aus *Z. mobilis* transformiert um einen effizienteren Ethanol-produzierenden Organismus zu erschaffen (Wang *et al.* 2008).

Neben dem Einsatz in großindustriellen fermentativen Prozessen haben Pyruvatdecarboxylasen auch in der Produktion von Feinchemikalien eine Bedeutung erlangt (Pohl *et al.* 2004). Verantwortlich dafür ist die Fähigkeit zur Durchführung von Carboligationsreaktionen. Dieser Aspekt wird in Kapitel 3.2.3 genauer behandelt.

3.2.1.2 Struktur und Mechanismus von Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*

Die Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* (ZmPDC) ist ein homotetrameres Enzym mit einem Molekulargewicht von etwa 61 kDa (568 Aminosäuren) je Untereinheit. Im Gegensatz zu den aus Hefen isolierten Enzymen weist ZmPDC keine Substrataktivierung und eine höhere Stabilität auf. Damit ist dieses Enzym für die kinetische Feinanalyse des Reaktionsmechanismus prädestiniert. Die Kristallstruktur wurde 1998 gelöst (Dobritzsch *et al.* 1998). Die Struktur des Holoenzym entspricht weitgehend der von LpPOX (Dimer von Dimeren, 4 aktive Zentren an den Kontaktstellen zwischen 2 Monomeren, aber keine Bindung von FAD). Das aktive Zentrum unterscheidet sich dagegen stark von dem in LpPOX (Abb. 3.17b). Während in LpPOX hydrophobe Reste überwiegen, liegen in ZmPDC vier polare Reste – Asp 27, His 113, His 114 und Glu 473 – vor. Der Reaktions-

verlauf gestaltet sich in PDC weniger komplex als in POX (Abb. 3.17a). Nach Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat wird das entstandene Carbanion/Enamin protoniert. Aus dem entstandenen HE-ThDP-Intermediat wird daraufhin Acetaldehyd freigesetzt. Mit Hilfe der Intermediatanalyse wurde 2003 ein Mechanismus der enzymvermittelten Katalyse vorgeschlagen (Tittmann *et al.* 2003). Demnach sollte Glu 473 an der Bindung und Decarboxylierung von Pyruvat beteiligt sein, Asp 27 und His 113 dagegen vorwiegend die Protonierung des Carbanion begünstigen. Im Rahmen der Promotionsarbeit durchgeführte Experimente zu Glu473-Varianten machen allerdings eine leichte Modifizierung dieses Vorschlags notwendig.

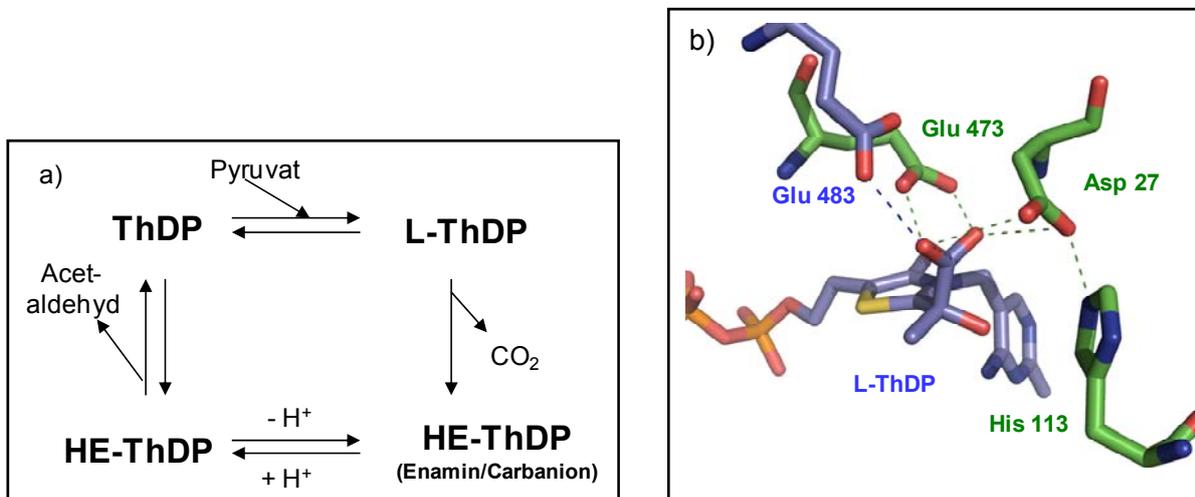


Abb. 3.17: Struktur des aktiven Zentrums und Mechanismus von *ZmPDC*. a) Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus von *ZmPDC*. b) Struktur des aktiven Zentrums von *ZmPDC* (grün) im Vergleich zu *LpPOX* (blau). Dargestellt ist die relative Orientierung der katalytischen Triade in *ZmPDC* zur Carboxylatgruppe des L-ThDP aus *LpPOX*. Die Strukturen wurden in PyMOL an Hand des Kofaktors übereinandergelagert. Verwendete Strukturen: *LpPOX* F479W in Komplex mit L-ThDP (PDB-code 2EZ8) und *ZmPDC* Wt (PDB-code 1ZPD)

3.2.2 Mechanistische Untersuchungen an Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*

3.2.2.1 Der Einfluss von Glu 473 auf die Katalyse in ZmPDC

Beim Vergleich der Strukturen von ZmPDC und LpPOX wird deutlich, dass die aktiven Zentren beider Enzyme trotz Umsetzung des gleichen Substrats sehr unterschiedlich strukturiert sind. Während in LpPOX überwiegend hydrophobe Reste zu finden sind, liegen in ZmPDC eine Reihe von polaren Gruppen vor. Selbst das aus Sequenzvergleichen als homolog erkannte Glutamat (Glu 483 in LpPOX, Glu 473 in ZmPDC) weist in beiden Enzymen unterschiedliche Orientierungen auf (Abb. 3.17). Beide Reste liegen „oberhalb“ der Thiazoliumringebene und interagieren mit der Carboxylatgruppe des L-ThDP nach Bindung des Substrates. Während aber ein Austausch des Restes in LpPOX in Varianten mit etwa 5 bis 20 % Restaktivität resultiert, kommt es in ZmPDC zu einem dramatischeren Abfall der Aktivität um drei Größenordnungen (Tab. 3.3, Abb. A3 im Anhang). Bereits 2003 konnte durch die Analyse der Intermediatverteilung⁷ im *steady state* gezeigt werden, dass der Aktivitätsverlust in E473D vorwiegend auf einer Störung der Decarboxylierung von L-ThDP beruht (Akkumulation von etwa 90 % L-ThDP, Tittmann *et al.* 2003). Dabei könnte dieser Rest entweder in seiner protonierten Form für eine perpendiculare

Tab. 3.3: Kinetische Konstanten bei der Umsetzung von Pyruvat durch ZmPDC Wt und Glu473-Varianten, Werte für die Geschwindigkeitskonstanten der Einzelschritte in Wt und E473D sind aus (Tittmann *et al.* 2003) entnommen. Der k_{cat} wurde im optisch gekoppelten Test ermittelt (siehe Abb. A3 im Anhang).

	Wt	E473D	E473Q
k_{cat}	150 s ⁻¹	0,1 s ⁻¹	0,15 s ⁻¹
K_M (Pyruvat)	0,31 mM	0,15 mM	0,4 mM
k_{C-C}	2650 s ⁻¹	0,6 s ⁻¹	>15 s ⁻¹
k_{Dec}	397 s ⁻¹	0,13 s ⁻¹	>15 s ⁻¹
k_{Prod}	265 s ⁻¹	1,2 s ⁻¹	0,15 s ⁻¹

⁷ Siehe zur Anwendung der Intermediatanalyse auf ZmPDC auch Kapitel 3.1.3.1

Ausrichtung der Carboxylatgruppe zum Thiazoliumring sorgen (*least-motion maximal-overlap* Mechanismus, siehe Kapitel 1.4), oder aber im dissoziierten Zustand eine Abspaltung des CO_2 durch elektrostatischen Stress begünstigen. Ein Austausch der benachbarten Reste Asp 27 und His 113 führte ebenfalls zu einer stark verringerten Aktivität. Allerdings wurde hier nahezu ausschließlich HE-ThDP im *steady state* der Reaktion gefunden. Diesen beiden Resten wurde daher eine Funktion als katalytische Duade bei der Protonierung des post-Decarboxylierungsintermediates (α -Carbanion) zugeschrieben. Es wurde vermutet, dass Glu 473 (Bindung von Pyruvat und Orientierung der Carboxylatgruppe) und die katalytische Duade (Protonierung des α -Carbanion) unabhängig voneinander arbeiten. Die Untersuchung der Intermediatverteilung in der isosterischen Variante E473Q erbrachte jetzt allerdings den Befund, dass hier wie in den Asp27- und His113-Varianten nahezu vollständig HE-ThDP akkumuliert wird (Abb. A3 im Anhang). Da in dieser Variante die Decarboxylierung des L-ThDP unbeeinträchtigt zu

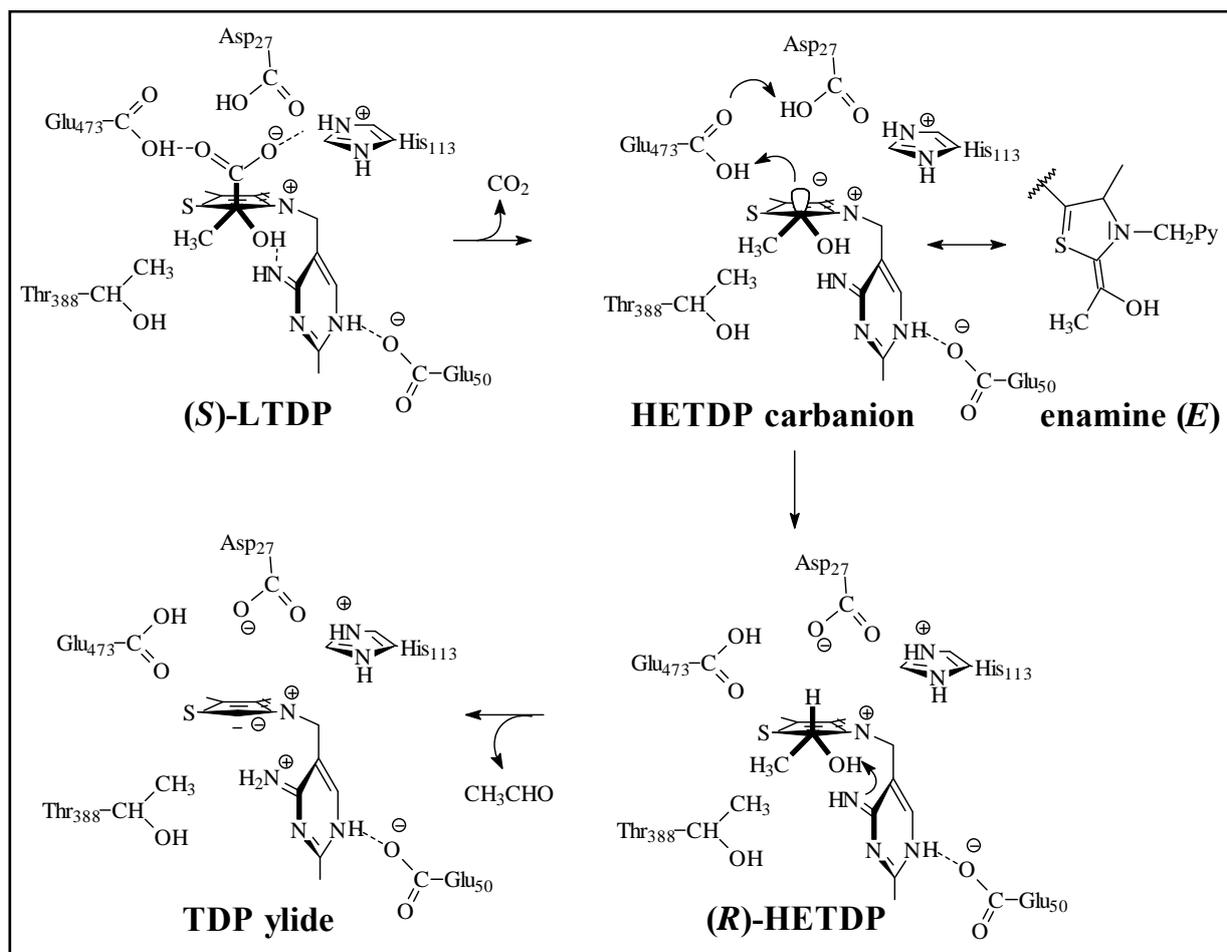


Abb. 3.18: Funktionen von Glu 473 im Reaktionsmechanismus von ZmPDC, Abbildung übernommen aus (Kluger und Tittmann 2008). Erklärungen siehe Text.

sein scheint, kann elektrostatischer Stress als Triebkraft der Decarboxylierung in PDC nahezu ausgeschlossen werden. Der in Abb. 3.18 dargestellte Mechanismus ist mit den beobachteten Ergebnissen bezüglich Glu 473 konsistent. Die für die Bindung des Substrats notwendige Protonierung des Carbonyl-Sauerstoffs wird durch die Aminogruppe des Kofaktors unter Beteiligung des „Aktivierungs“-Glutamins (Glu 50) katalysiert. Glu 473 interagiert mit dem Substrat und sorgt für die korrekte Ausrichtung der abzuspaltenden Carboxylatgruppe. In der Variante E473D führt der vergrößerte Abstand zwischen Substrat-Carboxylat und Seitengruppe möglicherweise zu einer Torsion des L-ThDP. Dieses könnte, zumindest zum Teil, die etwa 3000fach langsamere Decarboxylierung dieses Intermediats in der Variante bewirken. Strukturen dieser Variante im Komplex mit L-ThDP könnten diese Theorie überprüfen⁸. Nach erfolgter Decarboxylierung wird das entstehende α -Carbanion durch Glu 473 protoniert. Dieser Schritt muss äußerst schnell ablaufen, um die Möglichkeit einer Carbolygation mit dem Produkt der Reaktion (Acetaldehyd) auszuschließen. Die Protonierung wird durch Asp 27 und His 113 unterstützt, kann allerdings in der Variante E473Q nicht ablaufen. Die für die Abspaltung des Produktes notwendige Deprotonierung wird wiederum durch den Aminopyrimidinring gewährleistet. Nach der Abspaltung wird der Ausgangszustand durch Aufnahme eines Protons aus dem Lösungsmittel wiederhergestellt (in Abb. 3.18 nicht gezeigt).

An anderer Stelle wurde angemerkt, dass die Decarboxylierung des L-ThDP theoretisch reversibel verlaufen sollte (Kluger und Tittmann 2008 und Referenzen darin). Die Autoren argumentieren, dass nach Bildung des Carbanions dieses aufgrund des ausgeprägten nukleophilen Charakters CO_2 solange wieder angreifen kann, bis es aus dem aktiven Zentrum diffundiert ist. Da diese Rückreaktion

⁸ Im Rahmen der Promotionsarbeit wurden auch Kristallisationsversuche mit den *ZmPDC* Varianten E473D und E473Q durchgeführt. Viele der Kristalle wiesen allerdings, wie auch für den Wt beschrieben (Dobritzsch 1998), hohe Mosaizitäten und schlechte Auflösungen auf. Dennoch konnte ein adäquater Kristall der Variante E473D mit Pyruvat *gesoakt* und die Struktur bei 2,2 Å gelöst werden. In dieser Struktur war der Kofaktor vollständig definiert, wohingegen in *ZmPDC* Wt eine Spaltung des Thiazoliumrings beobachtet wurde (Dobritzsch *et al.* 1998). In drei von vier aktiven Zentren war keine zusätzliche Elektronendichte zu sehen. In einem konnte aber Dichte am C2 des ThDP detektiert werden, welche auf das Vorhandensein eines tetrahedralen Adduktes hinwies. Auch wenn die erhaltenen Daten noch nicht optimal waren, ergab ein freier *fit* unter Verwendung von L-ThDP aus *LpPOX* F479W tatsächlich eine gedrehte Konformation. Diese Drehung führte auch zum Verschwinden der Auslenkung des C2-C α -Bindungswinkels. Durch Optimierung der *soaking*-Bedingungen könnte die Lösung der Kristallstruktur mit gebundenem L-ThDP in dieser Variante also prinzipiell möglich sein. Alternativ könnten auch Co-Kristallisationsansätze mit Acetyl-Phosphinat (AcPho) erfolgreich sein. Dieses Substratanalogon wird von *ZmPDC* Wt und E473D im Gegensatz zu MAP gebunden.

theoretisch schneller ablaufen soll, als die Diffusion des CO₂ aus dem aktiven Zentrum heraus, bestünde die Notwendigkeit einer schnellen Protonierung des Carbanions. In E473D würde der vergrößerte Abstand zwischen dem Carbanion und der Seitengruppe diese Protonierung behindern. Die daraus resultierende erhöhte Rate der Rückreaktion mit CO₂ könnte demnach hauptsächlich für die beobachtete Akkumulation von L-ThDP im *steady state* verantwortlich sein. Allerdings wurden bereits eine Reihe von PDC-Varianten (D27E, H113K, E473Q) charakterisiert, in denen die Protonierung des Carbanion augenscheinlich stark beeinträchtigt war (Akkumulation von HE-ThDP in der Intermediatanalyse). Bei keiner dieser Varianten konnten jedoch Spuren von L-ThDP nachgewiesen werden. Es ist nicht einfach zu erklären, warum in E473D die beeinträchtigte Protonierung des Carbanions zu einer erhöhten Rückreaktion mit CO₂ führen soll, in den anderen Varianten die im Grunde gleiche Störung jedoch ein völlig andersartiges Ergebnis liefert. Demnach scheint es unwahrscheinlich, dass die interne Rückkehr des CO₂ hauptsächlich für die geringe Decarboxylierungsrate in *ZmPDC* E473D verantwortlich ist.

3.2.2.2 Vergleich der Funktionen von Glu 483 in *LpPOX* und Glu 473 in *ZmPDC*

Interessant ist ein direkter Vergleich der Glu473-Varianten in *ZmPDC* mit den Glu483-Varianten in *LpPOX*. In *LpPOX*, in der Glu 483 die einzige saure Gruppe im aktiven Zentrum darstellt, ist ein Austausch dieses Restes mit relativ geringem Aktivitätsverlust korreliert. Die Decarboxylierung ist nahezu unbeeinflusst und wird womöglich durch das Vorliegen der hydrophoben Umgebung beschleunigt. Glu 483 scheint allerdings an der Feinabstimmung diverser Reaktionsschritte beteiligt zu sein. In *ZmPDC* dagegen ist Glu 473 sowohl für die Decarboxylierung, als auch für die Protonierung des Carbanions nahezu essentiell. Der primäre Grund dafür ist wahrscheinlich in den unterschiedlichen Schicksalen des post-Decarboxylierungsintermediats zu finden. In *ZmPDC* ist die Protonierung des Carbanion/Enamin obligat. Um hohe Umsatzraten zu gewährleisten und Nebenreaktionen zu verhindern wird in diesem Enzym dieser Schritt über allgemeine Säure-Base-Katalyse beschleunigt. In *LpPOX* ist für die Bildung des Produktes Acetylphosphat dagegen eine Kopplung der Phosphorolyse mit dem radikalischen Elektronentransfer notwendig. Da dieses nach Bildung des HE-ThDP nicht möglich ist, darf in *LpPOX*

keine Protonierung des Carbanion/Enamin stattfinden. Daher fehlen Säure-Base-Katalysatoren weitgehend im aktiven Zentrum des Enzyms und das Glu 483 nimmt eine protonierungs-inkompetente Position ein. In *LpPOX* liegt das post-Decarboxylierungsintermediat in der planaren Enamin-Form vor (Kapitel 3.1.2.3.2). Auch dies könnte zur Vermeidung der Protonierung beitragen, da das sp^3 -hybridisierte Carbanion eine höhere Basizität aufweisen sollte, als das sp^2 -hybridisierte Enamin. Der Elektronentransfer vom Enamin zum FAD muss ausserdem mit der unspezifischen Protonierung (z.B. durch Wasser) kompetieren. Glu 483 sorgt in *LpPOX* für einen effizienten Ablauf dieser Reaktion indem es das am Elektronentransfer beteiligte Phosphat optimal ausrichtet. In *ZmPDC* ist Glu 473 dagegen direkt als Säure-Base-Katalysator für die Protonierung des Carbanions verantwortlich. Beide Reste sorgen also im jeweiligen Enzym für die spezifische Umsetzung des post-Decarboxylierungsintermediats.

3.2.2.3 Spektroskopische Charakterisierung der enzymgebundenen Intermediate L-ThDP und HE-ThDP (Carbanion/Enamin)

3.2.2.3.1 Qualitative Beschreibung der CD-Spektren

Die nahezu vollständige Akkumulation von L-ThDP und HE-ThDP (wahrscheinlich in der nicht-protonierten Form als Carbanion/Enamin) im *steady state* der Varianten E473D und E473Q und deren langsame Umsatzraten eröffneten die Möglichkeit einer detaillierten spektroskopischen Charakterisierung dieser Intermediate im enzymgebundenen Zustand. Dazu wurden sowohl Absorptions- als auch CD-Spektren der Varianten in Ab- und Anwesenheit des Substrates Pyruvat aufgenommen. Dabei sollten zwei grundsätzliche Fragestellungen angegangen werden – lassen sich die Reaktionsintermediate spektroskopisch voneinander unterscheiden und gibt es Hinweise auf das Vorliegen der iminotautomeren Form dieser Intermediate. In Modellstudien konnte gezeigt werden, dass die iminotautomere Form einer Aminopyrimidinium-Modellsubstanz ein Absorptionssignal bei etwa 300 nm aufweist (Jordan *et al.* 2002). Das Vorliegen eines entsprechenden spektroskopischen Signals in ThDP-abhängigen Enzymen wurde als Indiz für die Bildung der iminotautomeren Form gewertet (Jordan 2003,

Jordan und Nemeria 2005, Nemeria *et al.* 2007b). Insbesondere für tetrahedrale Intermediate (wie L-ThDP) wurde aus Untersuchungen mit substratanalogen Verbindungen das Vorliegen dieser Form postuliert (Nemeria *et al.* 2004). Weitere, die Imino-Theorie unterstützende, Ergebnisse wurden kürzlich erbracht, als gezeigt wurde, dass die CD-Signale abhängig vom pH-Wert sind (Nemeria *et al.* 2007a). Dies zeigt, dass die entsprechenden Signale tatsächlich mit Protonierungsgleichgewichten am ThDP assoziiert sind. Mit Hilfe der Glu473-Varianten sollte überprüft werden, inwiefern für die enzymgebundenen Intermediate HE-ThDP (Carbanion) und L-ThDP das Vorliegen der Iminoform nachgewiesen werden kann.

Da Pyruvat in dem Wellenlängenbereich absorbiert, in dem Signale der Intermediate vermutet werden, musste auf Differenz-Absorptionsspektren zurückgegriffen werden. Dabei ist wichtig, dass im Zeitraum der Spektrenaufnahme nahezu kein Substratverbrauch auftritt. Dieses wurde durch die geringen Umsatzraten der verwendeten Varianten gewährleistet. Abbildung 3.19 zeigt die Differenz-Absorptionsspektren von L-ThDP (in ZmPDC E473D) und HE-ThDP (in ZmPDC E473Q). Das Absorptionsspektrum von enzymgebundenem HE-ThDP wurde bereits 2002 von einer anderen Arbeitsgruppe publiziert (Jordan *et al.* 2002). Die Spektren,

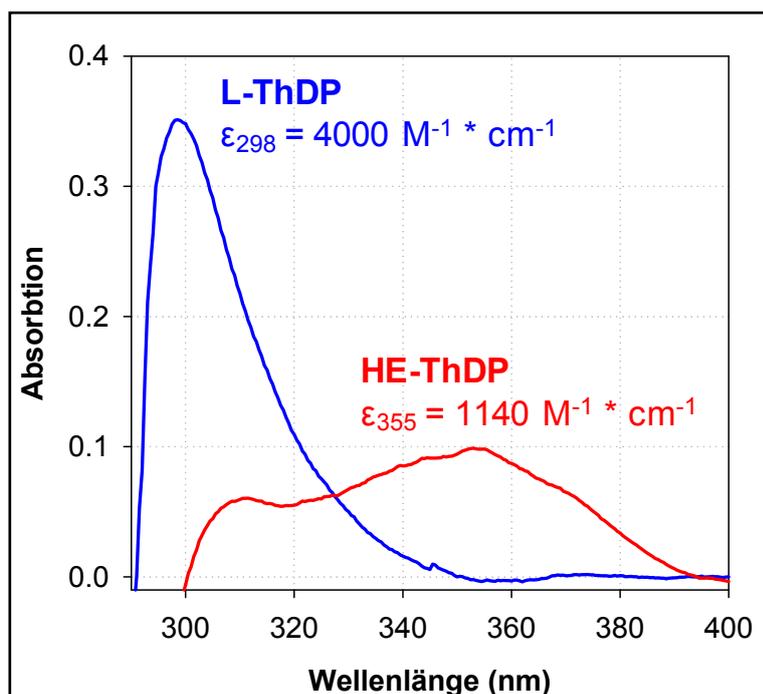


Abb. 3.19: Differenzabsorptionsspektren von L-ThDP und HE-ThDP (Carbanion/Enamin) in ZmPDC E473D und E473Q, 5,25 mg/ml der entsprechenden Variante wurden bei 30 °C mit 10 mM Pyruvat inkubiert und Spektren am Jasco V-560 aufgenommen. Die erhaltenen Spektren wurden um die Protein-, Puffer- und Pyruvat-Signale korrigiert. Die verbliebenen Signale der Intermediate blieben für mehrere Minuten konstant (Vergleich Abb. A4 im Anhang), bevor die Intensitäten auf Grund des Pyruvatverbrauchs abnahmen.

welche damals nach Zugabe von Pyruvat zu ScPDC E477Q (der zu ZmPDC E473Q analogen Variante) erhalten wurden, zeigten wie in ZmPDC E473Q zwei Signale bei etwa 310 und 350 nm. Ohne auf die Daten der Intermediatanalyse zurückgreifen zu können, postulierten die Autoren korrekt, dass die erhaltenen Spektren mit dem Vorliegen von HE-ThDP korrelieren. Im Spektrum von L-ThDP wird dagegen ein ausgeprägtes Signal bei etwa 300 nm beobachtet. Beide Intermediate sind also spektroskopisch klar zu unterscheiden.

Neben den Absorptionsspektren wurden auch CD-Spektren aufgenommen. Zusätzlich zur Akkumulation des jeweiligen Intermediats bei pH 6 wurden Spektren der Grundzustände bei verschiedenen pH-Werten (pH 6 und pH 8) aufgenommen. Damit sollte untersucht werden, ob die Ausprägungen der einzelnen Banden durch Protonierungsgleichgewichte beeinflusst sind. Im Grundzustand (Enzym + ThDP) treten vier Banden im Bereich zwischen 260 und 400 nm auf (Abb. 3.20). Diese Banden können dem Kofaktor zugeordnet werden, da sie im Apoenzym nicht detektierbar sind (Killenberg-Jabs *et al.* 1997). Alle Signale können sowohl im Wt, als auch in den beiden Glu473-Varianten detektiert werden. Nach Zugabe von Pyruvat zu den Varianten und der Akkumulation der jeweiligen Reaktionsintermediate können einige gravierende Änderungen beobachtet werden.

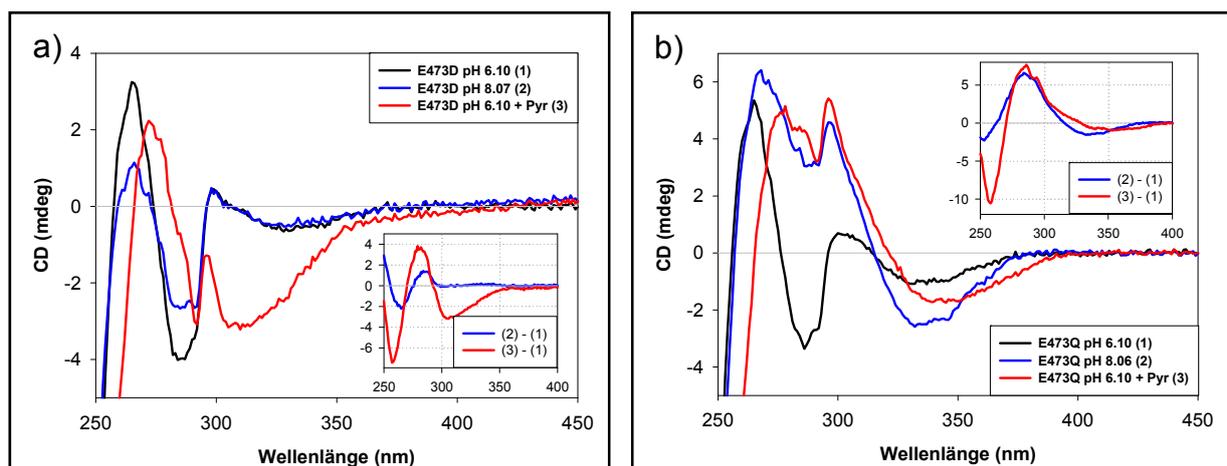


Abb. 3.20: CD-Spektren von ZmPDC E473D und E473Q bei verschiedenen pH-Werten und in Komplex mit Intermediaten, a) Spektren von 0,51 mg/ml ZmPDC E473D. b) Spektren von 0,45 mg/ml ZmPDC E473Q. Die Spektren der Intermediate wurden bei 4 °C, alle anderen bei 20 °C aufgenommen. Im *inset* sind Differenzspektren nach Abzug der Spektren im Grundzustand bei pH 6,0 gezeigt. Für die Intermediatspektren wurden die Enzyme mit 10 mM Pyruvat inkubiert.

Die langwellige Bande⁹ bei 330 nm verschiebt sich in E473Q (HE-ThDP) auf etwa 350 nm und entspricht somit dem Signal, welches auch im Absorptionsspektrum beobachtet wird. In E473D (L-ThDP) wird allerdings eine Verschiebung in den kurzwelligen Bereich beobachtet (auf etwa 310 nm, entsprechend dem Absorptionssignal). Die Intensität des Signals wird zusätzlich stark erhöht. Die Lage dieser Bande scheint also vom Substituenten am C2 des Thiazoliumringes abzuhängen. Eine Erhöhung des pH-Wertes von 6 auf 8 bedingt keine Änderung dieses Signales in *ZmPDC* Wt (siehe Abb. A6) und E473D. Dagegen kommt es zu einer starken Intensitätserhöhung (aber keiner Positionsänderung) in *ZmPDC* E473Q (Vergleich Abb. A6 im Anhang).

Schwieriger gestaltet sich die Analyse des Bereiches um 280 nm. Vor allem die augenscheinliche Überlagerung mehrerer Signale in diesem Bereich lässt eine genaue Interpretation hoffnungslos erscheinen. Im Grundzustand wird eine negative Bande bei 290 nm beobachtet, welche von zwei positiven bei 260 und 300 nm flankiert wird. In E473Q erscheint nach Zugabe von Pyruvat (HE-ThDP) ein breites, positives Signal im Wellenlängenbereich von 270 bis 310 nm. Das negative Signal scheint verschwunden zu sein. Allerdings weist der Einschnitt am Peak bei 290 nm darauf hin, dass dieses Signal nicht vollkommen verschwunden, sondern lediglich stark überlagert ist. Das Signal bei 300 nm kann ebenfalls als Schulter auf dem breiten Peak wiedergefunden werden. Erstaunlicherweise wird nahezu das gleiche Bild erhalten, wenn ein Spektrum der Variante in Abwesenheit von Pyruvat bei erhöhtem pH aufgenommen wird.

In E473D wird dagegen nach Zugabe des Substrats (Bildung von L-ThDP) kein ausgeprägtes positives Signal unterhalb 300 nm erhalten. Das negative Signal bei 290 nm nimmt scheinbar leicht ab und wird von der verschobenen 330-nm-Bande überlagert. Merkwürdigerweise unterscheidet sich das Spektrum dieser Variante bei pH 8 gravierend von dem entsprechenden Spektrum von E473Q. Die pH-Verschiebung hat nahezu keinen Einfluss auf den Wellenlängenbereich oberhalb 300 nm und führt lediglich zu einer leichten Abnahme des Signals bei 290 nm (das gleiche Bild ergibt sich für Wt, siehe Abb. A6). Auch in E473D ist die schmale Bande

⁹ Auch in den Absorptionsspektren konnte in Abwesenheit von Pyruvat in allen drei Enzymen ein schwaches Signal bei etwa 320 bis 350 nm detektiert werden.

bei 300 nm in allen Spektren zu erkennen. Nach Bindung des Substratanalogons AcPho werden die selben spektroskopischen Änderungen induziert, wie bei Vorlage von L-ThDP (Abb. A5 im Anhang). Leider konnte keine Bindung dieser Substanz an E473Q beobachtet werden. Damit wäre die Möglichkeit gegeben gewesen, die Spektren eines prä- und post-Decarboxylierungsintermediats in der gleichen elektronischen Umgebung zu vergleichen.

Die spektralen Änderungen im Bereich unter 270 nm könnten auf Änderungen der Sekundärstruktur zurückzuführen sein. Auf Grund der Nähe zum Indikationsbereich für Sekundärstrukturelemente können kleine Änderungen in diesem Bereich bereits große Auswirkungen auf die Bandenlagen haben¹⁰. Dass solche Änderungen bei Substratbindung tatsächlich vorliegen, kann bereits aus dem Vergleich der Spektren mit und ohne Pyruvat in E473Q gefolgert werden. So wird beispielsweise bei Zugabe von Pyruvat zu E473Q eine bathochrome Verschiebung der 270-nm-Bande beobachtet, wohingegen die pH-Änderung bei ansonsten gleichen spektroskopischen Änderungen in diesem Wellenlängenbereich keine solche Verschiebung induziert. Leider wurden keine Spektren der Varianten mit gebundenen Intermediaten im Fern-UV-Bereich aufgenommen. Damit hätten Kenntnisse über mögliche konformationelle Änderungen während der Katalyse gewonnen werden können. Dass solche Änderungen ablaufen müssen ist aus der Kristallstruktur des Enzyms ersichtlich (Dobritzsch *et al.* 1998). In dieser Struktur ist das aktive Zentrum durch einen *loop* verschlossen. Um die Bindung des Substrats zu gewährleisten, muss es demnach zu einer Öffnung des aktiven Zentrums kommen.

3.2.2.3.2 Ein Versuch der Bandenzuordnung

In diesem Teil soll ein Versuch der Bandenzuordnung erfolgen. Dieser ist allerdings insbesondere für den Spektralbereich unterhalb 300 nm auf Grund der Komplexität des Bandenmusters und teilweisen Widersprüchlichkeit in hohem Maße spekulativ, und daher nur als Vorschlag zu bewerten.

¹⁰ Zum Vergleich beträgt die Elliptizität bei 240 nm in den Spektren etwa -80 mdeg!

Die Lage der Bande bei 330 nm scheint vom Substituenten am C2 abhängig zu sein. Im Grundzustand (Substituent = Proton, pH = 6) ist diese Bande sowohl im Wt, als auch in den Varianten relativ schwach ausgeprägt. Sie unterliegt einer bathochromen Verschiebung in HE-ThDP und einer hypsochromen in L-ThDP. Außerdem nimmt ihre Intensität in E473Q mit steigendem pH zu. Nemeria *et al.* konnten einen ähnlichen Effekt bei der pH-Titration von *PfBAL* finden (Nemeria *et al.* 2007a). Sie ordneten dieses Signal der AP-Form des Kofaktors zu. Bei niedrigem pH sollte die protonierte Form (APH⁺) dominieren, für welche kein Signal gefunden wurde. Durch Erhöhung der Hydroxidionenkonzentration wird die Bildung der deprotonierten AP-Form induziert und es kommt zur Ausprägung eines Signals bei etwa 330 nm. Dieses könnte auch in *ZmPDC* E473Q stattfinden, da eine Erhöhung des pH-Wertes mit einer Intensitätssteigerung des Signals einhergeht. Die Erhöhung der Bandenintensität bei Vorlage eines Intermediats würde auf eine substratinduzierte Verschiebung des Protonierungszustandes hinweisen. Asztalos konnte außerdem durch Titrationsexperimente mit kofaktoranalogen Verbindungen zeigen, dass ein Signal bei etwa 320 nm in Transketolase nur beobachtet werden kann, solange eine Aminogruppe am Aminopyrimidinring des Kofaktors vorliegt (Asztalos 2008). Dies spricht dafür, dass die 330-nm-Bande der Aminopyrimidinkomponente des Kofaktors zuzuordnen ist. Ihre genaue Lage wird aber zusätzlich durch den Substituenten am C2 des Thiazoliumrings moduliert. Daraus könnte geschlossen werden, dass dieses Signal letztlich auf einem *charge-transfer*-Komplex zwischen den beiden Ringsystemen des Kofaktors beruht. Der Aminopyrimidinring liegt dabei womöglich in der deprotonierten AP-Form vor. Allerdings ist unklar, warum in E473Q bei Erhöhung des pH eine starke Intensitätssteigerung dieser Bande zu beobachten ist, in Wt und E473D dagegen nicht. Möglicherweise haben diverse Aminosäurereste ebenfalls einen Einfluss auf Bandenlage und -intensität (z.B. *quench*-Effekte durch Carboxylatgruppen), was eine genaue Zuordnung verkompliziert. Jordan und Mitarbeiter postulierten, dass die Bande bei 320 nm in PDH indikativ für das Vorliegen des Michaelis-Komplexes sei (Nemeria *et al.* 2004). Zumindest für PDC und TK ist diese Bande aber nicht streng mit dem Vorliegen eines solchen Komplexes korreliert, da sie ja bereits in Abwesenheit von Substrat beobachtet werden kann. Allerdings ist dennoch denkbar, dass auch der Michaelis-Komplex in PDH ähnlich wie die hier gezeigten Intermediate L-ThDP und HE-ThDP eine Modulation von Bandenlage und -intensität bewirkt.

Der Bereich unterhalb 300 nm ist auf Grund des komplexen Bandenmusters schwieriger auswertbar. Zunächst gilt es die tatsächlich beobachteten spektroskopischen Prozesse aus den Spektren zu extrahieren. Dafür wurden Differenzspektren und simulierte Spektren herangezogen (siehe Abb. A7 im Anhang). Obwohl die Originalspektren in Anwesenheit von L-ThDP und HE-ThDP in diesem Bereich völlig unterschiedlich aussehen, ist aus den Differenzspektren zu erkennen, dass im Grunde ähnliche Änderungen vorliegen (*inset* in Abb. A7). In beiden Varianten wird die Bildung eines ausgeprägten Signals bei 285 nm beobachtet (bzw. die Abnahme eines Signals mit negativem Vorzeichen). Dies ist allerdings in E473D (L-ThDP) nicht sofort ersichtlich, da dort das positive Signal durch das negative Signal bei 310 nm überlagert wird. Bemerkenswert ist der Befund, dass das Maximum im Differenzspektrum mit dem beobachteten Minimum in den Originalspektren ohne Pyruvat bei pH 6 zusammenfällt. Eine kritischer Vergleich der Spektren in Kombination mit den Simulationsversuchen führt zu folgendem Interpretationsvorschlag:

- Die in den Grundzuständen beobachteten drei Signale resultieren aus der Überlagerung von zwei tatsächlich vorliegenden Signalen: ein breites positives im Bereich von 260 bis 310 nm und ein schmaleres negatives im Bereich von ca 270 bis 300 nm.
- Das Vorliegen eines Intermediats (L-ThDP oder HE-ThDP) führt zu einer starken Intensitätsverringering der negativen Bande bei 285 nm. Dies führt zu einer Demaskierung der breiten positiven Bande, was besonders gut in E473Q zu beobachten ist.
- In E473D (L-ThDP) wird dieses positive Signal dagegen erneut durch ein starkes negatives bei 310 nm überlagert. Dieses Signal ist wie oben erwähnt wahrscheinlich der durch den Laktyl-Rest modifizierten *charge-transfer*-Bande zuzuordnen.

Demnach wird also sowohl bei Vorliegen von HE-ThDP als auch von L-ThDP lediglich eine spektroskopische Änderung unterhalb 300 nm induziert – die Abnahme

des negativen Signals bei 285 nm. Ein Vergleich der Spektren bei pH 6 und pH 8 zeigt, dass die Ausprägung des Signals außerdem vom Protonierungsgrad des Kofaktors abhängig ist. Prinzipiell treten drei Protonierungszustände des Kofaktors auf (Abb. 1.4). Die APH⁺-Form sollte bei niedrigen, die AP und IP-Formen (welche ein Tautomerenpaar bilden) bei höheren pH-Werten vorliegen. Da das negative CD-Signal bei 285 nm mit steigendem pH-Wert an Intensität verliert, stammt es also wahrscheinlich nicht von der IP-Form. Nur eine Zuordnung zur APH⁺-Form wäre mit der beobachteten pH-Abhängigkeit konform. Dieser Kofaktorspezies wurde bislang noch kein spektroskopisches Signal zugeordnet. Die erhaltenen CD-Spektren der Varianten bei pH 6, pH 8 und in Anwesenheit des jeweiligen Intermediats könnten demnach folgendermaßen erklärt werden:

- Im Grundzustand befindet sich der Kofaktor vorwiegend in der APH⁺-Form (negatives Signal bei 285 nm). Eine Erhöhung des pH-Wertes hat eine Verschiebung des Protonierungsgleichgewichtes zugunsten des Tautomerenpaares AP/IP zufolge (Abnahme der negativen Bande bei 285 nm, Zunahme der AP-charge-transfer-Bande bei 330 nm in E473Q).
- In *ZmPDC* Wt und E473D ist der entsprechende p*K*_a größer, als in E473Q. Daher kann in E473Q (p*K*_a etwa im Bereich von pH 6 bis 8) ein nahezu komplettes Verschwinden der APH⁺-Form beobachtet werden, wohingegen in Wt und E473D (p*K*_a >> 8) selbst bei pH 8 noch ein beträchtlicher Anteil an APH⁺-Form vorliegt. Da der p*K*_a eine entscheidende Rolle bei der Protonierung des N3' während der Aktivierung des Kofaktors ist, wäre eine Untersuchung der H/D-Austauschrate in E473Q interessant. Entsprechend der hier gegebenen Annahmen wird für die Kofaktoraktivierung in dieser Variante eine Störung postuliert. Für E473D konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Schritt nicht beeinflusst ist (Tittmann *et al.* 2003).
- Die Bindung des Substrates bewirkt ebenfalls eine Deprotonierung der APH⁺-Form. Aus mechanistischer Sicht macht dies Sinn, da wie in Abb. 3.18 gezeigt für die Aminogruppe eine Funktion als Säure-Base-Katalysator bei der Protonierung des Substrat-Carbonylsauerstoffs diskutiert wird.

Diese Zuordnung ist allerdings nicht ganz unproblematisch. Zum Einen wäre der hohe pK_a in *ZmPDC* Wt für die Protonierung des Substrates hinderlich. Außerdem haben Nemeria und Jordan kürzlich die durchaus einleuchtende Hypothese aufgestellt, dass in ThDP-abhängigen Enzymen der pK_a des Aminopyrimidinrings im Bereich des pH-Optimums des Enzyms liegt (Der pK_a von ThDP in Wasser wurde bei 4,85 gefunden, Cain *et al.* 1977), um die einfache Interkonversion von AP-, IP- und APH⁺-Form zu gewährleisten (Nemeria *et al.* 2007a). Es ist allerdings vorstellbar, dass der pK_a bei Bindung des Substrates durch Reorganisation von Seitengruppen im aktiven Zentrum von *ZmPDC* abgesenkt wird.

Abschließend sei noch angemerkt, dass die hier vorgeschlagene Zuordnung der CD-Signale keine umfangreiche Neuinterpretation bisheriger Theorien bezüglich der Iminoform (und deren Vorliegen in tetrahedralen Intermediaten) notwendig macht. Die Hauptaussage besteht darin, dass in den *ZmPDC*-Varianten die durch die Substratbindung induzierten spektralen Änderungen unterhalb 300 nm wahrscheinlich nicht durch die Bildung der Iminoform, sondern durch das Verschwinden der APH⁺-Form verursacht werden. Dies schließt natürlich die Bildung der Iminoform nach Zugabe von Substrat nicht aus.

Zusammenfassend scheint die Bildung der Intermediate also lediglich von zwei spektroskopischen Prozessen begleitet zu sein.

- 1) Die Modulation der 330er Bande, welche als Indikationsbereich für den Zustand des Thiazoliumrings betrachtet werden kann (*charge-transfer*-Komplex zwischen AP-Form und Thiazoliumring).
- 2) Einer Verringerung der Intensität der negativen 285er Bande, welche durch die Deprotonierung der APH⁺-Form im Zuge der Substratbindung (Protonierung des Carbonyl-Sauerstoff) verursacht wird.

3.2.3 Untersuchung der Carboligationskompetenz der ZmPDC Variante E473Q

3.2.3.1 Verwendung von Pyruvatdecarboxylasen für Carboligationsreaktionen

Neben der physiologischen Reaktion kann PDC auch Carboligationsreaktionen katalysieren (Abb. 3.21). Dabei können entweder im Sinne einer Acyloinkondensation zwei Aldehyde miteinander oder aber eine α -Ketosäure (nach Decarboxylierung) mit einem Aldehyd ligiert werden. Die dabei entstehenden Acyloine (oder 2-Hydroxyketone) sind für die pharmazeutische Industrie von großer Bedeutung, da sie zwei einfach zu substituierende Gruppen in der Nähe eines chiralen Zentrums aufweisen (Abb. 3.22). Die Ligation von Pyruvat (oder Acetaldehyd) und Benzaldehyd durch PDC wird seit den 1930ern technisch genutzt (Abb. 3.23, Hildebrandt und Klavehn 1932). Das dabei entstehende (*R*)-Phenylacetylcarbinol, oder (*R*)-PAC, stellt die Vorstufe zur Synthese von (-)-Ephedrin und Pseudoephedrin dar. Diese werden unter anderem als Antiasthmatika und bei der Behandlung von schweren Erkältungen eingesetzt (Shukla und Kulkarni 2000).

Für die Synthese von (*R*)-PAC stehen zwei grundsätzliche Strategien zur Verfügung (Rogers *et al.* 1997, Oliver *et al.* 1999). Zum Einen können verschiedene Hefen oder Bakterien fermentiert werden. Nach einer Wachstumsphase, in der Pyruvat in den Zellen akkumuliert wird, wird die Bildung von (*R*)-PAC durch Zugabe von Benzaldehyd induziert. Zum Anderen kann (*R*)-PAC durch gereinigte PDC aus Pyruvat (oder Acetaldehyd) und Benzaldehyd gewonnen werden. Beide Ansätze

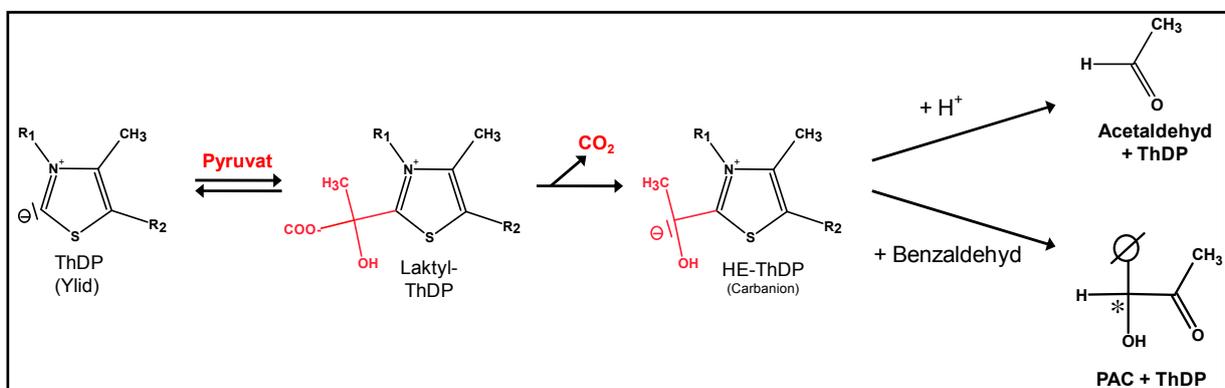


Abb. 3.21: Decarboxylase- und Carboligasereaktion in PDC. Das Carbanion stellt das zentrale Intermediat für beide Reaktionswege dar. Zur Vereinfachung wurde lediglich der Thiazoliumteil des ThDP dargestellt. R₁ = Aminopyrimidin, R₂ = -(CH₂)₂-PP

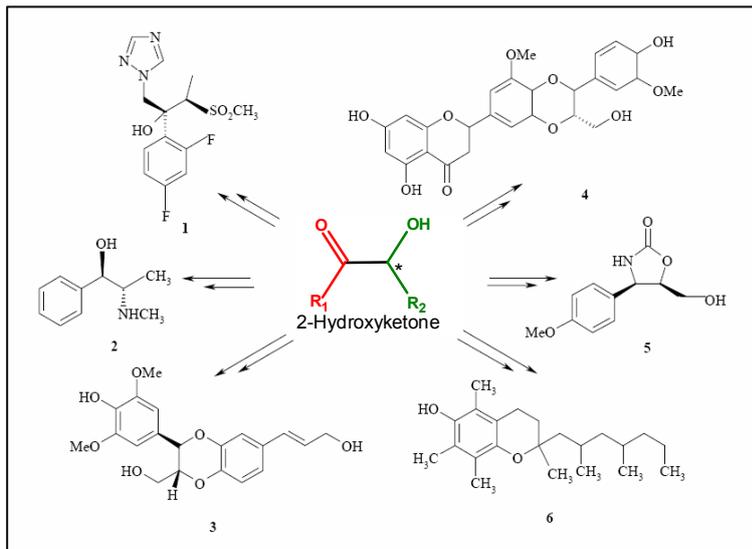


Abb. 3.22: Auswahl einiger aus Acyloinen gewonnener Produkte und deren Verwendung

1: Sch 42427 (Fungizid, AIDS),
 2: Ephedrin (Asthma),
 3: Nitidantin (Lebererkrankungen),
 4: 5-Methoxyhydnocarbin (Inhibitor der MDR-Pumpe),
 5: Cytoxazon (Cytokininhistor, Allergien),
 6: Vitamin E;
 rot: Atome des Donorsubstrats,
 grün: Atome des Akzeptorsubstrats. Abbildung modifiziert nach (Janzen 2002)

weisen Vor- und Nachteile auf und wurden in den letzten 15 Jahren ständig weiterentwickelt. Dabei wurden verschiedene Hefe- und PDC-Stämme hinsichtlich erhöhter PAC-Bildung untersucht, deren Widerstandsfähigkeit gegenüber den Substraten und Produkten verbessert, Fermentationsparameter optimiert und die Bildung von Nebenprodukten wie Acetoin, Benzylalkohol und dem PAC-diol minimiert (Rogers *et al.* 1997, Oliver *et al.* 1999, Shukla und Kulkarni 2000, Sandford *et al.* 2005, Gunawan *et al.* 2007 und 2008). Vor allem ZmPDC konnte mittels zielgerichteter Mutagenese verbessert werden. Sie eignet sich durch ihre hohe Stabilität und das Fehlen von Substrataktivierungs-Prozessen besonders für technische Anwendungen. Allerdings weist sie im Vergleich zu Enzymen aus Hefen geringere PAC-Bildungsraten auf (Bringer-Meyer und Sahn 1988). Eine mögliche Ursache dafür ist das relativ enge aktive Zentrum, welches die Bindung von Benzaldehyd erschwert.

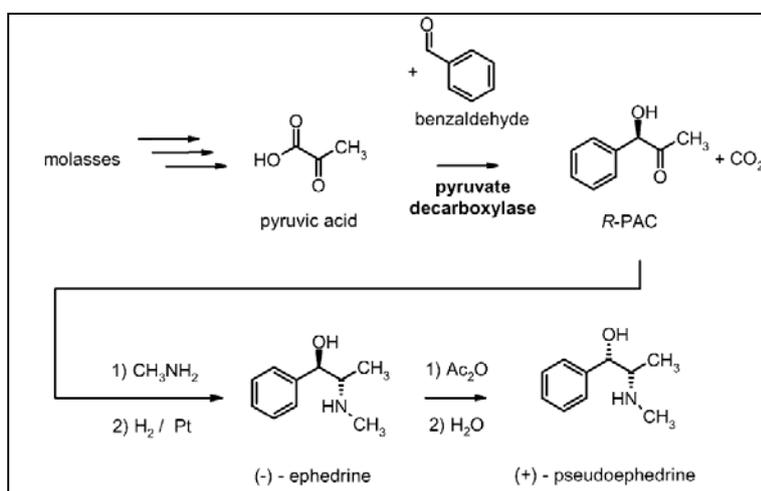


Abb. 3.23: Die biotechnologische Herstellung von (-)-Ephedrin und (+)-Pseudoephedrin

Nach der fermentativen Herstellung von (*R*)-PAC wird dieses durch klassische Chemie aminomethyliert und zu Ephedrin reduziert. Abbildung übernommen aus (Breuer *et al.* 2002)

Durch einen Austausch von Trp 392 konnte das aktive Zentrum vergrößert und die (*R*)-PAC-Bildung verbessert werden (Bruhn *et al.* 1995; Goetz *et al.* 2001). Die aus diesen Mutagenesestudien resultierenden Varianten weisen allerdings noch immer eine hohe Decarboxylaseaktivität auf, so dass bei der Synthese von (*R*)-PAC weiterhin große Mengen an Acetaldehyd und Acetoin als Verunreinigung anfallen.

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersuchte Variante E473Q ist dagegen in der Bildung von Acetaldehyd stark eingeschränkt. Die mechanistische Feinanalyse zeigte, dass die Ursache dafür in einem gestörten Protonenrelaysystem liegt (siehe Kapitel 3.2.2.1). Dadurch wird in dieser Variante die Carbanion-/ Enaminform des HE-ThDP akkumuliert. Dieses reaktive Intermediat stellt den Verzweigungspunkt zwischen Decarboxylierungs- (Protonierung des Carbanion/Enamin) und Carboligationsreaktion (Reaktion mit einem Aldehyd) dar. Sowohl die Akkumulierung des reaktiven Carbanions/Enamins als auch die verminderte Bildung von Acetaldehyd in der Variante E473Q könnten zu einer verbesserten (*R*)-PAC-Bildung aus Pyruvat und Benzaldehyd führen. Im Folgenden wird die (*R*)-PAC-Bildungskompetenz der *ZmPDC* Variante E473Q mit der des Wt verglichen.

3.2.3.2 Abhängigkeit von Geschwindigkeit und Menge der (*R*)-PAC-Bildung von den Substratkonzentrationen – CD-basierter Ansatz zur Ermittlung der Substratoptima

Wie viele andere Enzyme, welche die Bildung von chiralen Verbindungen katalysieren, weisen die Pyruvatdecarboxylasen bei der Synthese von Acyloinen eine Präferenz für eines der möglichen Enantiomere auf. Daher stellt die CD-Spektroskopie eine geeignete Methode zur kinetischen Analyse dieser Reaktionen dar. Zur Bestimmung der für die (*R*)-PAC Synthese optimalen Substratkonzentrationen wurden sowohl die Geschwindigkeiten der Signalbildung, als auch die erreichten Endwerte unter Variation der Pyruvat- und Benzaldehydkonzentration ermittelt (Abb. 3.24). Bei der Umsetzung von Pyruvat und Benzaldehyd können theoretisch fünf chirale Produkte – Acetoin, Acetolaktat, Phenylacetylcarbinol, 2-Hydroxypropiophenon und Benzoin – erhalten werden. Durch

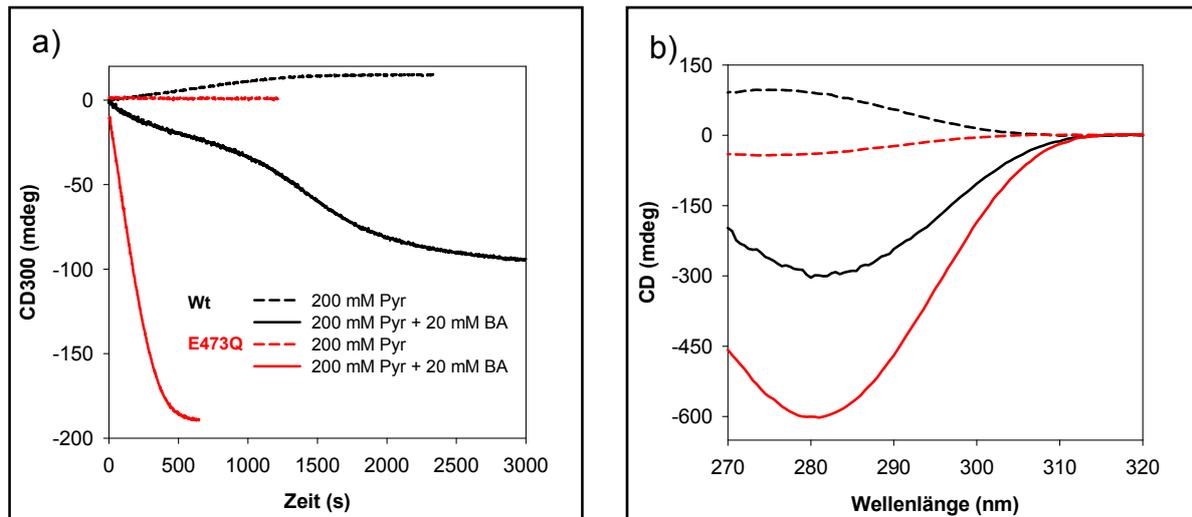


Abb. 3.24: Vergleich der Acetoin- und PAC-Bildung in *ZmPDC* Wt und E473Q, a) Kinetiken der Produktbildung bei 300 nm. b) Produktspektren am Ende der Reaktion. Die Legende in a) gilt für beide Abbildungen. Bedingungen wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben

ZmPDC werden allerdings lediglich Acetoin ($\Theta_{\max} = 276$ nm) und PAC ($\Theta_{\max} = 282$ nm) gebildet. Auf Grund der starken Absorption der Substrate und des Enzymes bei 280 nm, wurden die Kinetiken bei 300 nm aufgenommen. Bei dieser Wellenlänge geben beide möglichen Produkte ein CD-Signal. In Kontrollexperimenten wurde zunächst die Stärke des CD-Signales bei der Synthese von Acetoin in Abwesenheit von Benzaldehyd ermittelt (Abb. 3.24). Dabei wird durch *ZmPDC* Wt das (*S*)-Enantiomer ($ee = 23$ %) und durch E473Q das (*R*)-Enantiomer ($ee = 33$ %) gebildet. Die Bedeutung dieser Produktverschiebung ist allerdings gering, da sie bereits durch kleine Änderungen der Bindungsenergien hervorgerufen werden kann. Für die Produktion von enantiomerenreinen Substanzen sollten ee -Werte von mindestens 80 % erreicht werden. In der Variante E473Q konnte selbst bei den höchsten eingesetzten Pyruvatkonzentrationen (200 mM) unter den im CD-Ansatz vorliegenden Reaktionsbedingungen nahezu keine Acetoinbildung beobachtet werden (- 1 mdeg bei 300 nm in 20 min, 1 mm Küvette). Dies führt zu einfachen Progresskurven beim Umsatz von Pyruvat und Benzaldehyd mit einem linearen Teil zu Beginn der Messung. Dieser Teil wurde zur Bestimmung der Geschwindigkeiten der PAC-Bildung herangezogen (Vergleich auch Abb. A8 im Anhang). Durch den Wt werden dagegen in Abwesenheit von Benzaldehyd große Mengen an Acetoin gebildet (+ 15 mdeg Signal bei 200 mM Pyruvat). Beim Umsatz von Pyruvat und Benzaldehyd entstehen demnach zwei Produkte. Dabei gibt (*S*)-Acetoin ein positives und (*R*)-PAC ein negatives Signal. Dies führt zur Ausprägung komplexerer Progresskurven vor allem bei hohen Pyruvatkonzentrationen (Abb. A8). Aus diesen

Progresskurven wurden nicht die Initial- sondern die Maximalgeschwindigkeiten für die Ermittlung des Substratoptimums herangezogen. Die Signalbildung bei 300 nm kann in den Wt-Ansätzen nicht allein der (*R*)-PAC-Bildung zugeschrieben werden. Sie stellt jedoch eine einfache und schnelle Methode zur Ermittlung der PAC-Bildungskompetenz dar (eine Fehlerabschätzung findet sich in Kapitel 2.6.1). Die ermittelten Parameter der Produktbildung sind in Abb. 3.25 miteinander verglichen. Sowohl die Geschwindigkeit (Abb. 3.25a), als auch der Endwert (Abb. 3.25b) der (*R*)-PAC-Bildung unter den jeweils optimalen Bedingungen ist in der Variante im Vergleich zum Wt etwa 3fach erhöht. Das Substratoptimum für die Geschwindigkeit der (*R*)-PAC-Bildung liegt im Wt bei hohen Benzaldehyd- und niedrigen Pyruvatkonzentrationen (- 10 mdeg/min bei 60 mM Pyruvat, 60 mM Benzaldehyd) da dort die Synthese von Acetoin unterdrückt wird. Die Variante E473Q arbeitet dagegen bei hohen Pyruvat- und moderaten Benzaldehydkonzentrationen mit maximaler Geschwindigkeit (- 33 mdeg/min bei 200 mM Pyruvat, 20 mM Benzaldehyd). Das niedrigere Benzaldehyd-Optimum der Variante stellt aus prozesstechnischer Sicht einen Vorteil dar, da die *ZmPDC* bei länger andauernden Fermentationen durch hohe Benzaldehydkonzentrationen inaktiviert wird. Der inhibierende Effekt von Benzaldehyd wird auch in den Ansätzen der Variante E473Q sichtbar (Abb. 3.25a). Die aus den CD-Kinetiken ermittelten spezifischen Aktivitäten für die PAC-Bildung betragen 0,74 U/mg für den Wt (entspricht 0,5 % der Decarboxylaseaktivität) und 2,57 U/mg für die Variante (entspricht 1700 % der Decarboxylaseaktivität).

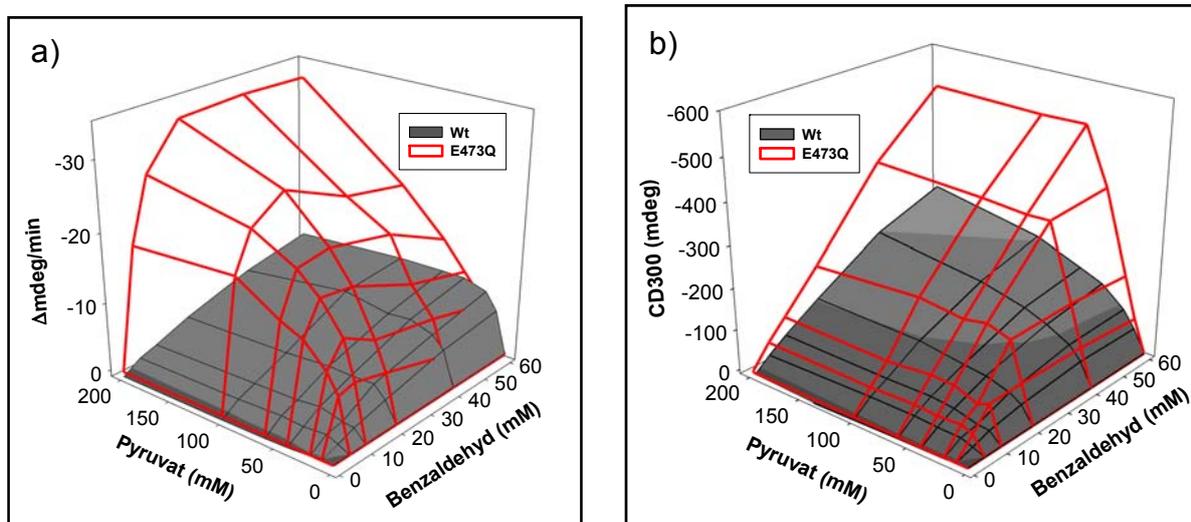


Abb. 3.25: Substratoptima der (*R*)-PAC-Bildung in *ZmPDC* Wt und E473Q, a) Maximale Geschwindigkeiten der Signalbildung bei 300 nm. b) Endwerte der Reaktionen bei 300 nm. Erklärungen siehe Text.

3.2.3.3 Produktverteilung

Neben der Geschwindigkeit der (*R*)-PAC-Bildung und der erhaltenen Produktmenge stellt die Produktreinheit ein weiteres wichtiges Kriterium für die Beurteilung der Variante dar. Ein möglichst vollständiger Umsatz der Substrate (Benzaldehyd, Pyruvat) und die Vermeidung von Nebenprodukten (Acetaldehyd, Acetoin) sind entscheidende Faktoren um hohe Ausbeuten zu erzielen und den nachfolgenden Reinigungsaufwand gering zu halten. Mit Hilfe des CD-basierten Ansatzes können lediglich indirekt Aussagen über den Substratumsatz und die Produktverteilung gewonnen werden. Die ¹H-NMR stellt hierfür die ideale Methode dar, da sie die simultane Detektion aller vorliegenden Substrate und Produkte erlaubt. Die Produktverteilung wurde bei verschiedenen strategischen Substratkombinationen ermittelt :

8 mM Pyruvat / 8 mM Benzaldehyd	(äquimolare Substratkonzentrationen)
20 mM Pyruvat / 20 mM Benzaldehyd	(äquimolare Substratkonzentrationen)
20 mM Pyruvat / 60 mM Benzaldehyd	(Optimum des Wt)
100 mM Pyruvat / 20 mM Benzaldehyd	(Optimum der Variante E473Q)

Die Umsetzungen erfolgten direkt im NMR-Probenröhrchen und konnten somit nach verschiedenen Zeitpunkten überprüft werden. Dabei wurde deutlich, dass das Wt-Enzym Pyruvat in wenigen Minuten vollständig decarboxyliert (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend wird im Wt-Ansatz Acetaldehyd, und nicht Pyruvat, mit Benzaldehyd ligiert. In Abbildung 3.26 sind die ¹H-NMR-Spektren zu Beginn und am Ende der Umsetzung von jeweils 8 mM Substrat durch *ZmPDC* Wt exemplarisch dargestellt. Anhand dieser Spektren werden die beiden hauptsächlichen Probleme bei der PAC-Bildung durch *ZmPDC* Wt deutlich. Zum Einen werden neben PAC auch beträchtliche Mengen an Acetaldehyd und Acetoin gebildet. Zum Anderen bedingt der Verbrauch von Pyruvat für die Bildung dieser unerwünschten Produkte eine unvollständige Umsetzung des zweiten Substrates. Durch eine Erhöhung des Verhältnisses von Pyruvat zu Benzaldehyd konnte zwar eine bessere Ausbeute bezüglich des Benzaldehyds erreicht werden, allerdings stieg damit auch die Menge an Nebenprodukten stark an (Daten nicht gezeigt). Die Variante E473Q zeigt ein

vollkommen verändertes Verhalten bei der Umsetzung von Benzaldehyd und Pyruvat. So kann keine Bildung von Acetaldehyd (und Acetoin) beobachtet werden, solange noch beide Substrate im Ansatz vorliegen. Daher wird von der Variante direkt die Kondensation des aus Pyruvat gebildeten HE-ThDP mit Benzaldehyd katalysiert. In Abbildung 3.26 wird die Überlegenheit der Variante bezüglich der PAC-Bildung besonders deutlich. Bei äquimolarem Einsatz beider Substrate wird bei vollständigem Substratverbrauch nahezu ausschliesslich PAC als Produkt gebildet. Die Ausbeute dieser Reaktion beträgt also 100 %. Die Messung unter den über den CD-basierten Ansatz ermittelten optimalen Bedingungen führte zwar zu einer Erhöhung der initialen PAC-Bildungsgeschwindigkeit. Allerdings konnte in diesem Ansatz auch die Bildung von Acetoin detektiert werden. Demnach wäre für eine potentielle technische Anwendung der Einsatz äquimolarer Substratkonzentrationen optimal.

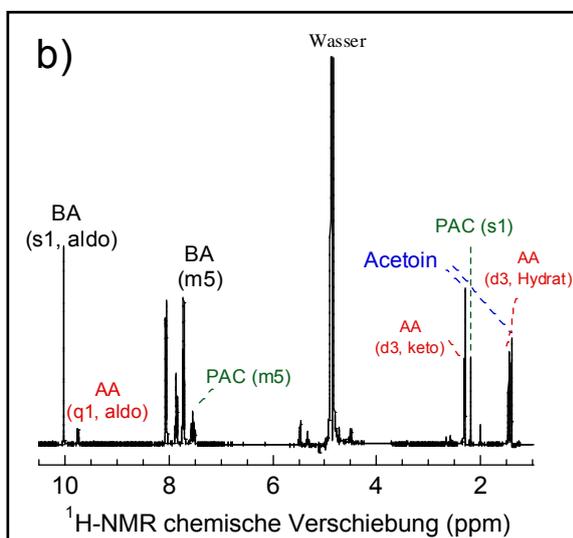
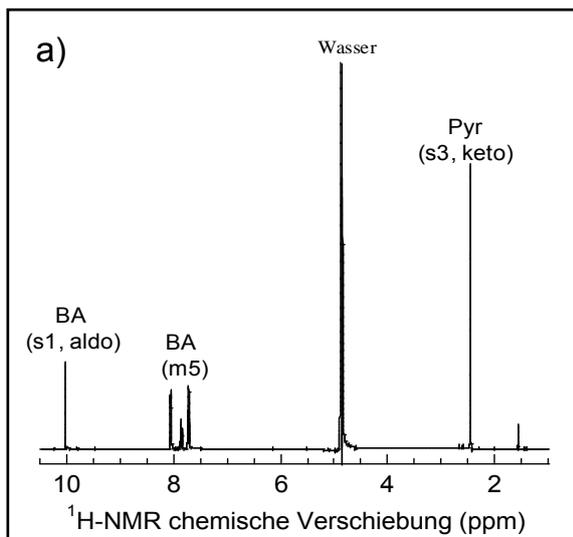


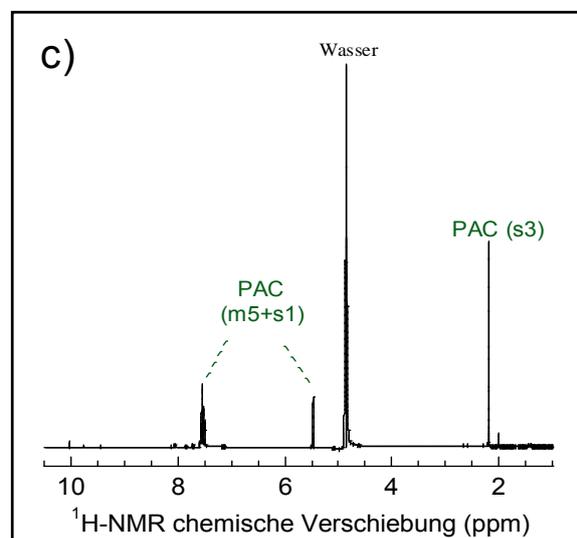
Abb. 3.26 Produktverteilung bei der (*R*)-PAC-Bildung durch ZmPDC Wt und E473Q,

a) Spektrum des Ansatzes (siehe Kapitel 2.6.2) mit 8 mM BA und 8 mM Pyr ohne Enzym.

b) Produktspektrum nach 60 min Inkubation mit ZmPDC Wt.

c) Produktspektrum nach 60 min Inkubation mit ZmPDC E473Q.

BA = Benzaldehyd, AA = Acetaldehyd; Pyr = Pyruvat, s = Singulett, d = Duplett, q = Quartett, m = Multipllett, die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der zugehörigen Protonen an.



Die enantiomere Reinheit (*enantiomeric excess*, im folgenden *ee*) der Produkte sollte ebenfalls ermittelt werden. Der *ee* gibt den Überschuss des einen Enantiomeres über das Andere an. So ergibt sich aus einer Enantiomerenverteilung von 90 % (*R*)- und 10 % (*S*)-Form ein *ee* von 80 % für die (*R*)-Form. Zur Bestimmung des *ee* wurden die Enantiomere des PAC mittels chiraler HPLC getrennt und über die Absorption bei 210 nm quantifiziert. Sowohl im Wt als auch in der Variante E473Q wurde (*R*)-PAC nahezu enantiomerenrein gebildet (98,2 % im Wt; 98,4 % in E473Q) (siehe Abb. A9 im Anhang).

3.2.3.4 Alternative durch ZmPDC E473Q katalysierte Carboligationsreaktionen

Nachdem die erhöhte PAC-Bildungskompetenz der Variante E473Q gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, inwiefern diese Variante zur Umsetzung weiterer Substrate befähigt ist. Dazu wurden in einer Kooperation mit PD Dr. Martina Pohl und Geraldine Kolter (Applied Enzyme Technologie, IMET, FZ Jülich) mit Hilfe eines kolorimetrischen Schnelltests („TTC-Test“, Breuer *et al.* 2002) mögliche Substrate identifiziert (Daten nicht gezeigt). Es wurde zum Einen die Länge des Donorsubstrates variiert (Pyruvat, α -Ketobutyrat, α -Ketopentansäure). Zum Anderen wurde der aromatische Ring des Akzeptorsubstrates modifiziert. Vor allem halogenierte Benzaldehyde stellen interessante Substrate dar, da die Halogene nach erfolgter Carboligation durch eine Vielzahl anderer Reste substituiert werden können.

Tab. 3.4: Vergleich der Produktbildung bei verschiedenen Carboligationsreaktionen

Donor	Akzeptor	Produktmenge relativ zum Wt (GC-MS)		ee für (<i>R</i>)-Produkt (chirale HPLC)	
		Wt	E473Q	Wt	E473Q
Pyruvat	Benzaldehyd	1	2,58	98,2 %	98,4 %
Pyruvat	2-Chlor-Benzaldehyd	1	1,88	90,0 %	92,6 %
Pyruvat	3,5-Dichlor-Benzaldehyd	1	6,09	37,0 %	17,0 %
α -Ketobutyrat	Benzaldehyd	1	0,45	98,6 %	n.b.

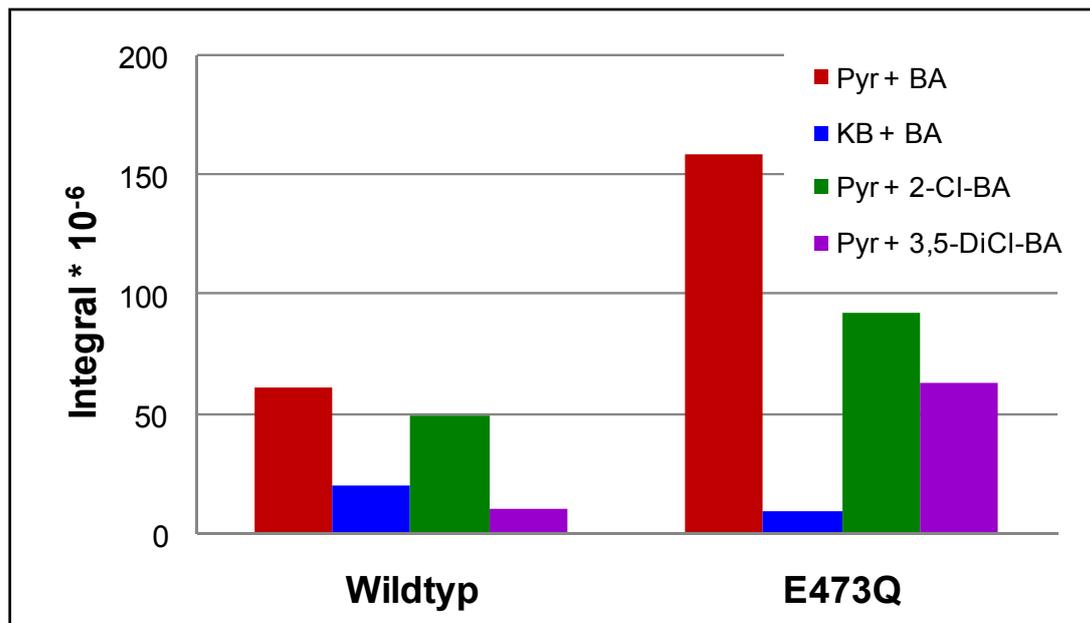


Abb. 3.27: Vergleich der Bildung verschiedener Carboligationsprodukte durch ZmPDC Wt und E473Q. Die Bearbeitung der Proben erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Inkubationszeiten der Ansätze betragen 42 h. Dargestellt sind die Integrale unter den Produktpeaks, welche durch GC-MS erhalten wurden. Auf Grund der unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten bei 210 nm können nur die Signalintensitäten gleicher Produkte miteinander verglichen werden. Pyr = Pyruvat, KB = Ketobutyrat, BA = Benzaldehyd, 2-Cl-BA = 2-Chlor-BA, 3,5-DiCl-BA = 3,5-Dichlor-BA

Die Produktbildung und Enantiomerenreinheit einiger ausgewählter Reaktionen wurde daraufhin in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Michael Müller und Lydia Walter (Pharmazeutische und medizinische Chemie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg) mittels GC-MS und chiraler HPLC bestimmt (Abb. 3.27 und Tab. 3.4). Dabei zeigte sich, dass α -Ketobutyrat bei der Ligation mit Benzaldehyd ein schlechteres Donorsubstrat als Pyruvat darstellt. Der Wt bildet mit diesem Substrat unerwartet mehr Produkt, als die Variante. Die Variante übertrifft dagegen den Wt in der Carboligation von halogenierten Benzaldehyden mit Pyruvat. Allerdings sinkt mit zunehmendem Halogenierungsgrad die enantiomere Reinheit der Produkte (Tab. 3.4 und Abb. A9 im Anhang). Dennoch scheint die Variante E473Q zumindest auch für die Produktion von einfach halogenierten PAC-Derivaten geeignet zu sein.

3.2.3.5 Untersuchung der thermischen Stabilität von ZmPDC Wt und E473Q

In technischen Prozessen müssen Enzyme oft auf einer Zeitskala von Stunden bis Tagen arbeiten um möglichst hohe Ausbeuten zu erzielen. Um dies zu gewährleisten, müssen diese Enzyme über den Reaktionszeitraum stabil und aktiv

bleiben. Wie bereits erwähnt, zeichnet sich die ZmPDC im Vergleich zu vielen Hefe-Enzymen durch eine erhöhte Stabilität aus. Um zu überprüfen, ob diese auch in der Variante gegeben ist, wurden vergleichende Untersuchungen zur thermischen Denaturierung von ZmPDC Wt und E473Q durchgeführt. Die stärkste Signaländerung bei der Entfaltung des Proteines wurde bei 208 nm beobachtet (Abb. 3.28a). Diese Wellenlänge wurde daher zur Detektion des Entfaltungsprozesses in den nachfolgenden Experimenten genutzt. Um eine erste Einschätzung bezüglich der Stabilität der beiden Enzyme zu erhalten, wurden thermisch induzierte Übergangskurven aufgenommen (Abb. 3.28b) und nach Gleichung (10) angepasst. Da die Entfaltung der ZmPDC irreversibel verläuft, kann

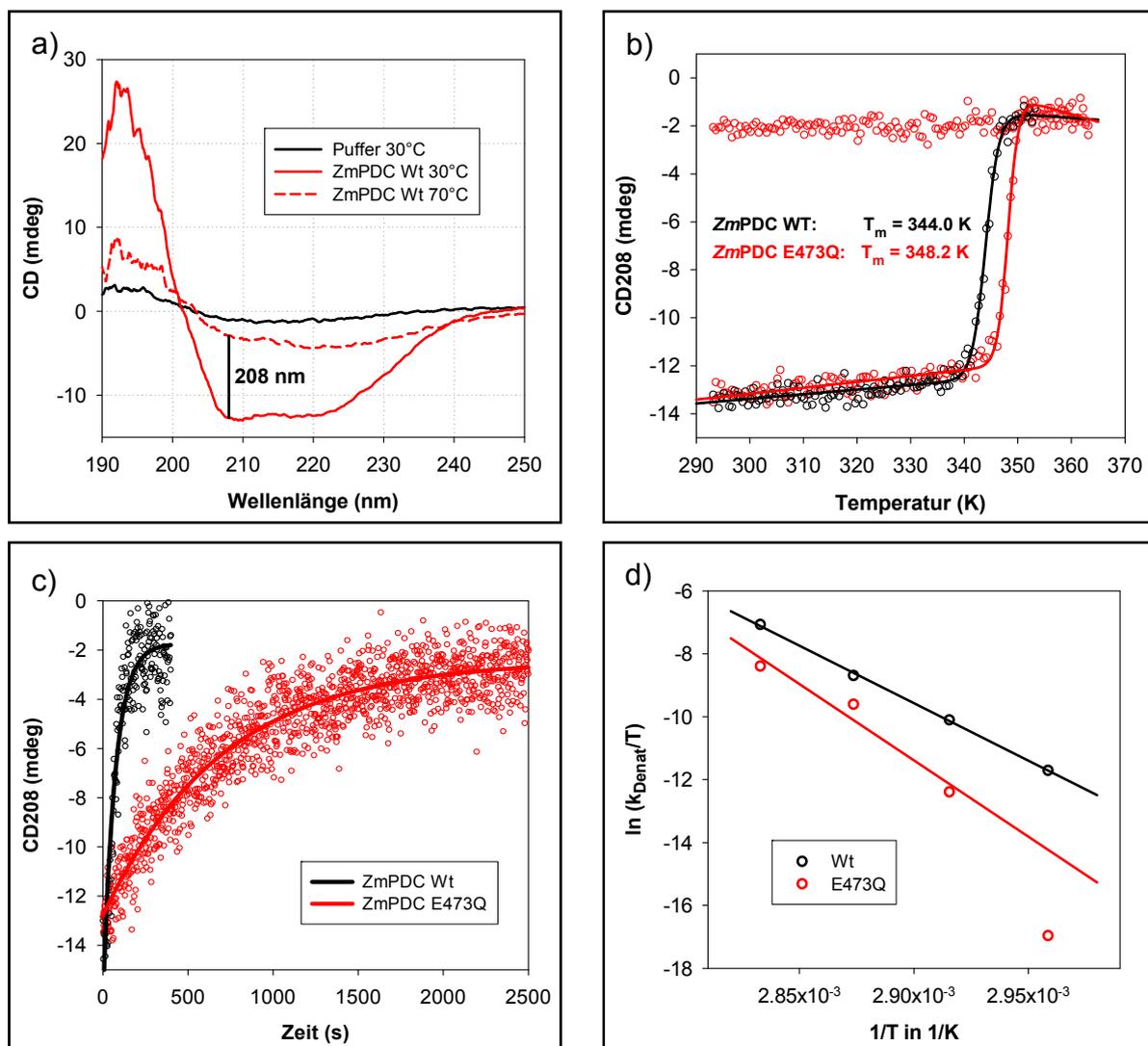


Abb. 3.28: Thermische Entfaltung von ZmPDC Wt und E473Q. a) Fern-UV-CD-Spektren von 0,1 mg/ml Wt. b) Vergleich der thermisch induzierten Übergangskurven von Wt und E473Q. c) Kinetiken der Inaktivierung bei 70 °C. d) Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierung nach Eyring. Für die Anpassung der Variante wurde der Wert für 338 K vernachlässigt, da im Zeitrahmen der Messung nahezu keine Entfaltung beobachtet werden konnte. Die Bedingungen sind in Materialien und Methoden zusammengefasst.

aus diesen Übergangskurven keine tatsächliche Übergangstemperatur berechnet werden. Trotzdem kann die Gleichung verwendet werden, um unter gleichen Bedingungen aufgenommene Übergangskurven von *ZmPDC* Wt und E473Q miteinander zu vergleichen. Der um 4 K erhöhte Mittelpunkt des Übergangs deutet auf eine verbesserte Stabilität der Variante hin. Diese Annahme konnte durch die Messung von Entfaltungskinetiken bestätigt werden (Abb. 3.28c und 3.28d). Die aus den Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung ermittelte thermische Stabilität ist in der Variante E473Q ($\Delta H^* = 403 \pm 8,8$ kJ/mol) im Vergleich zum Wt ($\Delta H^* = 304 \pm 6,6$ kJ/mol) erhöht. Die Ursache für die Stabilitätserhöhung der Variante ist allerdings unbekannt.

3.2.3.6 Zusammenfassung: Die *ZmPDC*-Variante E473Q – eine effiziente Carboligase

Pyruvatdecarboxylasen können die Carboligation von Ketosäuren mit Aldehyden katalysieren. Die Bildung von (*R*)-PAC aus Pyruvat und Benzaldehyd wurde im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit genauer betrachtet. Für diese Reaktion ist die Lebensdauer des Carbanion/Enamines von entscheidender Bedeutung. Dessen Protonierung (und damit einhergehend die Abspaltung von Acetaldehyd) steht in direkter Konkurrenz zur C-C-bindungsbildenden Reaktion (Abb. 3.29). Da die Protonierung im Wildtypenzym äußerst effizient verläuft, stellt die (*R*)-PAC-Bildung in diesem Enzym lediglich eine untergeordnete Nebenreaktion dar. Zusätzlich kommt es durch die schnelle Akkumulation von Acetaldehyd zur Bildung von beträchtlichen Mengen an Acetoin. Im Rahmen der Promotionsarbeit konnte die Beteiligung des Restes Glu 473 an verschiedenen Teilschritten des Katalysezyklus in *ZmPDC* nachgewiesen werden. Ein Austausch dieses Restes zum Glutamin führt zu einer Verringerung der Decarboxylaseaktivität auf 0,1 %. Als Ursache dafür wurde eine Störung des Protonenrelaysystems zur Protonierung des Carbanion/Enamins vorgeschlagen. Es konnte gezeigt werden, dass die dadurch verursachte kinetische Stabilisierung des carboligationskompetenten Intermediates tatsächlich zu einer Erhöhung der Carboligationsgeschwindigkeit von Pyruvat und Benzaldehyd führt. Gleichzeitig ist die Bildung von Nebenprodukten (Acetaldehyd, Acetoin) stark eingeschränkt. Die Variante ermöglicht die Herstellung von nahezu reinem (*R*)-PAC

aus Pyruvat und Benzaldehyd unter vollständigem Substratverbrauch. Die mit halogenierten Benzaldehyden durchgeführten Experimente demonstrieren weiterhin die Möglichkeit zur Produktion von substituierten aromatischen Acyloinen. Außerdem weist die Variante im Vergleich zum Wt eine leicht erhöhte thermische Stabilität auf.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass der gezielte Austausch einer einzigen, für die Hauptreaktion kritischen Aminosäure eine Transformation der ursprünglichen Pyruvatdecarboxylase in eine effiziente Carboligase bewirkte (Abb. 3.29). Eine Kombination dieser mechanistischen Mutante, mit den bereits publizierten sterisch optimierten Trp392-Varianten (Bruhn *et al.* 1995, Goetz *et al.* 2001), könnte zu einer weiteren Verbesserung der Carboligationskompetenz mit aromatischen Aldehyden führen.

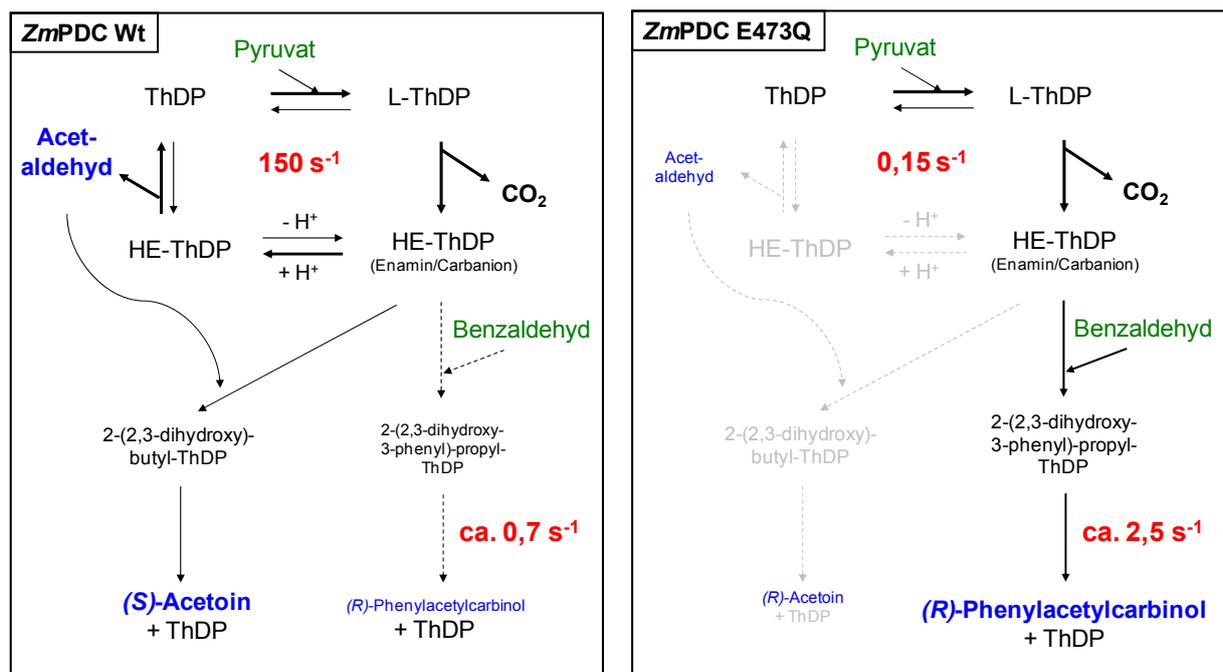


Abb. 3.29: Schematische Darstellung der Umsetzung von Pyruvat und Benzaldehyd durch ZmPDC Wt und E473Q. Während im Wt eine effiziente Decarboxylierung des Pyruvat zu Acetaldehyd gewährleistet wird, wird in E473Q vorwiegend die Carboligase unter Bildung von (R)-PAC katalysiert. Rote Zahlen geben den jeweiligen k_{cat} der Decarboxylierungs- bzw. Carboligasereaktion an.

3.3 Vergleichende Untersuchungen an Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* und Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens*

3.3.1 Einführung

3.3.1.1 Vorkommen und Relevanz von Benzoylformiatdecarboxylase und Benzaldehydlyase

Die Benzoylformiatdecarboxylase (BFDC, EC 4.1.1.7) wurde bisher in *Pseudomonas putida* (Hegemann 1966a und b sowie 1970), *Pseudomonas aeruginosa* (Barrowman *et al.* 1986) und *Acinetobacter calcoaceticus* (Barrowman und Fewson 1985) nachgewiesen. Das Enzym ist Teil des Mandelsäureabbauweges und ermöglicht das Wachstum auf (*R*)-Mandelsäure als einziger Kohlenstoffquelle. Dabei wird diese zu Benzoesäure umgesetzt, welche daraufhin im β -Ketoacidweg und Citratzyklus metabolisiert wird. BFDC katalysiert in einer zu PDC äquivalenten Reaktion die Decarboxylierung von Benzoylformiat (welches aus Mandelat gebildet wurde) zu Benzaldehyd (welches zu Benzoesäure oxidiert wird):



In der vorliegenden Arbeit wurde das Enzym aus *Pseudomonas putida* (*Pp*BFDC) untersucht.

Die Benzaldehydlyase (BAL, EC 4.1.2.38) wurde 1989 in *Pseudomonas fluorescens* Biovar I nachgewiesen (Gonzales und Vicuna 1989). Dieser Stamm wurde aus Holzresten einer Zellulosefabrik isoliert und ist dazu befähigt auf Anisoin oder Benzoin als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen (Gonzales *et al.* 1986). BAL katalysiert die reversible Spaltung von Acyloinen (wie Benzoin oder Anisoin) zu den Aldehyden, die genaue physiologische Bedeutung ist allerdings noch ungewiss. Da Anisoin als Modellsubstanz für Lignin gilt, ist eine Funktion in dessen Metabolismus wahrscheinlich. Der Abbau der sehr heterogenen,

aromatischen Komponenten des Polymers Lignin stellt die beteiligten Organismen vor eine nicht unerhebliche biochemische Herausforderung (Harwood und Parales 1996). Da Lignin etwa 25 % der landgebundenen Biomasse darstellt und in großen Mengen als Nebenprodukt in der Papierindustrie anfällt (ca. 50 Mio Tonnen jährlich weltweit), ist dessen Verwertung auch aus wirtschaftlicher Sicht interessant. Die Isolierung und Entwicklung (*metabolic engineering*) von Mikroorganismen, die zur Herstellung von Biogas oder Bioethanol aus Lignin befähigt sind, ist dabei von besonderem Interesse. BAL könnte dabei eine Schlüsselrolle bei der initialen Spaltung dieses Heteropolymers zukommen.

Beide Enzyme sind in den letzten Jahren intensiv hinsichtlich ihrer Carboligationsfähigkeit untersucht worden (Iding *et al.* 2000, Stillger 2004, Wendorff 2006, Janzen *et al.* 2006). Sowohl BFDC als auch BAL sind zur Bildung von 2-Hydroxypropiophenon (2-HPP) aus Benzaldehyd und Acetaldehyd befähigt. Diese Verbindung ist zu dem durch PDC gebildeten PAC tautomer (siehe Kapitel 3.2.3). Ursache dafür ist, dass BFDC und BAL im Gegensatz zu PDC bevorzugt aromatische Substrate in Donorposition binden. Auf Grund der unterschiedlichen Beschaffenheit der aktiven Zentren katalysiert BAL die Bildung von (*R*)-2-HPP, BFDC die von (*S*)-2-HPP. Durch die Analyse der Kristallstrukturen von BFDC und BAL konnte eine Erklärung für die unterschiedliche Enantioselektivität beider Enzyme gefunden werden (Knoll *et al.* 2006, Gocke *et al.* 2008). Demnach sind vor allem die Aminosäurereste Pro 24, Ala 460 und Leu 461 in BFDC für die (*S*)-Selektivität verantwortlich. Die durch diese Reste gebildete Bindungstasche wurde von den Autoren *S-Pocket* getauft. Wenn BFDC vor allem durch die Bildung von (*S*)-Enantiomeren interessant ist, so besticht BAL dadurch, da es das kompetenteste Enzym für C-C-Bindungsknüpfungen ist. BAL, BFDC und PDC stellen neben einigen anderen ThDP-abhängigen Enzymen den Grundstock für die Etablierung eines Enzyimbaukastens dar (Pohl *et al.* 2002; Pohl *et al.* 2004, Müller und Sprenger 2004). Die unterschiedlichen Eigenschaften der Enzyme hinsichtlich Donor- und Akzeptorsubstratbindung sowie der Enantioselektivität ermöglicht es, aus zwei verschiedenen Aldehyden bei geschickter Wahl von Katalysator und Reaktionsbedingung aus den acht möglichen Produkten das gewünschte 2-Hydroxyketon in hoher Ausbeute zu erhalten. Der zugängliche Produktraum wird durch Mutagenesestudien und die Charakterisierung von neuen Enzymen aus

verschiedenen Quellen ständig erweitert und umfasst mittlerweile neben C-C-Bindungsbildenden Reaktionen auch die Knüpfung von C-N-, C-S- und C-O-Bindungen.

3.3.1.2 Struktur und Mechanismus von *Pp*BFDC und *Pf*BAL

Sowohl *Pp*BFDC (528 Aminosäuren, 56 kDa) als auch *Pf*BAL (563 Aminosäuren, 59 kDa) sind homotetramere Enzyme und binden ThDP und Mg^{2+} als Kofaktoren. Die Kristallstrukturen beider Enzyme wurden in den letzten Jahren im Grundzustand und in Anwesenheit von substratanalogen Verbindungen gelöst (BFDC im Grundzustand: 1BFD, Hasson *et al.* 1998; BFDC mit gebundenem Inhibitor Mandelat: 1MCZ; Polovnikova *et al.* 2003; BAL im Grundzustand: 2AG0, Mosbacher *et al.* 2005; BAL mit gebundenem Analogon MBP: 3D7K, Brandt *et al.* 2008).

BFDC katalysiert die zur PDC äquivalente Decarboxylierung von Benzoylformiat zu Benzaldehyd. Dabei werden prinzipiell die gleichen Schritte (C-C-Bindungsbildung, Decarboxylierung, Protonierung des Carbanion/Enamin und Produktabspaltung) wie in der PDC-Reaktion durchlaufen (Abb. 3.30). Allerdings konnte in Modellexperimenten gezeigt werden, dass das entsprechende post-Decarboxylierungsintermediat in Lösung fragmentiert (Abb. 3.31). Diese Reaktion konkurriert mit der Protonierung des Carbanion/Enamin und verläuft im nicht-enzymatischen System schneller, als die Gesamtreaktion in BFDC ($k_{\text{Frag}} \sim 10^4 \text{ s}^{-1}$ bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$, $k_{\text{cat}} = 4,3 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$ bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, Kluger und Moore 2000). Wie im Enzym die Fragmentierung verhindert werden kann, ist bisher unbekannt. Es konnte aber

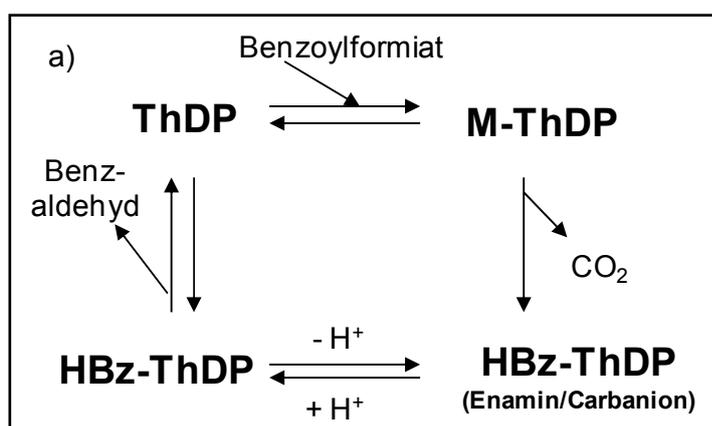


Abb. 3.30: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus von *Pp*BFDC. Die einzelnen Schritte der Reaktion entsprechen denen bei der Umsetzung von Pyruvat durch PDC.

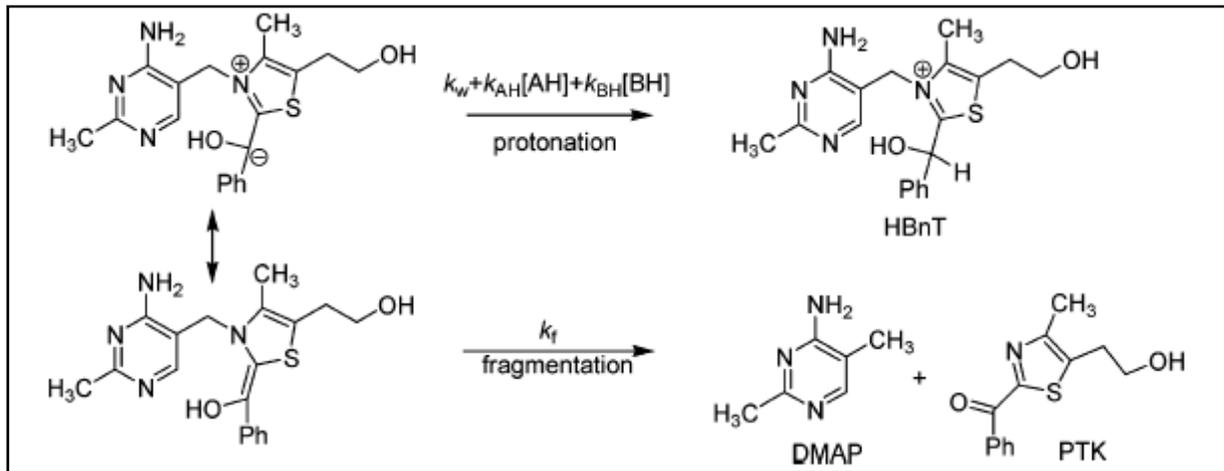


Abb. 3.31: Konkurrenz zwischen Protonierung und Fragmentierung von HBz-Thiamin in Lösung. Abbildung übernommen aus (Kluger 2006).

gezeigt werden, dass eine schnelle Protonierung des α -Carbanion in Modellstudien die Fragmentierung unterdrücken kann (Hu und Kluger 2002). Interessanterweise unterscheiden sich die aktiven Zentren von *Pp*BFDC und *Zm*PDIC trotz der grundsätzlich gleichen katalysierten Reaktion stark voneinander. Die für PDIC so wichtige katalytische Triade aus Glu 473, Asp 27 und His 113 ist in BFDC nicht zu finden. Ser 26 nimmt in diesem Enzym die Position von Asp 27 ein (Vergleich Abb. 1.10). Dieser Rest könnte also in BFDC entscheidend an der Umsetzung von Benzoylformiat und möglicherweise auch an der Protonierung des Carbanion beteiligt sein. Demgegenüber ist in BAL ein Alanin an Stelle von Ser 26 in BFDC zu finden. Ein Austausch dieses Restes gegen Serin befähigt BAL zur Decarboxylierung von Benzoylformiat (Kneen *et al.* 2005).

3.3.2 Mechanistische Untersuchungen an *Pp*BFDC Wt

3.3.2.1 Umsetzung des chromophoren Substrats para-Nitro-Benzoylformiat

Obwohl der generelle Mechanismus der BFDC-katalysierten Decarboxylierung von Benzoylformiat bekannt ist, fehlt bislang eine kinetische Feinanalyse der Reaktion. Die Strukturanalyse des Enzyms in Komplex mit dem Inhibitor Mandelat ergab Hinweise auf eine Beteiligung von Ser 26, His 70 und His 281 an der Katalyse. Diese Hinweise konnten durch die Generierung und Untersuchung von Enzymvarianten zunächst bestätigt werden (Polovnikova *et al.* 2003), wenn auch eine kürzlich veröf-

fentlichte Studie, in der die entsprechenden Seitengruppen auf innovative Weise durch alle möglichen Aminosäuren ersetzt wurden, die vorgeschlagenen spezifischen Funktionen der funktionellen Gruppen in Frage stellte (Yep *et al.* 2008). Ein Versuch der kinetischen Feinanalyse wurde bisher nur unter Verwendung eines chromophoren Substratanalogon (para-Nitro-Benzoylformiat, NBF, Sergienko *et al.* 2000) durchgeführt. Der Hintergrund für die Verwendung von NBF ist, dass die Absorptionseigenschaften des nitrierten Benzylrings empfindlich von der Gesamtstruktur der Substanz abhängen. Außerdem wird diese Substanz nur langsam umgesetzt¹¹. Demnach könnten theoretisch beim Umsatz dieser Verbindung die entsprechenden Intermediate (prä- und post-Decarboxylierungsintermediat) spektroskopisch detektiert und diskriminiert werden. Tatsächlich konnten Sergienko *et al.* zwei unterschiedliche Signale beim Umsatz dieses Substrats durch BFDC finden. Sie ordneten dem intermediär auftretenden Signal bei etwa 600 nm para-Nitro-M-ThDP und dem langlebigen bei 400 nm gefundenen Signal para-Nitro-HBz-ThDP zu. Auf Grundlage dieser Zuordnung wurde in einer darauffolgenden Arbeit versucht, die Funktion verschiedener Aminosäuren an spezifischen Schritten der Katalyse zu ermitteln (Polovnikova *et al.* 2003). Allerdings fehlt bisher eine eindeutige Bestätigung der Signalzuordnung.

Um die getroffene Zuweisung der Absorptionssignale zu den Intermediaten zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kombination von Absorptionsspektroskopie und ¹H-NMR Intermediatanalyse eingesetzt. Dabei konnten die Kinetiken der NBF-Umsetzung entsprechend (Sergienko *et al.* 2000) reproduziert werden (Abb. 3.32a). Das erste Signal (600 nm) wird mit 101 s^{-1} gebildet und zerfällt mit $14,7 \text{ s}^{-1}$. Die Generierung des zweiten Signals (400 nm) verläuft zweiphasig ($k_1 = 15,6 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 1,2 \text{ s}^{-1}$), wobei die erste der Phasen mit dem Zerfall des Signals bei 600 nm einhergeht. Mit Hilfe dieser Kinetiken wurden Zeitpunkte ausgewählt, an denen die Verteilung der Reaktionsintermediate mittels *acid-quench* ¹H-NMR bestimmt wurde (Abb. 3.32b). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Zuordnung des langlebigen Signals bei 400 nm zum HBz-ThDP-Analogon korrekt

¹¹ Bei 25 °C beträgt der k_{cat} für NBF etwa $0,05 \text{ s}^{-1}$, der K_{M} ist 0,15 mM. Für das native Substrat ist der $k_{\text{cat}} = 450 \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{M}} = 0,23 \text{ mM}$ bei 30 °C. Dies kann bereits als Nachteil der Methode aufgefasst werden, da die mit diesem Substrat gefundenen Prozesse kaum mit der nativen Reaktion in Korrelation zu bringen sind. Insbesondere Rückschlüsse über die Beteiligung von diversen Seitengruppen an speziellen Teilschritten der Reaktion sind äußerst schwierig einzuschätzen.

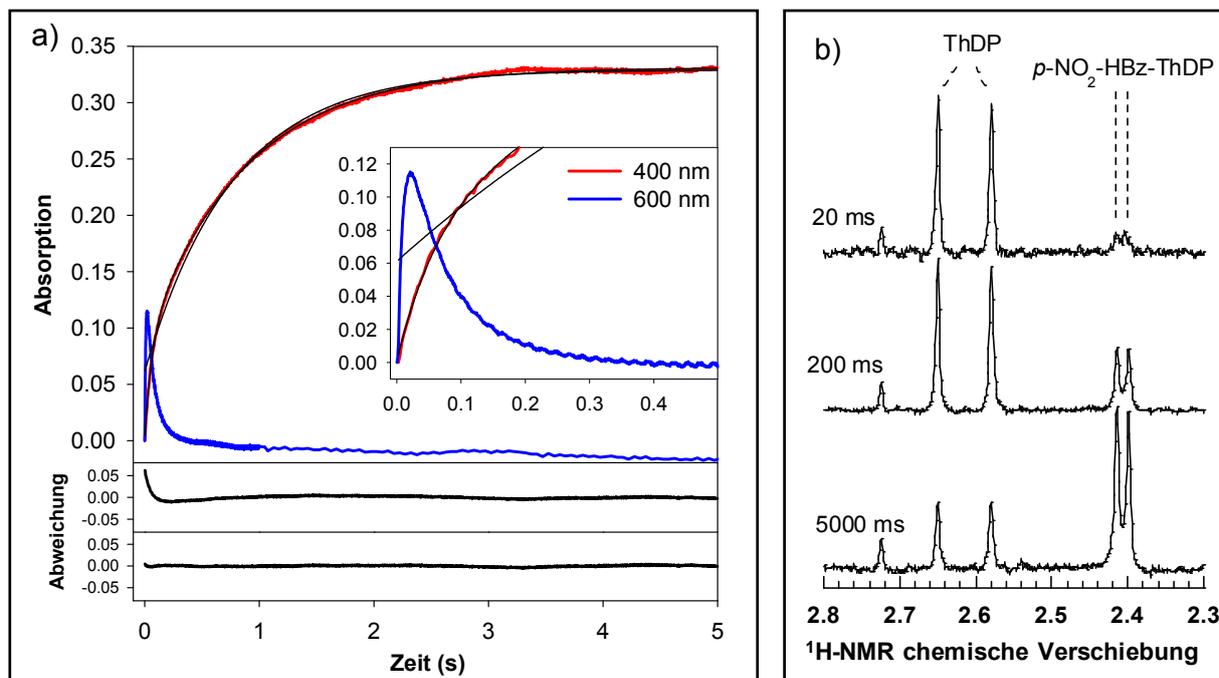


Abb. 3.32: Umsetzung von NBF durch *PpBFDC* Wt. a) *stopped flow* Progresskurven: 2,4 mg/ml Enzym wurden mit 5 mM NBF in 50 mM Phosphatpuffer und 2,5 mM $MgSO_4$ bei 25 °C inkubiert. Die Umsetzung wurde bei 400 und 600 nm verfolgt und sowohl doppelt als auch einfach exponentiell angepasst. Im unteren Teil der Abbildung sind die Abweichungen der einfach (oben) und doppelt (unten) exponentiellen Anpassung bei 400 nm abgebildet. b) Detektion der Intermediatbildung über 1H -NMR unter ähnlichen Bedingungen wie in a), die Konzentration an Enzym betrug 7,5 mg/ml

war. Allerdings konnte keine Korrelation des Signals bei 600 nm mit dem M-ThDP-Analogen gefunden werden. Nach 20 Millisekunden Reaktionszeit, dem Zeitpunkt der maximalen Signalausprägung im optischen Ansatz, konnten lediglich Spuren an kovalentem Reaktionsintermediat gefunden werden. Entsprechend dieser Beobachtung scheint das Signal bei 600 nm indikativ für das Vorliegen des Michaelis-Komplexes, und nicht für para-Nitro-M-ThDP, zu sein.

3.3.2.2 Umsetzung des nativen Substrats Benzoylformiat

Desweiteren wurde eine Intermediatanalyse von *PpBFDC* bei der Umsetzung des nativen Substrates Benzoylformiat durchgeführt. Die entsprechende Prozedur zur Bestimmung der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten ist in (Schütz *et al.* 2005) für Indolpyruvatdecarboxylase beschrieben. Da M-ThDP unter sauren Bedingungen mit einer Halbwertszeit von etwa 40 Minuten vergleichsweise schnell zu HBz-ThDP decarboxyliert, muss dieses bei der Auswertung der Spektren berücksichtigt werden ($k_{\text{uncat}} = 3,1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ bei pH 0,75 und 25 °C). Normalerweise

werden zur Quantifizierung der kovalenten Reaktionsintermediate die Signale des C6'-H genutzt. Da aber die entsprechenden Signale der Intermediate in BFDC sehr gering waren, wurde auf die dreifach intensiveren 2'-CH₃- und 4-CH₃-Signale ausgewichen. Die entsprechenden Signale der Intermediate sind:

ThDP	2,65 und 2,58 ppm
M-ThDP	2,50 und 2,41 ppm
HBz-ThDP	2,47 und 2,42 ppm

Auf Grund des großen k_{cat} -Wertes von BFDC (420 s^{-1}) und der hohen eingesetzten Konzentration an Enzym sind echte *steady state* Bedingungen nur für kurze Zeit gegeben. Um zu überprüfen, ob sich die Reaktion tatsächlich noch im *steady state* befindet, wurde die Intermediatverteilung nach verschiedenen Zeitpunkten (4 bis 150 ms) bestimmt. Andererseits muss gewährleistet werden, dass das *steady state* bereits erreicht wurde. Dafür kann die Bestimmung der Produktmenge durch das gleiche NMR-Spektrum genutzt werden. Für Enzyme, welche keine Aktivierungsphänomene aufweisen, ist ein Substratumsatz theoretisch ausreichend, um *steady state* Bedingungen zu gewährleisten. Das Spektrum nach 100 ms Reaktionszeit ist in Abb. 3.33 exemplarisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die C-C-Bindungsbildung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion darstellt (79 % unreakiertes ThDP). M-ThDP ist nur zu einem sehr geringen Teil populiert (3 % nach Korrektur). Da das isolierte Signal des M-ThDP bei 2,50 ppm auf Grund dessen geringer Populierung sehr schwach ist, wird damit der durch das Rauschen verursachte Fehler vergleichsweise groß. Das Zusammenfallen des zweiten M-ThDP-Signals mit einem der HBz-ThDP-Signale kann allerdings zur Verringerung des Fehlers ausgenutzt werden, da die Differenz zwischen den beiden gut aufgelösten HBz-ThDP-Signalen dem M-ThDP-Signal entsprechen sollte. Die berechneten Geschwindigkeitskonstanten für *PpBFDC* Wt sind in Tabelle 3.5 aufgeführt. Die C-C-Bindungsbildung stellt wie bereits erwähnt den limitierenden Schritt dar. Die Decarboxylierung des M-ThDP liefert mit etwa 16000 s^{-1} die schnellste beobachtete Decarboxylierungsreaktion in ThDP-abhängigen Enzymen. In Acetohydroxysäure Synthase II, dem bisher schnellsten Enzym bezüglich der Decarboxylierung, verläuft die entsprechende Reaktion mit 530 s^{-1} etwa 30fach langsamer (Tittmann *et al.* 2005b). Eine mögliche Erklärung könnte im Grad der Hyb-

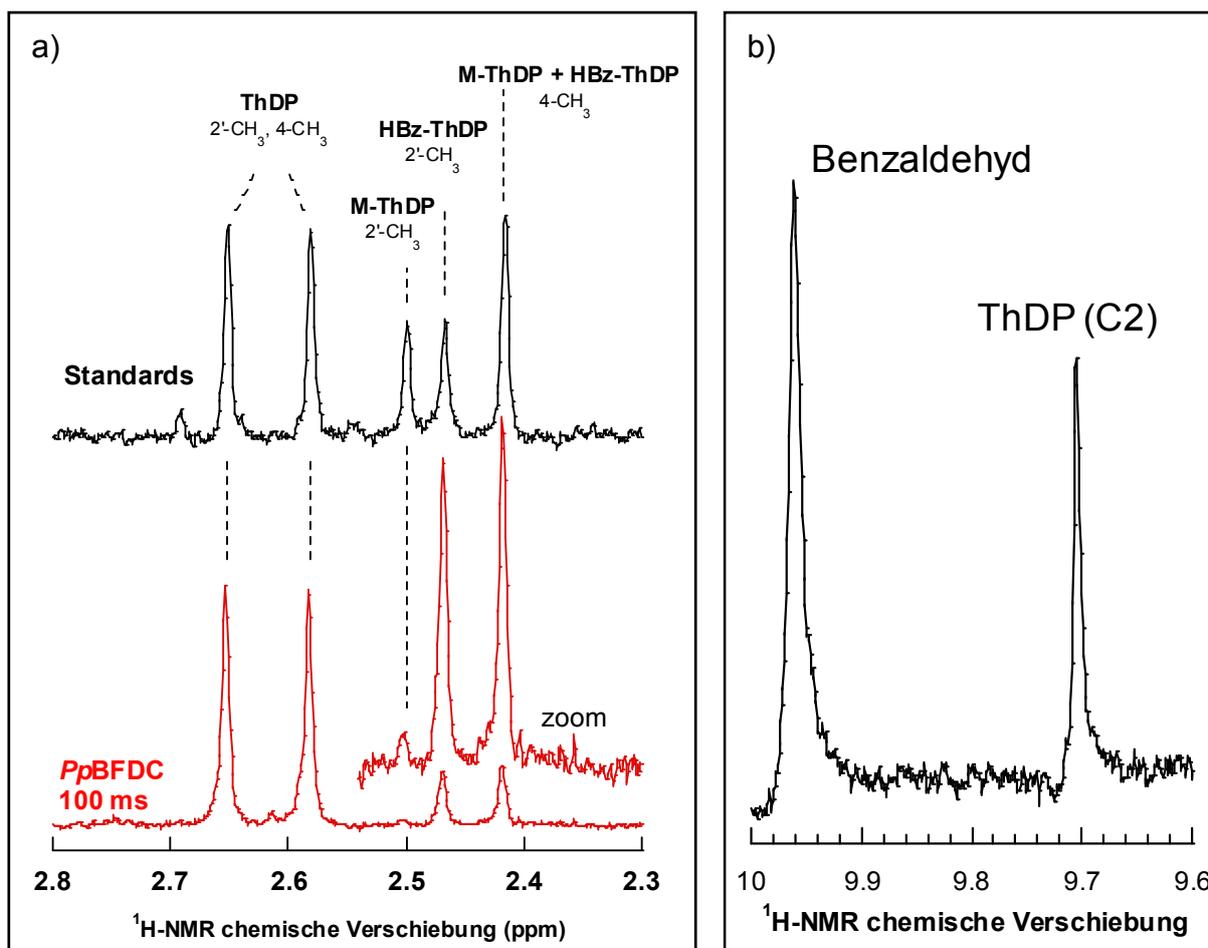


Abb. 3.33: Intermediatverteilung von *PpBFDC* Wt beim Umsatz von Benzoylformiat. a) Intermediatverteilung, 7,5 mg/ml Enzym wurden mit 20 mM Substrat in 50 mM Phosphatpuffer, 2,5 mM MgSO₄, pH 6,5 bei 30 °C inkubiert und die Reaktion nach 100 ms durch Säure abgestoppt. Im oberen Teil sind zum Vergleich die 2'-CH₃ und 4-CH₃ Signale der Intermediatstandards dargestellt. b) Vergleich des Benzaldehydsignals (Aldehydproton) mit der Kofaktormenge (hier C2-H, also etwa 80 % der Gesamtmenge an Kofaktor) im gleichen Spektrum wie bei a). Die Integration der Signale ergibt, dass etwa 2 Umsätze je aktivem Zentrum erfolgen.

ridisierung des α -C-Atoms liegen. Die Basizität des sp^3 -hybridisierten Carbanions sollte die des planaren Enamins auf Grund der stark lokalisierten negativen Ladung übertreffen und somit eine schnellere Protonierung bewirken. Wie bereits in Kapitel 3.2.2.1 angesprochen, besteht ein postulierter Mechanismus zur Beschleunigung von Decarboxylierungen darin, dass das entstandene Carbanion durch eine optimal orientierte Säure protoniert wird. Dadurch soll die Möglichkeit einer Rückreaktion mit CO₂ ausgeschlossen werden. Demnach sollte die Stabilisierung des post-Decarboxylierungsintermediats in der sp^3 -hybridisierten Form in Decarboxylasen generell von Vorteil sein. Der Hybridisierungsgrad kann theoretisch durch sterische Faktoren im aktiven Zentrum beeinflusst werden. Dabei ist zu bedenken, dass das mesomeriestabilisierte Enamin *per se* die bevorzugte Form darstellt. Durch Interaktionen mit der Enzymkomponente könnte allerdings eine tetrahedrale

Orientierung erzwungen werden. Die meisten bisher untersuchten Decarboxylasen setzen Pyruvat als Substrat um. Im entsprechenden post-Decarboxylierungsintermediat stehen lediglich die wenig voluminösen Hydroxyl- und Methylgruppen für Interaktionen zur Verfügung. Dementsprechend sind relativ geringe sterische Barrieren beim Übergang des Carbanions ins Enamin zu erwarten. Für die Umsetzung von Benzoylformiat muss dagegen eine voluminöse Bindungstasche für den Phenylteil zur Verfügung stehen. Diese Tasche könnte derart konstruiert sein, dass eine Bindung der Enaminform nicht möglich ist. Die bekannte Struktur von BFDC in Komplex mit dem Inhibitor Mandelat stützt diese Vermutung zumindest teilweise (Abb. 3.34). Es scheint zwar genügend Raum auch für die Bindung des Phenylrestes in einem sp^2 -hybridisierten Addukt vorhanden zu sein. Allerdings wird der Phenylring in einer Konformation gebunden, welche keine Konjugation zum Thiazoliumring erlaubt. In Lösung liegt dagegen wahrscheinlich ein ausgeprägtes aromatisches System vor, welches sich über den Thiazoliumring und den gesamten Hydroxybenzyl-Teil erstreckt (Vergleich Abb. 3.31). Die Bildung dieser Form im aktiven Zentrum würde wahrscheinlich eine Protonierung des $C\alpha$ nahezu unmöglich machen und somit die Reaktion blockieren. Zusätzlich könnte die Vermeidung dieses ausgeprägten Systems in *Pp*BFDC hauptsächlich für die Unterdrückung der Fragmentierungsreaktion verantwortlich sein, da das primär entstehende Spaltprodukt auf Grund der sterischen Restriktionen nicht im gleichen Maße mesomeriestabilisiert wäre, wie in Lösung.

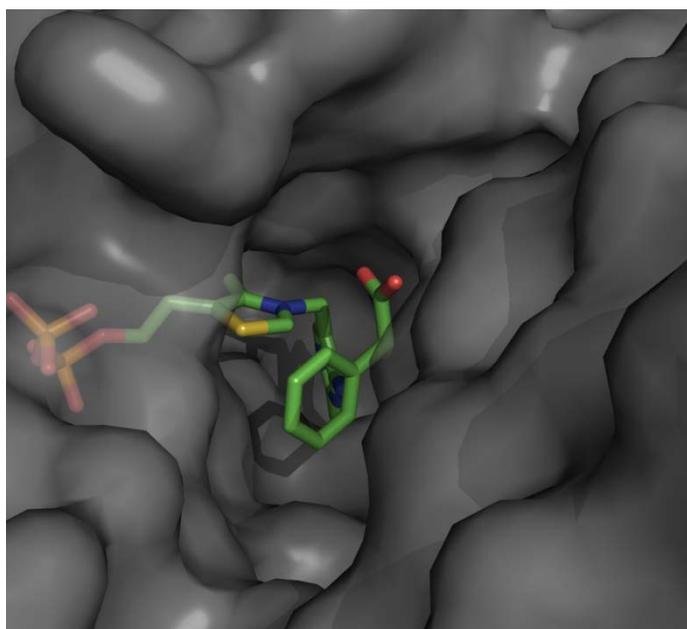


Abb. 3.34: Orientierung von Mandelat im aktiven Zentrum von *Pp*BFDC Wt. Die sterischen Bedingungen des aktiven Zentrums erlauben keine Rotation des Phenylringes in M-ThDP und schließen damit eine Konjugation zum Thiazoliumsystem aus. (PDB-Code:1MCZ)

3.3.2.3 Bindung des Substratanalogen MBP

Die C-C-Bindungsbildung ist in *PpBFDC* im Gegensatz zu *LpPOX* und *ZmPDC* geschwindigkeitsbestimmend. Dies deutet darauf hin, dass die optimale Orientierung von Substrat-Carbonyl und Kofaktor-C2 durch den relativ großen Phenylring im Vergleich zu Pyruvat erschwert sein könnte. Daher wurde die Bindung des Kofaktoranalogen Methylbenzoylphosphonat (MBP) an *PpBFDC* untersucht (siehe Kapitel 2.5.3). Die Affinität von *PpBFDC* zu diesem Analogon wurde durch CD-Titrationsexperimente ermittelt (Abb. 3.35). Der gefundene K_D von $97 \mu\text{M}$ spricht für eine affine Bindung von MBP. Allerdings ist die Geschwindigkeit der Bindung im Vergleich zum k_{cat} der Reaktion langsam (Abb. 3.36). In Gegenwart von 1 mM MBP verläuft die Reaktion in zwei Phasen mit $k_1 = 18,4 \text{ s}^{-1}$ und $k_2 = 2,02 \text{ s}^{-1}$. Die Rate der Produktbildung in Gegenwart von 1 mM Benzoylformiat verläuft dagegen mit 380 s^{-1} etwa 20 mal schneller. Im Vergleich dazu ist in *LpPOX* die Geschwindigkeit der Analogonbindung in etwa vergleichbar mit der Geschwindigkeit des Substratumsatzes (k_{obs} für 30 mM MAP $\sim 50 \text{ s}^{-1}$, k_{red} für 20 mM Pyruvat $\sim 120 \text{ s}^{-1}$). Dies deutet darauf hin, dass MBP für *PpBFDC* den Substratbindungsprozess weniger widerspiegelt, als MAP in *LpPOX*. Möglicherweise sind sterische Behinderungen dafür verantwortlich. Trotzdem lohnt sich eine genaue Betrachtung

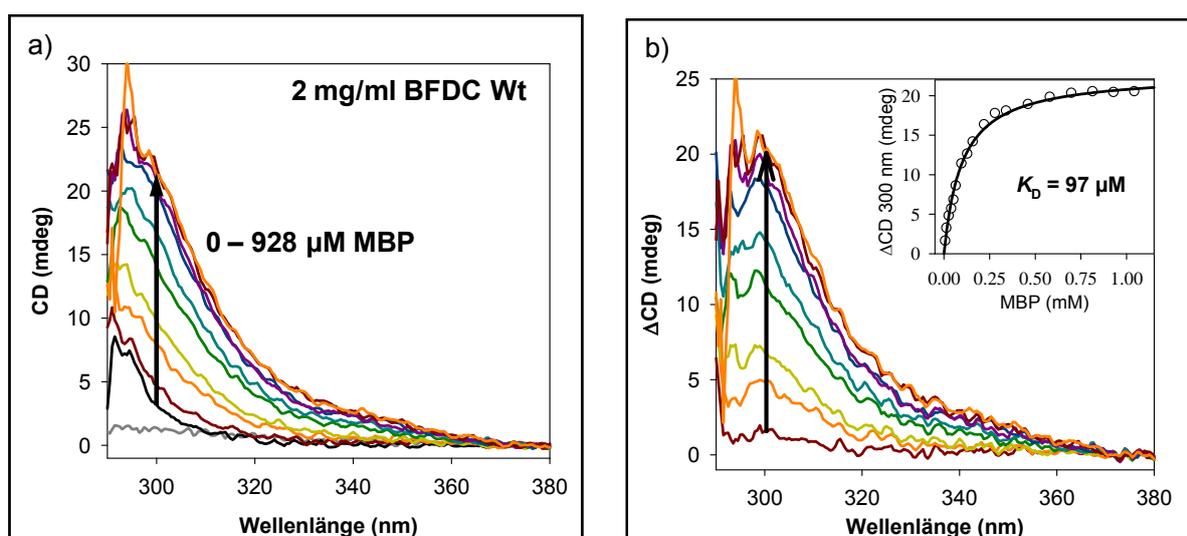


Abb.: 3.35: Titration von MBP zu *PpBFDC* Wt. a) CD-Spektren von 2 mg/ml BFDC Wt in Anwesenheit steigender MBP-Konzentrationen. b) Differenzspektren nach Abzug des Proteinspektrums. Im *Inset* ist die hyperbole Anpassung der Signale bei 300 nm dargestellt.

der MBP-Bindungskinetiken. Wie erwähnt verlaufen diese Kinetiken zweiphasig. Allerdings kann die schnelle Phase erst bei höheren MBP-Konzentrationen beobachtet werden (ab etwa 200 μM). Auch zeigen beide Phasen unterschiedliche Abhängigkeiten von der MBP-Konzentration. Während k_1 scheinbar linear mit der MBP-Konzentration zunimmt (detektierbar zwischen 100 und 2500 μM), wird für k_2 eine hyperbole Abhängigkeit gefunden. Dies deutet darauf hin, dass hier wie bei der zuvor beschriebenen Umsetzung von NBF, im ersten Schritt die Bildung des Michaelis-Komplexes beobachtet wird. Alternativ könnte die Zweiphasigkeit auch durch das Vorliegen zweier unterschiedlich affiner aktiven Zentren verursacht werden, und damit als Indiz für Halbseitenreaktivität in *PpBFDC* aufgefasst werden (siehe Kapitel 1.5). Um die tatsächliche Ursache für die beobachteten zwei Phasen zu ermitteln, wurde wiederum auf die $^1\text{H-NMR}$ zurückgegriffen. Anhand der Progresskurve mit 2,5 mM MBP ($k_1 \sim 30 \text{ s}^{-1}$, $k_2 \sim 2,5 \text{ s}^{-1}$) wurden Zeitpunkte gewählt, an denen in einem vergleichbaren Ansatz die Reaktion durch Zugabe von Säure gestoppt wurde. Die kovalenten Addukte wurden anschließend über $^1\text{H-NMR}$ quantifiziert (Abb. 3.37a). Theoretisch sollten sich beide Mechanismen leicht voneinander unterscheiden lassen. Bei Vorlage von Halbseitenreaktivität sollten innerhalb der ersten Phase 50 % der aktiven Zentren besetzt werden und die Bildung des kovalenten Adduktes insgesamt Zweiphasigkeit aufweisen. Würde dagegen die

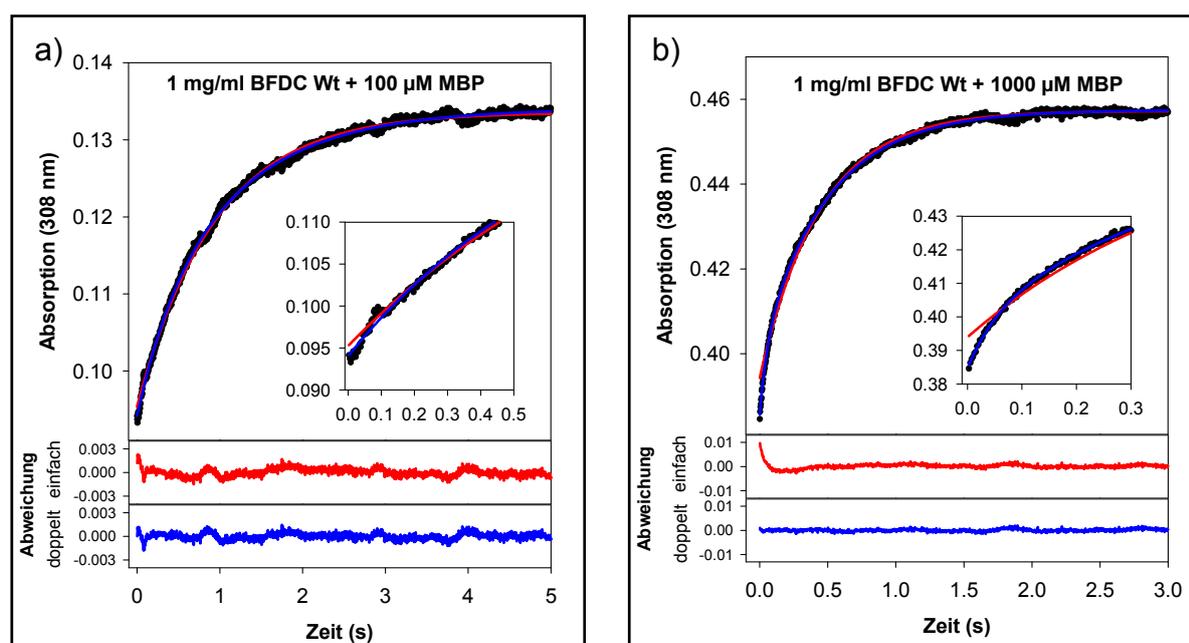


Abb. 3.36: Kinetik der MBP-Bindung an *PpBFDC* Wt. a) Reaktion von 1 mg/ml Enzym mit 100 μM MBP. b) Reaktion von 1 mg/ml Enzym mit 1000 μM MBP. Die Experimente wurden in 50 mM Phosphatpuffer, 2,5 mM MgSO_4 , 200 μM ThDP, pH 6,5 bei 30 $^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die Progresskurven wurden entweder an eine einfach (rot) oder doppelt (blau) exponentielle Gleichung angepasst.

erste Phase in den *stopped flow* Progresskurven die Bildung des Michaelis-Komplexes beschreiben, so sollte die Bildung des kovalenten Adduktes entsprechend einer Folgereaktion verlaufen:

$$[X]_t = [X]_{eq} * (1 + A * e^{(-k_1 * t)} - B * e^{(-k_2 * t)}) \quad (26)$$

$[X]_t$ = Anteil an kovalentem Addukt zur Zeit t

$[X]_{eq}$ = Anteil an kovalentem Addukt im Gleichgewicht (90 %)

$A = k_2 / (k_1 - k_2)$

$B = k_1 / (k_1 - k_2)$

$k_1 = 30 \text{ s}^{-1}$

$k_2 = 2,5 \text{ s}^{-1}$

In Abbildung 3.37b sind die simulierten Verläufe für die beiden Möglichkeiten im Vergleich zu den erhaltenen Messwerten dargestellt. Für die Simulationen wurden sowohl die aus der Progresskurve mit 2,5 mM MBP erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten, als auch der aus der CD-Titration erhaltene apparente K_D berücksichtigt. Damit war unter den vorliegenden Bedingungen lediglich ein maximaler Besetzungsgrad von 90 % zu erwarten. Die NMR-Daten können keinen

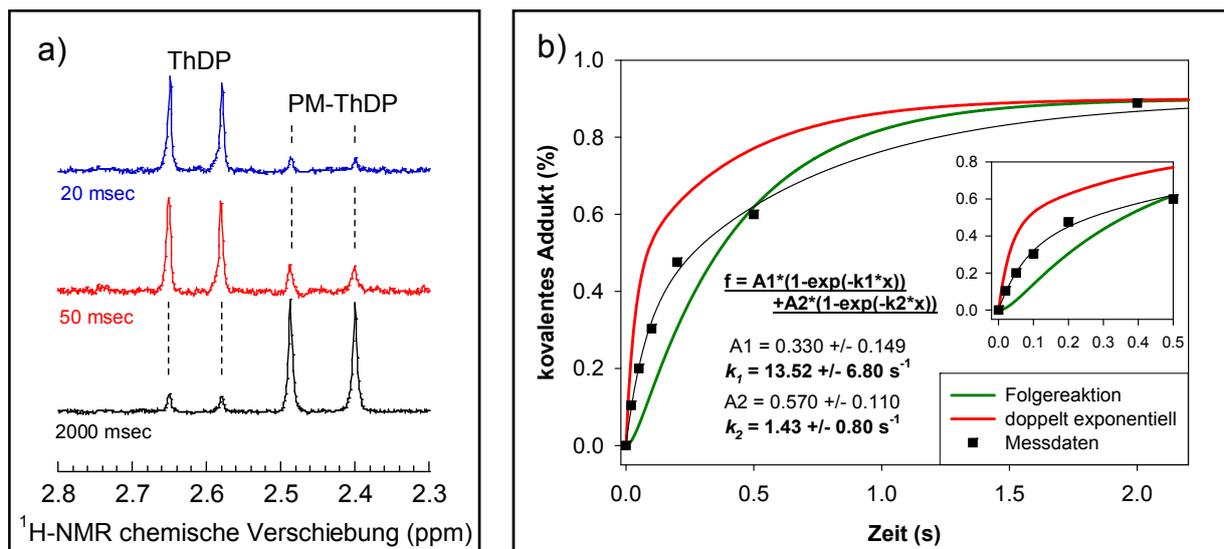


Abb. 3.37: Untersuchung der Kinetik der MBP-Bindung an *PpBFDC* Wt durch $^1\text{H-NMR}$. a) Detektion der PM-ThDP-Bildung bei der Reaktion von 7,5 mg/ml Enzym mit 2,5 mM MBP über $^1\text{H-NMR}$. b) Vergleich der gemessenen PM-ThDP-Bildung mit den theoretisch erwarteten Reaktionsverläufen. Die Messdaten wurden an eine doppelt exponentielle Gleichung angepasst. Erklärungen siehe Text.

der beiden Mechanismen eindeutig belegen. Die Folgereaktion (bzw. Bildung des Michaelis-Komplexes in der ersten Phase) wird dadurch unwahrscheinlich, da bereits nach kurzer Messdauer große Mengen an PM-ThDP vorliegen (etwa 10 % nach 20 ms). Theoretisch sollte die Adduktbildung nach dem Folgemechanismus vorwiegend in der zweiten Phase erfolgen und nach 20 ms maximal 1 % des Adduktes vorliegen. Die Theorie der Halbseitenreaktivität kann aber ebenfalls nicht eindeutig bestätigt werden, da im Laufe der ersten Phase zu wenig an PM-ThDP gebildet wird. Nach 100 ms Reaktionszeit sollten theoretisch 50 % Addukt vorliegen, gefunden werden aber nur 30 %. Eine Anpassung der NMR-Daten an eine zweifach exponentielle Gleichung ergibt Geschwindigkeitskonstanten von $13,5 \text{ s}^{-1}$ für die schnelle und $1,43 \text{ s}^{-1}$ für die langsame Phase. Beide Prozesse verlaufen also langsamer, als in den *stopped flow* Progresskurven beobachtet. Da der einzige Unterschied in beiden Methoden in der Konzentration an Enzym besteht (1 mg/ml im kontinuierlichen Ansatz, 7,5 mg/ml im NMR-basierten Ansatz), wurden Kontrollmessungen mit 1 mM MBP unter Variation der Enzymkonzentration (0,5 bis 4,35 mg/ml) durchgeführt (Abb. A10 im Anhang). Dabei zeigte sich, dass die Geschwindigkeit der ersten Phase erstaunlicherweise mit steigender Enzymkonzentration leicht abnimmt (von etwa 25 s^{-1} auf 17 s^{-1}). Auch wenn die Ursache dafür unklar bleibt, könnte dies die Diskrepanz zwischen der über NMR ermittelten und nach Halbseitenreaktion simulierten Adduktbildung erklären. Zusätzlich deutet bereits die Beobachtung, dass die Bildung von PM-ThDP in zwei Phasen verläuft, auf das Vorliegen dieses Mechanismus hin. Dieser Befund war überraschend, da bisher für *PpBFDC* keine Hinweise auf das Vorhandensein von Halbseitenreaktivität vorlagen. Eine intensive Untersuchung und Validierung dieses Prozesses fand bisher vor allem in Pyruvatdehydrogenase statt (Vergleich Kapitel 1.5). Dabei wurde zum einen gezeigt, dass unter *single turnover* Bedingungen die Bildung von HE-ThDP in zwei Phasen verläuft, deren Geschwindigkeitskonstanten sich um zwei Größenordnungen unterschieden. Auch konnte nachgewiesen werden, dass bereits die Aktivierung des Kofaktors in einer schnellen und einer langsamen Reaktion verläuft (Seifert *et al.* 2006). Die Messung der H/D-Austauschraten könnte daher auch für *PpBFDC* interessant sein und einen weiteren Hinweis auf das Vorliegen von Halbseitenreaktivität liefern.

3.3.3 Vergleichende Untersuchungen an *PpBFDC* Wt, *PpBFDC* S26A, *PfBAL* Wt und *PfBAL* A28S

3.3.3.1 Umsetzung des nativen Substrats Benzoylformiat

Die aktiven Zentren von *PpBFDC* und *ZmPDC* unterscheiden sich, wie bereits erwähnt, trotz der grundsätzlich gleichen katalysierten Reaktion gravierend voneinander. Während in *PDC* eine katalytische Triade bestehend aus drei dissoziierbaren Seitengruppen vorliegt, ist in *BFDC* lediglich ein Serin zu finden. Dieses Serin (Ser 26) nimmt die Position des für die *PDC*-Reaktion unabdingbaren Asp 27 ein. Daher könnte Ser 26 entscheidend an der Umsetzung von Benzoylformiat in *BFDC* beteiligt sein. Desweiteren ist der Befund interessant, dass in *PfBAL*, welche dieses Substrat nahezu gar nicht umsetzt, das Serin gegen Alanin ersetzt ist (Ala 28). Daher sollte untersucht werden, wie sich die Entfernung von Ser 26 in *PpBFDC* und die Einführung des entsprechenden Restes in *PfBAL* auf die jeweilige Kompetenz zur Decarboxylierung von Benzoylformiat auswirken.

Tatsächlich wirkt sich ein Austausch des Serin in *BFDC* im optisch gekoppelten Test sowohl auf den k_{cat} (13fach verringert), als auch auf den K_{M} (14fach erhöht) für Benzoylformiat aus (Abb. 3.38a und Tabelle 3.5). Eine Einführung von Serin in *PfBAL* wird dagegen durch eine starke Aktivitätsteigerung (94fach) begleitet. Der K_{M} ist allerdings nur unwesentlich beeinflusst. Dementsprechend ist die Vorlage von Serin an der entsprechenden Position entscheidend für die Kompetenz des

Tab. 3.5: Kinetische Konstanten bei der Umsetzung von Benzoylformiat durch *PpBFDC* Wt, *PpBFDC* S26A, *PfBAL* Wt und *PfBAL* A28S. k_{cat} und K_{M} wurden im optisch gekoppelten Test ermittelt. Die Berechnung der mikroskopischen Konstanten erfolgte nach Schütz *et al.* 2005.

	BFDC Wt	BFDC S26A	BAL Wt	BAL A28S
k_{cat}	420 s ⁻¹	33 s ⁻¹	0,05 s ⁻¹	4,7 s ⁻¹
K_{M}	0,23 mM	3,14 mM	8,20 mM	7,12 mM
$k_{\text{C-C}}$	536 s ⁻¹	43	0,05	6,8
k_{Dec}	16460 s ⁻¹	275	>1	52
k_{Prod}	2376 s ⁻¹	300	>1	21

jeweiligen Enzyms zur Decarboxylierung von Benzoylformiat. Auf Grund der Positionierung des Restes ist eine Interaktion mit der Carboxylatgruppe des Substrates wahrscheinlich. Dementsprechend könnte vor allem eine Beteiligung an der Bindung und Decarboxylierung des Substrates angenommen werden. Dies kann bereits aus den Ergebnissen des optisch gekoppelten Tests geschlossen werden. Analog zur in Kapitel 3.1.3.1 aufgeführten Argumentation, weist ein unveränderter K_M bei stark erhöhtem k_{cat} auf eine verbesserte Affinität zum Substrat hin. Um diese Annahme zu verifizieren, wurde die Intermediatverteilung während des *steady state* in allen untersuchten Enzymen ermittelt (Abb. 3.38b, Tab. 3.5). Es zeigte sich, dass wie in BFDC Wt die Bildung der C-C-Bindung in allen Enzymen geschwindigkeitsbestimmend ist. Die beobachteten Änderungen des jeweiligen k_{cat} lassen sich also primär auf Änderungen in diesem Schritt zurückführen. Ser 26 ist also vorwiegend für die Substratbindung und korrekte Orientierung des Substrat-Carbonyl zum Kofaktor-C2 verantwortlich. Der Grund, warum Benzoylformiat in *Pf*BAL trotz des theoretisch vorhandenen Platzes schlecht gebunden wird, ist wahrscheinlich das Fehlen eines H-Brücken-Donors. In *Pp*BFDC stabilisiert die Hydroxylgruppe von Ser 26 die negative Ladung der substrat-ständigen Carboxylatgruppe und übernimmt somit eine solvatisierende Funktion. In *Pf*BAL ist dagegen das Vorliegen der negativen Ladung in der sehr unpolaren Umgebung ohne die Möglichkeit von H-Brücken-Interaktionen sehr ungünstig.

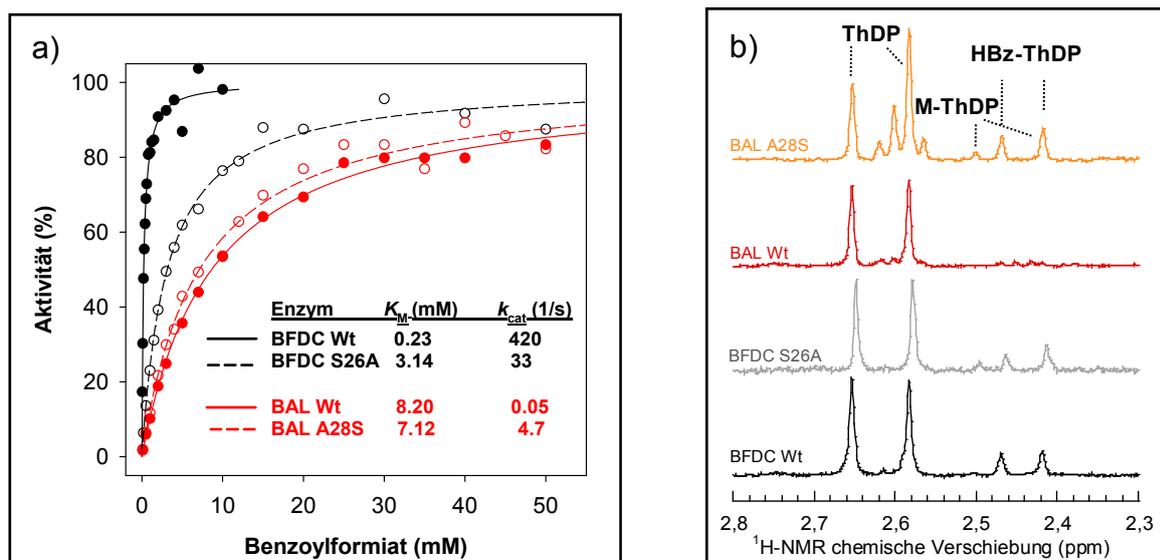


Abb. 3.38: Umsetzung von Benzoylformiat durch BFDC und BAL. a) optisch gekoppelter Test mit hIADH. b) Intermediatverteilung im *steady state*, im Ansatz mit BAL A28S wird einer der ThDP-Signale von einer Verunreinigung überlagert

3.3.3.2 Bindung des Substratanalogen MBP

Die Bindung des Substratanalogen MBP an BFDC Wt, BFDC S26A, BAL Wt und BAL A28S wurde thermodynamisch (CD-Titration) und kinetisch (Absorptions-*stopped-flow*) analysiert. Eine Beteiligung des Serin an der Substratbindung sollte sich durch eine verbesserte Affinität und/oder eine erhöhte Bindungsgeschwindigkeit für MBP in BFDC Wt (im Vergleich zu BFDC S26A) und BAL A28S (im Vergleich zu BAL Wt) äußern. Die erhaltenen Ergebnisse sind allerdings recht heterogen (Vergleich Tab. 3.6). So ist der apparente K_D für MBP in der BFDC-Variante S26A im Vergleich zum Wt erwartungsgemäß erhöht (ca. Faktor 7-10). Allerdings wird MBP sowohl in BAL Wt als auch in BAL A28S unerwartet stark gebunden. Dass die Bindung von MBP an BAL Wt im Vergleich zu BFDC Wt dennoch beeinflusst ist, zeigt sich in den Kinetiken (Abb. 3.39). Während die Reaktion von BFDC Wt und 1 mM MBP bereits nach 2 Sekunden abgeschlossen ist, vollzieht sie sich in BAL Wt auf einer Zeitskala von 200 Sekunden. In BAL A28S ist die Geschwindigkeit der Bindung (bei ähnlichem K_D -Wert) im Vergleich zu BAL Wt etwa 10fach erhöht. Demnach verbessert die Einführung von Serin in BAL die Bindung des Substratanalogen MBP.

Eine detaillierte Analyse der MBP-Bindung ist leider auf Grund der Komplexität der beobachteten Effekte schwierig (zum Vergleich siehe Tab. 3.6 und Abb. A11 bis A13

Tab. 3.6: Vergleich der Parameter zur MBP-Bindung an *PpBFDC* und *PfBAL*

Enzym	K_D in μM (CD)	k_{obs} in s^{-1} 100 μM MBP (<i>stopped flow</i>)	k_{obs} in s^{-1} 1 mM MBP (<i>stopped flow</i>)	Abhängigkeit k_1 und k_2
BFDC Wt	97 +/- 9	$k_1 = \text{n.b.}$ $k_2 = 0,84 \pm 0,12$	$k_1 = 18,4 \pm 6,5$ $k_2 = 2,02 \pm 0,12$	linear hyperbol
BFDC S26A	687 +/- 304	$k_1 = 7,07 \pm 0,92$	$k_1 = 6,38 \pm 0,12$	unabhängig
BAL Wt	< 35	$k_1 = 0,0030 \pm 0,0008$ $k_2 = 0,0008 \pm 0,0004$	$k_1 = \text{n.b.}$ $k_2 = 0,018 \pm 0,001$	hyperbol linear
BAL A28S	< 20	$k_1 = 0,063 \pm 0,001$ $k_2 = 0,023 \pm 0,001$	$k_1 = \text{n.b.}$ $k_2 = 0,45 \pm 0,04$	----- linear

im Anhang). So verläuft die Bindung des Analogon in BFDC Wt, BAL Wt und A28S zweiphasig, in BFDC S26A dagegen nur einphasig. In BFDC Wt wird die Zweiphasigkeit mit zunehmender MBP-Konzentration ausgeprägter, wohingegen für BAL Wt und A28S diese nur bei geringen Konzentrationen beobachtet werden kann. Auch die Abhängigkeiten der Geschwindigkeitskonstanten von der MBP-Konzentrationen unterscheiden sich. In BFDC Wt steigt die schnelle Phase linear, die langsame hyperbol an, wohingegen in BAL A28S der umgekehrte Fall beobachtet wird. Für BAL Wt kann für die langsame Phase wie für BAL A28S eine lineare Abhängigkeit gefunden werden. Für die zweite Phase ist keine Aussage möglich, da diese lediglich bei zwei Konzentrationen detektierbar war. Letztlich ist die einzige in BFDC S26A beobachtete Phase von der eingesetzten MBP-Konzentration vollkommen unabhängig. Gerade diese Beobachtung ermöglicht allerdings eine Aussage bezüglich der MBP-Bindung an BFDC. So wurden für den Wt auf Grund der im Vergleich zum k_{cat} langsamen MBP-Bindung sterische Probleme bei der Akkomodation der Phosphonatgruppe im aktiven Zentrum postuliert (Kapitel 3.3.2.3). Die Unabhängigkeit der Bindungsgeschwindigkeit in BFDC S26A von der MBP-Konzentration deutet darauf hin, dass im Gegensatz zum Wt in dieser Variante der erste Schritt der Reaktion (Bindung in der *docking site*, Bildung des Michaelis-Komplexes) unter Sättigungsbedingungen abläuft ($K_1 \ll [MBP]$, Vergleich Gleichung (6)). Dies könnte zum Beispiel durch das Wegfallen von sterischem Stress erklärt werden. Demnach ist es wahrscheinlich, dass die Hydroxylgruppe von Ser 26 für die

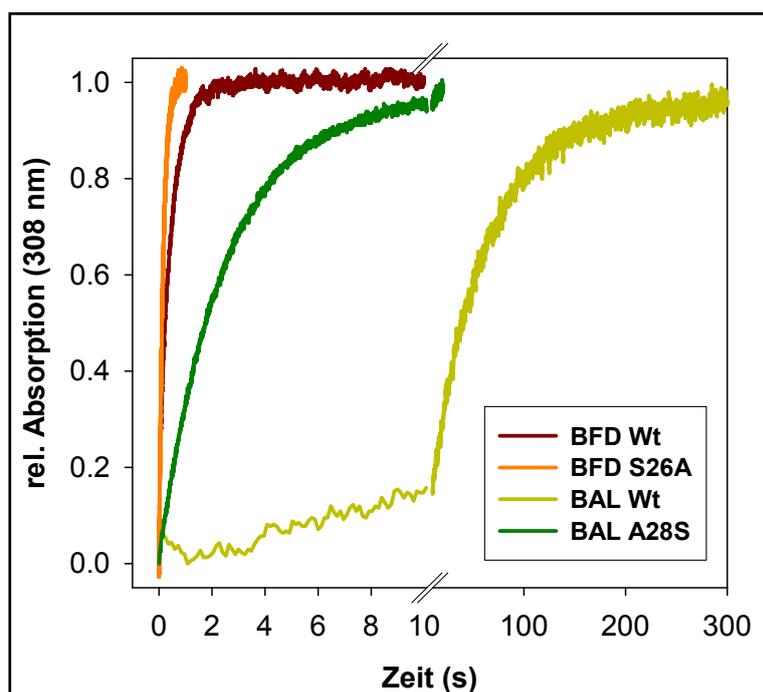


Abb. 3.39: Vergleich der MBP-Bindungskinetiken in *PpBFDC* und *PfBAL* mit 1 mM MBP. Die Bedingungen sind in Abb. 3.36 und Abb. A12 bis A14 zu finden.

Behinderung bei der Bindung des Phosphonatrestes verantwortlich ist. Überraschend ist die Beobachtung, dass die ermittelte Maximalgeschwindigkeit in S26A im Vergleich zum Wt etwa 3fach erhöht ist (ca $6,5 \text{ s}^{-1}$ in S26A, $k_{2\text{max}} = 2,33 \text{ s}^{-1}$ in Wt). Da unter Sättigungsbedingungen die Gesamtreaktion durch die C-C-Bindungsbildung dominiert wird, deutet dies zuerst auf eine erhöhte Geschwindigkeit der C-C-Bindungsbildung hin. Die Ergebnisse der Intermediatanalyse ergaben dagegen, dass die beobachtete Verringerung des k_{cat} bei der Umsetzung von Benzoylformiat vorwiegend auf eine Verlangsamung dieses Schrittes zurückzuführen ist. Eine Erklärung dieses Widerspruchs könnte aus dem Befund erfolgen, dass in S26A nur eine Phase beobachtet wird. Die NMR-basierte Untersuchung zum Besetzungsgrad mit MBP in BFDC Wt weist darauf hin, dass die beiden Phasen die Bindung des Substratanalogen in zwei unterschiedlichen aktiven Zentren repräsentieren. Demnach könnte in der Variante nur noch die Bindung in einem aktiven Zentrum beobachtet werden. Dies wird noch durch die Beobachtung unterstützt, dass für die *stopped flow* Progresskurven in BFDC S26A bei gleicher Proteinkonzentration nur etwa die Hälfte der Gesamtamplitude erhalten wurde, wie im Wt (Vergleich Abb. 3.36b und Abb. A11d). Demnach könnte entweder die Bindung von MBP im ersten aktiven Zentrum bereits in der Totzeit des Gerätes erfolgt, oder aber die Bindung in einem der aktiven Zentren blockiert sein. Ein Hinweis auf das Vorliegen der zweiten Möglichkeit ergeben die nahezu gleichen Startpunkte der Reaktion von BFDC Wt und S26A mit 1 mM MBP. Wäre in der Variante bereits eines der aktiven Zentren mit MBP belegt, so würde man eine Erhöhung der Startabsorption erwarten. Eine Bestimmung des tatsächlich vorliegenden Falls sollte durch die ^1H -NMR-basierte Untersuchung des Besetzungsgrades zu verschiedenen Zeitpunkten möglich sein. Dafür würde die Bestimmung der Verteilung zu Beginn der Reaktion (etwa 20 ms) und am Ende (etwa 5 s) genügen. Bei einer maximalen Besetzung von 50 % wäre der oben geschilderte Widerspruch erklärt. Demnach müsste die gefundene Geschwindigkeitskonstante in S26A mit der schnellen Phase im Wt verglichen werden. Diese verläuft im Wt etwa 3fach schneller, als in S26A. Warum aber in der Variante die Kommunikation zwischen den beiden aktiven Zentren gestört sein sollte, bleibt unklar.

3.3.4 Zusammenfassung: Decarboxylierung von Benzoylformiat durch *PpBFDC* und *PfBAL*

PpBFDC stellt mit einem k_{cat} von 420 s^{-1} eine der schnellsten bekannten ThDP-abhängigen Decarboxylasen dar. Die Intermediatanalyse dieses Enzyms ergab, dass im Gegensatz zu Pyruvatdecarboxylasen die C-C-Bindungsbildung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Möglicherweise wird die korrekte Orientierung von Substrat-Carbonyl und Kofaktor-C2 durch den voluminösen Phenylrest in Benzoylformiat im Vergleich zu Pyruvat erschwert. Die Decarboxylierung verläuft in *PpBFDC* dagegen schneller als in allen bisher untersuchten Enzymen. Ursache dafür könnte die Stabilisierung des post-Decarboxylierungsintermediats in der Carbanion-Form sein. Die starke Basizität dieses Intermediats führt zu einer schnellen Protonierung und könnte somit eine theoretische Rückreaktion mit CO_2 unterbinden. Zusätzlich wird durch die Struktur des aktiven Zentrums eine Konjugation des Phenylrings mit dem Thiazoliumteil des Kofaktors ausgeschlossen. Dies könnte hauptsächlich für die Unterdrückung der in Lösung beobachteten Fragmentierungsreaktion von HBz-ThDP verantwortlich sein. In Untersuchungen mit dem chromophoren Substrat NBF konnte eine zuvor getroffene Zuordnung von diversen spektroskopischen Prozessen zu verschiedenen Intermediaten berichtigt werden. Eine Kombination von Absorptionsspektroskopie und $^1\text{H-NMR}$ ermöglichte mit diesem Substrat erstmals die nachweisliche Detektion eines Michaelis-Komplexes in ThDP-abhängigen Enzymen. Desweiteren wurde die Bindung des substratanalogen Phosphonats MBP untersucht. Für diese Substanz konnte wiederum mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ die gefundene Zweiphasigkeit der Bindung auf das Vorliegen von Halbseitenreaktivität zurückgeführt werden. Vergleichende Untersuchungen an *PfBAL* und diversen Varianten erbrachten letztlich Hinweise darauf, dass Ser 26 in *PpBFDC* entscheidend an der Umsetzung von Benzoylformiat beteiligt ist. Allerdings lag in keiner der untersuchten Enzyme eine signifikante Störung des Decarboxylierungsschrittes vor. Vielmehr war überwiegend die Bindung des Substrats beeinflusst. Außerdem scheint dieser Rest auch an der Kommunikation der beiden verschiedenen aktiven Zentren beteiligt zu sein.

4 Zusammenfassung

ThDP-abhängige Enzyme, welche α -Ketosäuren umsetzen, sehen sich mit zwei hauptsächlichen Problemen konfrontiert. Zum Einen müssen sie gleichermaßen eine effiziente Decarboxylierung des ersten kovalenten Intermediats gewährleisten. Diese Reaktion läuft in enzymatischen Systemen um sechs bis sieben Größenordnungen schneller ab, als in Lösung. Andererseits muss das nach Decarboxylierung auftretende, hoch reaktive Carbanion auf sehr spezifische Weise unter Vermeidung von diversen Nebenreaktionen umgesetzt werden. Im Rahmen der Promotionsarbeit konnten unter Verwendung verschiedener strukturbiochemischer, kinetischer und thermodynamischer Methoden Prinzipien gefunden werden, nach denen Enzyme diese Prozesse gewährleisten. Der methodische Fokus lag insbesondere auf der Verwendung der $^1\text{H-NMR}$ -basierten Analyse von Reaktionsintermediaten, der Benutzung von substratanalogen Verbindungen, der spektroskopischen Charakterisierung von Reaktionsintermediaten und der röntgenkristallographischen Untersuchung von verschiedenen *gesoakten* Enzym-Kristallen. Dafür wurden einerseits Enzyme untersucht, welche das gleiche Substrat decarboxylieren, in denen aber die Umsetzung des post-Decarboxylierungsintermediats variiert (*LpPOX* und *ZmPDC*). Zum Anderen wurden Enzyme verglichen, welche verschiedene Substrate decarboxylieren, die aber eine vergleichbare Umsetzung des jeweiligen Carbanion gewährleisten (*ZmPDC* und *PpBFDC*).

Die Kristallstrukturen einer *LpPOX*-Variante ermöglichten erstmals die Identifizierung des Bindungsmodus eines tetrahedralen prä-Decarboxylierungsintermediats. Mit diesen Strukturen konnte die seit langem geäußerte Vermutung bestätigt werden, dass die zu spaltende C-C-Bindung eine perpendiculare Ausrichtung zum Thiazoliumring einnimmt. Diese Orientierung ermöglicht eine direkte Delokalisation des nach der Decarboxylierung entstehenden Elektronenpaars ohne die Notwendigkeit von weiteren Rotationen (*least-motion maximum-overlap mechanism*). Desweiteren konnte in den tetrahedralen Intermediaten eine Distorsion des C2-C α -Bindungswinkels und der Thiazoliumkomponente gefunden werden. Im Zuge der Decarboxylierung kommt es beim Übergang vom sp^3 - zum sp^2 -hybridisierten Zustand zu einer Entspannung des Systems. Das prä-Decarboxylierungsintermediat liegt also

in einer energetisch anspruchsvollen Konformation vor (*ground state destabilization*). Um diese zu ermöglichen, werden sowohl der Kofaktor (V-Konformation) als auch das Substrat unter Verwendung von Bindungsenergie im Enzym in eine energetisch ungünstige Konformation gezwungen (Circe-Effekt). Die perpendiculare Ausrichtung und die Distorsion im Laktyl-ThDP sind wahrscheinlich hauptsächlich für die gefundenen Beschleunigungsfaktoren der enzymatischen Decarboxylierung verantwortlich. Die These, dass die Seitengruppen, welche in den untersuchten Enzymen mit der Carboxylatgruppe des Substrates interagieren, für den effizienten Ablauf dieser Reaktion notwendig sind, konnte nur zum Teil bestätigt werden. Lediglich in *ZmPDC* konnte in der Variante E473D eine etwa 1000fach langsamere Decarboxylierung von Laktyl-ThDP detektiert werden. Erste kristallographische Ergebnisse deuten darauf hin, dass dafür vor allem eine Rotation des Laktyl-Restes um die C2-C α -Bindung verantwortlich ist. In dieser Konformation wird keine der beiden oben gegebenen Prinzipien (perpendiculare Orientierung, sterischer Stress) zur Beschleunigung der Decarboxylierung gewährleistet.

In *LpPOX* scheint Glu 483 für die korrekte Orientierung des Laktyl-Restes weniger relevant zu sein. Die Decarboxylierung war in keiner der untersuchten Varianten signifikant eingeschränkt. Allerdings konnte eine Beeinflussung von nahezu jedem anderen an der Katalyse beteiligten Schritt nachgewiesen werden. Die beobachteten Effekte konnten dabei zumeist auf eine fehlerhafte Orientierung der Substrate (Pyruvat und Phosphat) zurückgeführt werden. Eine veränderte Orientierung von Pyruvat in der *docking-site* des Enzyms (Michaelis-Komplex) hat zwangsläufig auch eine Änderung in der relativen Ausrichtung von Substrat-Carbonyl und Kofaktor-C2 zur Folge. Dies erklärt die Beeinflussung des C-C-Bindungsschritts in den Glu483-Varianten. Die suboptimale Ausrichtung der Phosphatgruppe resultiert dagegen in einer Störung des radikalischen Elektronentransfers. Auch in den vergleichenden Untersuchungen an *PpBFDC* und *PfBAL* wurde für die entsprechenden Reste (Ser 26 bzw. Ala 28) vorwiegend eine Rolle bei der Substratbindung gefunden. Dabei ist vor allem die Fähigkeit des Serin als H-Brücken-Donor zu fungieren wichtig, da dadurch die negative Ladung der Carboxylatgruppe in Benzoylformiat stabilisiert werden kann.

Den vergleichenden Experimenten an *Pp*BFDC und *Pf*BAL war eine detaillierte Untersuchung des Katalysemechanismus von *Pp*BFDC Wt vorausgegangen. Im Gegensatz zu *Zm*PDC, welche prinzipiell die gleiche Reaktion katalysiert, ist in *Pp*BFDC die C-C-Bindungsbildung geschwindigkeitsbestimmend (etwa 4fach langsamer als in *Zm*PDC). Möglicherweise ist in *Pp*BFDC die optimale Ausrichtung von Substrat-Carbonyl und Kofaktor-C2 durch den voluminösen Phenylring erschwert. Bemerkenswerterweise verläuft die in *Pp*BFDC beobachtete Decarboxylierung dagegen mehr als eine Größenordnung schneller, als in allen bisher untersuchten Enzymen. Wahrscheinlich kann in diesem Enzym das post-Decarboxylierungsintermediat durch sterische Restriktionen besonders gut in der Carbanionen-Form gehalten werden. Die sehr hohe Basizität dieses Intermediats bewirkt eine effiziente Protonierung und verhindert somit die Rückreaktion mit CO₂. Zusätzlich ist die Stabilisierung des post-Decarboxylierungsintermediats in der sp³-hybridisierten Form wahrscheinlich hauptsächlich für die Unterdrückung der in Lösung beobachteten Fragmentierungsreaktion verantwortlich. Maßgeblich dafür ist die Orientierung des Phenylrestes in einer Konformation, welche die Bildung eines ausgeprägten mesomeren Systems mit dem Thiazoliumring verhindert. Zwei weitere interessante Befunde wurden durch den kombinatorischen Einsatz von substratanalogen Verbindungen und der ¹H-NMR-basierten Intermediatanalyse erbracht. Beim Umsatz von NBF konnte erstmals die spektroskopische Detektion eines Michaelis-Adduktes bewiesen werden. Die Untersuchungen zur Bindung von MBP ergaben unerwartet einen Hinweis auf das eventuelle Vorliegen von Halbseitenreaktivität in BFDC.

Auch bezüglich des Schicksals des post-Decarboxylierungsintermediats in den untersuchten Enzymen konnten einige Aussagen getroffen werden. In Decarboxylasen muss eine effiziente Protonierung dieses Intermediats ablaufen. In *Pp*BFDC wird diese wahrscheinlich durch den ausgeprägten sp³-Charakter des Intermediats gewährleistet. Als Protonendonator genügt ein Histidin (wahrscheinlich His 281). In *Zm*PDC besteht auf Grund der kleineren Seitengruppe von Pyruvat weniger die Möglichkeit, das Vorliegen der Carbanionen-Form über sterische Restriktionen zu erzwingen. In diesem Enzym wird daher ein effizientes Protonenrelay-System aus drei sauren Gruppen (Asp 27, His 113 und Glu 473) bereitgestellt, um die geringere Basizität des post-Decarboxylierungsintermediats zu

kompensieren. In *LpPOX* darf dagegen keine Protonierung erfolgen. Dementsprechend konnte in den Kristallstrukturen die weniger basische Enamin-Form gefunden werden. Desweiteren fehlt das in *ZmPDC* gefundene Protonenrelaysystem und Glu 483 liegt in einer protonierungs-inkompetenten Orientierung vor. Dieser Rest ist in *LpPOX* dafür verantwortlich, eine optimale Ausrichtung des Phosphats im Zuge der radikalischen Produktsplaltung zu gewährleisten.

Die Blockierung des Protonenrelay-Systems in *ZmPDC* E473Q führte zu einer Akkumulation des reaktiven Carbanion-Intermediats in dieser Variante. Durch die Präsentation von geeigneten Akzeptoraldehyden konnte gezeigt werden, dass die Variante eine erhöhte Kompetenz zur Katalysierung von Carboligationsreaktionen aufweist. Im Speziellen wurde die Synthese des pharmazeutisch relevanten (*R*)-PAC aus Pyruvat und Benzaldehyd untersucht. *ZmPDC* E473Q ist dem Wt in dieser Reaktion in vielerlei Hinsicht überlegen. So führt die Blockierung der Protonierung des Carbanion nicht nur zu einer erhöhten Kompetenz zur Carboligation. Gleichzeitig wird durch die unterdrückte Abspaltung von Acetaldehyd auch die Bilanz der Reaktion verbessert. Durch den Wt werden neben PAC auch Acetaldehyd und Acetoin gebildet, so dass bei äquimolaren Substratkonzentrationen beträchtliche Mengen an Benzaldehyd verbleiben. Für E473Q kann dagegen ein vollständiger Verbrauch beider Substrate unter ausschließlicher Bildung von PAC beobachtet werden. Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass durch den Austausch einer Einzigen, für die Hauptreaktion kritischen Aminosäure die Reaktionstrajektorie des Enzyms vollkommen geändert wurde.

5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten Aussagen zu den Einzelschritten der ThDP-vermittelten Katalyse in einer Reihe von Enzymen getroffen werden. Bei allen durchgeführten Experimenten war allerdings einer der mikroskopischen Schritte nicht direkt zugänglich. Dabei handelt es sich um die Bildung des Michaelis-Komplexes. Theoretisch sollte dieser Prozess durch die Verwendung von kofaktoranalogen Verbindungen (z. B. N3'-Pyridyl-ThDP oder deaza-ThDP) zugänglich sein, da in diesen Verbindungen die Aktivierung des C2 nicht möglich ist. Über isothermale Titrationskalorimetrie könnten beispielsweise die Bindungsenergien von Substraten (α -Ketosäuren) und Produkten (Aldehyden) ermittelt und verglichen werden. Besonders interessant wäre die Lösung der Kristallstruktur des Michaelis-Komplexes von Pyruvat und *Lp*POX. In dieser Arbeit wurde postuliert, dass die Energie für die in den tetrahedralen Addukten beobachtete Distorsion aus der C-C-Bindungsbildung stammt. Demnach wäre erwartet, dass sowohl das Substrat als auch der Thiazoliumring im Michaelis-Komplex noch eine entspannte Konformation einnehmen. Für *Pp*BFDC wäre die Untersuchung der Intermediatverteilung im *steady state* beim Umsatz von Pyruvat und α -Ketobutyrat interessant. Es wurde vermutet, dass die Größe des Phenylrings in Benzoylformiat hauptsächlich dafür verantwortlich ist, dass die C-C-Bindungsbildung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Zum Einen könnte die optimale Orientierung von Substrat-Carbonyl und Kofaktor-C2 erschwert sein (Verschlechterung der C-C-Bindungsbildung), zum Anderen kann durch den voluminösen Rest das Vorliegen der Carbanionen-Form nach der Decarboxylierung erzwungen werden (sehr schnelle Protonierung). Beim Umsatz von Pyruvat und α -Ketobutyrat wäre demnach auf Grund der kleineren Seitengruppe eine Verschiebung der Intermediatverteilung in Richtung post-Decarboxylierungsintermediat erwartet. Auch bezüglich der Carboligationsfähigkeit der *Zm*PDC-Variante E473Q könnten weiterführende Arbeiten durchgeführt werden. Besonders eine Kombination dieser kinetisch optimierten Variante mit den bereits beschriebenen strukturoptimierten W392-Varianten erscheint vielversprechend, um eine weitere Steigerung der Kompetenz zur Bildung von aromatischen α -Hydroxyketonen zu erzielen.

6 Literaturverzeichnis

Albery, W. J. und Knowles, J. R. (1977), „Efficiency and evolution of enzyme catalysis.“, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 16 (285 – 293)

Arai, G., Noma, T., Habu, H. und Yasumori, I. (1999), „Pyruvate sensor based on pyruvate oxidase immobilized in a poly(mercapto-*p*-benzoquinone) film.“, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 464, (143 - 148)

Asztalos, P. (2008), „Untersuchungen zu molekularen, strukturellen und biokatalytischen Aspekten des Vitamin B1-abhängigen Enzyms Transketolase A aus *Escherichia coli*.“, Dissertation angefertigt an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Barrowman, M. M. und Fewson, C. A. (1985), „Phenylglyoxylate decarboxylase and phenylpyruvate decarboxylase from *Acinetobacter calcoaceticus*.“, *Current Microbiology* 12 (235 – 240)

Barrowman, M. M., Harnett, W., Scott, A. J., Fewson, C. A. und Kusel, J. R. (1986), „Immunological comparison fo microbial TPP-dependent non-oxidative α -keto acid decarboxylases.“, *FEMS Microbiology Letters* 34 (57 – 60)

Brandt, G. S., Nemeria, N., Chakraborty, S., McLeish, M. J., Yep, A., Kenyon, G. L., Petsko, G. A., Jordan, F. und Ringe, D. (2008), „Probing the active center of benzaldehyde lyase with substitutions and the pseudosubstrate analogue benzoylphosphonic acid methyl ester.“, *Biochemistry* 47 (7734 – 7743)

Breslow, R. (1957), „Rapid deuterium exchange in thiazolium salts.“, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1762 – 1763)

Breslow, R. (1958), „On the mechanism of thiamine action. IV. Evidence from studies on model systems.“, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (3719 – 3726)

Breuer, M., Pohl, M., Hauer, B. und Lingen, B. (2002), „High-throughput assay of (*R*)-phenylacetylcarbinol synthesized by pyruvate decarboxylase.“, *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (1069 - 1073)

Bringer-Meyer, S. und Sahm, H. (1988), „Acetoin and phenylacetylcarbinol formation by the pyruvate decarboxylases of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces carlsbergiensis*.“, *Biocatalysis* 1 (321 - 331)

Bruhn, H., Pohl, M., Grötzinger, J. und Kula, M.R. (1995), „The replacement of Trp392 by alanine influences the decarboxylase/carboligase activity and stability of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*.“, *Eur. J. Biochem.* 234 (650 - 655)

Cain, A. H., Sullivan, G. R. und Roberts, J. D. (1977), „The protonation site of vitamin B1 as determined from natural-abundance ^{15}N nuclear magnetic resonance spectra.“, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (6423 – 6425)

- Candy, J. M. und Duggleby, R. G. (1998)**, „*Structure and properties of pyruvate decarboxylase and site-directed mutagenesis of the Zymomonas mobilis enzyme.*“, *Biochimica et Biophysica Acta* 1385 (323 – 338)
- Chang, A. K., Nixon, P. F. und Duggleby, R. G. (1999)**, „*Aspartate-27 and glutamate-473 are involved in catalysis by Zymomonas mobilis pyruvate decarboxylase.*“, *Biochem. J.* 339 (255 – 260)
- Chang, A. K., Nixon, P. F. und Duggleby, R. G. (2000)**, „*Effects of deletions at the carboxyl terminus of Zymomonas mobilis pyruvate decarboxylase on the kinetic properties and substrate specificity.*“, *Biochemistry* 39 (9430 – 9437)
- Ciszak, E. M., Korotchkina, L. G., Dominiak, P. M., Sidhu, S. und Patel, M. S. (2003)**, „*Structural basis for flip-flop action of thiamin pyrophosphate-dependent enzymes revealed by human pyruvate dehydrogenase.*“, *J. Biol. Chem.* 278 (21240 - 21246)
- Costelloe, S. J., Ward, J. M. und Dalby, P. A. (2007)**, „*Evolutionary analysis of the TPP-dependent enzyme family.*“, *J. Mol. Evol.* 66 (36 – 49)
- Crosby, J und Lienhard, G. E. (1970)**, „*Mechanisms of thiamine-catalyzed reactions. A kinetic analysis of the decarboxylation of pyruvate by 3,4-dimethylthiazolium ion in water and ethanol.*“, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (5707 - 5716)
- Dobritzsch, D. (1998)**, „*Untersuchung zu Struktur und Funktion von Pyruvatdecarboxylasen aus einem Brauereinzuchtstamm und aus dem Bakterium Zymomonas mobilis.*“, Dissertation angefertigt an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Dobritzsch, D., König, S., Schneider, G. und Lu, G. (1998)**, „*High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from Zymomonas mobilis.*“, *J. Biol. Chem.* 273 (20196 – 20204)
- DuPré, D.B. und Wong, J.L. (2005)**, „*Topological analysis of the electron density in model azolium systems for thiamine structure-function: Sulfur is the electron sink and positively polarized carbanions act as nucleophiles.*“, *J. Phys. Chem. A* 109, 7606 – 7612
- Dyda, F., Furey, W., Swaminathan, S., Sax, M., Farrenkopf, B. und Jordan, F. (1993)**, „*Catalytic centers in the thiamin diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4-Å resolution.*“, *Biochemistry* 32 (6165 – 6170)
- Frank, R. A. W., Titman, C. M., Pratap, J. V., Luisi, B. F. und Perham, R. N. (2004)**, „*A molecular switch and proton wire synchronize the active sites in thiamine enzymes.*“, *Science* 306 (872 - 876)
- Frank, R. A. W., Leeper, F. J. und Luisi, B. F. (2007)**, „*Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes.*“, *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (892 – 905)
- Friedemann, R. und Breitkopf, C. (1996)**, „*Theoretical studies on the decarboxylation reaction in thiamin catalysis.*“, *Int. J. Quant. Chem.* 57 (943 – 948)

- Gocke, D., Walter, L., Gauchenova, E., Kolter, G., Knoll, M., Berthold, C. L., Schneider, G., Pleiss, J., Müller, M und Pohl, M. (2008)**, „Rational protein design of ThDP-dependent enzymes - engineering stereoselectivity.“, Chem. Bio. Chem. 9 (406 – 412)
- Goetz, G., Iwan, P., Hauer, B., Breuer, M. und Pohl, M (2001)**, „Continuous production of (R)-phenylacetylcarbinol in an enzyme-membrane reactor using a potent mutant of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*.“, Biotechnol. Bioeng. 74 (317 - 325)
- Goldemberg, J. (2007)**, „Ethanol for a sustainable energy future.“, Science 315 (808 – 810)
- Gonzales, B., Merino, A., Almeida, M. und Vicuna, R. (1986)**, „Comparative growth of natural bacterial isolates on various lignin-related compounds.“, Applied and Environmental Microbiology 52 (1428 – 1432)
- Gonzales, B. und Vicuna, R. (1989)**, „Benzaldehyde lyase, a novel thiamine PP₁-requiring enzyme, from *Pseudomonas fluorescens* Biovar I.“, Journal of Bacteriology 171 (2401 – 2405)
- Gruys, K. J., Halkides, C. J. und Frey, P. A. (1987)**, „Synthesis and properties of 2-acetylthiamin pyrophosphate: An enzymatic reaction intermediate.“, Biochemistry 26, (7575 - 7585)
- Gruys, K. J., Datta, A. und Frey, P. A. (1989)**, „2-Acetylthiamin pyrophosphate (Acetyl-TPP) pH-rate profile for hydrolysis of acetyl-TPP and isolation of acetyl-TPP as a transient species in pyruvate dehydrogenase catalyzed reactions.“, Biochemistry 28 (9071 – 9080)
- Gunawan, C., Satianegara, G., Chen, A. K., Breuer, M., Hauer, B., Rogers, P. L. und Rosche, B. (2007)**, „Yeast pyruvate decarboxylases: variation in biocatalytic characteristics for (R)-phenylacetylcarbinol productio.“, FEMS Yeast Research 7 (33 – 39)
- Gunawan, C., Breuer, M., Hauer, B., Rogers, P. L. und Rosche, B. (2008)**, „Improved (R)-phenylacetylcarbinol production with *Candida utilis* pyruvate decarboxylase at decreased organic to aqueous phase volume ratios.“, Biotechnology Letters 30 (281 – 286)
- Hasson, M. S., Muscate, A., McLeish, M. J., Polovnikova, L. S., Gerlt, J.A., Kenyon, G.L., Petsko, G.A. und Ringe, D. (1998)**, „The crystal structure of benzoylformate decarboxylase at 1.6 Å resolution: diversity of catalytic residues in thiamin diphosphate-dependent enzymes.“, Biochemistry 37 (9918 – 9930)
- Harwood, C. S. und Parales, R. E. (1996)**, „The β -Ketoacid pathway and the biology of self-identity.“, Annual Review of Microbiology 50 (553 – 590)
- Hegeman, G. D. (1966a)**, „Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida* I. Synthesis of the enzymes by the wild type.“, Journal of Bacteriology 91 (1140 – 1154)
- Hegeman, G. D. (1966b)**, „Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida* III. Isolation and Properties of constitutive mutants.“, Journal of Bacteriology 91 (1161 – 1167)
- Hegeman, G. D. (1970)**, „Benzoylformiate decarboxylase (*Pseudomonas putida*).“, Methods in enzymology 17 (674 – 678), Academic Press, New York.

Hildebrandt, G. und Klavehn, W. (1932), „Verfahren zu Herstellung von 1-phenyl-2-methylaminopropan-1-ol.“, Deutsches Reichspatent Nr. 548 459

Hu, Q. und Kluger, R. (2002), „Reactivity of intermediates in benzoylformate decarboxylase: Avoiding the path to destruction.“, J. Am. Chem. Soc. 124 (14858 – 14859)

Iding, H., Dünwald, T., Greiner, L., Liese, A., Müller, M., Siegert, P., Grötzinger, J., Demir, A. S. und Pohl, M. (2000), „Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones.“, Chemistry - A European Journal 6, No. 8 (1483 - 1495)

Janzen, E. (2002), „Die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens*.“, Dissertation angefertigt an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Janzen, E., Müller, M., Kolter-Jung, D., Kneen, M. M., McLeish, M. J. und Pohl, M. (2006), „Characterization of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*: A versatile enzyme for asymmetric C–C bond formation.“, Bioorganic Chemistry 34 (345 - 361)

Jencks, W. P. (1987), „Catalysis in chemistry and enzymology.“, gedruckt von Dover Publications, New York, Seite 615 - 798

Jordan, F., Li, H. und Brown, A. (1999), „Remarkable stabilization of zwitterionic intermediates may account for a billion-fold rate acceleration by thiamin diphosphate-dependent decarboxylases.“, Biochemistry 38 (6369 – 6373)

Jordan, F., Zhang, Z. und Sergienko, E. (2002), „Spectroscopic evidence for participation of the 1',4'-imino tautomer of thiamin diphosphate in catalysis by yeast pyruvate decarboxylase.“, Bioorganic Chemistry 30 (188 – 198)

Jordan, F. (2003), „Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate-dependent enzymatic reactions.“, Nat. Prod. Rep. 20 (184 – 201)

Jordan, F. und Nemeria, N. S. (2005), „Experimental observation of thiamin diphosphate-bound intermediates on enzymes and mechanistic information derived from these observations.“, Bioorganic Chemistry 33 (190 – 215)

Juan, E. Z. M., Hoque, H., Hossain, T., Yamamoto, T., Imamura, S., Suzuki, K., Sekiguchic, T und Takenaka, A. (2007), „The structures of pyruvate oxidase from *Aerococcus viridans* with cofactors and with a reaction intermediate reveal the flexibility of the active-site tunnel for catalysis.“, Acta Crystallographica Section F 63 (900 – 907)

Kaplun, A., Binshtein, E., Vyazmensky, M., Steinmetz, A., Barak, Z., Chipman, D., Tittmann, K. und Shaanan, B. (2008), „Glyoxylate carboligase lacks the canonical active site glutamate of thiamine-dependent enzymes.“, Nat. Chem. Biol. 4 (113 – 118)

Karrer, P. (1947), Bull. Soc. Chim. Fr 149 100

Kemp, D. S. und O'Brien, J. T. (1970), „Base catalysis of thiazolium salt hydrogen exchange and its implications for enzymatic thiamine cofactor catalysis.“, J. Am. Chem. Soc. 92 (2554 - 2555)

Kern, D., Kern, G., Neef, H., Tittmann, K., Killenberg-Jabs, M., Wikner, C., Schneider, G. und Hübner, G. (1997), „*How thiamine diphosphate is activated in enzymes.*“, *Science* 275 (67 – 70)

Killenberg-Jabs, M., König, S., Eberhardt, I., Hohmann, S. und Hübner, G. (1997), „*Role of Glu51 for cofactor binding and catalytic activity in pyruvate decarboxylase from yeast studied by site-directed mutagenesis.*“, *Biochemistry* 36 (1900 – 1905)

Kluger, R., Chin, J., und Smyth, T. (1981), „*Thiamin-catalyzed decarboxylation of pyruvate. Synthesis and reactivity analysis of the central, elusive intermediate, α -lactylthiamin.*“ *J. Am. Chem. Soc.* 103, 884-888

Kluger, R. (1987), „*Thiamin diphosphate: A mechanistic update on enzymic and nonenzymic catalysis of decarboxylation.*“, *Chem. Rev.* 87 (863 – 876)

Kluger, R. und Moore, I. F. (2000), „*Destruction of vitamin B1 by benzaldehyde. reactivity of intermediates in the fragmentation of N1'-benzyl-2-(1-hydroxybenzyl)-thiamin.*“, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (6145 – 6150)

Kluger, R. und Yu, D. (2006), „*Protein-enhanced decarboxylation of the covalent intermediate in benzoylformate decarboxylase – Desolvation or acid catalysis.*“, *Bioorg. Chemistry* 34 (337 - 344)

Kluger, R. und Tittmann, K. (2008), „*Thiamin diphosphate catalysis: enzymic and nonenzymic intermediates.*“, *Chem. Rev.* 108 (1797 – 1833)

Kneen, M. M., Pogozeva, I. D., Kenyon, G. L. und McLeish, M. J. (2005), „*Exploring the active site of benzaldehyde lyase by modeling and mutagenesis.*“, *Biochimica et Biophysica acta* 1753 (263 – 271)

Knoll, M., Müller, M., Pleiss, J. und Pohl, M. (2006), „*Factors mediating activity, selectivity, and substrate specificity for the thiamin diphosphate-dependent enzymes benzaldehyde lyase and benzoylformate decarboxylase.*“, *Chem. Bio. Chem.* 7 (1 – 8)

Langenbeck, W. und Hutschenreuther, R. (1930), „*Über organische Katalysatoren. IV. Die Decarboxylierung der Phenylglyoxylsäure und Brenztraubensäure.*“, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 188 (1 – 13)

Langenbeck, W. (1932), „*Fermentproblem und organische Katalyse.*“, *Angew. Chem.* 45 (97 – 99)

Lienhard, G. E. (1966), „*Kinetics and mechanism of the hydrolysis of 2-acetyl-3,4-dimethylthiazolium ion.*“, *J. Am. Chem. Soc.* 88, (5642 - 5649)

Lindqvist, Y., Schneider, G., Ermler, U. und Sundström, M (1992), „*Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution.*“, *The EMBO Journal* Vol. 11 (2373 – 2379)

Massay, V. (2000), „*The chemical and biological versatility of riboflavin.*“, *Biochem. Soc. Trans.* 28 (283 - 296)

Meyer, D. (2004), „*Mechanistische Analyse der Elektronentransferreaktion in Pyruvatoxidase aus Lactobacillus plantarum.*“, Diplomarbeit angefertigt an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

Mizuhara, S und Handler, P. J. (1954), „*Mechanism of thiamine-catalyzed reactions.*“, J. Am. Chem. Soc. 76 (571 - 573)

Mosbacher, T. G., Mueller, M. und Schulz, G. E. (2005), „*Structure and mechanism of the ThDP-dependent benzaldehyde lyase from Pseudomonas fluorescens.*“, FEBS J. 272 (6067 – 6076)

Muller, Y. A. und Schulz, G. E. (1993), „*Structure of the thiamine and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase.*“, Science 259 (965 – 967)

Muller, Y. A., Lindqvist, Y., Furey, W., Schulz, G. E., Jordan, F. und Schneider, G. (1993), „*A thiamin diphosphate binding fold revealed by comparison of the crystal structures of transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase.*“, Structure 1 (95 - 103)

Müller, M. und Sprenger, G. A. (2004), „*Thiamine-dependent enzymes as catalysts of C–C bonding reactions: the role of 'orphan' enzymes.*“, in: Thiamine: Catalytic Mechanisms in Normal and Disease States, New York: Marcel Dekker, Inc. (77 – 92)

Nemeria, N., Baykal, A., Joseph, E., Zhang, S., Yan, Y., Furey, W. und Jordan, F. (2004), „*Tetrahedral intermediates in thiamin diphosphate-dependent decarboxylations exist as a 1',4'-imino tautomeric form of the coenzyme, unlike the michaelis complex or the free coenzyme.*“, Biochemistry 43 (6565 – 6575)

Nemeria, N., Korotchkina, L. I., McLeish, M. J., Kenyon, G. L., Patel, M. und Jordan, F. (2007a), „*Elucidation of the chemistry of enzyme-bound thiamin diphosphate prior to substrate binding: defining internal equilibria among tautomeric and ionization states.*“, Biochemistry 46 (10739 – 10744)

Nemeria, N., Chakraborty, S., Baykal, A., Korotchkina, L. G., Patel, M. S. und Jordan, F. (2007b), „*The 1',4'-iminopyrimidine tautomer of thiamin diphosphate is poised for catalysis in asymmetric active centers on enzymes.*“, PNAS 104 (78 – 82)

Neumann, P., Weidner, A., Pech, A., Stubbs, M. T. und Tittmann, K. (2008), „*Structural basis for membrane binding and catalytic activation of the peripheral membrane enzyme pyruvate oxidase from Escherichia coli.*“, PNAS 105 (17390 – 17395)

Oliver, A.L., Anderson, B. N. und Roddick, F. A. (1999), „*Factors affecting the production of L-phenylacetylcarbinol by yeast: a case study.*“, Advances in microbial physiology 41 (1 – 45)

Pace, C. N., Hebert, E. J., Shaw, K. L., Schell, D., Both, V., Krajcikova, D., Sevcik, J., Wilson, K. S., Dauter, Z., Hartley, R. W. und Grimsley, G. R. (1998), „*Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa, Sa2 and Sa3.*“, J. Mol. Biol. 279 (271 – 286)

Pohl, M., Grotzinger, J., Wollmer, A., Kula, M.R., (1994), „*Reversible dissociation and unfolding of pyruvate decarboxylase from Zymomonas mobilis.*“, Eur. J. Biochem. 224 (651 – 661)

Pohl, M., Lingen, B. und Müller, M. (2002), „*Thiamin-diphosphate-dependent enzymes: new aspects of asymmetric C–C bond formation.*“, Chemistry 8 (5288 – 5295)

Pohl, M., Sprenger, G. A. und Müller, M. (2004), „*A new perspective on thiamin catalysis.*“, Curr. Op. Biotechn. 15 (335 – 342)

Polovnikova, E. S., McLeish, M. J., Sergienko, E. A., Burgner, J. T., Anderson, N. L., Bera, A. K., Jordan, F., Kenyon, G. L. und Hasson, M. S. (2003), „*Structural and kinetic analysis of catalysis by a thiamin diphosphate-dependent enzyme, benzoylformate decarboxylase.*“, Biochemistry 42 (1820-1830)

Rahman, A., Park, D.S., Chang, S.C., McNeil, C.J. und Shim, Y.B. (2006), „*The biosensor based on the pyruvate oxidase modified conducting polymer for phosphate ions determinations.*“, Biosensors and Bioelectronics 21, (1116 – 1124)

Rogers, P. L., Shin, H. S. und Wang, B. (1997), „*Biotransformation for L-Ephedrine Production.*“, Advances in biochemical engineering/biotechnology 56 (33 – 59)

Sandford, V., Breuer, M., Hauer, B., Rogers, P. und Rosche, B., (2005), „*(R)-phenylacetylcarbinol production in aqueous/organic two-phase systems using partially purified pyruvate decarboxylase from Candida utilis.*“, Biotechnology and bioengineering Vol 91, Issue 2 (190 – 198)

Schellenberger, A. (1967), „*Structure and mechanism of action of the active center of yeast pyruvate decarboxylase.*“, Angew. Chem. Int. Ed. 6 (1024 - 1035)

Schellenberger, A. (1998), „*Sixty years of thiamin diphosphate biochemistry.*“, Biochimica et Biophysica acta 1385 (177 – 186)

Schloss, J. V., Van Dyk, D. E., Vasta, J. V. und Kutny, R. M. (1985), „*Purification and properties of Salmonella typhimurium acetolactate synthase isozyme II from Escherichia coli HB 101/pDU9.*“, Biochemistry 24 (4952 – 4959)

Schütz, A., Golbik, R., König, S. Hübner, G. und Tittmann, K. (2005), „*Intermediates and transition states in thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. A kinetic and NMR Study on Wild-Type Indolepyruvate decarboxylase and variants using indolepyruvate, benzoylformate, and pyruvate as substrates.*“, Biochemistry 44 (6164 – 6179)

Sedewitz, B., Schleifer, K. H. und Götz, F. (1984a), „*Purification and biochemical characterization of pyruvate oxidase from Lactobacillus plantarum.*“, J. of Bacteriology 160 (273 – 278)

Sedewitz, B., Schleifer, K. H. und Götz, F. (1984b), „*Physiological role of pyruvate oxidase in the aerobic metabolism of Lactobacillus plantarum.*“, J. of Bacteriology 160 (462 - 465)

Seifert, F., Golbik, R., Brauer, J., Lilie, H., Schröder-Tittmann, K., Hinze, E., Korotchkina, L. G., Patel, M. S. und Tittmann, K. (2006), „*Direct kinetic evidence for half-of-the-sites reactivity in the E1 component of the human pyruvate dehydrogenase multienzyme complex through alternating sites cofactor activation.*“, Biochemistry 45 (12775 – 12785)

Sergienko, E. A., Wang, J., Polovnikova, L., Hasson, M. S., McLeish, M. J., Kenyon, G. L. und Jordan, F. (2000), „Spectroscopic detection of transient thiamin diphosphate-bound intermediates on benzoylformate decarboxylase.“, *Biochemistry* 39 (13862 – 13869)

Shin, W., Oh, D. W., Chae, C. H. und Yoon, T. S. (1993), „Conformational analyses of thiamin-related compounds. A stereochemical model for thiamin catalysis.“ *J. Am. Chem. Soc.* 115 (12238 - 12250)

Shukla, V. B. und Kulkarni, P. R. (2000), „L-Phenylacetylcarbinol (L-PAC): biosynthesis and industrial applications.“, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16 (499 – 506)

Spellerberg, B., Cundell, D. R., Sandros, J., Pearce, B. J., Idänpään-Heikkilä, I., Rosenow, C. und Masure, H. R. (1996), „Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*.“, *Mol. Microbiology* 19 (803 – 813)

Stephanopoulos, G. (2007), „Challenges in Engineering Microbes for Biofuels Production.“, *Science* 315 (801 – 804)

Stern, K. G. und Melnick, J. L. (1939), „On the mechanism of cocarboxylase action.“, *J. Biol. Chem.* 131 (597 – 613)

Stillger, T. (2004), „Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen.“, Dissertation angefertigt an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Sugden, P. H. und Randle, P. J. (1978), „Regulation of pig heart pyruvate dehydrogenase by phosphorylation.“, *Biochem. J.* 173 (659 - 668)

Tittmann, K., Proske, D., Spinka, M., Ghisla, S., Rudolph, R., Hübner, G. und Kern, G. (1998), „Activation of thiamin diphosphate and FAD in the phosphate dependent pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*.“, *J. Biol. Chem.* 273 (12929 – 12934)

Tittmann, K., Golbik, R., Ghisla, S. und Hübner, G. (2000), „Mechanism of elementary catalytic steps in pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*.“ *Biochemistry* 39 (10747 - 10754)

Tittmann, K., Golbik, R., Uhlemann, K., Khailova, L., Schneider, G., Patel, M., Jordan, F., Chipman, D. M., Duggleby, R. G. und Hübner, G. (2003), „NMR analysis of covalent intermediates in thiamin diphosphate enzymes.“ *Biochemistry* 42 (7885 - 7891)

Tittmann, K., Wille, G., Golbik, R., Weidner, A., Ghisla, S. und Hübner, G. (2005a), „Radical phosphate transfer mechanism for the thiamin diphosphate- and FAD-dependent pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. Kinetic coupling of intercofactor electron transfer with phosphate transfer to acetyl-thiamin diphosphate via a transient FAD semiquinone/hydroxyethyl-ThDP radical pair.“, *Biochemistry* 44 (13291 - 13303)

Tittmann, K., Vyazmensky, M., Hübner, G., Barak, Z. und Chipman, D. M. (2005b), „The carboligation reaction of acetoxyacid synthase II: Steady-state intermediate distributions in wild type and mutants by NMR.“, *PNAS* 102 (553 – 558)

Turano, A., Furey, W., Pletcher, J., Sax, M., Pike, D. und Kluger R. (1982), „*Synthesis and crystal structure of an analogue of 2-(α -lactyl)thiamin, racemic methyl 2-hydroxy-2-(2-thiamin)ethylphosphonate chloride trihydrate. A conformation for a least-motion, maximum-overlap mechanism for thiamin catalysis.*“, J. Am. Chem. Soc. 104 (3089 - 3095)

Wang, Z., Chen, M., Xu, Y., Li, S., Lu, W., Ping, S., Zhang, W. und Lin, M. (2008), „*An ethanol-tolerant recombinant Escherichia coli expressing Zymomonas mobilis pdc and adhB genes for enhanced ethanol production from xylose.*“, Biotechnol. Lett. 30 (657 – 663)

Washabaugh, M. W. und Jencks, W. P. (1988), „*Thiazolium C(2)-proton exchange: structure-reactivity correlations and the pKa of thiamin C(2)-H revisited.*“, Biochemistry 27 (5044 – 5453)

Wendorff, M (2006), „*Neue Benzoylformiatdecarboxylasen für die Biokatalyse.*“, Dissertation angefertigt an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Wille, G., Meyer, D., Steinmetz, A., Hinze, E., Golbik, R. und Tittmann, K. (2006), „*The catalytic cycle of a thiamin diphosphate enzyme examined by cryocrystallography.*“, Nat. Chem. Biol. 2 (324 – 328)

Williams, R. R. (1936), „*Structure of vitamin B1.*“, J. Am. Chem. Soc. 58 (1063 – 1064)

Yep, A., Kenyon, G. L. und McLeish, M. J. (2008), „*Saturation mutagenesis of putative catalytic residues of benzoylformate decarboxylase provides a challenge to the accepted mechanism.*“, PNAS 105 (5733 – 5738)

7 Anhang

Tab. A1: Kristallographische Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung von *LpPOX F479W* in Komplex mit verschiedenen Intermediaten. Werte in Klammern beziehen sich auf die jeweils höchste Auflösungsschale.

Name	F479W	F479W + L-ThDP	F479W + PL-ThDP	F479W + HE-ThDP	F479W + Ac-ThDP
PDB-Code	2EZ4	2EZ8	2EZ9	2EZT	2EZU
Datenaufnahme					
Wellenlänge (Å)	0,8045	0,8430	0,8430	0,8430	0,8430
Röntgenquelle	X13	BW7B	BW7B	BW7B	BW7B
Raumgruppe	C222 ₁				
Zellkonstanten					
a (Å)	118,346	118,133	118,661	118,790	118,276
b (Å)	154,180	154,462	154,517	154,022	154,724
c (Å)	165,432	165,656	165,640	165,320	166,003
Auflösung (Å) (höchste Schale)	99 – 2,03 (2,08 – 2,03)	99 – 1,97 (2,02 – 1,97)	99 – 1,60 (1,64 – 1,60)	99 – 2,29 (2,35 – 2,29)	99 – 2,16 (2,22 – 2,16)
R _{merge}	0,107 (0,343)	0,107 (0,275)	0,089 (0,343)	0,181 (0,444)	0,116 (0,258)
I/σ	10,2 (2,8)	11,5 (3,5)	12,1 (2,4)	8,9 (3,3)	9,5 (3,2)
Vollständigkeit (%)	94,6 (93,0)	98,2 (84,6)	83,0 (75,5)	99,2 (98,1)	95,2 (93,4)
Redundanz	3,8 (2,8)	4,5 (3,7)	4,6 (3,1)	4,6 (4,1)	4,0 (2,7)
Refinement					
Auflösung (Å) (höchste Schale)	94,07 – 2,03 (2,08 – 2,03)	93,66 – 1,97 (2,20 – 1,97)	94,07 – 1,60 (1,64 – 1,60)	94,07 – 2,29 (2,35 – 2,29)	94,07 – 2,16 (2,22 – 2,16)
Anzahl der Reflektionen	92823	105590	165339	68079	77402
R _{work}	0,156 (0,186)	0,149 (0,172)	0,159 (0,187)	0,151 (0,169)	0,144 (0,158)
R _{free}	0,186 (0,209)	0,172 (0,203)	0,180 (0,234)	0,187 (0,244)	0,184 (0,212)
Anzahl der Atome					
Protein	9046	9046	9046	9046	9046
Ligand	172	186	178	190	180
Wasser	965	993	1030	948	977
Mean B-Faktor (Å²)					
Protein	15,3	12,2	12,0	10,9	11,3
ThDP (Addukt)	13,6	12,4	13,0	9,7	11,2
FAD	11,3	8,4	8,4	6,2	8,1
Wasser	24,4	21,7	23,4	17,4	19,4
R.m.s. Abweichung					
Bindungslängen (Å)	0,012	0,014	0,009	0,014	0,016
Bindungswinkel (°)	1,352	1,463	1,318	1,508	1,521
Ramachandran (%)					
favorisiert	92,2	91,0	91,9	91,4	91,5
erlaubt	7,6	8,8	7,9	8,4	8,3
generell erlaubt	0	0	0	0	0
nicht erlaubt	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

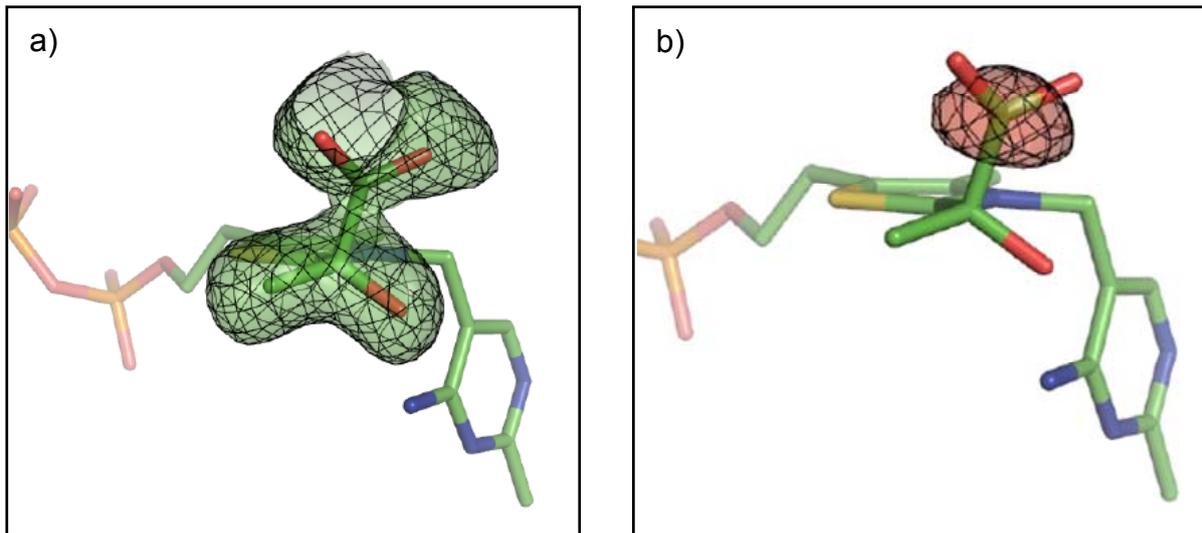


Abb. A1: Elektronendichtekarten der Laktyl-Komponente in 2EZ8: a) Positive Dichte in der $2F_o - F_c$ omit map bei 3σ , die Laktyl-Komponente am Kofaktor wurde bei der Strukturberechnung nicht berücksichtigt. b) Negative Dichte bei 4σ , wenn Laktyl-ThDP in die Berechnung eingeht. Die Abbildungen zeigen, dass L-ThDP einen Großteil des Intermediats in dieser Struktur darstellt (80 %), ein Teil aber bereits decarboxyliert vorliegt. Die Abbildungen sind aus (Wille *et al.* 2006) entnommen.

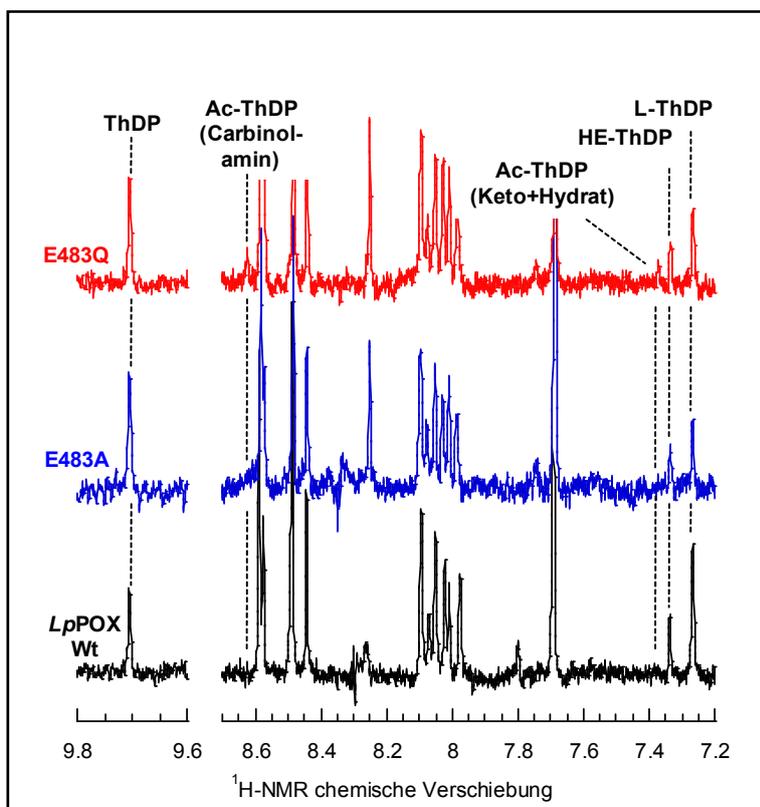


Abb. A2: Intermediatverteilung von *LpPOX* Wt, E483A und E483Q bei der Umsetzung von 50 mM Pyruvat bei 25 °C in 200 mM Phosphat, 1 mM $MgSO_4$, pH 6,0

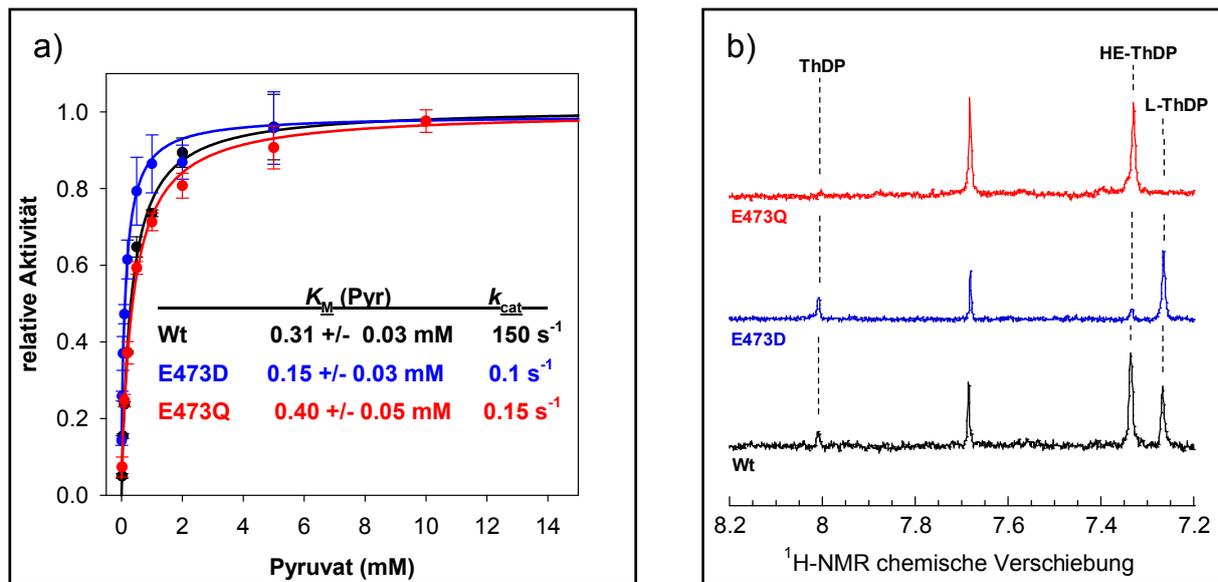


Abb. A3: Pyruvatumsatz durch ZmPDC Wt und Glu473-Varianten, a) normierte Aktivitäten im optisch gekoppelten Test mit ADH und NADH. b) Intermediatverteilung im *steady state* beim Umsatz von 50 mM Pyruvat in 50 mM MES, 1 mM MgSO₄, pH 6,0

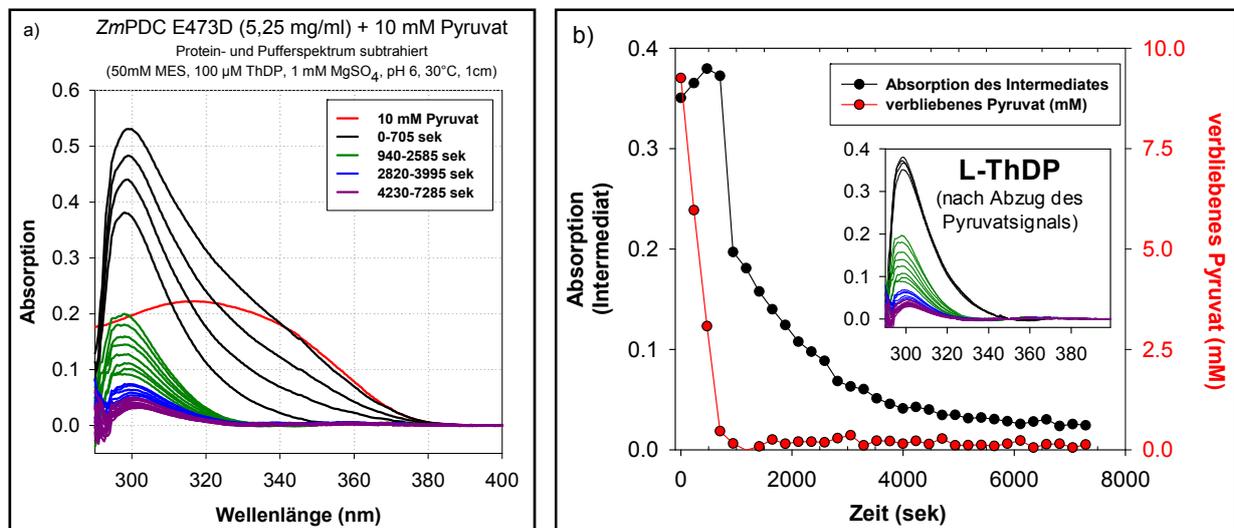


Abb. A4: Zeitlicher Verlauf des Zerfalls des Absorptionssignals von L-ThDP in ZmPDC E473D. a) Absorptionsspektren nach Zugabe von 10 mM Pyruvat, Signale von Puffer und Protein sind bereits subtrahiert. Auf Grund der Tatsache, dass Pyruvat oberhalb 340 nm alleinig absorbiert, können zu jedem Zeitpunkt die verbliebenen Mengen an Substrat berechnet werden. b) Zeitlicher Verlauf des Zerfalls von L-ThDP und Pyruvat, im *inset* sind die reinen Spektren des Intermediats gezeigt.

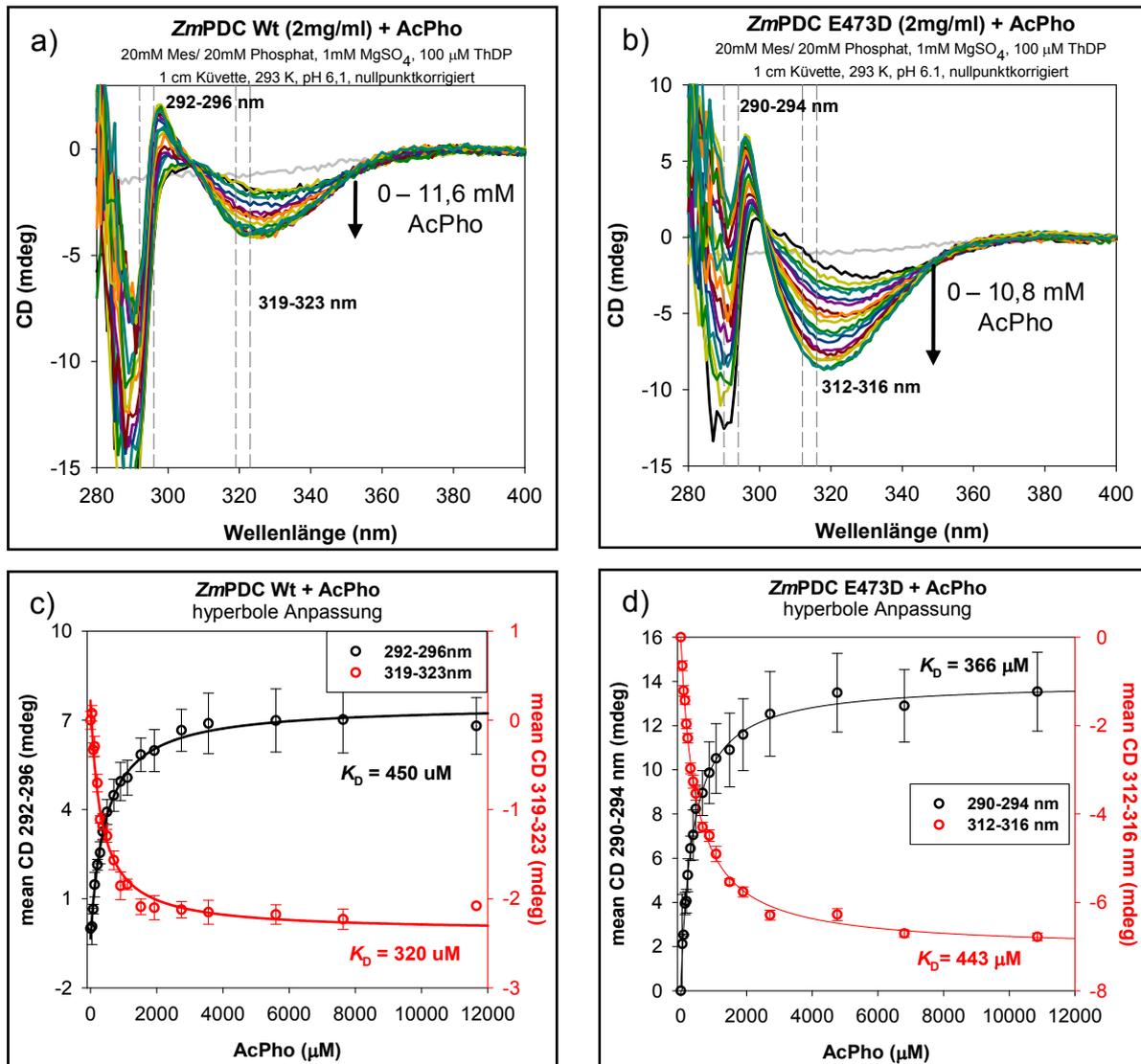


Abb. A5: Titration von AcPho zu ZmPDC Wt und E473D. a) CD-Spektren von ZmPDC Wt mit verschiedenen Konzentrationen an AcPho. b) CD-Spektren von ZmPDC E473D mit verschiedenen Konzentrationen an AcPho. grau = Pufferspektrum, schwarz = Enzymspektrum in Abwesenheit von AcPho. c) Abhängigkeit der Signalbildung in ZmPDC Wt. d) Abhängigkeit der Signalbildung in E473D. Die beobachteten Signaländerungen bei etwa 295 und 320 nm zeigen den gleichen Verlauf. Es konnte keine Bindung von AcPho an E473Q beobachtet werden. MAP kann auf Grund der voluminöseren Kopfgruppe im Gegensatz zu AcPho nicht an ZmPDC Wt oder E473D binden.

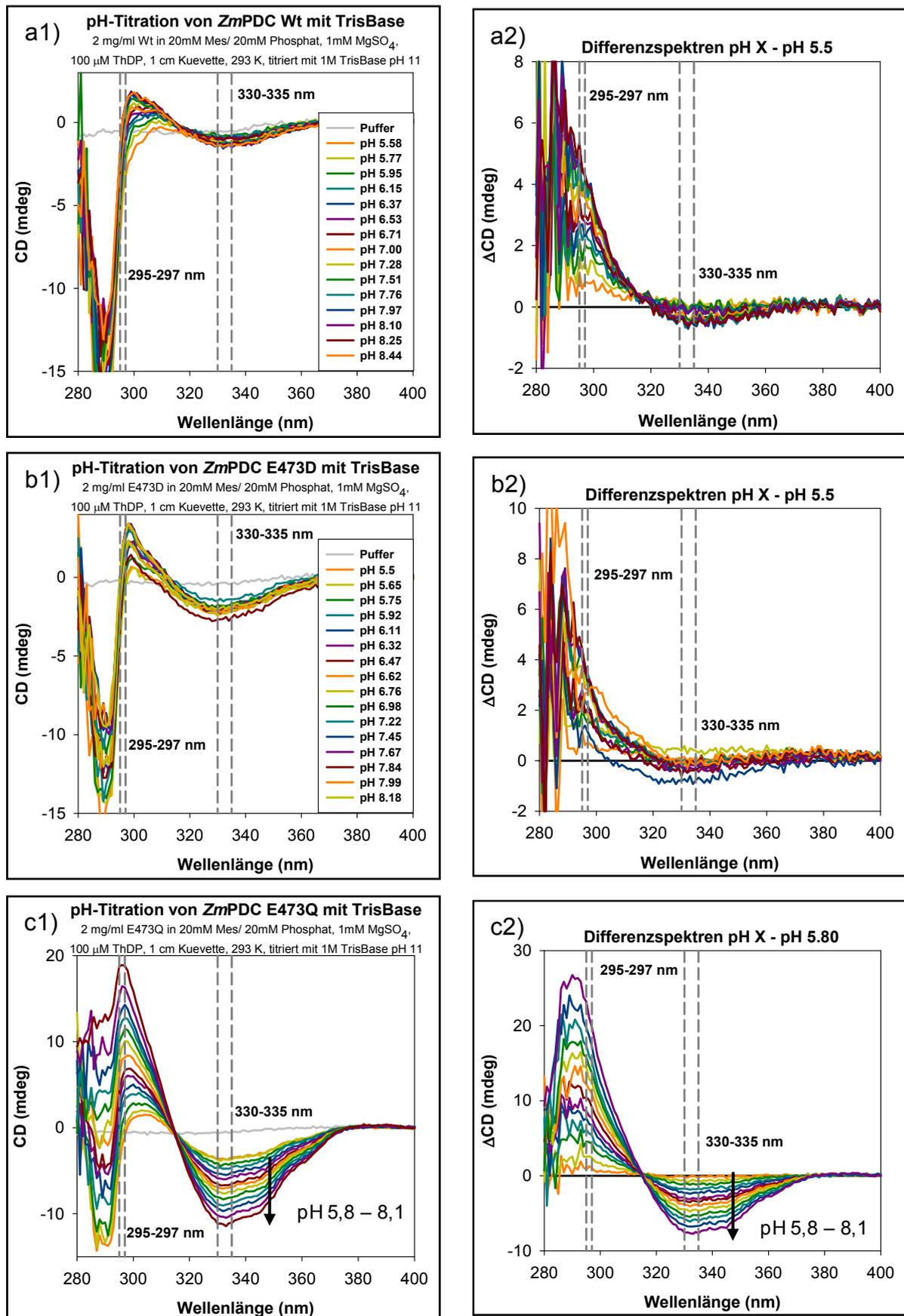


Abb. A6: pH-Titrations in ZmpDC Wt und Varianten. Links: Spektren der Enzyme bei verschiedenen pH-Werten. Rechts: Differenzspektren nach Abzug des Spektrums beim jeweils niedrigsten pH-Wert

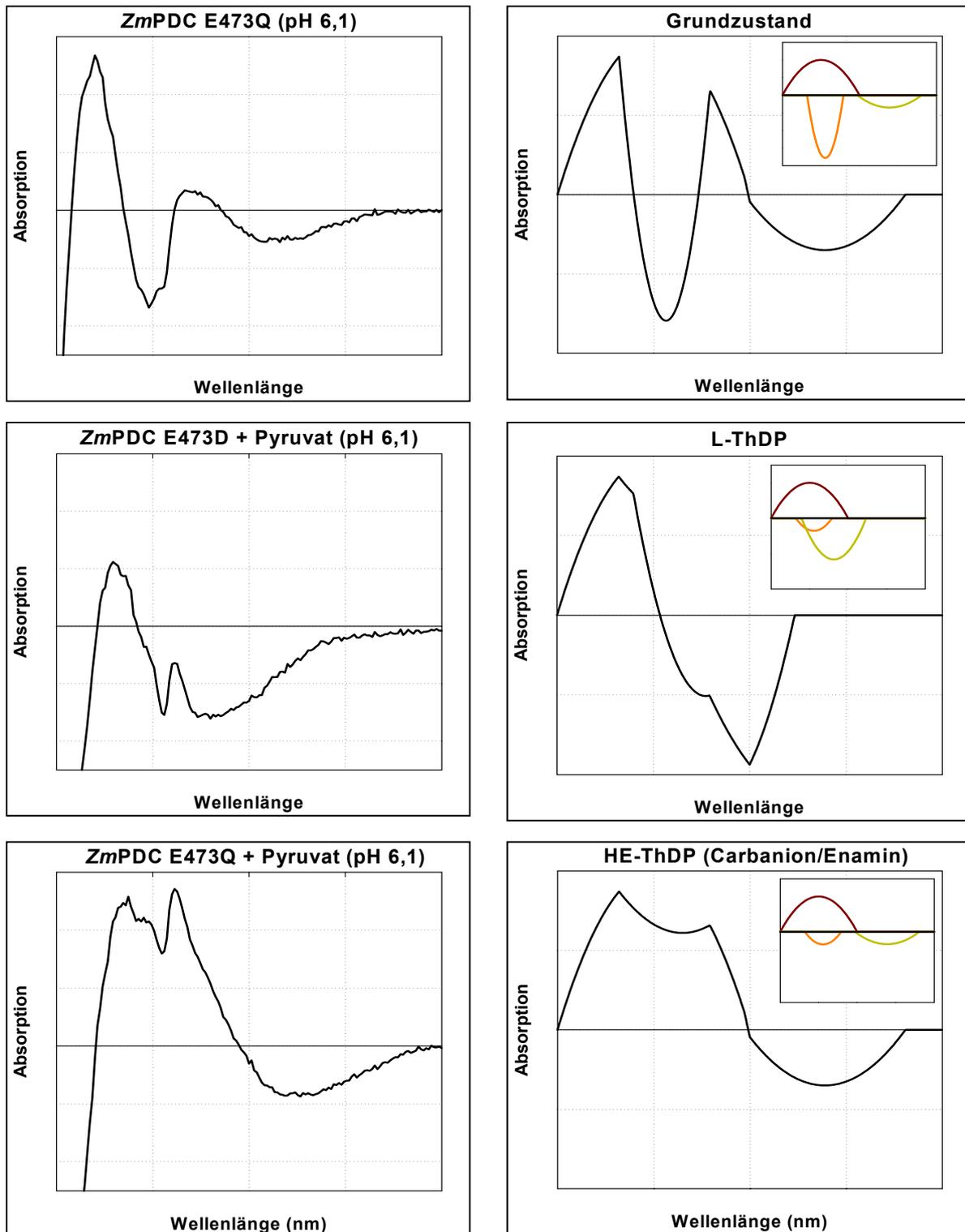


Abb. A7: Vergleich der gemessenen CD-Spektren von *ZmPDC* Varianten (linke Spalte) mit simulierten Spektren (rechte Spalte). Im *inset* sind die drei Einzelsignale gezeigt, die zum jeweiligen Gesamtspektrum addiert wurden. Erklärung siehe Text in Kapitel 3.2.2.3.2.

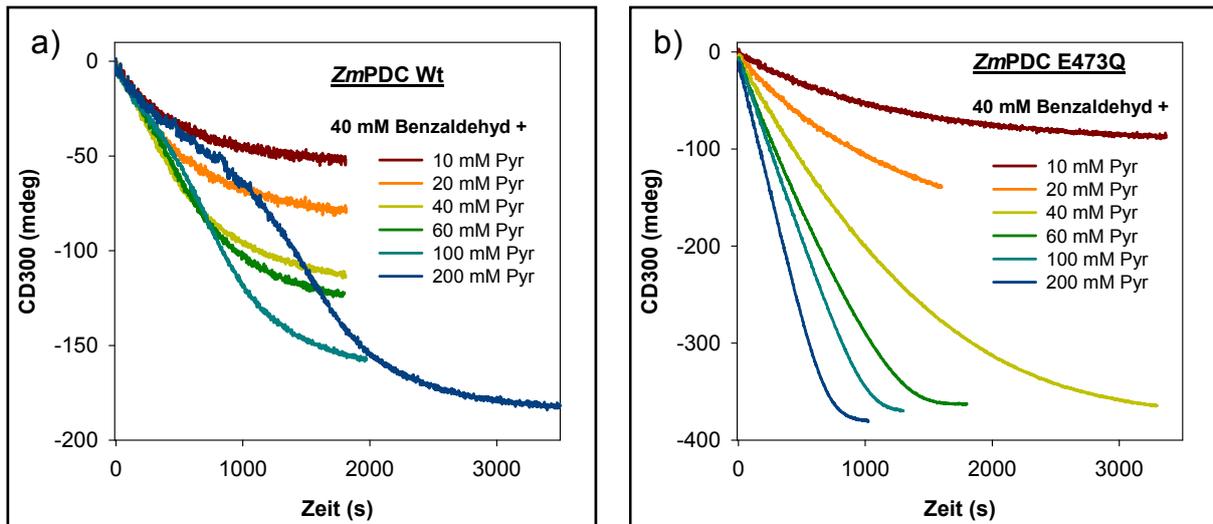


Abb. A8: Progresskurven der PAC-Bildung im CD-basierten Ansatz. Exemplarisch sind die Reaktionen von 40 mM Benzaldehyd mit steigenden Konzentrationen an Pyruvat dargestellt. a) für *ZmPDC Wt*, b) für *ZmPDC E473Q*. Die Bedingungen sind in Kapitel 2.6.1 gegeben. Mit zunehmender Konzentration an Pyruvat steigt im Wt-Ansatz die Menge an gebildetem Acetoin. Dadurch kommt es zur Ausbildung von *lag*-Phasen. In E473Q sind dagegen auch bei den höchsten eingesetzten Pyruvat-Konzentrationen keine *lag*-Phasen sichtbar.

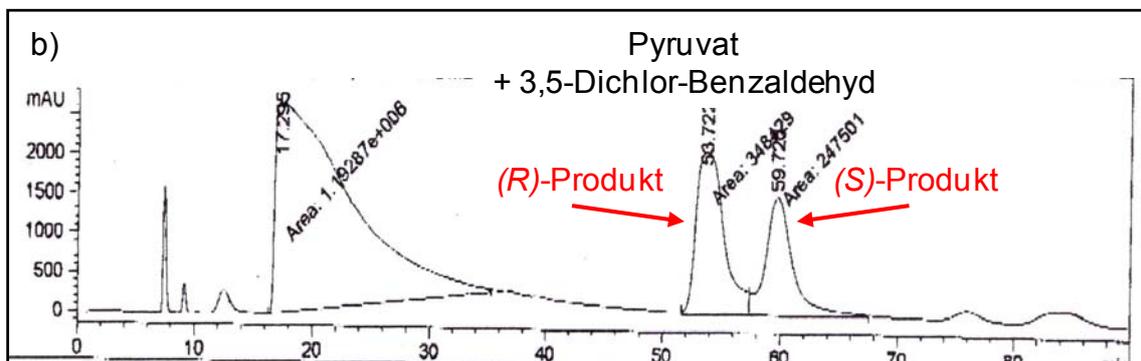
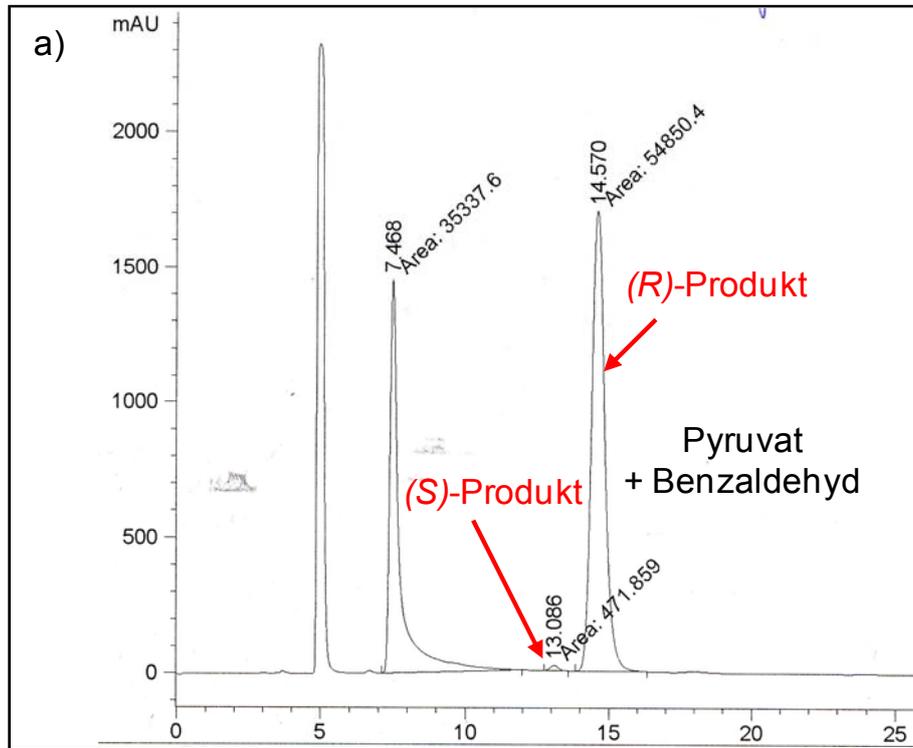


Abb. A9: Bestimmung des ee von Carboligationsprodukten mit chiraler HPLC. Zwei Chromatogramme (Detektion bei 210 nm) sind exemplarisch dargestellt. a) Umsetzung von Pyruvat und Benzaldehyd, b) Umsetzung von Pyruvat und 3,5-Dichlor-Benzaldehyd durch *ZmPDC* E473Q. Die Skalierung der Abzisse ist in Minuten angegeben.

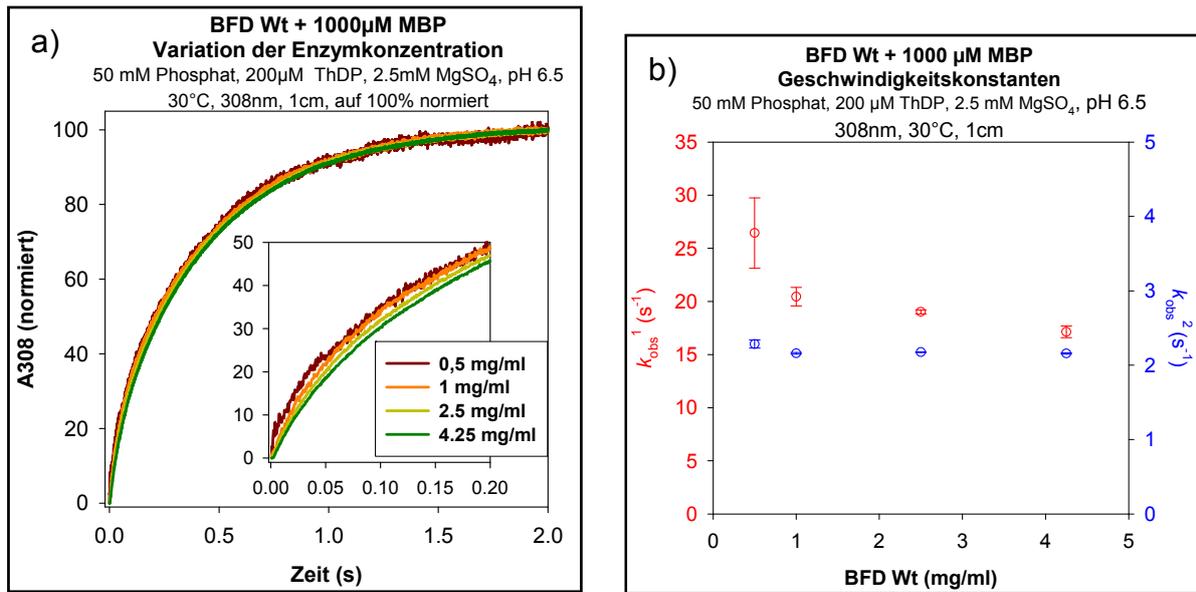


Abb. A10: Abhängigkeit der MBP-Bindung von der BFDC-Konzentration. a) Progresskurven bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen. b) Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der beiden detektierten Phasen von der BFDC-Konzentration

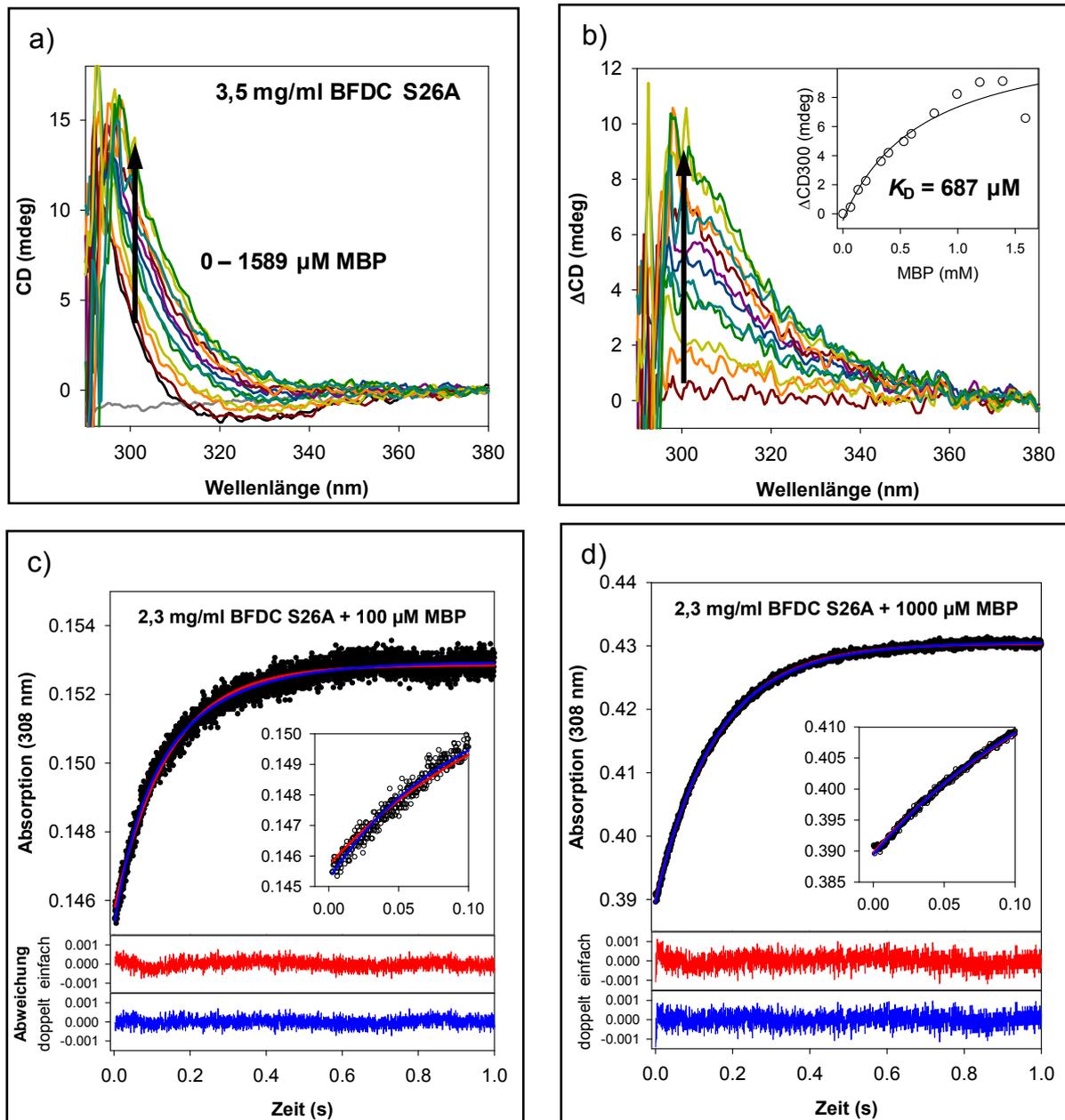


Abb. A11: Bindung von MBP an PpBFDC S26A. a) CD-Spektren der MBP-Titration. b) Differenzspektren aus a) nach Abzug des Proteinspektrums, im *inset* sind die Werte bei 300 nm hyperbol an die MBP-Konzentration angepasst. c) Kinetik der MBP-Bindung bei 100 μ M Analogon. d) Kinetik der MBP-Bindung bei 1 mM Analogon.

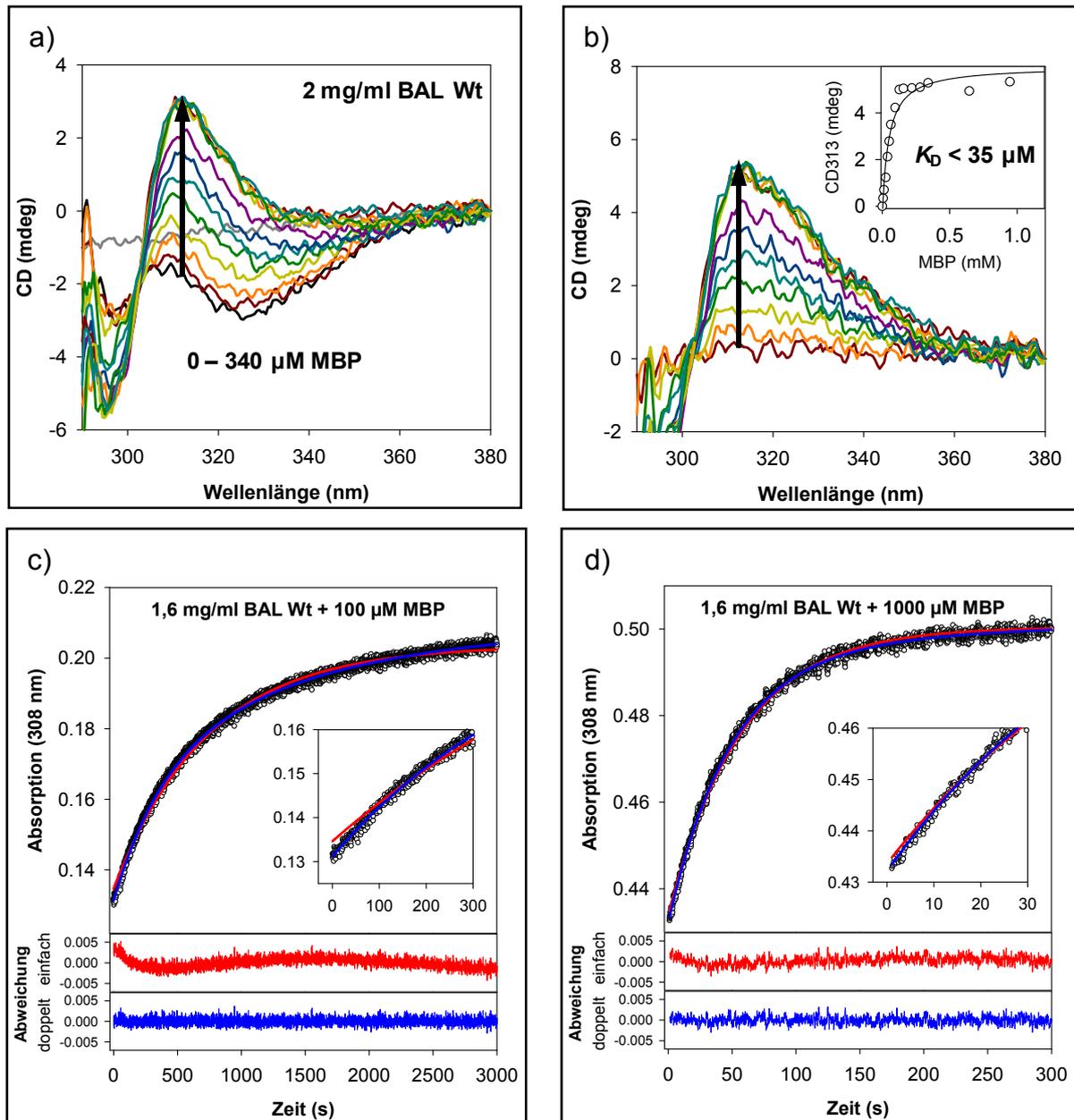


Abb. A12: Bindung von MBP an PfBAL Wt. a) CD-Spektren der MBP-Titration. b) Differenzspektren aus a) nach Abzug des Proteinspektrums, im *inset* sind die Werte bei 313 nm hyperbol an die MBP-Konzentration angepasst. c) Kinetik der MBP-Bindung bei 100 μM Analogon. d) Kinetik der MBP-Bindung bei 1 mM Analogon.

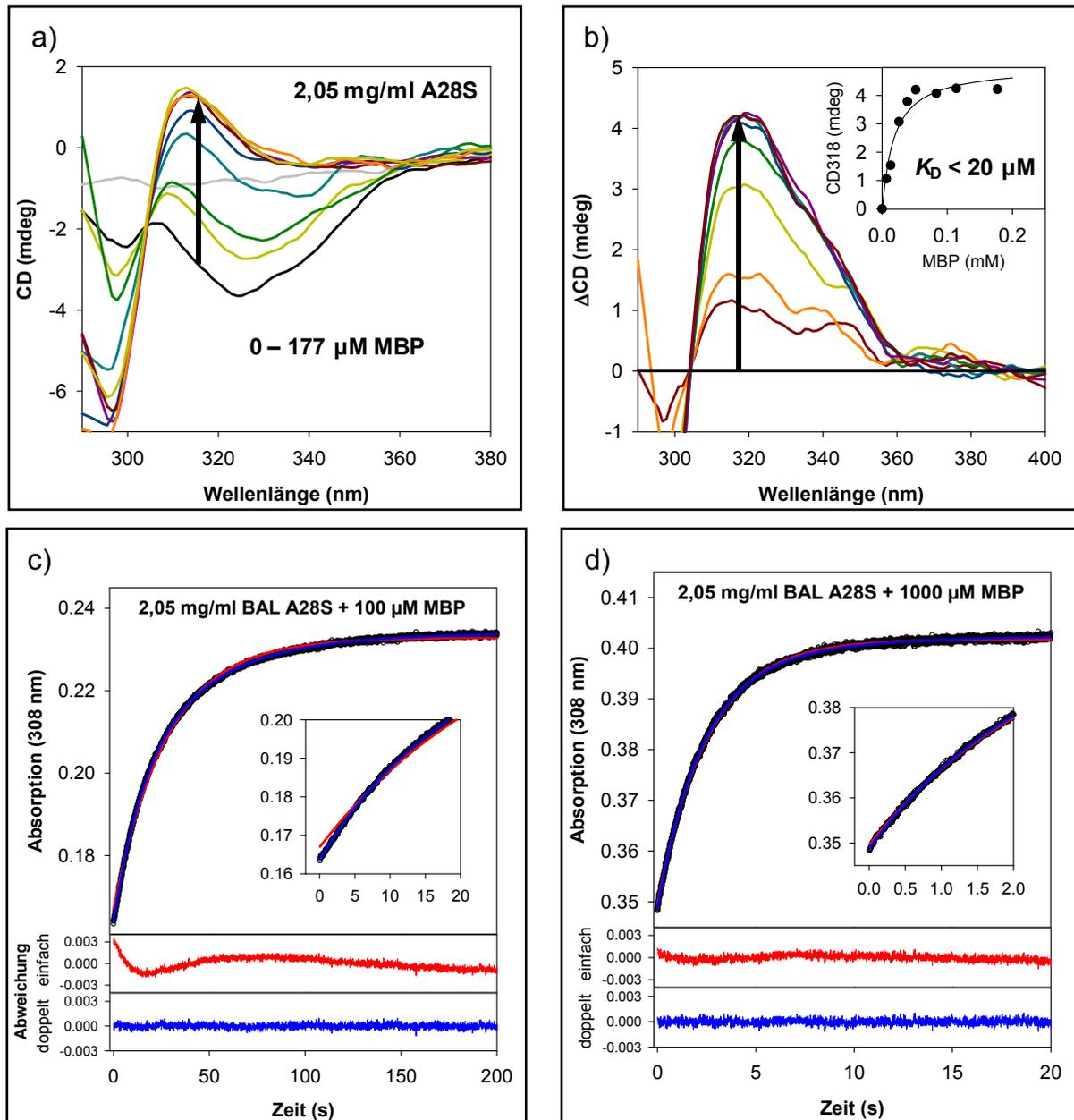


Abb. A13: Bindung von MBP an PfBAL A28S. a) CD-Spektren der MBP-Titration. b) Differenzspektren aus a) nach Abzug des Proteinspektrums, im *inset* sind die Werte bei 318 nm hyperbol an die MBP-Konzentration angepasst. c) Kinetik der MBP-Bindung bei 100 µM Analogon. d) Kinetik der MBP-Bindung bei 1 mM Analogon. Die Spektren in a) und b) wurden im Program SigmaPlot 8.0 mit einer polynomischen Funktion geglättet. Die Form der Spektren wurde dadurch nicht geändert.

Danksagung

Die Arbeit hätte ohne das vielgestaltige Mitwirken verschiedener Personen nicht in dem vorliegenden Umfang verfasst werden können. Diesen Personen gilt mein Dank.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Kai Tittmann für die Möglichkeit bedanken, meine Promotionsarbeit in seiner noch jungen Arbeitsgruppe anzufertigen. Seine ständige Unterstützung theoretischer und praktischer Natur hat in nicht unerheblichen Maße zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Insbesondere möchte ich mich für die Unterstützung während meiner ersten enzymologischen Gehversuche im Laufe des Forschungsgruppenpraktikums und der Diplomarbeit bedanken. Außerdem wurden alle NMR-Daten von Prof. Dr. Kai Tittmann aufgenommen und ausgewertet.

Die chemisch-synthetische Expertise von Herrn PD Dr. Ralph Golbik hat mir die umfangreichen Arbeiten mit den substratanalogen Phosphonaten ermöglicht.

Herrn Dr. Georg Wille möchte ich besonders für die Datenaufnahme und Lösung der LpPOX-Kristallstrukturen danken. Desweiteren hat er mir freundlicherweise die Plasmide zur Expression der LpPOX-Varianten zur Verfügung gestellt.

Der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Milton Stubbs danke ich für die Unterstützung während der kristallographischen Arbeiten an ZmPDC. Besonders Dr. Pjotr Neumann und Dr. Christoph Partier haben mir bei der Vermessung der „king-size crystals“ geholfen.

PD Dr. Martina Pohl, Prof. Dr. Michael Müller und Prof. Dr. Frank Jordan danke ich dafür, dass sie mir den Aufenthalt in ihren Arbeitsgruppen ermöglicht und mir ihre jeweiligen wissenschaftlichen und methodischen Expertisen für die Bearbeitung meiner Thematik zur Verfügung gestellt haben. Bei der Gelegenheit möchte ich mich auch bei Geraldine Kolter, Lydia Walter und Dr. Natalia Nemeria bedanken, welche mich während dieser Aufenthalte fürsorglich betreut haben.

Es übersteigt mein Erinnerungsvermögen, die Vielzahl von Schülern und Studenten zu benennen, welche im Rahmen diverser Praktika Ergebnisse zur vorliegenden Arbeit beisteuern konnten. Der Beitrag von Dipl. Biochemikerin Susan Böhme war allerdings unverhältnismäßig groß. Durch ihren unermüdlichen Fleiß konnte sie im Rahmen ihrer Diplomarbeit eine Vielzahl der Daten bezüglich der LpPOX Glu483-Varianten erarbeiten – dafür mein Dank an sie.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung Enzymologie und der AG Molekulare Enzymologie für die fantastische Arbeitsatmosphäre. Insbesondere Michael Spinka möchte ich meinen Dank für einige mathematische Hilfestellungen und nicht zuletzt für die sehr interessanten Referate aussprechen, mit welchen er nicht wenige unserer Teepausen erfüllt hat.

Für finanzielle Unterstützung danke ich der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt und dem Graduiertenkolleg 1026. Ein spezieller Dank geht an Prof. Dr. Milton Stubbs, Mechthild Wahle und allen Organisatoren für die Aufnahme ins Grk1026. Die vielen Seminare, Tagungen und insbesondere auch die inoffiziellen Doktorandentreffen hatten nicht nur aus wissenschaftlicher Sicht viele Vorteile zu bieten.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die jahrelange Unterstützung vom Beginn des Studiums bis zur Fertigstellung der Arbeit.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, noch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht.

Göttingen, den 17.10.2009

Lebenslauf

persönliche Angaben

Name:	Meyer
Vorname:	Danilo
geboren:	14.08.1980 in Salzwedel
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch
Adresse:	Am Kirschberge 88, 37085 Göttingen
Email:	danilopeptid@gmx.de

schulischer Werdegang

1987 – 1991	Werner-Lambertz Grundschule (Salzwedel)
1991 – 1999	Albert-Schweitzer Gymnasium / Friedrich-Ludwig-Jahn Gymnasium (Salzwedel)
	Abschluß: Abitur

universitäre Ausbildung

1999 – 2004	Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluß: Diplom („sehr gut“)
seit Juli 2007	Anfertigung der Promotionsarbeit unter Leitung von Prof. Dr. Kai Tittmann, AG „Molekulare Enzymologie“, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Natruwissenschaftliche Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Förderungen

07.2004 – 03.2007	Promotionsstipendium der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt
02.2005 – 06.2008	Assoziiertes Mitglied des GrK1026 „ <i>Conformational transitions in macromolecular interactions</i> “

Forschungsaufenthalte

April 2007	Einwöchiger Aufenthalt in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Martina Pohl (FZ Jülich)
Juni 2007	Einwöchiger Aufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Müller (Universität Freiburg)
Januar 2008	Zweiwöchiger Aufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Jordan (University Newark, USA)

Fähigkeiten

Wissenschaftliche	Grundlagen der Molekularbiologie (Klonierung, PCR, Mutagenese), Expression und Reinigung heterolog exprimierter Proteine, Enzymkinetik (klassisch, <i>stopped flow</i> , <i>quenched flow</i>), Spektroskopische Methoden (UV/VIS, CD, Grundlagen der NMR), Proteinkristallisation
-------------------	---

Lehrerfahrung

Betreuung der Praktika „Enzymkinetik I“ und „Enzymkinetik II“, Betreuung von Forschungsgruppen- und Schülerpraktikanten, Betreuung einer Diplomarbeit

Fremdsprachen

Englisch

Computerprogramme

MS Office, SigmaPlot, KaleidaGraph, ChemSketch, ISIS Draw, PyMol, CCP4 und Coot (Grundlagen)

Publikationen

Wille, G., **Meyer, D.**, Steinmetz, A., Hinze, E., Golbik, R. und Tittmann, K. (2006), „*The catalytic cycle of a thiamin diphosphate enzyme examined by cryocrystallography.*“, Nat. Chem. Biol. 2 (324 – 328)

Bruning, M., Berheide, M., **Meyer, D.**, Golbik, R., Bartunik, H., Liese, A. und Tittmann, K. (2009), „*Structural and kinetic studies on native intermediates and an intermediate analogue in benzoylformate decarboxylase reveal a least-motion mechanism with an unprecedented short-lived pre-decarboxylation intermediate.*“, Biochemistry 48 (3258 – 3268)

Vorträge

„*Enzymes in action - X-ray crystallographic snapshots of the thiamine diphosphate dependent pyruvate oxidase from Lactobacillus plantarum*“, 8. Heart of Europe Biocrystallography Meeting 2005, Karlovy Vary, Tschechische Republik

Desweiteren fünf Vorträge im Rahmen der halbjährlichen Tagungen des Grk1026 „*Conformational transitions in macromolecular interactions*“

Poster

Danilo Meyer, Martina Pohl, Michael Müller & Kai Tittmann, „*From Decarboxylase to Carboligase – Reprogramming an Enzyme for Industrial Purposes*“, First International Meeting of Grk1026, Februar 2008, Halle

Danilo Meyer, Susan Böhme, Georg Wille & Kai Tittmann, „*Glu 483 is involved in multiple steps of LpPOX catalysis*“, Chemical Biology of Thiamin, Mai 2008, Wittenberg