Die Regulation der Pyruvatdecarboxylasen aus den Schlauchpilzen *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa*.

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften der

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Steffen Kutter

geboren am 26.9.1979 in Wolmirstedt

Gutachter:

- 1. Privatdozent Dr. Stephan König
- 2. Prof. Dr. Gunter Schneider
- 3. Prof. Dr. Yves Müller

Verteidigung der Arbeit am 14.04.2009

Inhaltsverzeichnis	1

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	3
1	Einleitung	4
1.1	Funktionelle und strukturelle Untersuchung von Proteinen	4
1.2	Struktur I niaminpyrophosphat-abhangiger Enzyme	5
1.3	Pyruvatdecarboxylase	11
1.4	Zielstellung	20
2	Materialien und Methoden	22
2.1	Materialien	22
2.1.1	Chemikalienverzeichnis	22
2.1.2	Verwendete chromatographische Säulen	23
2.1.3	Geräte	24
2.1.4	Messplätze	24
2.1.5	Organismen und Plasmide	25
2.2	Methoden	25
2.2.1	Proteinexpression und Reinigung	25
2.2.1.1	<i>Nc</i> PDC, Wildtypenzym	25
2.2.1.2	<i>KI</i> PDC, Wildtypenzym	26
2.2.1.3	ScPDC, Wildtypenzym	27
2.2.1.4	ScPDC, rekombinantes Wildtypenzym	27
2.2.1.5	Rekombinante ScPDC Varianten D28A und E477Q	27
2.2.2	SDS-Gelelektrophorese	28
2.2.3	Kristallisation, Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung	28
2.2.3.1	Native <i>Nc</i> PDC, Wildtypenzym	28
2.2.3.2	Native <i>KI</i> PDC, Wildtypenzym	28
2.2.3.3	MAP-aktivierte <i>KI</i> PDC, Wildtypenzym	30
2.2.3.4	Pyruvamid-aktivierte <i>KI</i> PDC, Wildtypenzym	30
2.2.3.5	Pyruvat-aktivierte ScPDC _{D28A} und ScPDC _{E477Q}	31
2.2.3.6	Pyruvamid-aktivierte ScPDC _{E477Q}	32
2.2.3.7	Soaking der Pyruvamid-aktivierten ScPDC _{E477Q} mit Acetaldehyd	32
2.2.3.8	Verwendete Programme für die Datenanalyse der PDC-Kristall- strukturen	32
2.2.4	SAXS-Messungen	33
2.2.5	Proteinkonzentrationsbestimmungen	33
2.2.6	Kinetische Messungen	33
2.2.7	Messungen in Gegenwart von MAP und Pyruvamid	34
2.2.8	Analytische Gelfiltration	34
3	Ergebnisse und Diskussion	35
3.1	Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase aus Neurospora	35
	crassa	
3.1.1	Kinetische Charakterisierung	36
3.1.2	Strukturelle Charakterisierung	41
3.2	Präparation der PDC aus Hefen	42
3.2.1	Enzymreinigung der Pyruvatdecarboxylase aus Kluyveromyces lactis	42

Enzymreinigung der Pyruvatdecarboxylase aus Saccharomyces cerevisiae	43
Kinetische Untersuchungen zur Substrataktivierung der Pyruvat- decarboxylasen aus <i>Kluyveromyces lactis</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
Die native KIPDC-Kristallstruktur	47
Kinetische Charakterisierung der Substratanaloga Methylacetyl- phosphonat und Pyruvamid im Komplex mit den Pyruvatdecar- boxylasen aus <i>Kluyveromyces lactis</i> und <i>Saccharomyces cerevi-</i> <i>siae</i>	55
Kristallstrukturen von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen in Gegenwart aktivierender Liganden	70
SAXS-Studien zur globalen Dimer-Dimer-Rotation von Hefe-Pyru- vatdecarboxylasen während der Aktivierung	96
Ausblick	105
Zusammenfassung	106
Literaturverzeichnis	108
Statistische Daten der gemessenen Kristallstrukturen	122
Differenzelektronendichtekarten der gebundenen Liganden	123
r.m.s.dDaten der superpositionierten Kristallstrukturen	124
Ableitung der kinetischen Gleichungen	126
Temperaturabhängigkeit der Aktivierungsparameter	129
	Enzymreinigung der Pyruvatdecarboxylase aus <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> Kinetische Untersuchungen zur Substrataktivierung der Pyruvat- decarboxylasen aus <i>Kluyveromyces lactis</i> und <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> Die native <i>KI</i> PDC-Kristallstruktur Kinetische Charakterisierung der Substratanaloga Methylacetyl- phosphonat und Pyruvamid im Komplex mit den Pyruvatdecar- boxylasen aus <i>Kluyveromyces lactis</i> und <i>Saccharomyces cerevi- siae</i> Kristallstrukturen von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen in Gegenwart aktivierender Liganden <i>SAXS</i> -Studien zur globalen Dimer-Dimer-Rotation von Hefe-Pyru- vatdecarboxylasen während der Aktivierung Ausblick Zusammenfassung Literaturverzeichnis Statistische Daten der gemessenen Kristallstrukturen Differenzelektronendichtekarten der gebundenen Liganden <i>r.m.s.d.</i> -Daten der superpositionierten Kristallstrukturen Ableitung der kinetischen Gleichungen Temperaturabhängigkeit der Aktivierungsparameter

2

Abkürzungsverzeichnis

Abstand	Δ
Acetohydroxysäuresynthase	AHAS
Arabidopsis thaliana	At
Azospirillum brasilense	Ab
Benzoylformiatdecarboxylase	BFD
Desoxyribonukleinsäure	DNA
Durchschnitt	Ø
Enterobacter cloacae	Ec
Gyrationsradius	R_{G}
Halbwertzeit	t _{1/2}
Indolpyruvatdecarboxylase	IPDC
Kernspinresonanzspektroskopie	NMR
Kluyveromyces lactis	KI
Letale Dosis bei der 50 % der Probanden sterben	LD ₅₀
Methylacetylphosphonat	MAP
Neurospora crassa	Nc
Phenylpyruvatdecarboxylase	PPDC
Pisum sativum	Ps
Protein Data Bank	PDB
Pseudomonas putida	Рр
Pyruvatdecarboxylase	PDC
Pyruvatoxidase	POX
root mean square deviation	r.m.s.d.
Saccharomyces cerevisiae	Sc
Seite	S.
Sichtbares Licht	VIS
Small angle X-ray solution scattering	SAXS
Streuintensität extrapoliert auf den Streuvektor s = 0	I(0)
Streuvektor mit s = $(4 \pi \sin \theta)/\lambda$	S
Temperatur	Т
Thiaminpyrophosphat	TPP
Ultraviolettes Licht	UV
Zymomonas mobilis	Zm

1 Einleitung

1.1 Funktionelle und strukturelle Untersuchung von Proteinen

Proteine übernehmen innerhalb und außerhalb von Zellen vielfältigste Funktionen. Sie sind Biokatalysatoren bei chemischen Reaktionen, fungieren als Strukturproteine, übernehmen Transport-, Kontroll- und Regulationsaufgaben, spielen bei Bewegungsvorgängen eine Rolle und wirken bei der Immunantwort sowie der Sinneswahrnehmung. Diese große funktionelle Vielfalt korreliert mit der strukturellen Variabilität der Proteine. Es ist daher nicht überraschend, dass Proteine bis zur Mitte des letzten Jahrhunderts als Träger der Erbinformation angesehen wurden, bevor Avery *et al.* (1944) und Hershey & Chase (1952) das Gegenteil bewiesen.

Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen stellen Proteine seit jeher einen zentralen Gegenstand der biochemischen Forschung dar. Zur Aufklärung von Struktur und Funktion, können verschiedenste Methoden eingesetzt werden, die zum Teil erst vor kurzer Zeit etabliert bzw. in ihrem Potential deutlich gesteigert werden konnten. Auf struktureller Seite sind vor allem die Röntgenkristallographie und die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) zu nennen, die Proteinstrukturen mit atomarer Auflösung liefern. Die derzeit höchstaufgelöste Struktur stammt mit 0,54 Å von dem pflanzlichen Toxin Crambin aus Crambe abyssinica (Jelsch et al., 2000) und bietet Einblicke bis auf die subatomare Ebene. Bei der Kristallstrukturanalyse werden hochenergetische Röntgenstrahlen an vorher erzeugten Proteinkristallen gebeugt. Aus den zweidimensionalen Beugungsmustern lässt sich dann mittels mathematischer Verfahren die Elektronendichteverteilung der Proteinmoleküle bestimmen, sofern neben den Strukturamplituden auch die Phaseninformationen vorliegen. Im Gegensatz zur NMR sind bei der Kristallstrukturanalyse auch Proteine mit Molekulargewichten von mehr als 30 kDa einsetzbar. Begrenzend wirken hier lediglich die mit zunehmender Molekülgröße meist schlechtere Kristallisierbarkeit sowie die vorher nicht oder nur schwer abschätzbare Streuleistung des jeweiligen Proteinkristalls.

Zur Bestimmung niedrig aufgelöster Proteinstrukturen im Bereich von 10-20 Å bieten sich ferner zwei weitere Möglichkeiten an. Hierbei handelt es sich zum einen um die Röntgenkleinwinkelstreuung (*small angle X-ray solution scattering*, *SAXS*) und zum anderen um die Elektronenmikroskopie. Bei der Röntgenkleinwinkelstreuung werden wie bei der Röntgenkristallographie Proben mit Röntgenstrahlung beschossen. Vor-

teilhaft ist, dass sich das Protein in Lösung befindet, was der Bildung von Artefakten, wie sie bei der Kristallstrukturanalyse oder Elektronenmikroskopie möglich sind, entgegenwirkt. Bei *SAXS*-Messungen lassen sich über mathematische Verfahren zwei charakteristische Streuparameter aus den eindimensionalen Streukurven bestimmen. Zum einen ist dies der Gyrationsradius (R_G), auch Streumassenradius genannt, der Angaben über die Molekülform enthält und zum anderen die Anfangsintensität (I(0)), die Rückschlüsse auf das Molekulargewicht ermöglicht. Tiefergehende Informationen über *SAXS*-Messungen, insbesondere hinsichtlich der Bestimmung von Oberflächenstrukturen aus den Streukurven, bieten die Programmdokumentationen des *SAXS*-Software-Paketes von Dr. D. I. Svergun (www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/ Research/Sax/software.html) und die dort angegebenen Referenzen.

Daneben gibt es weitere strukturelle Untersuchungsmethoden wie z.B. die analytische Ultrazentrifugation, die Massenspektroskopie, diverse chromatographische Techniken wie die analytische Gelfiltration, verschiedene gelelektrophoretische Methoden, die Lichtstreuung oder die CD- und Fluoreszens-Spektroskopie.

Da Struktur und Funktion einander bedingen, sind zur funktionellen Analyse von Proteinen auch viele der oben genannten Methoden einsetzbar. So können z.B. durch den Einbau von Substraten, Substratanaloga oder Inhibitoren in Proteinkristalle Schlussfolgerungen zu den Katalysemechanismen von Enzymen gezogen werden.

Weitere Einblicke in die Funktion von Proteinen lassen sich beispielsweise durch enzymkinetische Analysen, durch Sequenzvergleiche in Protein- und DNA-Datenbanken oder durch Protein-Ligand-Bindungsstudien basierend auf Oberflächen-Plasmon-Resonanz gewinnen. Letztere Methode bietet sich vor allem bei Proteinen mit Transport-, Kontroll- und Regulationsaufgaben an.

1.2 Struktur Thiaminpyrophosphat-abhängiger Enzyme

Thiaminpyrophosphat (TPP), die biologisch aktive Form des Vitamins B1, ist ein essentieller Kofaktor bei zahlreichen enzymkatalysierten C-C-Bindungsknüpfungen und -spaltungen. Zu den TPP-enthaltenden Enzymen, zählen Lyasen (z.B. Pyruvat-decarboxylase und Benzaldehydlyase), Oxidasen (z.B. Pyruvatoxidase) sowie Transferasen und Ligasen (z.B. Transketolase und Glyoxylatcarboligase).

Bereits im letzten Jahrzehnt der 19. Jahrhunderts konnte C. Eijkman (1896, 1897) die auf TPP zurückzuführende antineuritische Wirkung von Silberhäutchen des Reises beschreiben, ohne aber die ursächliche Verbindung zu isolieren. Einige Jahre später gelang dies C. Funk (1911, 1912), der zudem erste Elementaranalysen durchführte und die Substanz als Pyrimidinbase beschrieb. Die Aufklärung der TPP-Struktur gelang 1937 durch Lohmann und Schuster. Der Kofaktor besteht aus einem 4-Amino-2-methylpyrimidin-Ring, der in 5-Position über eine Methylengruppe mit dem N₃-Stickstoffatom eines 5-Ethyldiphosphat-4-methylthiazolium-Ringes verknüpft ist (Abb. 1).

Die Konformation des enzymgebundenen Kofaktors konnte 1992 durch die Kristallstrukturanalyse der Transketolase bestimmt werden (Lindqvist *et al.*). Wie bei den meisten anderen TPP-abhängigen Enzymen wird dieser sowie ein bivalentes Metallion in der Spalte zwischen zwei Monomeren gebunden, an der die PYR-Domäne (Bindung des Aminopyrimidinparts) des einen und die PP-Domäne (Bindung des Dioder Pyrophosphatankers) des anderen Monomers beteiligt sind (Abb. 1). Das so gebildete Dimer wird häufig auch als katalytisches Dimer bezeichnet, das die kleinste funktionelle Einheit darstellt. Lediglich bei der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (Chabriere *et al.*, 1999) und der 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase (Xiang *et al.*, 2007) ist nur ein Monomer an der Bindung der Kofaktoren beteiligt. Dennoch bilden auch diese Enzyme Dimere aus fest, jedoch nicht kovalent assoziierten Monomeren.

Insbesondere die TPP-bindenden Aminosäuren der PP-Domäne sind hochgradig konserviert und bilden u.a. das für TPP-Enzyme typische Motiv GDGxxx₂₄₋₂₆NN (Hawkins *et al.*, 1989). Ferner ist der Kofaktor in der V-Konformation gebunden, ein gemeinsames Kriterium aller TPP-Enzyme und erstmals durch Schellenberger (1967^{a, b}) postuliert. Eine solche Konformation des freien Kofaktors ist zwar in Lösung energetisch ungünstiger als die S- und F-Konformation (Pletcher & Sax, 1972; Shin *et al.*, 1993), kommt aber aufgrund der Proteinkomponente zu 100 % im enzymgebundenen Zustand vor (Schellenberger, 1967^{a, b}). Die Angaben V-, S- und F-Konformation beziehen sich auf die unterschiedlichen Rotationswinkel, die zwischen dem Pyrimidin- bzw. dem Thiazoliumring und der dazwischen liegenden Methylengruppe entstehen können (Abb. 1).



Abb. 1: Kofaktorbindung am Beispiel der Pyruvatdecarboxylase-D28A-Variante aus Saccharomyces cerevisiae mit gebundenen Substrat Pyruvat im aktiven Zentrum. Der Kofaktor TPP und das Substrat Pyruvat sind als Stabmodell (dicke Linien) mit individuell gefärbten Atomen dargestellt. Aminosäuren in van-der-Waals-Distanz zu den Kofaktoren bzw. dem Substratmolekül sind als Stabmodell (dünne Linien) in der Farbe der jeweiligen Untereinheit gezeigt. Das Magnesium-Ion und die Wassermoleküle in van-der-Waals-Distanz zu den Kofaktoren bzw. dem Substratmolekül sind als Kugeln abgebildet. Die V-Konformation des Kofaktors TPP soll durch die beiden Ebenen und die Drehwinkel Φ_P (Drehung des Pyrimidinringes zwischen C_{5^-} und Methylenkohlenstoffatom) und Φ_T (Drehung des Thiazoliumringes zwischen N₃- und Methylenkohlenstoffatom) angedeutet werden. Im Insert ist die Strukturformel des Kofaktors gezeigt.

Seit 1992 konnten zahlreiche Kristallstrukturen TPP-abhängiger Enzyme ermittelt werden, so dass mittlerweile über 80 Strukturen in der *Brookehaven Protein Data Bank* zugänglich sind. Hierzu zählen auch mehrere Strukturen mit gebundenen Analoga bzw. Reaktionsintermediaten, die Aufschluss über die Funktionsweise dieser Enzyme liefern (Chabriere *et al.*, 1999)¹.

Trotz z.T. geringer Sequenzidentitäten ist die Quartärstruktur der Dimere in den Kristallstrukturen vieler TPP-abhängiger Enzyme übereinstimmend (Abb. 2). Ausnahmen hiervon sind neben der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio africanus*¹ (Chabriere *et al.*, 1999) und den 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthasen aus *Escherichia coli* und *Deinococcus radiodurans* (Xiang *et al.*, 2007) die Transketolasen aus *Saccharomyces cerevisiae*¹ (Lindqvist *et al.*, 1992), Mais (Gerhard *et al.*,

¹ Mehrere Artikel veröffentlicht, angegeben ist jeweils die älteste Publikation.

2003), Leishmania mexicana (Veitch et al., 2004) und Escherichia coli (Asztalos et al., 2007), die Pyruvatdehydrogenasen aus Escherichia coli¹ (Arjunan et al., 2002), Mensch¹ (Ciszak et al., 2003) und Bacillus stearothermophilus (Frank et al., 2004) sowie die Oxovaleriatdehydrogenasen aus Pseudomonas putida (Ævarsson et al., 1999), Mensch¹ (Ævarsson et al., 2000) und Thermus thermophilus (Nakai et al., 2004). Alle anderen Enzyme (die Pyruvatdecarboxylasen aus Brauhefe¹ (ScPDC, Dyda et al., 1993), Zymomonas mobilis (ZmPDC, Dobritzsch, 1998; Dobritzsch et al., 1998) und Kluyveromyces lactis¹ (KIPDC, Kutter et al., 2006), die Indolpyruvatdecarboxylase aus Enterobacter cloacae (EclPDC, Schütz et al., 2003), die Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida*¹ (*Pp*BFD, Hasson *et al.*, 1998), die Phenylpyruvatdecarboxylase aus Azospirillum brasilense¹ (AbPPDC, Versées et al., 2007^a), die Oxalyl-CoA-Decarboxylasen aus Oxalobacter formigenes¹ (Berthold et al., 2005) und Escherichia coli¹ (Zimmer, 2007), die Pyruvatoxidasen aus Lactobacillus plantarum¹ (Muller & Schulz, 1993), Aerococcus viridans (Magat Juan et al., 2007) und Escherichia coli (Weidner et al., 2008), die Benzaldehydlyase aus Pseudomonas fluorescens (Mosbacher et al., 2005), die Acetohydroxysäuresynthasen aus Saccharomyces cerevisiae (Pang et al., 2002) und Arabidopsis thaliana (AtAHAS, McCourt et al., 2006), die Acetolaktatsynthase aus Klebsiella pneumoniae (Pang et al., 2004), die N2-(2-Carboxyethyl)-Argininsynthase aus Streptomyces clavuligerus (Caines et al., 2004) und die Verzweigtketten-α-Ketosäuredecarboxylase aus Lacto-

coccus lactis (Berthold *et al.*, 2007)) bestehen aus zwei Monomeren mit je drei Domänen in der Reihenfolge PYR- (Bindung des Pyrimidinringes) \rightarrow R- (regulatorische) \rightarrow PP-Domäne (Bindung des Pyrophosphatankers). Jede dieser Domänen weist eine α - β -Topologie auf. Sie bestehen aus in der Regel 6 β -Faltblättern flankiert von im Allgemeinen 5-7 α -Helices (Muller *et al.*, 1993). Diese α - β -Topologie wird auch bei allen anderen TPP-abhängigen Enzymen gefunden. Allerdings gibt es dort Unterschiede hinsichtlich der Reihenfolge und Anzahl der Domänen.

Über die meisten der oben beschriebenen TPP-abhängigen Enzyme mit vergleichbarer Dimerstruktur wird berichtet, dass sie in Lösung als Tetramer oder als Dimer-Tetramer-Gemisch vorliegen (König *et al.* (1998) und Kutter *et al.* (2006) für verschiedene Pyruvatdecarboxylasen, Berthold *et al.* (2005) und Zimmer (2007) für verschiedene Oxalyl-CoA-Decarboxylasen, Koga *et al.* (1992) für die *Ec*IPDC, Versées

¹ Mehrere Artikel veröffentlicht, angegeben ist jeweils die älteste Publikation.

et al. (2007^a) für die *Ab*PPDC, Caines *et al.* (2004) für die N2-(2-Carboxyethyl)-Argininsynthase aus *Streptomyces clavuligerus*, Risse *et al.* (1992) und König *et al.* (2004) verschiedene Pyruvatoxidasen, Hasson *et al.* (1995) für die Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida*, Janzen *et al.* (2006) für die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens*. Lediglich die Verzweigtketten- α -Ketosäuredecarboxylase aus *Lactococcus lactis* (Gocke *et al.*, 2007) liegt als Dimer vor. Auch die Acetohydroxysäure- und Acetolaktatsynthasen zeigen Abweichungen in ihrem Oligomerisierungsverhalten, da hier zum Teil auch noch regulatorische Untereinheiten beteiligt sind (Chipman *et al.*, 1998).

Trotz ähnlicher Dimerstruktur weist das Tetramerarrangement der hier beschriebenen Enzyme eine große Variabilität der Dimer-Dimer-Winkel auf. Abb. 2 soll dies verdeutlichen und zeigt die Kristallstrukturen dieser Enzyme. Die Dimere auf der negativen x-Achse wurden superpositioniert. Das andere Dimer rotiert im einfachsten Fall, wie bei Acetohydroxysäuresynthase aus Arabidopsis thaliana (McCourt et al., 2005) um 180° bezüglich der y- oder z-Achse und wird lediglich auf der x-Achse verschoben. Fast alle anderen unterliegen zusätzlich noch einer Rotation um die x-Achse zwischen 84° und 126° (siehe auch Tab. 1). Nur die ScPDC und die AbPPDC sind hierzu eine Ausnahme. Im nativen Zustand der ScPDC (Dyda et al., 1993) bzw. bei der Substrat-aktivierten AbPPDC (Versées et al., 2007^b) tritt ein Drehwinkel von 4° um die x-Achse auf. Im Falle der nativen AbPPDC (Versées et al., 2007^a) bzw. nach der Zugabe des Substratanalogons Pyruvamid zur ScPDC (Lu et al., 1997) ist die Situation komplexer. Die Pseudosymmetrie wurde aufgebrochen, das Rotationszentrum vom Schwerpunkt in die Nähe des Glu199 der ScPDC (Ala190 bei AbPPDC) verschoben, das zweite Dimer um 4 Å auf der +y-Achse verschoben und um alle Achsen gedreht (Gesamtwinkel 26°).

Die native tetramere Struktur der *Sc*PDC und der Substrat-aktivierten *Ab*PPDC lässt sich am Besten als komplett offen beschreiben (siehe auch Abb. 4B oben), bei der benachbarte Dimere nur eine kleine Kontaktfläche haben. Demgegenüber besitzen die Pyruvamid-aktivierte *Sc*PDC und die native *Ab*PPDC auf einer Molekülseite eine größere Kontaktfläche als auf der anderen und liegen in einer halbseitig geschlossenen Form vor (nach Lu *et al.*, 2000; siehe auch Abb. 4B unten). Verglichen mit den anderen TPP-Enzymen sind die Kontaktflächen von *Sc*PDC und *Ab*PPDC unabhängig von offener oder halbseitig geschlossener Form aber dennoch klein (Tab. 1). Folgerichtig liegt die *Sc*PDC in Lösung zu nicht unerheblichen Teilen als Dimer vor,



Abb. 2: Vergleich des Zusammenbaus der Tetramere von TPP-abhängigen Enzymen mit ähnlicher globaler Dimerstruktur¹ aus verschiedenen Blickwinkeln entsprechend zum eingezeichneten Koordinatensystem.

Weiß: Superpositionierte Dimere der tetrameren Enzyme.

Farbig: Das zweite Dimer (*Sc*PDC (nativ), rot; *Sc*PDC (Pyruvamid-aktiviert), blau; *Ec*IPDC, hellblau; *Zm*PDC, weizenfarben; *Pp*BFD, sandfarben; *At*AHAS, waldgrün).

Die gelben Linien im unteren Bild deuten die unterschiedlichen Drehwinkel der farbigen Dimere sowie die Verschiebung des Rotationszentrums bei der Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC an (siehe Text auf Seite 9).

¹Zur besseren Übersichtlichkeit sind nicht alle der auf Seite 8 und in Tab. 1 aufgeführten Enzyme und Spezies eingezeichnet.

was besonders im kinetisch relevanten Proteinkonzentrationsbereich (20-100 μ g/ml) deutlich wird (Killenberg-Jabs, 1997; Killenberg-Jabs *et al.*, 2001). Dass dieser Effekt spezifisch für die *Sc*PDC und ihre lockere Dimer-Dimer-Assoziation ist, zeigt der Vergleich mit der *Zm*PDC, die aufgrund der deutlich größeren Kontaktfläche eine viel stärkere Dimer-Dimer-Bindung aufweist und daher in Lösung nur als Tetramer vorkommt, wie auch analytische Gelfiltrationsexperimente von Neale *et al.* (1987) zeigten.

Enzym ^a	Dimer-Dimer-	Dimer-Dimer-	Dimer-Dimer-
	Winkel in °	Translokation	Kontaktflächen ^b
		in Å	in nm ²
AtAHAS	1	1	25
ScPDC (nativ), AbPPDC (Substrat-aktiviert)	4	1	9
ScPDC (Pyruvamid-aktiviert), AbPPDC (nativ)	26	4	16
EcIPDC	84	/	22
<i>Zm</i> PDC	103	/	39
Pyruvatoxidase aus Lactobacillus plantarum	125	/	20
Acetolaktatsynthase aus Klebsiella pneumo-	125	/	22
niae			
Oxalyl-CoA-Decarboxylase aus Oxalobacter	125	1	30
formigenes			
N2-(2-Carboxyethyl)-Argininsynthase aus	126	1	26
Streptomyces clavuligerus			
Benzaldehydlyase aus Pseudomonas fluores-	126	1	36
cens			
<i>Pp</i> BFD	126	/	44
Acetohydroxysäuresynthase aus Saccharomy-	-	-	-
ces cerevisiae ^c			
Verzweigtketten-	-	-	-
aus Lastagogous lastis ^C			

Tab. 1: Vergleich der TPP-abhängigen Enzyme mit gleicher Quartärstruktur auf Dimerebene hinsichtlich ihres Tetrameraufbaus.

aus Lactococcus lactis

Der Drehwinkel entspricht der Rotation der farbigen Dimere in Abb. 2. Bei der Dimer-Translokation bleiben unterschiedliche Abstände auf der x-Achse unberücksichtigt, aufgeführt sind nur Bewegungen hinsichtlich der y- und z-Achse. ^a Sind gleiche Enzyme aus verschiedenen Spezies veröffentlicht, die sich in ihrem Tetrameraufbau nicht unterscheiden, so ist

jeweils nur eines von diesen aufgeführt.

^b Bestimmt mit PDB-sum (<u>www.ebi.ac.uk/pdbsum</u>); bei mehreren veröffentlichten Strukturen vorzugsweise mit denen, die keine flexiblen Reste in der Interdimerregion aufweisen.

^c Liegt als Dimer im Kristall vor.

1.3 Pyruvatdecarboxylase

Die Pyruvatdecarboxylase ist ein Enzym des Zuckerstoffwechsels und katalysiert den vorletzten Schritt der alkoholischen Gärung, die Reaktion von Pyruvat zu Acetaldehyd und Kohlendioxid. Wie andere TPP-abhängige Enzyme kann auch die PDC eine Carboligation als Nebenreaktion ausführen. Dabei wird das Carbanion des Hydroxyethyl-Thiaminpyrophosphates (siehe Abb. 3) nicht protoniert, sondern reagiert mit Acetaldehyd oder einem weiteren Pyruvatmolekül unter Bildung von Acetoin bzw. Acetolaktat. Der Anteil der Carboligation am Gesamtumsatz ist normalerweise nur sehr gering (< 1 %), kann aber, wie im Fall der Brauhefe- oder *Zm*PDC, durch ortsgerichtete Mutagenese gesteigert werden (Wu *et al.*, 2000; Sergienko & Jordan, 2001^a). Die PDC kommt in der Natur weit verbreitet vor. Zu den PDC besitzenden Organismen zählen Prokaryoten wie *Zymomonas*, Pilze wie *Saccharomyces* oder *Kluyvero-myces* sowie Pflanzen wie Weizen. Hierbei handelt es sich nur um einen kleinen Auszug der Spezies mit PDC-Genen an denen später für dieses Enzym wichtige funktionelle und strukturelle Untersuchungen getätigt wurden. An dieser Stelle sei lediglich noch erwähnt, dass das Reich der Tiere keine Pyruvatdecarboxylasen besitzt, mit der Folge dass diese Organismen nicht zur alkoholischen Gärung befähigt sind. Die industriell bedeutendste PDC ist die aus der Brauhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Ethanol, das Endprodukt der alkoholischen Gärung, fand unbewusst bereits in Ägypten vor ca. 6000 Jahren zur Bier- und später auch zur Weinherstellung Anwendung und wurde bereits in der Bibel erwähnt (1. Buch Mose, Genesis 9, 18-29). Auch heute noch wird die alkoholische Gärung zu großen Teilen für die Herstellung von Genussmitteln in Form diverser alkoholischer Getränke genutzt. Zunehmende Bedeutung findet Alkohol auch in der Kraftstoffindustrie als Bioethanol, speziell in Brasilien, einem der größten Erzeugerländer von Ethanol. Weitere wichtige Anwendungsfelder sind die chemische Industrie, wo Ethanol als Lösungsmittel genutzt wird und die Medizin in Form von Desinfektionsmitteln.

Erstmalige Erwähnung fand die PDC durch Neuberg & Karzcag (1911), die sie damals noch als Carboxylase bezeichneten. Die PDC war das Enzym, für das zum ersten Mal ein Katalyse-Mechanismus postuliert wurde (Langenbeck, 1932), auch wenn sich später herausstellte, dass entgegen diesem nicht die 4'-Aminogruppe sondern das C₂-Atom des Thiazoliumringes das katalytische Zentrum darstellt (Breslow, 1957, 1958). Abb. 3 zeigt den aus Breslows Messungen abgeleiteten Mechanismus von Pyruvatdecarboxylasen.

Der eigentliche katalytische Zyklus der PDC beginnt mit der Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen dem C₂-Atom des Pyruvates und dem TPP-C₂-Atom unter Formierung des Laktyl-Thiaminpyrophosphates. Anschließend wird das erste Reaktionsprodukt Kohlendioxid abgespalten und es entsteht das mesomeriestabilisierte Hydroxyethyl-Thiaminpyrophosphat. Nach dessen Protonierung, erfolgt zum Abschluss die Freisetzung des zweiten Produktes Acetaldehyd.

Sowohl Laktyl- als auch Hydroxyethyl-Thiaminpyrophosphat sind kovalente Intermediate und lassen sich aufgrund ihrer Säurestabilität mittels NMR qualitativ und quantitativ untersuchen (Tittmann *et al.*, 2003).

Wie erwähnt, sind Pyruvatdecarboxylasen bei zahlreichen Bakterien, Pilzen und Pflanzen verbreitet. Die kinetisch und strukturell am besten untersuchte Spezies ist die aus *Saccharomyces cerevisiae*. Im Bereich des katalytischen pH-Optimums von 6,0 und bei nativen Proteinkonzentrationen (ca. 10000 µg/ml, König, unveröffent-



Abb. 3: Katalysemechanismus der Pyruvatdecarboxylase nach Schellenberger (1998); leicht modifiziert.

licht) liegt die PDC als Tetramer vor. Eine Verringerung der Enzymkonzentration führt über das Dimer-Tetramer-Gleichgewicht (ca. 40-2500 µg/ml), der Dimeranreicherung (ca. 20-40 µg/ml) und dem Dimer-Monomer-Gleichgewicht (ca. 0,25-20 µg/ml) bis zu reinen Monomeren bei weniger als 0,25 µg/ml (Killenberg-Jabs, 1997; Killenberg-Jabs *et al.*, 2001; Kutter *et al.*, 2007). Die Gegenwart der Kofaktoren TPP und Magnesium-Ionen führt zur Stabilisierung der höheroligomeren Formen (König *et al.*, 1993), während Harnstoff das Gleichgewicht in Richtung der kleineren Oligomere verschiebt (Killenberg-Jabs *et al.*, 2001). Bei pH-Werten über 8,5 dissoziieren die Kofaktoren reversibel ab (Holzer & Goedde, 1957), was ebenfalls zur Anreicherung kleinerer Spezies führt (König *et al.*, 1992, 1993).

Eine andere PDC-Spezies, die aus dem Bakterium *Zymomonas mobilis*, existiert hingegen als Holoenzym nur in tetrameren Form, was durch die deutlich größere Dimer-Dimer-Interaktionsfläche bedingt ist (Tab. 1). Selbst die Apo-*Zm*PDC liegt nur zu geringen Anteilen als kleinere Oligomerform vor (Diefenbach & Duggleby, 1991; Pohl *et al.*, 1994).

Größere Molmassen treten hingegen bei zahlreichen pflanzlichen Pyruvatdecarboxylasen auf. So kommen beispielsweise bei der Spezies aus *Pisum sativum* neben der mono-, di- und tetrameren Form auch Okto-, Dodeca- und Hexadecamere vor (Dietrich, 2001). Noch höhere Oligomerisierungsgrade werden von Alvarez *et al.* (1993) für die Pyruvatdecarboxylase aus *Neurospora crassa* (*Nc*PDC) berichtet. Hier scheint es für das Enzym neben der katalytischen auch eine strukturelle Funktion zu geben. Thompson-Coffe *et al.* (1999) sprechen daher von einem *gene-sharing*-Ereignis, bei dem ein hochkonserviertes Protein, dass im Allgemeinen durch ein einzelnes Gen kodiert wird, zwei verschiedene Funktionen aufweist. Während die PDC im vegetativen Stoffwechsel in erster Linie enzymatisch wirkt, bilden sich bei der geschlechtlichen Fortpflanzung von *Neurospora crassa* 8-10 nm dicke PDC-Filamente, die mit kortikalen Mikrotubuli assoziiert sind. Jedoch gibt es weder eine genaue Funktionsbeschreibung dieser Filamente, noch liegen kinetische Daten zu diesem Protein vor.

Ein gemeinsames Merkmal aller Pyruvatdecarboxylasen mit Ausnahme der *Zm*PDC ist die allosterische Regulation durch das Substrat, auch als Substrataktivierung bekannt. Von den anderen TPP-abhängigen Enzymen besitzt lediglich die *Ab*PPDC (Spaepen *et al.*, 2007) und die Verzweigtketten-α-Ketosäuredecarboxylase aus *My-cobacterium tubercolosis* (Werther *et al.*, 2008) diese Eigenschaft. Sie wurde erstmals durch Davies (1967) an der PDC aus Weizenkeimlingen in Form einer sigmoiden Abweichung von den zunächst als hyperbol angenommenen v/S-Diagrammen gemessen und ließ sich kurze Zeit später auch bei der Brauhefe-PDC nachweisen (Boiteux & Hess, 1970; Ullrich & Donner, 1970; Hübner *et al.*, 1970).

Im aktiven Zentrum führt die Substrataktivierung zu einer um Faktor 600 beschleunigten Deprotonierung des TPP-C₂-Atoms (Kern *et al.*, 1997). Abb. 5 stellt das kinetische Minimalmodell hierzu dar. Diese Umpolungsreaktion zum Carbanion ist in Abwesenheit von aktivierenden Liganden geschwindigkeitsbestimmend (1 s⁻¹) und zu langsam um die vergleichsweise hohen k_{kat} -Werte (60 s⁻¹) erklären zu können. In Gegenwart aktivierender Liganden (Pyruvamid) ist die Deprotonierungsreaktion hinreichend schnell (600 s⁻¹). Daher beeinflusst (beschleunigt) die Substrataktivierung im aktiven Zentrum die Umpolungsreaktion.

Ein erstes kinetisches Modell der PDC-Substrataktivierung schlugen 1978 Hübner *et al.* vor. Zudem wurde ein separater Substratbindungsort außerhalb des katalytischen Zentrums postuliert. Versuche diesen zu spezifizieren endeten schließlich bei Thiolgruppen von Cysteinseitenketten. Die in der Brauhefe-PDC oberflächenzugänglichen Cysteine wurden mit Hydroxymercuribenzoat modifiziert. Dadurch wurden die *lag*-Phasen (siehe Kapitel 3.3 ab S. 43) in den Progresskurven, die für die Substratregulierte PDC typisch sind, unterdrückt (Hübner *et al.*, 1988).

Die Bedeutung von Cysteinresten für die enzymatische Aktivität der PDC ist schon lange bekannt. 1952 wiesen Stoppani *et al.* nach, dass die Pyruvatdecarboxylase durch ihr Substrat vor einer Modifikation der Cysteinseitenketten geschützt wird. Kinetische Analysen zu diesem Phänomen erfolgten durch Hübner (1966). Da allerdings zum damaligen Zeitpunkt die Substratregulation noch unbekannt war und auch keine hochaufgelösten strukturellen Daten vorlagen, wurde vermutet, dass eine Cysteinseitenkette für die Bindung von Pyruvat im aktiven Zentrum nötig ist.

Basierend auf den ersten Kristallstrukturen für die Hefe-PDC (Dyda et al., 1993; Arjunan et al., 1996) sowie Studien mit Cysteinvarianten (Baburina et al., 1994) stellte die Newark-Gruppe um F. Jordan ein Modell für die Aktivierung auf, das kinetische und strukturelle Daten einschließt (Abb. 4A). Mittlerweile war bekannt, dass die Brauhefe-PDC vier Cysteine besitzt, von denen sich keines in der Nähe des aktiven Zentrums befindet. Nach diesem Aktivierungsmodell bindet zuerst das Substrat Pyruvat in Form eines Thiohemiketals kovalent an Cys221. Die Information über diese Bindung wird dann über den Aktivierungsweg His92 \rightarrow Glu91 \rightarrow Val410-Gly413 übertragen. Der Hauptkettensauerstoff der letzten Aminosäure befindet sich in Wasserstoffbrückenbindungsabstand zur 4'-Aminogruppe des Thiaminpyrophosphates. Nach Jordan et al. (1998) ist die korrekte Ausrichtung dieser Wasserstoffbrückenbindung (Abb. 5) verantwortlich für die Kofaktoraktivierung und erklärt so die Geschwindigkeitssteigerung bei den H-D-Austauschexperimenten am TPP-C₂-Atom. Die Bedeutung der 4'-Aminogruppe für die Kofaktoraktivierung konnte durch Messungen von Kern et al. (1997) nachgewiesen werden. Bei der Hefe-PDC im Komplex mit 4'-desamino-TPP ergab sich eine dramatische Verringerung der Deprotonierungsgeschwindigkeit am Kofaktor-C₂-Atom.

Es erfolgten zahlreiche Studien sowohl mit Varianten von Aminosäuren des postulierten Aktivierungsweges, als auch von solchen die diese flankieren (Baburina *et al.*, 1994; Baburina *et al.*, 1998^{a, b}; Guo *et al.*, 1998; Eberhardt *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Li & Jordan, 1999; Liu *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2002; Joseph *et al.*, 2006). Trotz detaillierter kinetischer Daten zu den Varianten, fehlen jedoch Kristallstrukturen, so dass die aus den kinetischen Daten gezogenen Schlüsse mit Vorsicht zu werten sind. Insbesondere ist die Rolle von Cys221 in diesem Modell kritisch zu sehen. Außer *Kluyveromyces lactis* und *Saccharomyces cerevisiae* besitzt keine andere bisher untersuchte Pyruvatdecarboxylase diesen Aminosäurerest. Daher ist u.a. bei den pflanzlichen Pyruvatdecarboxylasen (z.B. der PDC aus Weizenkeimlingen; Davies, 1967) ein Regulationsmechanismus, der auf eine kovalente Bindung des Substrates an Cys221 basiert, nicht möglich.

Daneben gibt es ein zweites Modell, favorisiert von S. König und G. Schneider (Abb. 4B), welches im Folgenden als Halle-Stockholm-Modell bezeichnet wird. Hauptkritikpunkt gegenüber dem Newark-Modell ist, dass in der Kristallstruktur der mit dem Substratanalogon Pyruvamid kokristallisierten ScPDC weder Elektronendichte von diesem in der Umgebung der Cys221-Seitenkette zu finden war, noch, dass es signifikante Bewegungen bei den Aminosäuren des postulierten Newarkschen-Aktivierungsweges gab (Lu et al., 2000). Pyruvamid, das Amid des Substrates Pyruvat (Abb. 18, S. 56), ist zwar nicht umsetzbar, kann die PDC aber dennoch aktivieren (Hübner *et al.*, 1978). Der maximale Aktivierungsgrad beträgt \approx 70 % (Krieger *et al.*, 2002). In der Kristallstruktur befindet sich Pyruvamid, wenn auch mit deutlich erhöhten B-Faktoren, in zwei der vier Untereinheiten zwischen der Arg224-Hauptkette und der Tyr157-Seitenkette. In denselben beiden Untereinheiten, die die geschlossene Seite des Tetramers darstellen (Abb. 4B), wird das Substratanalogon zudem im aktiven Zentrum in der Nähe des C2-Atoms des Kofaktors gefunden. Der Abstand zum Ketocarbonylkohlenstoffatom des Pyruvamides ist mit \approx 3,9 Å jedoch weit außerhalb des Bereiches kovalenter C-C-Bindungen.

Die Kristallstrukturen der nativen und Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC unterscheiden sich voneinander hinsichtlich der Fixierung der beiden Loops 104-113 und 290-304 auf der geschlossenen Seite des aktivierten Enzyms, einer Rotation der β-Domäne um 8° sowie der bereits erwähnten Drehung der beiden Dimere von komplett offen zu halbseitig geschlossen. Lu *et al.* (2000) beschreiben daher die Substrataktivierung als kleine strukturelle Änderung (Loopfixierung), die eine globale Konformationsände-

rung verursacht (Rotation der β-Domäne und Drehung offen zu halbseitig geschlossen). Das gebundene Pyruvamid zwischen der Arg224-Hauptkette und der Tyr157-Seitenkette soll dabei die halbseitig geschlossene Form stabilisieren.



Abb. 4: Substrataktivierung von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen. A: Newark-Modell nach Jordan *et al.* (1998).

Im oberen Teil ist ein Monomer der nativen *Sc*PDC gezeigt. Unten befindet sich die aktivierte Struktur mit kovalent gebunden Pyruvat (modelliert) an der postulierten regulatorischen Bindungsstelle Cys221 und im aktiven Zentrum am TPP. Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Hauptkettensauerstoffatom von Gly413 und der 4'-Aminogruppe, die letztlich für die Aktivierung verantwortlich sein soll, ist durch eine gestrichelte Linie angedeutet. B: Halle-Stockholm-Modell nach Lu *et al.* (2000).

Abgebildet ist das Tetramer der ScPDC. Nach Bindung von Pyruvamid an das regulatorische Zentrum werden die Loops 104-113 und 290-304 fixiert, die beiden PDC-Dimere rotieren von offen zu halbseitig geschlossen und Pyruvamid bindet im aktiven Zentrum an den Kofaktor TPP. Die Bindung von Pyruvamid und die Loopfixierung erfolgen nur auf der geschlossenen Seite.



Abb. 5: Minimalmodel der Kofaktoraktivierung unter Einbeziehung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen Gly413 und der 4'-Aminogruppe nach Jordan *et al.* (1998). k: Geschwindigkeitskonstante für die Deprotonierung des TPP-C₂-Atoms nach Kern *et al.* (1997).

_____18

Dass es eine globale strukturelle Änderung bei der Aktivierung der ScPDC geben muss, ließ sich durch SAXS-Messungen zeigen (Hübner et al., 1990; König et al., 2000^{a, b}, 2004; Svergun *et al.*, 2000). Dabei nahm der Gyrationsradius in Gegenwart von Pyruvamid von 4,10 auf 4,30 nm (Hübner et al., 1990) bzw. von 3,97 auf 4,20 nm (Svergun et al., 2000) zu, wobei in jedem Fall eine Änderung des Oligomerisierungsgrades ausgeschlossen werden konnte. Allerdings war es nicht möglich aus den Streukurven den Übergang vom offenen zum halbseitig geschlossenen Zustand auch in Lösung nachzuweisen, d.h. die genauen Drehwinkel der beiden Dimere zueinander konnten nicht eindeutig bestimmt werden (Svergun et al., 2000). Sowohl die native, aber insbesondere die Pyruvamid-aktivierte Spezies zeigen in ihren Gyrationsradien deutliche Abweichungen von den aus den Kristallstrukturen rechnerisch bestimmten Werten, die eine Abnahme nahe legten. Um dennoch eine gute Korrelation zwischen Kristallstrukturdaten und gemessenen Streukurven zu erhalten, war es daher notwendig die Dimere um 7,6 Å für die native ScPDC anzunähern und um 7 Å im Fall der Pyruvamid-aktivierten Spezies zu entfernen (entspricht x-Achsen-Translokation in Abb. 2). Dennoch weichen die erhaltenen Dimer-Dimer-Winkel deutlich von denen der Kristallstrukturen ab, so dass die mittlere guadratische Abweichung für die native ScPDC 5,8 Å und für die Pyruvamid-aktivierte ScPDC 15,3 Å beträgt. Der offensichtliche Widerspruch zwischen Gyrationsradienzunahme in Lösung und Abnahme bei den Kristallstrukturen ist auch einer der Kritikpunkte der Newark-Gruppe (Furey et al., 1998) an diesem Aktivierungsmodell. Zwar diskutieren Svergun et al. (2000), ob nicht aufgrund einer besseren Korrelation der Daten, die entgegengesetzte Drehung, also von halbseitig geschlossen zu offen, bei der Substrataktivierung auftreten könnte, verwerfen diese Möglichkeit jedoch. Demgegenüber nehmen Furey et al. (1998) an, dass es sich bei der halbseitig geschlossenen Tetrameranordnung um ein kristallographisches Artefakt handelt. Dies gilt sowohl für die Pyruvamid-aktivierte Spezies als auch für die durch ein weiteres Substratanalogon, nämlich Ketomalonat, aktivierte ScPDC (Alvarez & Schowen, 1991). Von letzterer konnten Furey et al. (1996) je eine Struktur in offener und in halbseitig geschlossener Form bestimmen. Jedoch ist die Auflösung mit 2,7 bzw. 3,5 Å zu schlecht um Aussagen über den regulatorischen Bindungsort zu treffen. Bedauerlicherweise sind die Koordinatendateien dieser Strukturen nicht in der Proteindatenbank hinterlegt. Letztlich können aber auch Furey et al. (1998) die Aufweitung der PDC-Struktur in Lösung, dass heißt die Gyrationsradienzunahme, nicht erklären.

Ein weiteres Problem des Aktivierungsmodells von Lu *et al.* (2000) ist, dass die Katalyse nur auf der geschlossenen Seite stattfinden kann. Daher muss das Tetramer hier die kleinste katalytische Einheit darstellen. Jedoch legen auf der anderen Seite kinetische Experimente bei variierender PDC-Konzentration nahe, dass auch Dimere Aktivität zeigen (Killenberg-Jabs *et al.*, 2001).

Während der Anfertigung dieser Promotionsarbeit erfolgte die Veröffentlichung mehrerer Strukturen der Phenylpyruvatdecarboxylase aus Azospirillum brasilense. Trotz einer recht geringen Identität von 25 % im Vergleich zur ScPDC (Versées et al., 2007^a) sind die funktionellen und strukturellen Übereinstimmungen offensichtlich. So beträgt die mittlere guadratische Abweichung der Position der C_a-Atome auf Dimerebene lediglich 2,7 Å (Versées et al., 2007^a). Zudem nutzen beide Enzymspezies TPP als Kofaktor, katalysieren die Decarboxylierung von α-Ketocarbonsäuren und zeigen das Phänomen der Substrataktivierung. Gerade der letzte Punkt ist für diese Arbeit von Interesse, vor allem da die AbPPDC kein Cys221 enthält. Daher ist ein Aktivierungsmechanismus, der auf einer kovalenten Bindung des Liganden an diesen Rest basiert, nicht möglich. Zur Analyse der Substratregulation kristallisierten Versées et al. (2007^{a, b}) die native AbPPDC in Gegenwart des katalytisch inaktiven Kofaktoranalogons 3-deaza-TPP (Erixon et al., 2007) sowie mit verschiedenen Substraten. Nach der Substrataktivierung durch Phenylpyruvat bzw. 5-Phenyl-2-Oxovaleriat liegt der Loop 104-120 fixiert vor, während der Loop 280-294 komplett neu geordnet wird. Dies unterstreicht die Bedeutung der beiden Loops für die Aktivierung entsprechend zum oben beschriebenen Halle-Stockholm-Modell auch bei diesem Enzym, wobei die Fixierung der Loops im Unterschied zur Pyruvamid-aktivierten ScPDC hier sogar in allen vier Untereinheiten auftritt. Des Weiteren dreht sich während der Aktivierung die gesamte β-Domäne um 12°. Zudem war ein geringes Kippen der Cterminalen Helix und die Umorientierung einiger Reste zwischen regulatorischen und aktiven Zentrum zu beobachten. Der regulatorische Bindungsort befindet sich zwar wie bei der Hefe-PDC an der Schnittstelle der drei Domänen eines Monomers, mit jeweils gut 1 nm Abstand, ist er aber dennoch deutlich von den beiden für die ScPDC postulierten regulatorischen Zentren nach Lu et al. (2000) und Jordan et al. (1998) entfernt. Dementsprechend unterscheidet sich der Aktivierungsmechanismus bei diesem Enzym auch von dem der Hefe-PDCs. Nach Versées et al. (2007^b) beginnt der Aktivierungsweg der AbPPDC mit einer lokalen Neuorientierung einiger Reste infolge der Bindung des Substrates an die regulatorische Bindungsstelle. Dies resultiert in einer Drehung der gesamten β -Domäne um 12°, was wiederum Auslöser für die Fixierung bzw. Neuorientierung der beiden Loops 104-120 und 280-294 sein soll. Interessanterweise tritt auch bei diesen Kristallstrukturen eine globale Konformationsänderung auf. Diese ist jedoch genau entgegengesetzt zur *Sc*PDC von halbseitig geschlossen im nativen Zustand zu offen für die Substrat-aktivierten Spezies. Allerdings existieren keine Daten zur globalen Struktur der *Ab*PPDC in Lösung.

Die allosterische Aktivierung durch das Substrat ist nicht die einzige Möglichkeit die Pyruvatdecarboxylase zu regulieren. So beschrieben Boiteux & Hess bereits 1970 die inhibitorische Wirkung von Phosphat auf die *Sc*PDC, die sich in einer Verstärkung der *lag*-Phasen der Progresskurven und in einer zunehmenden Sigmoidität der v/S-Diagramme bemerkbar macht¹. Darüber hinaus ist bekannt, dass das Reaktionsprodukt Acetaldehyd, die Aktivität der Brauhefe-PDC reversibel verringert (Lohmann & Schuster, 1937) Bei pflanzlichen Pyruvatdecarboxylasen, wie der aus keimenden Erbsensamen (Dietrich, 2001), haben neben Phosphat auch weitere Salze Einfluss auf die Enzymaktivität und die Substrataktivierung. So verhindert beispielsweise die Zugabe von Natriumchlorid das Auftreten von *lag*-Phasen in Progresskurven und unterdrückt die Sigmoidität in den resultierenden v/S-Diagrammen.

1.4 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es den molekularen Mechanismus der Substrataktivierung und der Regulation von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen aufzuklären, wobei besonders die Funktion von Cys221 des Newark-Modells näher betrachtet werden soll. Methodisch erfolgt dies in erster Linie mittels *SAXS*-Experimenten, der Proteinkristallographie und kinetischer Messungen. Um Rückschlüsse auf die Aktivierung zu ziehen, wurden sowohl die funktionellen als auch die strukturellen Untersuchungen in Gegenwart des nativen Substrates Pyruvat und/oder der Substratanaloga Pyruvamid und Methylacetylphosphonat durchgeführt. Darüber hinaus wird der Einfluss des Reaktionsproduktes Acetaldehyd auf die Substrataktivierung diskutiert. Die verwendeten PDC-Spezies stammen aus *Kluyveromyces lactis* und *Saccharomyces cerevi*-

¹ Für die kinetischen Hintergründe der Substrataktivierung siehe auch Kapitel 3.3 ab S. 43.

siae. Diese zeichnen sich durch eine hohe wechselseitige Übereinstimmung ihrer Proteinsequenz aus. Die Identität beträgt 86 %, wobei sich die Aminosäureaustausche weitgehend auf Interdomänenloops und die dem Lösungsmittel exponierten Oberflächenregionen beschränken, während die Umgebung des aktiven Zentrums unverändert bleibt. Bei der *KI*PDC kam der Wildtypstamm zum Einsatz, bei der *Sc*PDC der Wildtypstamm, der rekombinante Wildtyp sowie die beiden Varianten D28A und E477Q. Die Aminosäuresubstitutionen der letzten beiden befinden sich im aktiven Zentrum und haben einen direkten Einfluss auf die Katalyse (Restaktivität < 0,2 % des Wildtyps), ohne die Substrataktivierung signifikant zu beeinflussen (Liu *et al.*, 2001). Daher wurden diese PDC-Spezies genutzt um strukturelle Messungen auch in Gegenwart des Substrates Pyruvat durchführen zu können.

Zunächst wird jedoch über die Charakterisierung der PDC aus *Neurospora crassa* berichtet. Zu dieser Enzymspezies lagen bis zum jetzigen Zeitpunkt lediglich molekularbiologische und immunologische Daten vor. Ein besonderes Augenmerk soll auch hier auf die Regulation gelegt werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalienverzeichnis

Acrylamid 30% Mix 37,5:1	AppliChem GmbH, Darmstadt
ADH	AppliChem GmbH, Darmstadt bzw.
	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
	München
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Aktivkohle	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Albumin Fraction V	SERVA Feinbiochemica GmbH.
	Heidelberg
Ammoniumporculfat	E Morek Darmstadt
	L. WEICK, Dannislaut
Ammoniumsuitat	Applichem GmbH, Darmstadt
Antipain Dihydrochlorid	E. Merck, Darmstadt bzw. AppliChem
	GmbH, Darmstadt
Bavsilone-Paste, mittelviskos	Baver AG. Leverkusen
BISTRIS	SERVA Feinbiochemica GmbH
	Heidelborg
Chelaplex III (EDTA)	VEB Laborchemie Apolda
Chymostatin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Coomassie-Brilliantblau G250	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dichlordimethylsilan	E. Merck, Darmstadt
DNase	AppliChem GmbH Darmstadt
DTT oder DTE	AppliChem GmbH Darmstadt
	Carl Dath Cmbl & Ca. Karlaruha
Essigsaure	Can Roth Gribh & Co, Kanstune
Ethanol	E. Merck, Darmstadt
Glasperlen 0,25-0,50 mm	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glasperlen 1,7-2,0 mm	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glucose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycerin	KME Laborchemie Handels GmbH
Ciyociiii	haw Carl Both CmbH & Co. Karlerubo
Ohusia	Dzw. Call Roth Gilloll & Co, Kallstulle
Giycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsrune
Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Darmstadt
HEPES	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	F Merck Darmstadt
Magnesiumsulfat-Hentahydrat	E Merck Darmstadt
MES	AppliCham CmbH Darmatadt
Methanol	E. Merck, Darmstadt
Methylacetylphosphonat	synthetisiert (PrivDoz. Dr. R. Golbik)
N, N, N', N' Tetramethylethylendiamin	E. Merck, Darmstadt
(Temed)	
NADH+H ⁺	SERVA Feinbiochemica GmbH
	Heidelberg
	renemery

Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	VEB Laborchemie Apolda
Natriumdodecylsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid	KMF Laborchemie Handels GmbH
, ,	bzw CHEMAPOL Praha
	Czechoslovakia
PageRuler TM Protein Ladder	Fermentas
Phosphorsäure	VEB Laborchemie Apolda
DMSE	AppliChem GmbH Darmstadt
Polyothylonglykol 400	Applichem GmbH, Darmstadt
Polyethylenglykol 2000	E Morek Dermetedt
Polyethylenglykol 2000	E. Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol 6000	E. Merck, Darmstadt
Polyetnylengiykol 8000	E. Merck, Darmstadt
Protaminsuitat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	Munchen
Pufferlösung pH 4,0	VWR international GmbH, Darmstadt
Pufferlösung pH 7,0	VWR international GmbH, Darmstadt
Pufferlösung pH 9,0	VWR international GmbH, Darmstadt
Pyruvamid	synthetisiert (PrivDoz. Dr. R. Golbik)
Pyruvat	E. Merck, Darmstadt
Salzsäure	E. Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Fluka Chemie AG, Buchs
Thiamin-Hydrochlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Thiaminpyrophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München
Tricin	SERVA Feinbiochemica GmbH,
	Heidelberg bzw. AppliChem GmbH,
	Darmstadt
Tris	SERVA Feinbiochemica GmbH.
	Heidelberg
Trypton	AppliChem GmbH. Darmstadt
Zitronensäure	E. Merck. Darmstadt

2.1.2 Verwendete chromatographische Säulen

fünf gekoppelte Hitrap [™] 5 ml Desalting Säulen	8 mm/ 2,5 cm	Pharmacia Biotech, Uppsala
HPLC TSKgel G 3000 SW	7,5 mm/ 30 cm	Tosohaas GmbH, Stuttgart
Poros 20 QE	4,6 mm/ 10 cm	PerSeptive Biosystems, Framingham
Superdex [™] 200	26 mm/ 60 cm	Pharmacia Biotech, Uppsala

2.1.3 Geräte

HPLC	Biosys™ 2000	Beckman, Krefeld
Kugelmühlen	Bead-beater	Biospec Products, Bartlesville
	Nagema 192 AK	VEB Maschinenfabrik, Heidenau
pH Meter	MP220	Mettler Toledo, Giessen
Photometer	Jasco V-560 UV/VIS Spectrophotometer	Jasco, Groß-Umstadt
	Uvikon 941	Kontron Instruments, Groß- Zimmern
	Specord M40	VEB Carl-Zeiss-Jena, Jena
	Bio Sequential SX-18 MY. <i>stopped-flow</i> Reaction Analyser	Applied Photophysics, Leather- head
SDS Gelelektrophorese	EPS 600 Elektrophoreseeinheit	Pharmacia Biotech, Uppsala
	Mighty Small II for 8×7cm Gels	Amersham Biosciences, Uppsala
Zentrifugen	Sorvall® RC 5B Plus Rotoren: SLA-3000 FAS-26c	Thermo Scientific, Waltham
	Beckman® L8-60M Ultrazentrifuge Rotor: Type 45 Ti	Beckman, Krefeld
	EBA 12	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.1.4 Messplätze

European Synchrotron Radiation Facility, Gre- noble	ID14-2
europäisches moleku- larbiologisches Labora- torium, Hamburg	X11 X12 X31 X33

Brauhefe PDC	Hefestamm: WS 34/70 (Wernesgrüner Brauerei, Wernesgrün)
<i>KI</i> PDC	Hefestamm: JA6
rekombinante ScPDC	PDC1 Gen (Schmitt <i>et al.</i> , 1983) in einem PET22b(+) Plasmid im <i>Escherichia coli</i> Stamm Bl 21
rekombinante <i>Sc</i> PDC Varianten E477Q und D28A	PDC1 Gen mit der Mutation D28A bzw. E477Q auf einem pUC 18 Plasmid im <i>Escherichia coli</i> Stamm JM 109 (Liu <i>et al.</i> , 2001)
<i>Nc</i> PDC	Neurospora crassa Stamm: St. Lawrence 74-OR23-1A

2.1.5 Organismen und Plasmide

2.2 Methoden

2.2.1 Proteinexpression und Reinigung

Alle Reinigungsschritte wurden sofern nicht anders angegeben auf Eis oder bei 8 °C durchgeführt. Die Kontrolle der Reinheit erfolgte bei jedem Präparationsschritt durch Aktivitätstests und der Entnahme von Proben für eine SDS-Gelelektrophorese.

2.2.1.1 NcPDC, Wildtypenzym

Die Anzucht des *Neurospora crassa* Wildtyp-Stammes erfolgte in einem Komplexmedium aus 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Trypton, 3,5 % (w/v) Glukose, 10 mg Thiamin-Hydrochlorid/I und 10 mg Magnesiumsulfat/I. Zwei Vorkulturen (100 ml) wurden mit mehreren Einzelkolonien von Kulturplatten (Medium wie oben, jedoch mit 1 % (w/v) Agar-Agar) angeimpft und nach 36 h Stunden schütteln (Rotationsfrequenz max. 120 U/min) bei 30 °C gleichmäßig auf die Hauptkulturen (12 mal 1,7 l) verteilt. Nach weiteren 48 h erfolgte die Zellernte durch Filtration mittels grobporigen Küchentüchern. Die mit Leitungswasser gewaschenen und anschließend ausgewrungenen Zellen (Frischzellmasse ca. 250 g) wurden bei -20 °C gelagert.

Zur Präparation der *Nc*PDC wurden ca. 70 g aufgetaute *Neurospora-crassa*-Zellen mit 150 ml Puffer (0,1 M Phosphat pH 6,1, 5 % Glycerin, 0,1 mM TPP, 0,1 mM Magnesiumsulfat, 1 mg/l PMSF) versetzt und in einer Kugelmühle mit 100 g Glaskugeln (Durchmesser 0,25-0,50 mm) viermal 40 s mit Pausen von jeweils 5 min aufge-

schlossen. Nach mehrmaligem Waschen der Glaskugeln mit insgesamt 150 ml Puffer erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer (10 min Zentrifugation bei 7500g). Anschließend ließ sich die PDChaltige Proteinfraktion durch eine Fällung mit 3,6 % (w/v) PEG 6000 abtrennen (10 min Zentrifugation bei 7500g). Das in 30 ml Aufschlusspuffer gelöste Pellet wurde mit 0,4 µg DNAse versetzt, 30 min gerührt, dann wurden weitere 60 ml Puffer hinzugegeben (wie oben jedoch pH 5,0), das Ganze bei 44 °C 30 min gerührt und die Lösung wurde abermals mit 90 ml Puffer (pH 6,6) versetzt. Als abschließender Reinigungsschritt erfolgte eine fraktionierte Ultrazentrifugation, zuerst für 12 min bei 7800g und dann 30 min bei 85000g. Das Pellet des zweiten Ultrazentrifugationsschrittes wurde in möglichst wenig 0,025 M Phosphatpuffer pH 5,1 gelöst und fraktioniert bei -20 °C eingefroren.

2.2.1.2 KIPDC, Wildtypenzym

Die Proteinexpression und Reinigung erfolgten nach Krieger et al. (2002) mit Modifikation nach Kutter et al. (2006, 2007). Von Zellen einer Glycerinkultur des Stammes JA6 (freundlicherweise von Frau Prof. K. Breunig zu Verfügung gestellt) wurden zwei Vorkulturen mit je 50 ml Medium (0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Trypton, 3,5 % (w/v) Glukose, 20 mg Thiamin-Hydrochlorid/l) angeimpft und für 36 h bei 30 °C geschüttelt (200 U/min). Mit diesen wurde anschließend die Hauptkultur, bestehend aus 12 Kolben mit je 1,7 I Medium, angeimpft und weitere 48 h geschüttelt (150 U/min). Das Abtrennen der Kluyveromyces-lactis-Zellen erfolgte durch 10minütiges Zentrifugieren bei 7500g. Diese wurden dann bei -20 °C bis zur Weiterverwendung gelagert. Zur Präparation wurden ca. 125 g der aufgetauten Zellen mit 150 ml Aufschlusspuffer (0,1 M Phosphat pH 6,0 mit 5 % (w/v) Glycerin, 50 mg TPP/I, 50 mg Magnesiumsulfat/I, 1 mM DTT und 1 mg PMSF/I) versetzt und bei 4 °C in einer Kugelmühle (Biospec Products) viermal für 40 s mit Pausen von 5 min aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (10 min bei 7500g), der Überstand mit 1 % (w/v) Protaminsulfat versetzt und abermals für 10 min bei 7500g zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine fraktionierte Fällung, zuerst mit 28,85 % (w/v) und dann mit weiteren 5,65 % (w/v) Ammoniumsulfat durchgeführt und jeweils für 10 min bei 48000g zentrifugiert. Das Pellet der zweiten Fällung wurde in wenig (ca. 5 ml) Gelfiltrationspuffer (0,1 M MES pH 6,0 mit 0,3 M Ammoniumsulfat und 1 mM DTT) gelöst und auf eine äguilibrierte Superdex-200-Säule aufgetragen. Die bei der Gelfiltration

eluierten und vereinigten Fraktionen wurden mit Ammoniumsulfat ausgefällt, zentrifugiert und in maximal 1,5 ml Niedrigsalzpuffer (20 mM BISTRIS pH 6,8 mit 1 mM DTT) gelöst. Im Anschluss erfolgte die Entsalzung des Proteins mit 5 gekoppelten Hitrap-Desalting-Säulen. Das gesammelte Protein wurde auf eine mit Niedrigsalzpuffer äquilibrierte Poros 20 QE Ionenaustauscher-Säule aufgetragen und mit einem linearen Ammoniumsulfatgradienten von 0-0,5 M (Hochsalzpuffer: 20 mM BISTRIS pH 6,8 mit 1 mM DTT und 0,5 M Ammoniumsulfat) eluiert. Die vereinigten PDChaltigen Fraktionen wurden mit 0,2 ml Puffer (0,1 M HEPES pH 7,5 mit 50 mM TPP und 50 mM Magnesiumsulfat) versetzt, mit Ammoniumsulfat gefällt, zentrifugiert, in Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Nutzung bei -20 °C gelagert.

2.2.1.3 ScPDC, Wildtypenzym

Saccharomyces-cerevisiae-Zellen des Reinzuchtstammen WS 34/70 wurden freundlicherweise von der Wernesgrüner Brauerei (Wernesgrün) zur Verfügung gestellt. Eine Suspension aus 10 kg Hefe in 10 I Puffer (0,1 M Phosphat pH 6,7 mit 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mg Antipain Dihydrochlorid/I und 1 mg Chymostatin/I) wurde kontinuierlich in einer Kugelmühle mit 50 ml/min aufgeschlossen und anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Präparation der *Sc*PDC erfolgte wie für die *KI*PDC unter 2.2.1.2 beschrieben, jedoch mit einem veränderten Konzentrationsbereich der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung von 32,75-34,25 % (w/v).

2.2.1.4 ScPDC, rekombinantes Wildtypenzym

Die Anzucht, Reinigung und Präparation der rekombinanten *Sc*PDC erfolgte freundlicherweise durch Frau J. Brauer und Frau Biol.-Ing. (FH) B. Seliger nach Killenberg-Jabs *et al.* (1997).

2.2.1.5 Rekombinante ScPDC Varianten D28A und E477Q

Die Proteinexpression und Reinigung der beiden Varianten wurde dankenswerterweise durch Frau Dipl.-Biochem. K. Uhlemann und Frau Biol.-Ing. (FH) B. Seliger nach Uhlemann (2001) durchgeführt. 2.2.2 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS Gelelektrophorese erfolgte nach Lämmli (1970). Die dabei eingesetzte Acrylamidkonzentration betrug 10 % (w/v) im Trenngel und 5 % (w/v) im Sammelgel. Die Gele liefen bei einer konstanten Stromstärke von 15 mA.

2.2.3 Kristallisation, Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung

2.2.3.1 Native NcPDC, Wildtypenzym

Die Vorauswahl geeigneter Kristallisationsbedingungen geschah an der Hamburg HT-X facility (Müller-Dieckmann, 2006) der EMBL Außenstation, Hamburg. Dabei wurden die *Screens* Jena 1-10 und HR Crystal Screen bei 1 mg *Nc*PDC/ml verwendet. Frisch präpariertes Protein wurde hierfür durch Ultrazentrifugation und Lösen in Wasser entsalzt.

Zwar war es dabei möglich Kristalle zu erhalten, der Versuch die Bedingungen zu optimieren brachte jedoch keinen Erfolg, so dass letztlich auch kein Datensatz aufgenommen wurde.

2.2.3.2 Native KIPDC, Wildtypenzym

Die Kristallisation, Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung erfolgten nach Kutter *et al.* (2006). Das Enzym wurde in Konzentratoren (0,5 ml; 30 kDa Ausschlussgröße) mit Kristallisationspuffer (A: 50 mM MES pH 6,45 mit 1 mM DTT, 5 mM TPP und 5 mM Magnesiumsulfat oder B: 35 mM Citrat pH 6,45 mit 1 mM DTT, 5 mM TPP und 5 mM Magnesiumsulfat) umgepuffert und anschließend mit Puffer auf die benötigte Enzymkonzentration verdünnt. Die Kristallisation erfolgte durch Gasphasendiffusion mit hängenden Tropfen in 24-zelligen Kulturplatten (TPP, Trasadingen) bei 8 °C. Dafür wurden auf einem Deckglas zwei Tropfen bestehend aus jeweils 4 µl Protein- und 4 µl Reservoirlösung pipettiert und gemischt. Als Reservoirlösung diente der Kristallisationspuffer in dem sich 12-24 % (w/v) Fällungsmittel (PEG 2000 und PEG 8000 im Verhältnis 1:1) befanden. Die qualitativ besten Kristalle ließen sich bei 20 % PEG im Reservoir und 2 mg *KI*PDC/ml beobachten. Im Falle von Puffer A dauerte das Kristallwachstum ca. 4 Wochen. Die so entstandenen nadelför-

migen Kristalle (400×30×30 µm) waren über Monate stabil. Bei Puffer B bildeten sich nadelförmige Kristalle (600×20×20 µm) innerhalb von 10 Tagen mit höherer Reproduzierbarkeit. Jedoch waren diese nur maximal zwei Wochen lagerfähig.

Zur Datensammlung wurde einer dieser Kristalle ca. 20-30 s in Kryolösung (1:1 Gemisch aus Reservoirlösung sowie 15 % (w/v) Glycerin in Wasser) inkubiert, in Stickstoff eingefroren und in den kryogenen Stickstoffstrom des Messplatzes überführt. Kristalle in Puffer A streuten bis 1,95 Å. Von diesen wurde ein Datensatz am Messplatz X11 der Außenstelle des europäischen molekularbiologischen Laboratoriums (EMBL) am Hamburger Synchrotronlabor (HASYLAB) des deutschen Elektronensynchrotrons (DESY) in Hamburg aufgenommen. Kristalle in Puffer B streuten zwar nur bis 3,0 Å, jedoch wurde auch von diesen ein Datensatz gemessen (Messplatz X31 des EMBL Hamburg).

Die Datensätze wurden von Dr. M. S. Weiss (EMBL, Hamburg) mittels der Programme DENZO und SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) indiziert, integriert und anschließend mit der Softwaresuite CCP4i skaliert (French & Wilson, 1978; Collaborative Computational Project Number 4, 1994). Danach erfolgte die Ermittlung der Strukturamplituden mit dem Programm TRUNCATE (Collaborative Computational Project Number 4, 1994). Die Bestimmung der initialen Phasen geschah durch molekulares Ersetzen mit dem Programm MOLREP (Collaborative Computational Project Number 4, 1994). Als Suchmodell diente die Struktur eines Monomers der nativen *Sc*PDC (Arjunan *et al.*, 1996; PDB-Code 1PVD), jedoch mit der Aminosäuresequenz der *KI*PDC. Die Verfeinerung wurde von Dr. G. Wille (Institut für Biophysik, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main) mit dem Programm REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) vorgenommen. Die Kontrolle der Elektronendichte sowie das Erstellen und Überprüfen des Modells erfolgte mit dem Programm WINCOOT (Emsley & Cowtan, 2004; Lohkamp *et al.*, 2005).

Der Datensatz des Kristalls in Puffer A wurde zunächst bis 2,26 Å ausgewertet. Allerdings waren auch noch Streureflexe bis 1,95 Å vorhanden. Auf diesen hochaufgelösten Bereich wurde in der ersten Strukturlösung jedoch aufgrund mehrerer dünner Eisringe verzichtet. Um bessere Aussagen zu den flexiblen Regionen in der Struktur treffen zu können, wurde der Bereich von 1,95-2,26 Å in einer zweiten Auswertung des Datensatzes mit eingeschlossen. Diese geschah mit dem automatischen Datenreduktionsprogramm xia2 (Bahar *et al.*, 2006). Zur Vermeidung von Artefakten bei der Bestimmung der Positionen der flexiblen Loops 104-115 und 288-304 sowie der ebenfalls flexiblen C-terminalen Bereiche erfolgte die Modellbildung und die Verfeinerung der nativen *KI*PDC-Struktur auf Grundlage der nativen *Sc*PDC-Struktur (Arjunan *et al.*, 1996; PDB-Code 1PVD), aber mit der *KI*PDC-Sequenz, zunächst ohne Loops, C-terminale Bereiche und Kofaktoren. Erst danach wurden in die deutlich erkennbare Differenzelektronendichte zuerst die Kofaktoren eingefügt und nach einem weiteren Verfeinerungszyklus auch die Loops und C-terminalen Bereiche.

2.2.3.3 MAP-aktivierte KIPDC, Wildtypenzym

Die Kristallisation erfolgte mit geringen Veränderungen wie unter 2.2.3.2 beschrieben. Als Kristallisationspuffer diente 20 mM Citrat pH 6,1 mit 1 mM DTT, 5 mM TPP und 5 mM Magnesiumsulfat. Nach dem Aufkonzentrieren der PDC wurde diese mit Kristallisationspuffer auf die benötigte Enzymkonzentration eingestellt und mit Methylacetylphosphonat (MAP) versetzt, so dass die Konzentration des Analogons 80 mM betrug. Als Reservoirlösung diente der Kristallisationspuffer mit 7-23 % (w/v) Fällungsmittel (PEG 2000 und PEG 6000 im Verhältnis 1:1). Nach 10tätigen Wachstum ließen sich die qualitativ besten Kristalle bei 20 % PEG im Reservoir und 0,95 mg *KI*PDC/ml beobachten.

Zur Datensammlung wurde einer dieser Kristalle ca. 5-10 s in Kryolösung (1:1 Gemisch aus Reservoirlösung sowie einer Lösung aus 32 % (w/v) PEG 400 und 4 % (w/v) Glycerin in Wasser) inkubiert, in Stickstoff eingefroren und in den kryogenen Stickstoffstrom des Messplatzes überführt. Trotz der geringen Größe des quaderförmigen Kristalls von 30×30×25 µm war die Streuleistung mit 2,3 Å gut genug um einen Datensatz am Messplatz X12 des EMBL Hamburg aufzunehmen.

Die Auswertung des Datensatzes erfolgte in Kooperation mit Dr. M. S. Weiss und Dr. G. Wille. Zur Bestimmung der initialen Phasen wurde das Monomer der nativen *KI*PDC verwendet.

2.2.3.4 Pyruvamid-aktivierte K/PDC, Wildtypenzym

Die Kristallisationsbedingungen entsprachen denen der MAP-aktivierten Spezies (2.2.3.3), jedoch mit 100 mM Pyruvamid statt der 80 mM MAP in der Proteinlösung. Die besten Kristalle (hexagonale Form mit einer Kantenlänge von 30 μ m und einer Höhe von 200-300 μ m) ergaben sich bei einer PEG Gesamtkonzentration von 20 %

(w/v) im Reservoir (1:1 Gemisch aus PEG 2000 und PEG 6000) und 1,5 mg *KI*PDC/ml. Als Kryolösung fand ein 1:1 Gemisch aus Reservoirlösung und einer Lösung aus 42 % (w/v) PEG 400 mit 6,7 % (w/v) Glycerin und 100 mM Pyruvamid in Wasser Anwendung. In dieser wurden die Kristalle ca. 45 s inkubiert.

Trotz schlechter Auflösung von lediglich 3,65 Å wurde ein Datensatz am Messplatz ID14-2 an der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) Grenoble gesammelt, um zumindest einen Rückschluss auf die Anordnung der beiden Dimere zu erhalten. Die Auswertung des Datensatzes erfolgte in Kooperation mit Dr. M. S. Weiss. Als Suchmodell wurde die MAP-aktivierte *KI*PDC aus 2.2.3.3 genutzt.

2.2.3.5 Pyruvat-aktivierte ScPDC_{D28A} und ScPDC_{E477Q}

Wie auch bei den anderen Strukturen erfolgte die Kristallisation in Anlehnung an Kutter *et al.* (2006). Es wurde jedoch auf ein Umpuffern verzichtet und das aufgetaute Protein (50 mg/ml) direkt mit Kristallisationspuffer (12 mM Citrat, 1,33 mM MES pH 6,35 mit 1,33 mM DTT, 1,33 mM TPP, 1,33 mM Magnesiumsulfat, 630 mM Pyruvat, 5 μ g/ml ADH und 2 mM NADH+H⁺) auf die benötigte Proteinkonzentration verdünnt und anschließend wie unter 2.2.3.2 beschrieben mit Reservoirlösung (18 mM Citrat, 2 mM MES pH 6,35 mit 2 mM DTT, 2 mM TPP, 2 mM Magnesiumsulfat und 6,9-24 % (w/v) PEG 2000:PEG 6000 im Verhältnis 1:1) auf Deckgläser pipettiert. Die Proteinkonzentration im Tropfen betrug dabei 1,1 mg/ml. Nach 14tägigen Wachstum bei 0 °C wurden mehrere Kristalle isoliert, ca. 1 min in Kryolösung (1:1 Gemisch aus Reservoirlösung sowie 42 % (w/v) PEG 400 und 6,7 % (w/v) Glycerin in einer 70 mM wässrigen Pyruvatlösung) inkubiert und bis zur endgültigen Verwendung in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Die beste Streuleistung wurde bei 22,5 % (w/v) PEG im Reservoir erzielt. Wie bei der MAP-aktivierten *KI*PDC ergaben sich auch hier quaderförmige Kristalle, die mit 30×25×20 µm von nur geringer Größe waren. Dennoch konnten von beiden Mutanten jeweils zwei Datensätze bis 1,71 Å bzw. 2,05 Å für die D28A-Variante und 1,42 Å bzw. 1,67 Å für die E477Q-Variante am Messplatz ID14-2 an der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) Grenoble gesammelt werden.

Die Indizierung, Integration und Skalierung erfolgte in Kooperation mit Dr. M. S. Weiss. Als Suchmodell diente die Pyruvamid-aktivierte Spezies (Lu *et al.*, 2000;

PDB-Code: 1QPB) für die ScPDC_{D28A}. Für die E477Q-Variante wurde die zuvor fertig gestellte Struktur der D28A-Variante genutzt.

2.2.3.6 Pyruvamid-aktivierte ScPDC_{E477Q}

Für die Pyruvamid-aktivierte ScPDC_{E477Q} waren die Bedingungen identisch zu 2.2.3.5. Es wurde lediglich das Substrat Pyruvat in der Reservoirlösung weggelassen und stattdessen festes Pyruvamid der Proteinlösung hinzugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 600 mM einstellte. Zudem erfolgte die Kristallisation bei 8 °C.

Auch hier streuten die Kristalle bei 22,5 % (w/v) PEG im Reservoir und bei 1,1 mg PDC/ml am besten. Allerdings betrug die Wachstumszeit 5 Monate. Die Kryolösung beinhaltete ein 1:1 Gemisch aus Reservoirlösung und 42 % (w/v) PEG 400 mit 4,2 % (w/v) Glycerin und 80 mM Pyruvamid in Wasser, in die der verwendete Kristall ca. 20 s inkubiert wurde. Die Datensammlung des bis zu einer Auflösung von 1,60 Å streuenden Kristalls erfolgte am Messplatz X12 des EMBL Hamburg. Das Indizieren, Integrieren und Skalieren geschah wiederum in Kooperation mit Dr. M. S. Weiss. Als Suchmodell diente die Pyruvat-aktivierte-*Sc*PDC_{E477Q}.

2.2.3.7 Soaking der Pyruvamid-aktivierten ScPDC_{E477Q} mit Acetaldehyd

Zwei der Kristalle aus 2.2.3.6 wurden für 30 bzw. 60 s in einer Kryolösung entsprechend zu der oben beschriebenen inkubiert, die jedoch 500 mM Acetaldehyd anstatt des Pyruvamides enthielt. Auch hier erfolgte die Datensammlung am Messplatz X12 des EMBL Hamburg. Die Auflösungen betrugen 2,13 Å bzw. 2,50 Å. Das Indizieren, Integrieren und Skalieren geschah in Kooperation mit Dr. M. S. Weiss. Es wurde wiederum die Pyruvat-aktivierte *Sc*PDC_{E477Q} als Suchmodell genutzt.

2.2.3.8 Verwendete Programme für die Datenanalyse der PDC-Kristallstrukturen

Für die weitere Auswertung und Visualisierung der Kristallstrukturen wurden einzelne Subprogramme der CCP4i-Suite (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) sowie die Programme PYMOL und WINCOOT (Lohkamp *et al.*, 2005) genutzt.

2.2.4 SAXS-Messungen

Alle *SAXS*-Messungen wurden am Messplatz X33 der Außenstelle des europäischen molekularbiologischen Laboratoriums (EMBL) am Hamburger Synchrotronlabor (HASYLAB) des deutschen Elektronensynchrotrons (DESY) durchgeführt. Die Messtemperatur betrug bei *SAXS*-Kinetiken 4 °C, bei allen anderen Experimenten 10 °C. Die Proben befanden sich entweder in einer Glimmerküvette (Schichtdicke 1 mm) bzw. in einer Kapillarküvette. Bei allen Versuchen betrug die Kameralänge 2,7 m. Als Detektor fand entweder ein positionsempfindlicher Geiger-Müller-Zähler oder eine *MAR345 image plate* Verwendung. Die Auswertung und Visualisierung geschah mit den Programmen SAPOKO, PRIMUS, GNOMOKO, GNOM, OLIGOMER, CRYSOL, MASHA, GASBOR, DAMMIN und SASPLOT, die alle als Bestandteil des ATSAS 2.2 Programmpaketes unter <u>www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/download.html</u> zugänglich sind. Datenaufnahme und Auswertung erfolgten in Zusammenarbeit mit Privatdozent Dr. S. König.

2.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte im Allgemeinen über die Aufnahme eines UV/VIS Spektrums von 240-340 nm unter Annahme eines Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_{280} = 1 \cdot \text{ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für die PDC. Lediglich im Falle von SAXS-Messungen, während der Vorbereitung der Kristallisationsproben und bei der *Nc*PDC wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (1976) bestimmt.

2.2.6 Kinetische Messungen

Die Experimente basierten auf den gekoppelten optischem Test nach Holzer *et al.* (1956) bei dem Acetaldehyd, das Reaktionsprodukt der PDC, mit dem Hilfsenzym ADH und dem Hilfssubstrat NADH+H⁺ zu Ethanol umgesetzt wird. Der Verbrauch von NADH+H⁺ lässt sich UV/VIS-photometrisch detektieren. Die genauen Messbedingungen werden im Ergebnisabschnitt detailliert beschrieben. Im Allgemeinen wurden die Versuche für die Hefe-Pyruvatdecarboxylasen bei 25 °C in 50 mM MES pH 6,0 mit 150 mM Ammoniumsulfat bei 355 nm (*stopped-flow* bei 340 nm) durchgeführt.

Alle *stopped-flow*-Messungen erfolgten mit zwei Spritzen, deren Inhalt im Verhältnis 1:1 gemischt wurde. Die eine Spritze enthielt Puffer, Substrat, ADH sowie NADH+H⁺ und die andere die in Puffer gelöste PDC.

2.2.7 Messungen in Gegenwart von MAP und Pyruvamid

Experimente, bei denen die PDC in Kontakt mit den Substratanaloga Methylacetylphosphonat oder Pyruvamid kam, erfolgten grundsätzlich in Gegenwart von mindestens 1 mM TPP und 1 mM Magnesiumsulfat.

2.2.8 Analytische Gelfiltration

Neben *SAXS*-Experimenten diente auch die analytische Gelfiltration zur Untersuchung des Oligomerisierungsgrades der *Nc*PDC. Alle Messungen wurden an einem Biosys[™] 2000 HPLC Gerät mit einer TSKgel G 3000 SW Säule bei 8 °C und einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml durchgeführt. Die genauen Bedingungen sind im Ergebnisabschnitt aufgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase aus Neurospora crassa

Neurospora crassa, der rote Brotschimmel, ist ein zur Abteilung der Schlauchpilze gehörender, vielfältig genutzter Modellorganismus. Dennoch ist bisher nur sehr wenig über die Pyruvatdecarboxylase dieser Spezies bekannt. Bisher liegen lediglich sechs die PDC beschreibende Artikel vor (Rosa *et al.*, 1990^{a, b}; Haedo *et al.*, 1992; Alvarez *et al.*, 1993; Thompson-Coffe *et al.*, 1999; Folco *et al.*, 2002). Diese Publikationen beschränken sich hauptsächlich auf molekularbiologische und immunologische Fragestellungen während strukturelle und vor allem kinetische Daten fast gänzlich fehlen. Es ist bisher lediglich bekannt, dass die *Nc*PDC Filamente bilden kann, die mit dem kortikalen Zytoskelett assoziiert sind (Thompson-Coffe *et al.*, 1999). Im Rahmen dieses Abschnittes sollen daher die kinetischen und strukturellen Eigenschaften dieses Enzyms näher betrachtet werden. Insbesondere stellt sich die Frage, ob die katalytische Aktivität der *Nc*PDC durch das Substrat reguliert wird.

Der Sequenzvergleich mit Pyruvatdecarboxylasen aus anderen Spezies zeigt vor allem mit bakteriellen Enzymen eine hohe Übereinstimmung. So beträgt die Sequenzidentität zur *Zm*PDC 49,9 % und zur PDC aus *Glucanobacter oxydans* 49,7 %. Eine etwas geringere Übereinstimmung tritt zu den pflanzlichen Pyruvatdecarboxylasen auf. Sie beträgt für die Enzyme aus Reis, Mais, Tabak, der Erbse und der Ackerschmalwand jeweils rund 40 %. Am geringsten sind die Identitäten zu den Hefe-Enzymen. Sie liegen für die *KI*PDC bei 29,2 % und für die *Sc*PDC bei 27,5 %.

Die Präparation des Enzyms wurde bereits im Abschnitt Materialen und Methoden beschrieben (2.2.1.1). Das besondere war dabei die fraktionierte Ultrazentrifugation in Anlehnung an Rosa *et al.* (1990^a). Damit war es möglich, die PDC ohne die Verwendung chromatographischer Säulen aufzureinigen (Abb. 6). Wie Studien von Fiebig (2008) zeigten, waren noch Nukleinsäuren an der *Nc*PDC gebunden. Diese haben jedoch nur einen geringen Einfluss auf die kinetischen Eigenschaften des Enzyms.

Mittels Massenspektroskopie ließ sich das gereinigte Protein als PDC aus *Neurospora crassa* identifizieren (von Dr. A. Schierhorn durchgeführt, Institut für Biochemie & Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg). Die einzelnen Reini-
gungsschritte inklusive Protein- und Aktivitätsausbeuten sind in Tab. 2 zusammengefasst.



Abb. 6: SDS-Gel nach der Reinigung der *Nc*PDC (links). Die molekularen Massen der Markerproteine (rechts) betragen von oben nach unten: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25 und 20 kDa.

Reinigungsschritt	Protein in mg	Gesamtaktivität in	spezifische Aktivi-	Aktivitätsausbeute
Deboytrakt	5600	2200	0.57	100
Ronexiraki	5000	3200	0,57	100
PEG-Fällung, gelöstes Pellet	4800	2600	0,54	81,3
1. Ultrazentrifuga- tion, Überstand	525	1750	3,33	54,7
2. Ultrazentrifuga- tion, gelöstes Pel- let	33	980	29,7	30,6

Tab. 2: Reinigungsschema der NcPDC.

¹ Messung in 50 mM MES, pH 5,1.

3.1.1 Kinetische Charakterisierung

Zunächst sollen die kinetischen Eigenschaften der *Nc*PDC näher beschrieben werden. In Abb. 7A sind exemplarisch zwei v/S-Diagramme dargestellt. Für die Messung erwiesen sich die zwei Puffer 50 mM MES pH 5,1 bzw. 50 mM Phosphat pH 5,1 als geeignet. Diese beiden Puffer eignen sich auch zur Lagerung der *Nc*PDC. Speziell in 50 mM Phosphat pH 5,1 ist das Enzym über eine sehr lange Zeitspanne ohne Aktivitätsverlust stabil ($t_{1/2} > 28$ d bei T ≤ 25 °C unabhängig von der Proteinkonzentration). Beide v/S-Diagrammen aus Abb. 7A zeigen einen hyperbolen Verlauf, so dass eine Anpassung nach der Michaelis-Menten-Gleichung (Michaelis & Menten, 1913)

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_{M} + S}$$
 Glg. 1

v, Reaktionsgeschwindigkeit; V_{max} , Maximalgeschwindigkeit; S, Substratkonzentration; K_{M} , Michaelis-Menten-Konstante.

angebracht war. Dieser Befund spricht gegen eine Substratregulation, wie sie bei Hefe-Enzymen mit den typischen sigmoiden v/S-Diagrammen (Abb. 12B, S. 46) auftritt. Um dies abzusichern, wurden stopped-flow-Progresskurven in verschiedenen Puffern aufgenommen (Abb. 7B). Im Falle von Phosphat trat bei keiner verwendeten Substratkonzentration eine *laq*-Phase auf, wie sie für die Hefe-Pyruvatdecarboxylasen (Abb. 12A, S. 46) gefunden wird. Gleiches gilt für MES (50 mM, pH 5,1, ohne Abb.) und HEPES (50 mM pH 6,8, ohne Abb.) sowie in Gegenwart des Substratanalogons Methylacetylphosphonat (100 mM, ohne Abb.). Daher liegt keine Substratregulation der *Nc*PDC vor. Andererseits traten in Puffern wie Citrat (50 mM pH 5,1, Abb. 7C), Acetat (50 mM, pH 6,0, ohne Abb.) und MES bei höherer Konzentration (> 200 mM pH 5,1, ohne Abb.) laq-Phasen auf, wobei der Anfangsanstieg der Progresskurven im Gegensatz zu den Hefe-Enzymen immer deutlich größer als Null ist (mind. 30 % der steady-state-Geschwindigkeit). Dies trifft ebenso für die Progresskurven in Gegenwart von Ammoniumsulfat und Natriumchlorid (50 mM, ohne Abb.) zu. Die aus der lag-Phase berechnete Geschwindigkeitskonstante für die Aktivitätszunahme beträgt dabei $\approx 0,005 \text{ s}^{-1}$ (bei 25 °C). Eine Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante der lag-Phase von der Pyruvatkonzentration ist nach Fiebig (unveröffentlicht) nicht erkennbar, so dass auch hier eine Substrataktivierung¹ auszuschließen ist.

Ähnlich wie bei der PDC aus Erbsenkeimlingen (*Ps*PDC; Dietrich, 2001) scheint es sich hier also um eine durch verschiedene Ionen induzierbare oder unterdrückbare Regulation zu handeln. Bei der *Ps*PDC kommt aufgrund der vorhandenen Abhängigkeit der beobachtete Geschwindigkeitskonstante der *lag*-Phase von der Pyruvatkon-zentration zusätzlich noch eine Substratregulation hinzu (Dietrich & König, 1997).

Die Wirkung der Ionen unterscheidet sich bei den beiden Spezies *Nc*PDC und *Ps*PDC grundlegend. Während Phosphat bei *Neurospora crassa* einen aktivierenden Einfluss besitzt, zeigt sich bei der *Ps*PDC eine inhibitorische Wirkung mit stark ausgeprägten *lag*-Phasen in den Progresskurven, deren Anfangsanstieg gegen Null geht (Dietrich, 2001). Andererseits unterdrückt Natriumchlorid die *lag*-Phasen bei der *Ps*PDC, induziert diese aber bei der *Nc*PDC. Ammoniumsulfat ist für beide Spezies ein Inhibitor und verstärkt die *lag*-Phasen.

Wie aus Abb. 7A und Tab. 3 ersichtlich wird, ergibt sich ein relativ kleiner K_M -Wert für die *Nc*PDC in 50 mM MES (pH 5,1) von 0,1 mM. Dieser ist damit der Kleinste aller für

¹ Für die Hintergründe der Substrataktivierung siehe auch Kapitel 3.3 ab S. 43.

Pyruvatdecarboxylasen bestimmte. Demgegenüber beträgt der K_M-Wert in 50 mM Phosphat (pH 5,1) 0,24 mM. Andererseits ist jedoch die Maximalgeschwindigkeit in Phosphatpuffer größer als in MES. So beträgt die spezifische Aktivität der *Nc*PDC in 50 mM Phosphat 27 U/mg (bei 25 °C) und ist daher um ca. 45 % höher als in MES-Puffer (19 U/mg).



Abb. 7: Vergleich der Kinetiken der *Nc*PDC in verschiedenen Puffern. Alle Messungen bei pH 5,1 nach dem gekoppelten optischen Test (Holzer *et al.*, 1956) bei 25 °C mit 1 μg *Nc*PDC/ml. A: v/S-Diagramm in 50 mM Phosphat bzw. 50 mM MES. Insert: Doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver & Burk (1934).

B: Ausgewählte stopped-flow-Progresskurven in 50 mM Phosphat.

C: Progresskurven in 50 mM Phosphatpuffer bzw. in 50 mM Citratpuffer bei Substratsättigung (33 mM Pyruvat).

Tab. 3: Kinetische Charakterisierung der *Nc*PDC. Alle Messungen bei pH 5,1 nach dem gekoppelten optischen Test (Holzer *et al.*, 1956) bei 25 °C und mit 1 µg *Nc*PDC/ml.

	50 mM Phosphat-	50 mM MES-Puf-	50 mM Citratpuf-
	puffer, pH 5,1	fer, pH 5,1	fer, pH 5,1
spezifische Aktivität in U/mg	27	19	24
K _M -Wert in mM	0,24	0,10	nicht messbar

Auch bei der *Zm*PDC hängen die spezifische Aktivität und der K_M-Wert vom Puffermilieu ab (Pohl *et al.*, 1995). Wie bei der *Nc*PDC ist die spezifische Aktivität in Phosphat größer als in Citrat. Im Falle von MES-Puffer (50 mM) ergab sich bei der *Zm*PDC eine geringfügige Aktivitätssteigerung von 9 % bei fast unverändertem K_M-Wert im Vergleich mit Phosphat. Allerdings wird in keiner Publikation zur *Zm*PDC über das Auftreten von *lag*-Phasen berichtet.

Bei den Hefe-Enzymen wirkt Phosphat hingegen als allosterischer Inhibitor (Boiteux & Hess, 1970). Im Gegensatz zur *Nc*PDC verstärkt Phosphat hier die *lag*-Phasen.

Ungewöhnlich ist auch das pH-Profil der *Nc*PDC (Abb. 8A). Verglichen mit allen anderen bisher charakterisierten Pyruvatdecarboxylasen wie z.B. der *Sc*PDC (Ermer, 1988), der *KI*PDC (Krieger, 2000), der *Zm*PDC (Neale *et al.*, 1987) oder der PDC aus Erbse (Mücke *et al.*, 1995) mit pH-Optima zwischen 6,0-6,5 liegt es für die *Nc*PDC weit im sauren Bereich. Sowohl für die Maximalgeschwindigkeit als auch für den K_M-Wert ergibt sich ein Plateau bei pH 4,2-6,0 für Phosphat bzw. bei pH 4,9-5,4 für MES. In beiden Puffern liegt der maximale k_{kat}- bzw. minimale K_M-Wert bei pH 5,1, so dass auch die katalytische Effizienz (k_{kat}/K_M) bei pH 5,1 maximal ist (Abb. 8B).



Abb. 8: Abhängigkeit der katalytischen Konstanten für den Umsatz von Pyruvat durch die *Nc*PDC vom pH-Wert. Alle Messungen im gekoppelten optischen Test (Holzer *et al.*, 1956) bei 33 mM Pyruvat, 6 μg *Nc*PDC/ml und 25 °C.
A: Vergleich von k_{kat} (durchgezogene Linie) und K_M (gestrichelte Linie) in 50 mM Phosphat (schwarz) bzw. 50 mM MES (rot).
B: Abhängigkeit der katalytischen Effizienz (k_{kat}/K_M) vom pH-Wert in 50 mM Phosphat (schwarz) bzw. 50 mM MES (rot).

Ähnlich wie bei den Hefe-Pyruvatdecarboxylasen aus *Kluyveromyces lactis* und *Saccharomyces cerevisiae* (Kutter 2004; Kutter *et al.*, 2007) nimmt auch bei der *Nc*PDC die spezifische Aktivität mit steigender Proteinkonzentration zu (Abb. 9A). Auch in diesem Fall sollte die Aktivitätssteigerung das Ergebnis von Änderungen des Oligomerisierungszustandes sein. Ein Einfluss hoher Konzentrationen von Fremdproteinen (*macromolecular crowding*, Minton, 2000) war nicht nachweisbar (Abb. 9B).



Abb. 9: Proteinkonzentrationsabhängigkeit der *Neurospora crassa* PDC in 50 mM Phosphat pH 5,4. Messungen im gekoppelten optischen Test (Holzer *et al.*, 1956) unter Substratsättigung (33 mM Pyruvat) bei 25 °C.

A: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der NcPDC-Konzentration.

B: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von den Konzentrationen an *Nc*PDC und Fremdprotein (BSA).

Während sich bei Hefe-Pyruvatdecarboxylasen eine schnell einsetzende Thermoinaktivierung zeigt, ähnelt die *Nc*PDC der *Zm*PDC (Pohl *et al.*, 1995) und kann kurzzeitig (5 min) Temperaturen bis 68 °C ohne Denaturierungserscheinungen überstehen (Abb. 10). Aus dem Arrhenius-Plot (Arrhenius, 1889) ergibt sich wie bei den Hefe-Pyruvatdecarboxylasen eine Aktivierungsenergie von \approx 44 kJ/mol für den Brenztraubensäureumsatz.



Abb. 10: A: Temperaturabhängigkeit der spezifischen Aktivität der *Nc*PDC in 50 mM Phosphat pH 5,4. Gemessen nach dem gekoppelten optischen Test (Holzer *et al.*, 1956) unter Substratsättigung (10 mM Pyruvat) mit 5 μg *Nc*PDC/ml. Puffer und PDC wurden vor der Reaktion für 5 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Durchgezogene Linie, exponentieller Fit erster Ordnung für die Messpunkte bis 68 °C; gestrichelte Linie, Verbindung der Messpunkte ab 68 °C.

B: Arrhenius-Plot zu A sowie von der *KI*PDC und *Sc*PDC in 50 mM MES pH 6,0 mit 150 mM Ammoniumsulfat unter ansonsten identischen Messbedingungen.

3.1.2 Strukturelle Charakterisierung

Zur Bestimmung der molaren Masse des Enzyms in Lösung fand die analytische Gelfiltration Anwendung. Im Bereich des katalytischen pH-Optimums wurde die *Nc*PDC unabhängig vom verwendeten Puffer (50 mM Phosphat oder 50 mM MES oder 50 mM Citrat; jeweils pH 5,4) kurz nach dem Ausschlussvolumen in zwei *Peaks* eluiert. Der Oligomerisierungsgrad entsprach mit \approx 450 kDa und \approx 900 kDa dem des Oktamers und Hexadecamers und ist daher von vergleichbarer Größe wie der maximale Oligomerisierungsgrad der PDC aus Erbsenkeimlingen, der mittels nativer Gelelektrophorese (Mücke *et al.*, 1995) bzw. Elektronenmikroskopie (Dietrich, 2001) bestimmt wurde. Damit ist die *Nc*PDC aber auch deutlich größer als das Brauhefe-Enzym (Patzlaff, 1996) oder die *Zm*PDC (Pohl *et al.*, 1994), die maximal die tetramere Größe aufweisen.

Bei einer Erhöhung des pH-Wertes auf 6,5 sind zwar weiterhin höheroligomere Spezies zu finden, allerdings kam ein weiterer *Peak* bei 240 kDa hinzu, welcher der tetrameren *Nc*PDC entspricht. Der Anteil dieses Peaks an der Gesamtproteinmenge betrug dabei mindestens 80 %. Folglich führt eine Erhöhung des pH-Wertes wie bei anderen Pyruvatdecarboxylasen (König *et al.*, 1992, 1993) zur Bildung kleinerer Spezies.

Die Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrades vom pH-Wert lässt sich auch mittels Röngtenkleinwinkelstreuexperimenten demonstrieren. Abb. 11 zeigt die *SAXS*-Streukurven der *Nc*PDC in Phosphat im pH-Bereich von 4,0-8,0. Bei hocholigomeren Proteinen ergibt sich ein großer Anstieg bei kleinen Streuwinkeln in den logarithmisch aufgetragenen Streukurven. Bei kleineren Proteinen ist der Anfangsanstieg deutlich flacher. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, nimmt der Oligomerisierungsgrad mit zunehmenden pH-Wert ab. Weitere *SAXS*-Experimente zeigten zudem, dass die Änderung des Molekulargewichtes reversibel ist.

Für die höchsten pH-Werte (7,4 und 8,0) war es möglich, die SAXS-Kurven durch Entfernen der ersten Messpunkte (bis zu einem Streuvektor von 0,32 nm⁻¹) einer weiteren Analyse zur Bestimmung des Gyrationsradius und des Molekulargewichtes zu unterziehen. Der Gyrationsradius ist mit einem Wert von \approx 4,0 nm mit dem anderer PDC-Spezies vergleichbar (*Zm*PDC 3,98 nm nach König *et al.* (1998) bzw. 4,08 nm nach Abb. 38B, *Sc*PDC 4,10 nm nach Hübner *et al.* (1990) bzw. *Sc*PDC und

*KI*PDC 3,85-3,87 nm nach Abb. 38B). Die Bestimmung der molaren Masse erfolgte durch Vergleich mit einem BSA-Standard anhand der Gleichung

$$M = M_{BSA} \cdot \frac{I(0)}{I_{BSA}(0)} \cdot \frac{c}{c_{BSA}}$$

M, molare Masse des untersuchten Makromoleküls; M_{BSA} , molare Masse von BSA (66,4 kDa); I(0), auf s = 0 extrapolierte Streuintensität des untersuchten Makromoleküls; $I_{BSA}(0)$, auf s = 0 extrapolierte Streuintensität der BSA-Probe; c, Konzentration des untersuchten Makromoleküls; c_{BSA} , Konzentration der BSA-Probe.

und entspricht mit ≈ 240 kDa dem der tetrameren NcPDC.



Abb. 11: SAXS-Streukurven der NcPDC in 50 mM Phosphat bei verschiedenen pH-Werten mit 1,72 mg NcPDC/ml.

Der Versuch die *Nc*PDC zu kristallisieren blieb erfolglos. Als Ursache ist das breite Spektrum der vorhandenen Oligomere anzunehmen. Lediglich bei sehr hohen pH-Werten (50 mM MES pH 7,1) wurden Kristalle gefunden, deren Streuleistung aber nicht für eine Datenaufnahme ausreichend war.

3.2 Präparation der PDC aus Hefen

3.2.1 Enzymreinigung der Pyruvatdecarboxylase aus Kluyveromyces lactis

Der PDC-Anteil bei Hefen beträgt ca. 5 % des löslichen Proteins (König, unveröffentlicht). Daher bot es sich an, das Enzym direkt aus dem Wildtypstamm zu isolieren.

Glg. 2

Die Reinigung erfolgte wie beschrieben (2.2.1.2) nach dem modifizierten Protokoll von Krieger *et al.* (2002) und bestand aus einer Protaminsulfatfällung, einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung sowie anschließender Gelfiltration, Entsalzung und Anionenaustauschchromatographie. Die Veränderungen zu Krieger *et al.* (2002) bestehen in einer Optimierung der Ammoniumsulfatfällungsbereiche (28,85-34,5 % (w/v) gegenüber 27-37 % (w/v)) und der Auswahl der chromatographischen Medien. Die Reinigung ist in Tab. 4 zusammengefasst. Verglichen mit Krieger *et al.* (2002) wurde eine 50 %ige Steigerung der spezifischen Aktivität erzielt.

rab. It rtoningange				
Reinigungsschritt	Protein in mg	Gesamtaktivität in	spezifische Aktivi-	Aktivitätsausbeute
		U	tät in U/mg	in %
Rohextrakt	25000 ^a	5000	0,20	100
Protaminsulfat- fällung, Überstand	13000 ^ª	4550	0,35	91,0
1. Ammoniumsul- fatfällung, Über- stand	10500 ^a	4200	0,40	84,0
2.Ammoniumsul- fatfällung, gelös- tes Pellet	1000 ^ª	2200	2,2	44,0
Gelfiltration	55 [⊳]	1210	22	24,2
Entsalzung	45 ^b	1125	25	22,5
Anionenaus- tauschchromato- graphie	10 ^b	450	45	9,0

Tab. 4: Reinigungsschema der *KI*PDC.

^a Konzentrationsbestimmung nach Bradford.

^b Konzentrationsbestimmung durch Messung der Extinktionsdifferenz bei 280 nm.

3.2.2 Enzymreinigung der Pyruvatdecarboxylase aus Saccharomyces cerevisiae

Die Präparation der *Sc*PDC erfolgte wie für die *KI*PDC, jedoch mit Ammoniumsulfatfällungen bei 32,75 % und 34,25 %. Sowohl die Aktivitätsausbeute (8 %) als auch die spezifische Aktivität (42 U/mg) unterscheiden sich nach der Präparation nicht wesentlich zur *KI*PDC aus Tab. 4.

3.3 Kinetische Untersuchungen zur Substrataktivierung der Pyruvatdecarboxylasen aus *Kluyveromyces lactis* und *Saccharomyces cerevisiae*

Die katalytischen Aktivitäten von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen werden durch ihr Substrat reguliert. Im einfachsten Fall lässt sich die Substrataktivierung als zweistufiger Prozess nach folgendem Schema beschreiben.



Schema 1: Kinetisches Minimalmodell der Substrataktivierung und Katalyse von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen nach Alvarez & Schowen (1991).

Zuerst bindet ein Substratmolekül an das regulatorische Zentrum des Enzyms (k_a), gefolgt vom Isomerisierungsschritt, bei dem die Enzymkonformation vom inaktiven in den aktiven Zustand übergeht (k_{iso}). Erst danach können Substratmoleküle an das aktive Zentrum binden (k_1) und zu den Reaktionsprodukten umgesetzt werden (k_2 , k_3). In diesem Modell wird eine schnelle Bindung des Substrates an die regulatorische Bindestelle vorausgesetzt und die Isomerisierung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Aktivierung postuliert. Die mathematischen Konsequenzen des aktuellen Modells zur Substrataktivierung sind bei Krieger *et al.* (2002) und Krieger (2000) dargestellt.

Im Rahmen der Diplomarbeit des Autors der vorliegenden Arbeit (Kutter, 2004; Kutter *et al.*, 2007) wurde gezeigt, dass die Unterschiede zwischen *Sc*PDC und *KI*PDC hinsichtlich der Substrataktivierung und der Katalyse nur gering sind (Abb. 12, Tab. 5).

Aufgrund der relativ langsamen Isomerisierung besitzen die *stopped-flow*-Progresskurven der Hefe-PDCs ausgeprägte *lag*-Phasen (Abb. 12A). Die Anfangsaktivität (t = 0) ist annährend null, da die gesamte Enzympopulation als inaktive Spezies E_i und SE_i (siehe Schema 1) vorliegt. Mit zunehmender Zeitdauer reichern sich die aktivierten Spezies SE_a, SE_aS und SE_aP an, bis schließlich die *steady-state*-Geschwindigkeit erreicht wird. Im Falle der in Abb. 12A dargestellten Progresskurve (33 mM Pyruvat, T = 25 °C) dauert dieser Prozess ca. 15 s.

Die sich aus der Abhängigkeit der *steady-state*-Geschwindigkeit von der Substratkonzentration ergebenden v/S-Diagramme (Abb. 12B) zeichnen sich für beide HefeEnzyme durch einen sigmoiden Verlauf aus. Die abgebildeten Kurven wurden nach

 $v = \frac{V_{max} \cdot S^2}{a + b \cdot S + S^2}$ (Krieger *et al.*, 2002) angepasst. Die kinetischen Konstanten V_{max} und S_{0.5} (Substratkonzentration bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal

ist) weisen nur marginale Unterschiede zwischen den beiden Hefe-PDC-Spezies auf (Tab. 5).

Die positive Kooperativität ist eine direkte Folge der Substrataktivierung. Der erste Schritt der Aktivierung, die Bindung des Substrates an das regulatorische Zentrum, ist eine von der Substratkonzentration abhängige Reaktion. Infolge der Größe der Gleichgewichtskonstanten K_a und K_{iso} (siehe Tab. 5) ist die Aktivierung bei kleinen Substratkonzentrationen nie vollständig. Daher ist der Anteil der aktivierten Enzymspezies bezogen auf die Gesamtenzymmenge hier deutlich kleiner als eins

 $\left(\sum \frac{SE_a + SE_aS + SE_aP}{E_{Gesamt}} << 1\right).$ Dies macht sich in einer Verringerung der katalytisch

wirksamen Enzymkonzentration bemerkbar und führt letztlich zur Sigmoidität.

Wie bei den v/S-Diagrammen unterscheiden sich auch die Abhängigkeiten der Geschwindigkeitskonstante der Aktivierung (k_{obs}) von der Substratkonzentration zwischen den beiden verwendeten Hefespezies nur geringfügig (Abb. 12C).

$$k_{obs} = \frac{k_{-iso} \cdot K_{M}}{S + K_{M}} + \frac{k_{iso} \cdot S}{S + K_{a}}$$
Glg. 3

Bei k_{obs} handelt es sich um eine komplexe Größe, die sich aus den Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Aktivierung und Katalyse zusammensetzt und ein Maß für die Dauer der *lag*-Phasen in den Progresskurven ist (Glg. 3; siehe auch Krieger *et al.*, 2002). Für beide Hefe-PDCs ist ein nahezu identischer Kurvenverlauf mit einem lokalen Minimum bei 1,5 mM Pyruvat und einer Zunahme der k_{obs} -Werte bis zur Sättigung zu verzeichnen. Auch die aus den k_{obs} -Abhängigkeiten resultierenden Konstanten (Tab. 5) variieren nur geringfügig.

Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Substrataktivierung ergaben sich zwischen der aus Brauhefe gereinigten PDC und dem rekombinanten Wildtyp (Tab. 5, ohne Abb.). Bei der rekombinanten *Sc*PDC ist lediglich die spezifische Aktivität etwas erhöht.

 k_{obs} , Geschwindigkeitskonstante der Aktivierung; S, Substratkonzentration. Zur Definition von $K_a,\,k_{iso},\,k_{\cdot iso}$ und K_M siehe auch Schema 1.



Abb. 12: Substrataktivierung bei den Hefe-Pyruvatdecarboxylasen aus Kluyveromyces lactis (schwarz) und Saccharomyces cerevisiae (rot). Alle Messungen in 50 mM MES pH 6,0 mit 150 mM Ammoniumsulfat bei 25 °C. Aktivitätsbestimmung über den gekoppelten optischen Test nach Holzer et al. (1956).

A: Stopped-flow-Progresskurven (durchgezogene Linien) bei 33 mM Pyruvat und einer Proteinkonzentration von 18 µg/ml. Gefittet (grau gepunktete Linien) nach $A = A_0 - v_{SS} \cdot t -$

 $\frac{V_0 - V_{SS}}{V_0} \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot t})$ (Krieger *et al.*, 2002). Gestrichelte Linien, differenzierte Progresskur k_{obs} ven.

B: v/S-Diagramme der beiden Hefe-PDCs bei einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml. An-

 $\frac{V_{max}\cdot S^2}{a+b\cdot S+S^2}$ (Krieger et al., 2002). Insert: Vergrößerter Ausschnitt bei passung nach v

kleinen Konzentrationen.

C: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante der Aktivierung (kobs) von der Substratkonzentration bei 10 µg PDC/ml. Gefittet nach Glg. 3. Insert: Vergrößerter Ausschnitt bei kleinen Konzentrationen.

Tab. 5: Vergleich	der kinetischen	Konstanten	und der	Aktivierungskonsta	nten der	Pyruvatdecarboxy-
lasen aus	Kluyveromyces	lactis und Sa	accharon	nyces cerevisiae bei	25 °C.	

	KIPDC (Wildtyp)	ScPDC (Wildtyp)	ScPDC (rekombinan-
			ter Wildtyp)
S _{0,5} in mM	1,7	1,8	1,7
K _A in mM	130	107	102
k _{iso} in s⁻¹	1,3	1,4	1,5
k₋ _{iso} in s⁻¹	0,08	0,09	0,09
K _M in mM	0,56	0,56	0,55
spezifische Aktivität in	45	42	55
U/mg			

3.4 Die native KIPDC-Kristallstruktur

Nachdem im letzten Abschnitt gezeigt werden konnte, dass es keine signifikanten Unterschiede im Aktivierungsverhalten der Pyruvatdecarboxylasen aus den Hefespezies *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces lactis* sowie zwischen rekombinanter und aus Hefezellen präparierter *Sc*PDC gibt, sollen beginnend mit diesem Kapitel Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Substrataktivierung vorgestellt werden.

Wie in der Einleitung unter 1.3 beschrieben, werden in der Literatur gegenwärtig zwei Substrataktivierungsmodelle diskutiert. So schlagen Jordan *et al.* (1998) Cys221 als regulatorisches Zentrum der *Sc*PDC vor und postulieren die kovalente Bindung eines Pyruvatmoleküls an die Thiolgruppe des Cysteins unter Bildung eines Thiohemiketals als initialen Aktivierungsschritt. Der Informationstransfer zum aktiven Zentrum soll über die miteinander interagierenden Aminosäurereste His92 \rightarrow Glu91 \rightarrow Val410-Gly413 zum Kofaktor TPP erfolgen. Das alternative Halle-Stockholm-Modell basiert auf den Kristallstrukturen der nativen Brauhefe-PDC (Dyda *et al.*, 1993) und der mit dem Substratanalogon Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC (Lu *et al.*, 2000). Dabei interagiert Pyruvamid nicht-kovalent mit den Resten Tyr157 und Arg224, was zur Fixierung der Loops 104-113 und 290-304 führen und wiederum Auslöser für eine globale Strukturänderung, der Drehung der beiden PDC-Dimere von offen zu halbseitig geschlossen, sein soll (siehe auch Abb. 4B, S. 17).

Eine Zielstellung der Arbeit bestand darin die PDC aus *Kluyveromyces lactis* in Abwesenheit von Effektoren zu kristallisieren. Zu diesem Enzym lagen bisher keine hochaufgelösten strukturellen Daten vor. Es waren lediglich die Primärsequenz (Holloway & Subden, 1993), Informationen über die Sekundärstrukturanteile (Krieger, 2000) sowie eine grobe Oberflächenstruktur basierend auf *SAXS*-Messungen (König *et al.*, 2000^a; Kutter, 2004) bekannt. Die Resultate dieser Untersuchungen belegen die strukturelle Ähnlichkeit der *Sc*PDC und *KI*PDC und ließen eine weitgehend identische Dimerstruktur der beiden Enzyme vermuten.

Die Bedingungen für die Kristallisation wurden zum einem so gewählt, dass der pH möglichst dicht am Optimum der katalytischen Aktivität des Enzyms (5,9-6,1) lag. Andererseits sollte die *KI*PDC aber auch für einen möglichst langen Zeitraum stabil sein. Aus *SAXS*-Messungen geht hervor, dass bei pH-Werten von \leq 6 bereits nach kurzer Zeit (20 min Inkubation) Aggregate auftreten, die sich in großen Beträgen für I(0) bemerkbar machen (Abb. 13). Daher wurde für die Kristallisation ein pH-Wert von 6,45 gewählt. Dieser war somit deutlich höher als der, den Dyda *et al.* (1993), Arjunan *et al.* (1996), Furey *et al.* (1996; 2,7 Å Datensatz) und Lu *et al.* (1997, 2000) für die Brauhefe-PDC in Ab- und Anwesenheit verschiedener Effektoren einsetzten (pH 5,4-5,7). Ansonsten waren die Kristallisationsbedingungen vergleichbar zu denen der nativen und Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC. So wurde ein niedrig-konzentrierter Citrat-oder MES-Puffer unter Zusatz geringer Mengen der Kofaktoren und DTT verwendet, Polyethylenglykol der Kettenlängen 2000 und 8000 in gleichen Verhältnissen als Präzipitanz genutzt und die Kristallisation bei 8 °C durchgeführt.



Abb. 13: SAXS-Streukurven der *KI*PDC bei verschieden pH Werten. Gemessen in 50 mM Citrat (pH 5,4) bzw. 50 mM MES (pH 6,0-6,6) mit 150 mM Ammoniumsulfat und Zusätzen von 1 mM DTT sowie 10 mM der Kofaktoren. Die gepunkteten Linien deuten die Zunahme von I(0) bei kleiner werdenden pH-Wert an.

Insgesamt wurden zwei Datensätze der nativen *KI*PDC aufgenommen. Die Statistiken der Datenaufnahme und -auswertung befinden sich im Anhang I. Ein Datensatz hat eine Auflösung von 3 Å, der andere wurde bis 2,26 Å ausgewertet (Kutter *et al.*, 2006). Allerdings waren bei dem hochaufgelösten Datensatz noch weitere Reflexe bis 1,95 Å vorhanden. Aufgrund mehrerer dünner Eisringe wurde aber auf diesen Bereich zunächst verzichtet. Erst später, bei einer zweiten Auswertung, nunmehr mit dem automatischen Datenreduktionsprogramm xia2 (Bahar *et al.*, 2006) erfolgte die Einbeziehung dieser Daten um zuverlässigere Aussagen über flexible Bereiche der Enzymstruktur, insbesondere zu den von Lu *et al.* (2000) postulierten Aktivierungsloops 104-113 und 290-304, treffen zu können. Daher unterscheiden sich die beiden Modelle der *KI*PDC auch nur geringfügig, so dass die mittlere quadratische Abweichung aller Atome bei lediglich 0,4 Å liegt. Ähnliches gilt für den 3 Å Datensatz. Bei diesem sind aufgrund der deutlich niedrigeren Auflösung und der geringen Vollständigkeit des Datensatzes die flexibleren Bereiche des Enzyms noch schlechter definiert. Dennoch ist die globale Struktur mit den anderen beiden Modellen identisch. In jedem Fall liegt die *KI*PDC in der asymmetrischen Einheit als Tetramer vor. Aufgrund der hohen Übereinstimmung wird an dieser Stelle nur über den hochaufgelösten und bis 1,95 Å ausgewerteten Datensatz berichtet. Abb. 14 zeigt die globale Struktur eines Monomers, eines Dimers und des Tetramers. Erwartungsgemäß ähnelt der Aufbau bis zur Ebene des Dimers dem der meisten anderen TPP-abhängigen Enzyme (siehe auch 1.2). Jedes Monomer weist den typischen Aufbau aus drei Domänen (PYR oder α , Aminosäuren 2-188; R oder β , 189-353 und PP oder γ , 354-563) mit α/β -Topologie, bestehend aus zentralen β -Faltblättern und flankiert von α -Helices, auf. Zwei benachbarte Monomere sind fest, aber nicht kovalent, über ihre αund y-Domänen miteinander verbunden. Im dazwischen liegenden Spalt befinden sich die beiden TPP-Moleküle, wobei jeweils der Pyrophosphatanker mit der y-Domäne der einen und der Aminopyrimidinring mit der α-Domäne der anderen Untereinheit wechselwirkt.

Da die Untereinheiten der Tetramere nicht äquivalent sind, werden diese im Folgenden mit A, B, C und D entsprechend zu Abb. 15B bezeichnet.

Wie bei der *Sc*PDC fehlt das Startmethionin in allen vier Untereinheiten. Zudem sind die Bereiche 104-115, 288-304 und 554-563 flexibel und weisen erhöhte B-Faktoren auf (Abb. 15). Gleiches gilt für den Interdomänenloop 345-360 sowie, wenn auch in abgeschwächter Form, für den anderen Interdomänenloop 179-194. Besonders hoch ist die Flexibilität im Loop 104-115 aller Untereinheiten, im Loop 288-304 der Monomere A und C und den C-terminalen Helices der Ketten B und C. Daher war es notwendig die Aminosäuren 105-106 vom Monomer A, 109-111 und 562-563 vom Monomer B, 104-107 und 561-563 vom Monomer C und 105-106 vom Monomer D in der deponierten Koordinaten-Datei (PDB-Code: 2vk4) zu entfernen, da diese zu große geometrischen Fehler aufwiesen. In den hier gezeigten Abbildungen sind entsprechende Aminosäuren, bis auf die C-Termini der Monomere B und C, aber dennoch enthalten, da zumindest für das Peptid-Rückgrat bei σ = 1,0 Elektronendichte vorlag (siehe auch Abb. 17).



Abb. 14: Kristallstrukturmodell der nativen KIPDC bei 1,95 Å Auflösung. Abgebildet ist ein Monomer (A), ein Dimer (B) und das Tetramer (C) als Linienmodell mit individuell gefärbten Domänen (α, rot; β, blau; γ, gelb). Die Kofaktoren sind als Kugeln mit individuell gefärbten Atomen dargestellt.



Abb. 15: Schematische Darstellung der B-Faktoren eines Monomers (A) und des Tetramers (B) der nativen *KI*PDC. Ein größerer Liniendurchmesser und eine Farbänderung von blau über gelb nach rot stehen für zunehmende B-Faktoren von 5 Å² auf 65 Å². Bereiche mit erhöhten B-Faktoren sind bei A mit Zahlen (1, Loop 104-115; 2, Loop 288-304; 3, β→γ Interdomänenloop; 4, C-terminale Helix) und mit rechteckigen Umrahmungen gezeigt. In B ist der Kofaktor TPP mit rechteckiger Umrahmung eingezeichnet. Flexible Regionen sind in der Untereinheit A mit den Zahlen 1-4 entsprechend zur Abb. 15A nummeriert. 1* bezeichnet den flexiblen Loop 104-115 des Monomers B, der zum oberen aktiven Zentrum (von A) zeigt. Die Bezeichnungen A-D stehen für die einzelnen Monomere, die im Text verwendet werden. Der Kofaktor TPP ist als Stabmodell eingezeichnet.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Monomeren der nativen *KI*PDC sind gering (Abb. 16). Bei der Superposition der Monomere weisen von der α - und γ -Domäne lediglich der C-terminale Bereich und der Loop 104-115 nennenswerte Unterschiede auf (Ø-*r.m.s.d.* _{Cα-Atome C-terminaler Bereich}: 2,7 Å; Ø-*r.m.s.d.* _{Cα-Atome Loop 104-115}: 2,6 Å). Daneben zeigt die gesamte β-Domäne Abweichungen in den Positionen der Atome (Ø-*r.m.s.d.* _{Cα-Atome ohne Loop 288-304}: 0,9 Å, zum Vergleich Ø-*r.m.s.d.* _{Cα-Atome der α-Domäne ohne Loop 104-115 bzw. der γ-Domäne ohne den C-terminalen Bereich}: 0,3 Å)¹. Dennoch lassen sich die β-Domänen der einzelnen Monomere der tetrameren *KI*PDC durch eine geeignete Superposition dieser Domäne gut zur Überstimmung bringen. Der Ø-*r.m.s.d.*-Wert ist dabei mit knapp 0,4 Å nur geringfügig größer als bei der Superposition der α- oder γ-Domäne (je 0,3 Å)².

Die unterschiedlichen Positionen der β -Domänen im Kristall sind vermutlich dadurch bedingt, dass es nur sehr wenige und schwache Wechselwirkungen dieser Domäne mit benachbarten Domänen gibt. Daher fungieren die Interdomänenloops zur α - und γ -Domäne als eine Art Scharnier um das sich die β -Domäne im begrenzten Rahmen drehen kann (maximaler Drehwinkel = 17°). Die größte Auslenkung tritt an den Molekülbereichen auf, die von den Scharnieren am weitesten entfernt sind. Hierbei handelt es sich um den Loop 288-304, der aber die erwähnte interne Flexibilität aufweist, was den hier beschriebenen Effekt zum Teil überlagert. Daher wird die Rotation der β -Domäne an den oberflächenlokalisierten Helices und Loops am deutlichsten (Abb. 16).

Im Allgemeinen sollten sich die unterschiedlichen Positionen dieser Domäne über den gesamten Kristall herausmitteln. Dies geschieht offensichtlich bei den β -Domänen desselben Monomers, da dort jeweils nur eine Konformation zu finden ist, aber nicht bei den Untereinheiten die nichtkristallographisch symmetrieverwandt sind. Die unterschiedlichen Positionen lassen sich daher nur aufgrund von Wechselwirkungen mit symmetrieverwandten benachbarten PDC-Molekülen erklären, die dafür sorgen, dass die β -Domänen eines Monomers über den gesamten Kristall in eine bestimmte Richtung gedrückt werden. Dies wird speziell an einem Monomer deutlich, das besonders große Abweichungen aufweist (Abb. 16). Verglichen mit den anderen drei Untereinheiten treten hier auch die größten Unterschiede in Anzahl und Stärke der Wechselwirkungsmöglichkeiten mit benachbarten PDC-Tetrameren auf.

Der Vergleich der Monomere der *KI*PDC mit denen der nativen bzw. Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC zeigt in weiten Bereichen nur geringfügige Unterschiede. Auch hier sind bei der Superposition der Monomere vor allem bei den β -Domänen Abweichungen festzustellen (\emptyset -*r.m.s.d.* _{Cα-Atome der β-Domäne}: 2,0 Å bezüglich der nativen

¹ Siehe auch Abb. 43A im Anhang III, S. 124.

² Für die Superposition wurden die flexiblen Loops 104-115 und 288-304 sowie die ebenfalls flexible C-terminale Helix außen vorgelassen. Siehe auch Abb. 43A und 43B im Anhang III, S. 124.



Abb. 16: Superposition der vier Monomere der nativen *KI*PDC. Die Monomere sind als Cartoonmodell mit individuell gefärbten Domänen (α, rot; β, blau; γ, gelb) gezeichnet und der Kofaktor TPP als Stabmodell mit individuell gefärbten Atomen. Die flexiblen Bereiche C-Terminus, Loop 104-115 und β-Domäne einschließlich des Loops 288-304 sind grau unterlegt.

und 1,4 Å bezüglich der Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC; zum Vergleich Ø-*r.m.s.d.* _{Cα-Atome der α- und γ-Domäne}: 0,7 Å bezüglich der nativen und 0,4 Å bezüglich der Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC)¹. Dabei besitzen auch die beiden Monomere der nativen *Sc*PDC intern eine große Flexibilität der β-Domäne (Ø-*r.m.s.d.* _{Cα-Atome der β-Domäne}: 1,7 Å; zum Vergleich Ø-*r.m.s.d.* _{Cα-Atome der α- und γ-Domäne}: 0,5 Å)². In jedem Fall sind die größeren *r.m.s.d.*-Werte der β-Domäne auf unterschiedliche Rotationswinkel dieser Domäne zwischen den Interdomänenloops zurückzuführen. Bei der Superposition der β-Domäne (0,6 Å) wie bei der Superposition der α- oder γ-Domänen (0,5 Å; Superposition ohne Loop 104-115). Als Ursache sind wiederum die Summe und Stärke der Kristallkontakte von symmetrieverwandten Molekülen und den β-Domänen anzunehmen.

Im Bereich des aktiven Zentrums gibt es abgesehen vom Loop 104-115 nur wenige Unterschiede zwischen *KI*PDC und *Sc*PDC. Hierbei handelt es sich um geringfügige Verschiebungen der Seitenketten von Asp28, Thr475 und Glu477.

Von besonderem Interesse ist die Anordnung der beiden Loops 104-115 und 288-304. Diese waren in der Elektronendichtekarte der nativen *Sc*PDC nicht vorhanden

¹ Für den Vergleich native *KI*PDC und native *Sc*PDC siehe auch Abb. 43E und 43F im Anhang III, S. 124.

² Siehe auch Abb. 43C und 43D im Anhang III, S. 124.

(Arjunan *et al.*, 1996), wohl aber auf der geschlossenen Seite der Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC (Lu *et al.*, 2000)¹. Zudem waren die C-terminalen Bereiche 557-563 in beiden Brauhefe-PDC-Strukturen aufgrund ihrer hohen Beweglichkeit nicht definiert. Im Falle der *KI*PDC besitzen sowohl alle Loops als auch die C-terminalen Bereiche stark erhöhte B-Faktoren. Aufgrund der höheren Auflösung der *KI*PDC (1,95 Å) war es jedoch möglich, die wahrscheinlichsten Positionen dieser Strukturelemente im Kristall zu ermitteln.

Abb. 17 zeigt die Elektronendichtekarte der beiden Loops, des C-terminalen Bereiches und des Kofaktors TPP in den aktiven Zentren der *KI*PDC. Bemerkenswert ist, dass bei der nativen *KI*PDC zwei verschiedene Konformationen des Loops 104-115 und damit auch zwei verschiedene Typen aktiver Zentren gefunden werden. Dabei überwiegt in drei aktiven Zentren des Tetramers die in Abb. 17B gezeigte Konformation, während in der vierten Untereinheit die in Abb. 17A dargestellte vorkommt. Damit dominiert letztlich die Konformation aus Abb. 17B. Von besonderer Bedeutung sind die beiden Histidine 114 und 115, die notwendig für die Katalyse sind (Liu *et al.*, 2001). In Abb. 17A sind die Aminosäureseitenketten zum aktiven Zentrum hin orientiert, während sie in Abb. 17B in einen Winkel von 90° dazu ausgerichtet sind und einen zu großen Abstand zum TPP-C₂-Atom aufweisen, um mit potentiellen Substratmolekülen im aktiven Zentrum wechselwirken zu können.

Die Unterschiede hinsichtlich der Anordnung und Flexibilität der C-terminalen Bereiche (Abb. 17) hängen mit der offenen und geschlossenen Seite des Tetramers zusammen. Während auf der geschlossenen Seite die beiden Dimere miteinander wechselwirken und somit die Beweglichkeit des C-terminalen Bereiches stark einschränken, ist dies auf der offenen Seite nicht möglich. Hier steht dem C-terminalen Bereich mehr Raum zur Verfügung, was zu höheren B-Faktoren und zu einer veränderten Position der Atome führt.

Die Loopanordnung aus Abb. 17A stimmt bis auf die Bereiche 106-110 und 301-302 gut mit der geschlossenen Seite der Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC überein. Allerdings sind die B-Faktoren der *KI*PDC-Loops deutlich erhöht. Ob und inwieweit die beiden möglichen Loopanordnungen der *KI*PDC aus Abb. 17 dem aktivierten (Abb. 17A bzw. dem nicht-aktivierten Zustand (Abb. 17B) entsprechen, kann an dieser

¹ Bei Lu *et al.* (2000) bestehen diese beiden Loops aus den Aminosäuren 104-113 (106-113 bei Arjunan *et al.* (1996)) und 290-304 (292-301 bei Arjunan *et al.* (1996)). Bei der nativen *KI*PDC lagen aber auch die Aminosäuren 114, 115, 288 und 289 flexibel vor (B-Faktor > 60 Å²). Im Folgenden wird der Einfachheit halber von den Loops 104-115 und 288-304 gesprochen, unabhängig davon ob es sich um *KI*PDC oder *Sc*PDC handelt.



Abb. 17: Strukturmodell der nativen *KI*PDC inklusive der Elektronendichtekarte des Kofaktors TPP (blau; σ, 2,3), der Loops 104-115 (grün; σ, 1,1) und 288-304 (grau; σ, 1,1) sowie der C-terminalen Aminosäuren (gelb, 557-563 in A und 557-560 in B; beide mit σ, 1,1) in der Umgebung von verschiedenen aktiven Zentren der nativen *KI*PDC. Das Protein-Rückgrat ist als Linie dargestellt. TPP, die beiden Loops und der C-Terminus sind als Stabmodell gezeigt. Die Farben der Atome entsprechen ihren B-Faktoren (zunehmend von blau über gelb bis rot).

Stelle noch nicht geklärt werden. Allerdings erschien es wahrscheinlich, dass zumindest der Loop 104-115 mit der Substrataktivierung in Zusammenhang steht, wobei vor allem die korrekte Ausrichtung der Histidine 114 und 115 notwendig ist, damit die Katalyse erfolgen kann (Liu et al., 2001). Die Ursache für das Vorhandensein beider Konformationen bei der nativen KIPDC mit, je nach Untereinheit, drastischen Unterschieden in ihren Anteilen, sollte wiederum an Kristallkontakten mit symmetrieverwandten benachbarten Molekülen liegen. Aus stopped-flow-Experimenten geht hervor, dass die Aktivierungsenergie und der Energieunterschied zwischen nicht-aktiviert und aktiviert nur gering sind ($\Delta G_0 = R \cdot T \cdot \ln K = +9 \text{ kJ/mol}$ mit K \approx 0,03 aus dem Verhältnis von Anfangs- und steady-state-Geschwindigkeit bei Substratsättigung; E_{A (Arrhenius-Plot)} = 42 kJ/mol mit den Daten zur Temperaturabhängigkeit von k_{iso} (siehe Anhang V, S. 129)). Somit kann eine Neuorientierung wie in Abb. 17A gezeigt vermutlich durch geringfügige Verschiebungen an der Moleküloberfläche ausgelöst werden. Dies wird vor allen daran deutlich, dass das Monomer mit den eventuell aktivierten Looppositionen (Abb. 17A) dasjenige ist, welches in Abb. 16 die größten Abweichungen der β-Domäne aufwies und dessen Anzahl an Kontaktmöglichkeiten mit benachbarten PDC-Molekülen im Kristall sich deutlich von den anderen drei Untereinheiten unterscheidet.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist, dass die tetramere *KI*PDC (Abb. 14C) genau wie die Pyruvamid-aktivierte *Sc*PDC (Abb. 4B unten), aber entgegen der nativen *Sc*PDC

(Abb. 4B oben) halbseitig geschlossen vorliegt. Daher stellt sich die Frage, was den veränderten Tetrameraufbau der KIPDC verursacht. Hierbei ist ein Blick auf die Aminosäuresequenzen der beiden Spezies sinnvoll, die eine Identität von 86 % aufweisen. Die meisten der insgesamt 77 abweichenden Aminosäuren sind entweder an der Oberfläche der Dimere lokalisiert und/oder befinden sich in den relativ flexiblen Interdomänenloops. In der Umgebung des aktiven Zentrums treten keine Austausche auf, jedoch sind zwei Substitutionen in den flexiblen Loops zu verzeichnen, nämlich Ile104Val und Ala106Ser (erste Aminosäure ScPDC, zweite Aminosäure K/PDC). Allerdings ermittelten Kellermann et al. (1986) auch für die ScPDC an Position 106 ein Serin. Für die in Kapitel 3.6 vorgestellten rekombinanten ScPDC-Varianten E477Q und D28A entspricht dies auch den kristallographischen Daten während Lu et al. (2000) für die aus dem Wildtyp präparierte ScPDC Alanin in Position 106 fanden. Drei der Substitutionen sind an Wechselwirkungen in der offenen bzw. halbseitig geschlossenen Form beteiligt. Hierbei handelt es sich um Ala143Asn, Ser196Ala und Asn318Ser (erste Aminosäure ScPDC, zweite Aminosäure KIPDC). Daher erschien es zunächst denkbar, dass diese Austausche einen veränderten Tetrameraufbau hervorrufen. Zumindest ist für die KIPDC aus kristallographischer Sicht auszuschließen, dass die Aktivierung dem von Lu et al. (2000) vorgeschlagenen Mechanismus folgt. Eine Drehung der Dimere zu halbseitig geschlossen war nicht mehr möglich, da diese Form bereits im Ausgangszustand vorlag.

3.5 Kinetische Charakterisierung der Substratanaloga Methylacetylphosphonat und Pyruvamid im Komplex mit den Pyruvatdecarboxylasen aus *Kluyveromyces lactis* und *Saccharomyces cerevisiae*

Seit langem ist bekannt, dass Pyruvamid (Abb. 18) die Brauhefe-PDC aktivieren kann (Hübner *et al.*, 1978). Dies trifft auch für die PDC aus *Kluyveromyces lactis* (Krieger *et al.*, 2002) zu. Es konnte in dieser Publikation allerdings auch gezeigt werden, dass die Aktivierung durch Pyruvamid nicht vollständig ist. Selbst bei der höchsten verwendeten Pyruvamidkonzentration von 200 mM lag der Aktivierungsgrad der *Kl*PDC nur bei rund 70 %. Daher soll hier, mit Methylacetylphosphonat (O'Brien *et al.*, 1980; Abb. 18), ein weiteres Analogon des Pyruvates und potentieller Aktivator der PDC vorgestellt werden.

MAP hat gegenüber Pyruvamid den Vorteil, dass es wie Pyruvat Träger einer negativen Ladung ist (Abb. 18). Somit sollten Ladungswechselwirkungen von beiden Liganden vergleichbar gut ausgeprägt werden können. Für das ungeladene Pyruvamid ist das nicht der Fall.

Problematisch bei der Verwendung von MAP könnte prinzipiell das größere Molekülvolumen verglichen mit Pyruvat oder Pyruvamid sein. Es ist jedoch bekannt, dass auch längerkettige α-Ketocarbonsäuren, die selbst größer als MAP sind, als Aktivator wirken und umgesetzt werden können (Lehmann *et al.*, 1973). Zum anderen ergibt sich aus den bis hierher vorliegenden Kristallstrukturen, dass sowohl das aktive als auch das von Jordan *et al.* (1998) bzw. von Lu *et al.* (2000) postulierte regulatorische Zentrum genügend Raum für die Bindungen von MAP bietet. Im Weiteren ist bekannt, dass bei der eng verwandten Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum* MAP eine kovalente Bindung mit dem Kofaktor TPP ausbildet (Wille *et al.*, 2006).



Abb. 18: Vergleich der chemischen Strukturen von Pyruvat, dem Substrat der PDC, mit den beiden Analoga Pyruvamid und Methylacetylphosphonat. Die negativ geladene Carboxylat- bzw. Methylphosphonatgruppe ist blau dargestellt, die ungeladene Säureamidgruppe ist grün unterlegt.

Die meisten der in diesen Abschnitt beschriebenen Messungen erfolgten bei relativ niedrigen Temperaturen (in der Regel 10 °C). Dies war notwendig, um die Substrataktivierungsphasen der PDC an einem konventionellen UV/VIS-Photometer messen zu können.

Mittels Vorversuchen (siehe auch Abb. 10B und Anhang S. 129) wurden Umrechnungsfaktoren für die Geschwindigkeitskonstanten bestimmt, um Versuche bei verschiedenen Temperaturen vergleichen zu können.

Zur besseren Übersichtlichkeit sind in diesem Abschnitt nur Abbildungen für die *KI*PDC gezeigt. Sofern möglich, wurden aber alle Experimente auch für die *Sc*PDC durchgeführt. Die Ergebnisse sind jedoch nahezu identisch und werden in Tab. 6 zusammengefasst. Falls Unterschiede auftraten, werden diese im Text diskutiert.

Zunächst sollte geklärt werden, ob es sich bei Methylacetylphosphonat tatsächlich um einen Aktivator von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen handelt. Abb. 19A zeigt die v/S-Diagramme der *KI*PDC in Gegenwart unterschiedlicher MAP-Konzentrationen. Deutlich zu erkennen ist die mit wachsender Analogonkonzentration abnehmende Sigmoidität. Bei niedrigen Pyruvatkonzentrationen ist dieser Effekt mit erhöhten Aktivitäten verbunden, was die aktivierende Wirkung des Substratanalogons belegt. In der Auftragung nach Lineweaver-Burk (Lineweaver & Burk, 1934; Daten nicht gezeigt) ergibt sich erwartungsgemäß ein linearer Verlauf bei hohen MAP-Konzentrationen (75 mM), was den hyperbolen Verlauf im v/S-Diagramm bestätigt. Die Aktivierung durch MAP wird auch an den Progresskurven deutlich (Abb. 19B). Je größer die Analogonkonzentration im Inkubationsansatz ist, desto höher ist die Anfangsgeschwindigkeit und umso kleiner ist die Amplitude der *lag*-Phase. Die Zunahme der Aktivität im Messansatz (Abb. 19B) ist sowohl durch die MAP-, als auch durch die substratgetriebene Aktivierung verursacht, da die beiden aktivierenden Substanzen gleichzeitig vorliegen.



Abb. 19: Methylacetylphosphonataktivierung der *KI*PDC. Alle Messungen mit 10 µg *KI*PDC/ml in 50 mM MES pH 6,0 mit 150 mM Ammoniumsulfat, 2 mM TPP und 2 mM Magnesiumsulfat bei 10 °C im gekoppelten optischen Test nach Holzer *et al.* (1956). Vor dem Experiment wurde die *KI*PDC-Stammlösung (5 mg/ml) mit der für die Messung verwendeten MAP-Konzentration für mindestens 30 min bei 25 °C inkubiert.

A: v/S-Diagramme. An passung nach $v = \frac{V_{max} \cdot S^2}{a + b \cdot S + S^2}$ (Krieger *et al.*, 2002).

B: Progresskurven (durchgezogenen Linie) bei 15 mM Pyruvat und die dazugehörigen Anstiege (gestrichelte Linie). MAP-Konzentrationen wie bei A.

Abb. 19A zeigt zudem, dass die Halbsättigungskonzentration der v/S-Diagramme mit zunehmender MAP-Konzentration steigt. Da gleichzeitig die Maximalgeschwindigkeit unverändert bleibt, handelt es sich bei MAP nicht nur um einen allosterischen Aktivator sondern auch um einen schwachen kompetitiven Inhibitor. Damit unterscheidet

sich MAP von Pyruvamid, bei welchem es sich um einen gemischten kompetitiven und nichtkompetitiven Inhibitor handelt (Krieger et al., 2002). Der kompetitive Effekt ist dabei für MAP etwas stärker als für Pyruvamid ausgeprägt. Die Halbsättigungskonzentration für sowohl die KIPDC als auch die ScPDC steigt von ca. 1,7 mM auf 3.3 mM (Abb. 19A und Tab. 6) bei einer Erhöhung der Analogonkonzentration von 0 auf 75 mM. Für die KIPDC und Pyruvamid ermittelten Krieger et al. (2002) hingegen eine Zunahme der Halbsättigung von 1,85 mM auf 2,3 mM bei Erhöhung der Pyruvamidkonzentration von 0 auf 100 mM. Für die ScPDC wurde sogar eine leichte Abnahme beim Vergleich der v/S-Diagramme in Abwesenheit und in Gegenwart von 80 mM Pyruvamid gefunden (Hübner et el., 1978). Da jedoch in der Kristallstruktur der Pyruvamid-aktivierten Brauhefe-PDC zumindest zwei der vier aktiven Zentren mit dem Analogon besetzt waren (Lu et al., 2000), ist auch hier von einer kompetitiven Wechselwirkung auszugehen. Die kompetitive Wirkung von Pyruvamid zeigt sich auch daran, dass der K_M-Wert der PDC in Effektorabwesenheit, bestimmt aus stopped-flow-Messungen nach Glg. 3 (S. 45), bei ca. 0,56 mM liegt (Tab. 5). Die durch Liganden vollständig aktivierte PDC sollte diesen Wert als Halbsättigungskonzentration aufweisen. Es wurden jedoch sowohl für die KIPDC (Krieger et al., 2002) als auch für die ScPDC (Hübner et al., 1978) deutlich größere Werte gefunden.

Die Prozesse, die nach Zugabe eines Substratanalogons zur PDC ablaufen, lassen sich durch Schema 2 beschreiben. Ähnlich wie Pyruvat bindet das Analogon an den regulatorischen Bindungsort, wodurch eine Isomerisierung zur aktivierten Enzymform ausgelöst wird. Daraufhin binden Analoga im aktiven Zentrum, werden im Gegensatz zum Substrat jedoch nicht umgesetzt.

Im Weiteren sollte untersucht werden, mit welcher Affinität die Substratanaloga an das regulatorische Zentrum binden. Dies geschah durch Bestimmung des Anteils der aktivierten Enzymspezies (Schema 2, SE_a und SE_aS) an der Gesamtenzymmenge. Der Anteil der aktivierten Spezies lässt sich nach Präinkubation des Enzyms mit definierten Analogonkonzentrationen anhand der Anfangsanstiege der Progresskurven bestimmen. Es ist bekannt, dass die PDC in Abwesenheit des Substrates fast inaktiv ist, dass heißt, die Anfangsgeschwindigkeit einer nicht mit Effektoren versetzten



Schema 2: Mechanismus der Substrataktivierung von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen durch Substratanaloga.

Hefe-PDC ist nahezu null (\approx 3 % der *steady-state*-Geschwindigkeit, Krieger *et al.*, 2002). Durch Zugabe eines Analogons zum Mess- und Inkubationsansatz kann dieser Wert höchstens bis zum Betrag der *steady-state*-Geschwindigkeit ansteigen. Daher lässt sich aus dem Verhältnis aus Anfangs- und *steady-state*-Geschwindigkeit der prozentualen Anteil der aktivierten Spezies berechnen. Die Halbsättigungskonzentration S_{0,5}^a, dass heißt, die Konzentration an Substrat bzw. Substratanalogon bei der der Anteil der aktivierten gleich dem Anteil der nicht-aktivierten Spezies ist, lässt sich durch die Gleichung (Spinka, unveröffentlicht)

$$S_{0,5}^{a} = \frac{(1 - K_{iso}) \cdot K_{1}}{2} + \sqrt{\frac{((1 - K_{iso}) \cdot K_{1})^{2}}{4}} + K_{a} \cdot K_{iso} \cdot K_{1}} \text{ für Analoga bzw.} \quad \text{Glg. 4a}$$
$$S_{0,5}^{a} = \frac{(1 - K_{iso}) \cdot K_{M}}{2} + \sqrt{\frac{((1 - K_{iso}) \cdot K_{M})^{2}}{4}} + K_{a} \cdot K_{iso} \cdot K_{M}} \text{ für Substrate} \quad \text{Glg. 4b}$$

 $S_{0,5}{}^{a}$, Halbsättigungskonzentration im Anteil-aktivierte-Spezies/S-Diagramm. Zur Definition von K_a, K_{iso}, K_M und K₁ siehe auch Schemata 1 und 2.

beschreiben.

Aus den *stopped-flow*-Daten von Tab. 5 ergibt sich für Pyruvat bei 25 °C ein $S_{0,5}^{a}$ -Wert von 2,4 mM für die *KI*PDC und 2,2 mM für die *Sc*PDC. Dieser weist im Bereich von 6-35 °C keine messbaren Unterschiede auf und ist somit direkt mit den Werten für die Substratanaloga vergleichbar, die bei 10 °C bestimmt wurden.

Für die *KI*PDC in Gegenwart von Pyruvamid ergibt sich aus den Messungen von Krieger *et al.* (2002) ein $S_{0,5}^{a}$ -Wert von 90 mM. Das Resultat basiert jedoch nur auf vier Progresskurven. Das Experiment wurde daher wiederholt (Abb. 20). Der $S_{0,5}^{a}$ -Wert der *KI*PDC betrug dabei 71 mM (Abb. 20). Für die rekombinante *Sc*PDC ergab sich ein Wert von 65 mM (Tab. 6). Für Pyruvamid ist somit der $S_{0,5}^{a}$ -Wert um etwa Faktor 30 größer als für das Substrat Pyruvat.

Zudem konnte der Befund von Krieger *et al.* (2002) bestätigt werden, dass die Hefe-PDC nicht vollständig durch Pyruvamid aktivierbar ist. Nach Abb. 20 beträgt der maximale Aktivierungsgrad ca. 70 %.

Für das Analogon MAP erfolgte die Bestimmung des $S_{0,5}^{a}$ -Wertes im Rahmen eines Verdünnungsexperiments. Zunächst wurde die PDC mit MAP vorinkubiert und zum Reaktionsstart verdünnt. Abb. 20 zeigt die Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der MAP-Konzentration für die *KI*PDC. Im Gegensatz zu Pyruvamid ist die Aktivierung mit diesem Analogon vollständig (100 % Aktivierungsgrad). Der MAP- $S_{0,5}^{a}$ -Wert beträgt für die *KI*PDC 37 mM und für die rekombinante *Sc*PDC 32 mM. Gegenüber Pyruvat ist dies zwar eine Erhöhung um Faktor 15, die Konstante ist andererseits aber nur halb so groß wie die von Pyruvamid. Welcher oder welche Reaktionsschritte durch die Analoga verglichen mit dem Substrat Pyruvat beschleunigt oder verlangsamt werden, lässt sich an dieser Stelle noch nicht beantworten.

Die Messpunkte in Abb. 20 wurden mittels der Gleichung (Spinka, unveröffentlicht)

$$a_{s}\% = \frac{[Analogon] \cdot K_{1} + [Analogon]^{2}}{K_{a} \cdot K_{iso} \cdot K_{1} + (1 + K_{iso}) \cdot K_{1} \cdot [Analogon] + [Analogon]^{2}} \cdot 100\%$$
 Glg. 5

 a_s %, Anteil aktivierte Spezies in %; [Analogon], Analogonkonzentration. Zur Definition von K_a, K_{iso} und K₁ siehe auch Schema 2.

angepasst.

Die in Abb. 20 gezeigten Kurven dienen jedoch nur der besseren Visualisierung, da speziell die Konstante K₁ bei dieser Gleichung eine zu große Unsicherheit aufweist.



Abb. 20: Abhängigkeit des Anteils der aktivierten Spezies von der Methylacetylphosphonat- (schwarz) bzw. von der Pyruvamidkonzentration (rot) für die Pyruvatkatalyse der *KI*PDC. Inkubation: 1 mg *KI*PDC/ml mit der in der Abbildung angegeben Analogonkonzentration in Messpuffer für 40 min bei 25 °C inkubiert. Messung: 1:500 Verdünnung des *KI*PDC-Analogon-Komplexes und Messung der Progress-kurven in 50 mM MES pH 6,0 mit 150 mM Ammoniumsulfat, 2 mM TPP, 2 mM Magnesi-umsulfat und 3 mM Pyruvat bei 10 °C nach dem gekoppelten optischen Test (Holzer *et al.*, 1956). Im Falle der Pyruvamidkurve wurde auch das Analogon der auf der x-Achse angegebenen Konzentration dem Messansatz hinzugegeben. Aufgetragen wurden die auf 0 bis 100 % normierten Anfangsanstiege. Die durchgezogene Linie entspricht dem Fit nach Glg. 5.

Wie für Pyruvat (siehe Abb. 12A und 12C) lässt sich die Geschwindigkeitskonstante der Aktivierung (k_{obs}) auch für Analoga ermitteln. Unter der Annahme, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Aktivierung wie beim Pyruvat die Isomerisierung ist (Hübner *et al.*, 1978; Krieger *et al.*, 2002), kann die zeitabhängige Aktivierung über die Anfangsgeschwindigkeit und damit den Anteil der aktivierten Spezies verfolgt werden (Abb. 21A). Aus der nach einer Reaktion erster Ordnung gefitteten Kurve lässt sich der k_{obs} -Wert für eine bestimmte Analogonkonzentration berechnen. Abb. 21B zeigt die ermittelten k_{obs} -Werte in Abhängigkeit von der MAP-Konzentration. Die Ergebnisse der rekombinanten *Sc*PDC unterscheiden sich auch hier nicht wesentlich von denen der *KI*PDC, so dass auf diese nicht weiter eingegangen wird. Die k_{obs} -Werte ließen sich von 15 bis 3200 mM bestimmen. Allerdings war es notwendig die Inkubationstemperatur für die Messpunkte von 1000-3200 mM MAP von 25 °C auf 4°C zu verringern. Entgegen der Abhängigkeit für Pyruvat (Abb. 12C) ließ sich keine weitere Analyse nach der Gleichung

$$k_{obs} = \frac{k_{-iso} \cdot K_{1}}{[Analogon] + K_{1}} + \frac{k_{iso} \cdot [Analogon]}{[Analogon] + K_{a}}$$
Glg. 6

 k_{obs} , Geschwindigkeitskonstante der Aktivierung; [Analogon], Analogonkonzentration. Zur Definition von K_a, K_{iso} und K₁ siehe auch Schema 2.

durchführen, weil im messbaren Konzentrationsbereich keine Plateaubildung eintrat. Daher hätte eine solche Auswertung zu große Unsicherheiten beim Fit gegen die Konstanten k_{iso} , k_{-iso} , K_a und K_1 zur Folge. Zudem ist ebenfalls anzumerken, dass sich bei MAP, im Gegensatz zu Pyruvat (Krieger *et al.*, 2002; Kutter *et al.*, 2007; siehe auch Abb. 12C Insert), kein Minimum der k_{obs} -Werte bei kleinen Konzentrationen des Liganden ergibt. Der Vergleich der k_{obs} -Werte von MAP mit denen von Pyruvat (Abb. 21B) zeigt im gesamten durch Messungen abgedeckten Konzentrationsbereich kleinere Aktivierungskonstanten für das Analogon. Da für MAP keine Sättigung erkennbar ist, kann von einer weiteren Zunahme von k_{obs} ausgegangen werden. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit des Methylacetylphosphonates war es aber nicht möglich bei einer Analogonkonzentrationen von mehr als 3200 mM zu messen.

Die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante der Aktivierung von der MAP-Konzentration wird durch Glg. 6 beschrieben. Für sehr große MAP-Konzentrationen ergibt sich daher, dass der maximale k_{obs} -Wert der Konstante k_{iso} entspricht. Nach Abb. 21B kann dieser Wert für MAP nicht wesentlich kleiner als der vom Pyruvat sein. Dass er andererseits größer ist und damit die durch das Analogon getriebene Isomerisierung schneller als die durch Pyruvat getriebene erfolgt, ist aber ebenfalls unwahrscheinlich. Daher sollte der k_{iso} -Wert des Substrates mit dem des Analogons übereinstimmen.

Unter Vernachlässigung des ersten Terms in Glg. 6 entspricht K_a der Halbsättigungskonzentration in einem k_{obs}/[Analogon]-Diagramm. Die Extrapolation von dieser Konzentration aus Abb. 21B ergibt unter Berücksichtigung der eben postulierten Annahme (k_{iso (MAP)} \approx k_{iso (Pyruvat)} \approx 1,4 s⁻¹) für die MAP-Aktivierung einen K_a-Wert ca. 2600 mM, der damit \approx 20 mal so groß wie der von Pyruvat ist. Folglich bindet das Analogon entweder deutlich langsamer an das regulatorische Zentrum bzw. wird schneller von diesem abgespalten.

Die Aktivierung durch Pyruvamid hingegen ist deutlich schneller, so dass die Geschwindigkeitskonstante mit dem hier beschrieben Experiment lediglich abgeschätzt werden kann. Eine Konzentrationsabhängigkeit wie bei MAP war nicht messbar. Für



Abb. 21: Substrataktivierungskinetik der KIPDC.

A: Zeitabhängigkeit der Aktivierung exemplarisch gezeigt für die Inkubation der PDC mit 100 mM MAP. Aufgetragen ist die Zeit gegen den normierten Anfangsanstieg. Fit der experimentellen Daten entsprechend einer Reaktion erster Ordnung.

B: Abhängigkeit der k_{obs} -Werte von der MAP-Konzentration (schwarz) und Vergleich mit Pyruvat (rot; siehe auch Abb. 12C) sowie Pyruvamid bei 75 mM, 100 mM und 150 mM (blau; die Werte für Pyruvamid wurden mit ihren Fehlerbalken eingefügt). Durchgezogene Linie für Pyruvat, Fit nach Glg. 3 analog zu Abb. 12C; durchgezogene Linie für MAP, Verbindung zwischen den einzelnen Messpunkten zur besseren Visualisierung.

Inkubationsansatz: 6,7 mg *KI*PDC/ml mit dem Analogon der entsprechenden Konzentration aus B im Messpuffer bei 4-10 verschiedenen Zeiten bei 25 °C (15-500 mM MAP) bzw. 4 °C (1000-3200 mM MAP sowie 75 mM, 100 mM und 150 mM Pyruvamid) inkubiert.

Messung: 1:500 Verdünnung des *KI*PDC-Analogon-Komplexes und Messung in 50 mM MES pH 6,0 mit 150 mM Ammoniumsulfat, 2 mM TPP, 2 mM Magnesiumsulfat und 3 mM Pyruvat bei 10 °C (4 °C bei Pyruvamid) nach dem gekoppelten optischen Test (Holzer *et al.*, 1956). Im Falle der Pyruvamidmessung enthielt der Messansatz auch noch das Analogon mit derselben Konzentration wie bei der Inkubation. Für den Messansatz der Abhängigkeit des k_{obs} -Wertes von der Pyruvatkonzentration siehe Abb. 12C.

Die k_{obs} -Werte sind für die Temperatur von 25 °C aufgetragen. Für die Messungen bei 4 °C bzw. 10 °C wurde ein experimentell bestimmter Umrechnungsfaktor von 6,3 bzw. 3,7 genutzt.

75, 100 und 150 mM Pyruvamid ließen sich k_{obs} -Werte bestimmen (Abb. 21B). Bei anderen Konzentrationen war entweder der Aktivierungsgrad (siehe auch Abb. 20) zu gering um ein Anteil-aktivierte-Spezies/Zeit-Diagramm (siehe Abb. 21A) mit einem akzeptablen Signal-Rausch-Verhältnis zu messen oder die Aktivierungsgeschwindigkeit war selbst für eine Inkubations- und Messtemperatur von 4 °C zu schnell um diese auflösen zu können. Für die drei verwendeten Pyruvamidkonzentrationen ergaben sich auf 25 °C umgerechnete k_{obs} -Werte zwischen 0,2 und 0,8 s⁻¹ (Abb. 21B). Diese entsprechen dem Wert der Brauhefe-PDC (0,3 s⁻¹ für 80 mM Pyruvamid) aus den Daten von Hübner *et al.* (1978), die diesen an einem *multi-mixing-stopped-flow*-Photometer ermittelten. Auch wenn es wie erwähnt nicht möglich war eine komplette Konzentrationsabhängigkeit für die k_{obs} -Werte von Pyruvamid zu bestimmen, so ist dennoch eine bessere k_{obs} -Übereinstimmung zu Pyruvat als zu MAP ersichtlich. Während MAP bei 100 mM einen k_{obs} -Wert von ca. 0,02 s⁻¹ aufweist, liegt der von Pyruvat und Pyruvamid bei 0,6 s⁻¹ bzw. 0,2-0,7 s⁻¹ (Abb. 21, Tab. 6). Eine Abschätzung von K_a und k_{iso} wie bei MAP fällt hier wesentlich schwerer, da nur bei wenigen Analogonkonzentrationen gemessen werden konnte. Es kann nur vermutet werden, dass K_a und k_{iso} größenordnungsmäßig mit den entsprechenden Werten für Pyruvat übereinstimmen, da k_{obs}, außer im Bereich sehr kleiner Ligandenkonzentrationen, im Wesentlichen nur durch K_a und k_{iso} beeinflusst wird und die k_{obs}-Werte eine relativ gute Übereinstimmung zwischen Pyruvat und Pyruvamid aufweisen.

Das Substratanalogon Methylacetylphosphonat eignet sich, um den K_M-Wert für Pyruvat mit hoher Genauigkeit zu ermitteln. Im Allgemeinen wird diese Konstante aus den k_{obs} -Abhängigkeiten, die an einem *stopped-flow*-Photometer durchgeführt werden (siehe Abb. 12C, S. 46) nach Glg. 3 (S. 45) berechnet. Durch die Kopplung mit den anderen Konstanten ist die K_M-Wert-Bestimmung entsprechend ungenau.

Eine Alternative zur Bestimmung des K_M -Wertes bieten Messungen mit einem durch MAP voraktivierten Enzym. Der Enzym-Analogon-Komplex wird dann wiederum stark im Messansatz verdünnt. Für dieses Substratanalogon ist k_{-iso} sehr klein (siehe S. 67-68), so dass die Anfangsaktivitäten unmittelbar nach dem Verdünnungsschritt unabhängig von der Substratregulation sind. Messungen bei variierender Pyruvat-konzentration resultieren daher in hyperbolen v/S-Charakteristiken, deren Halbsättigungskonzentration dem K_M-Wert entspricht.

Für die *KI*PDC zeigt Abb. 22 die Ergebnisse eines solchen Experimentes mit zunehmender MAP-Konzentration im Inkubationsansatz. Bei geringer Analogonkonzentration liegen noch die für die PDC typischen sigmoiden v/S-Diagramme vor. Mit zunehmender MAP-Konzentration nimmt dann einerseits die Sigmoidität ab und zum anderen sinkt die Halbsättigungskonzentration. Oberhalb einer Analogonkonzentration von 75 mM sind die Kurven hyperbol. Die Halbsättigungskonzentration und damit der K_M-Wert für den Pyruvatumsatz beträgt dann 0,15 mM für die *KI*PDC bzw. 0,19 mM für die rekombinante *Sc*PDC und ist somit wesentlich kleiner als der aus den *stopped-flow*-Messungen (Tab. 5) bestimmte Wert. Andererseits liegt er aber dicht an der durch Krieger *et al.* (2002) für die *KI*PDC ermittelten Konstante (0,23 mM). Der Vergleich mit anderen PDC Spezies zeigt ebenfalls gute Übereinstimmungen. So beträgt der K_M-Wert der *Zm*PDC 0,4 mM (Bringer-Meyer *et al.*, 1986) und der der *Nc*PDC je nach Puffer 0,1-0,24 mM (siehe Kapitel 3.1 und Abb. 7). Für Pyruvamid war das hier beschriebene Experiment nicht durchführbar, da der k_{-iso} -Schritt zu schnell ist (S. 68-69) und so die Anfangsaktivitäten zu stark verfälscht werden.



Abb. 22: Bestimmung des Pyruvat-K_M-Wertes der MAP-aktivierten *KI*PDC durch ein Verdünnungsexperiment. Gestrichelte Linie, v/S-Diagramm ohne MAP; durchgezogene Linien, v/S-Diagramme mit MAP der angegebenen Konzentration im Inkubationsansatz und Verdünnung um den

Faktor 1000 im Messansatz. Alle Kurven wurden nach $v = \frac{V_{max} \cdot S^2}{a + b \cdot S + S^2}$ (Krieger *et al.*,

2002) gefittet. Farben: Ohne MAP, schwarz; 10 mM MAP, rot; 20 mM MAP, blau; 40 mM MAP, dunkelgrau; 75 mM MAP, dunkelgelb; 175 mM MAP, magenta und 500 mM MAP, dunkelblau.

Inkubationsansatz: 2 mg KIPDC/ml mit MAP im Messpuffer für mindestens 40 min bei 25 °C inkubiert und dann auf Eis bis zur Verwendung gelagert.

Messung: 1:1000 Verdünnung des *KI*PDC-MAP-Komplexes und Messung in 50 mM MES pH 6,0 mit 150 mM Ammoniumsulfat, 2 mM TPP, 2 mM Magnesiumsulfat und Pyruvat der angegebenen Konzentration bei 10 °C nach dem gekoppelten optischen Test (Holzer *et al.*, 1956). Für die Bedingungen des v/S-Diagramms ohne MAP siehe Abb. 12.

Unter der Annahme, dass es sich bei den Substratanaloga MAP und Pyruvamid nicht nur um Aktivatoren sondern auch um klassische Inhibitoren handelt, lässt sich mit dem eben bestimmten K_M-Wert für Pyruvat und den Kurven bei denen sich das Analogon im Messansatz befand (Kurve mit 75 mM MAP aus Abb. 19A, Daten von Hübner *et al.* (1978) bzw. Kurve mit 300 mM Pyruvamid von Krieger *et al.* (2002)) die Bindungskonstante der Analoga für das aktive Zentrum bestimmen. Bei einem kompeti-

tiven Inhibitor erhöht sich der K_M-Wert um den Faktor $\left(1 + \frac{I}{K_1}\right)$ mit K_I = K₁ (Analogon)

nach Schema 2. Für MAP ergibt sich daher eine Bindungskonstante von 3,6 mM für die *KI*PDC und 4,7 mM für die rekombinante *Sc*PDC. Im Falle von Pyruvamid ergibt sich aus dem v/S-Diagramm von Krieger *et al.* (2002) ein Wert von 14 mM für die

*KI*PDC und mit den Daten von Hübner *et al.* $(1978)^1$ ein Wert von 9 mM für die *Sc*PDC. Die Bindungskonstante von Pyruvat ist nicht direkt messbar, kann aber zumindest abgeschätzt werden. Durch Umstellen der Gleichung für den K_M-Wert

$$K_{M} = \frac{(k_{-1} + k_{2}) \cdot k_{3}}{(k_{2} + k_{3}) \cdot k_{1}}$$
Glg. 7

 K_M , Michaelis-Menten-Konstante. Zur Definition von k_1 , k_{-1} , k_2 und k_3 siehe Schema 1.

ergibt sich $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{(k_2 + k_3) \cdot K_M}{k_3}$. Mit $K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1}$ folgt, dass $K_1 \le \frac{(k_2 + k_3) \cdot K_M}{k_3}$ sein muss. Mit dem hier bestimmten K_M -Wert sowie k_2 und k_3 aus NMR-Intermediatsmessungen für die *Sc*PDC (Tittmann *et al.*, 2003; je 105 s⁻¹) folgt $K_1 \le 0.38$ mM. Daher ist die Affinität von MAP gegenüber dem aktiven Zentrum mindestens 11mal geringer und die Affinität von Pyruvamid mindestens 33mal geringer als die von Pyruvat.

Abschließend soll die Rückreaktion der Aktivierung betrachtet werden, also die Reaktion von SE_a in Richtung der inaktiven Spezies SE_i und E_i (Schema 1 und 2; S. 44 und 59). Krieger et al. (2002) führten in Anlehnung an Ermer (1988) für Pyruvat ein Verdünnungsexperiment durch, bei dem die PDC zunächst mit 2 mM Pyruvat aktiviert wurde. Nach Erreichen der steady-state-Geschwindigkeit wurden Enzym und Substrat im Messansatz mit Puffer auf ein Drittel der Ausgangskonzentration verdünnt. Sowohl vor als auch unmittelbar nach dem Verdünnen arbeitet das Enzym mit ≈ 60 % der Maximalgeschwindigkeit (Abb. 22, schwarze Kurve für 2 mM Pyruvat), dass heißt, die spezifischen Aktivitäten vor und unmittelbar nach dem Verdünnen sind identisch. Aufgrund der geringen Pyruvatkonzentrationen wird der endgültige Aktivierungsgrad im steady-state nach dem Verdünnen geringer (≈ 10 % der Maximalgeschwindigkeit; siehe Abb. 22, schwarze Kurve für 0,67 mM Pyruvat). Mit zunehmender Reaktionszeit reagiert daher E_AS (Schema 1) zu E_iS und zu E_i bis das Gleichgewicht für die neue, geringere Pyruvatkonzentration erreicht ist. Die Inaktivierung setzt sich entsprechend zu Schema 3 aus zwei geschwindigkeitsbestimmenden Schritten zusammen. Zum einen handelt es sich um den k-iso-Schritt und zum anderen um die weiterhin stattfindende Substrataktivierung (kobs), die die Inaktivierungszeit verlängert.

¹ Messung in einem anderen Puffer (Malat) bei geringfügig höherem pH (6,2).



Schema 3: Mechanismus eines Verdünnungsexperimentes zur Bestimmung von k_{-iso} von aktivierenden Liganden (L). Die beiden geschwindigkeitsbestimmenden Prozesse sind rot hervorgehoben.

Zur Auswertung der zweiphasigen Extinktions/Zeit-Diagramme wurde die Gleichung (Spinka, unveröffentlicht)

$$f'(E) = m_{0_1} \cdot e^{-k_1 \cdot t} + m_{0_2} \cdot e^{-k_2 \cdot t} + m_E$$
 Glg. 8

f'(E), Anstieg des Extinktions/Zeit-Diagramms; m_{0_1} , m_{0_2} , Anfangsanstieg der ersten bzw. zweiten Phase; k_1 , k_2 , Geschwindigkeitskonstante der ersten bzw. zweiten Phase; m_E , Endanstieg; t, Zeit.

genutzt. Dabei entspricht eine der beiden Geschwindigkeitskonstanten dem k_{-iso} und die andere dem k_{obs} -Wert von Pyruvat für die verwendete Substratkonzentration.

Das Experiment von Krieger *et al.* (2002) wurde bei 10 °C wiederholt und auch für die *Sc*PDC durchgeführt (ohne Abb.). Für beide Spezies ergibt sich ein k_{obs} -Wert von 0,008 s⁻¹ (0,67 mM Pyruvat) und ein k_{-iso} -Wert (Pyruvat) von 0,020 s⁻¹. Temperaturkorrigiert (experimentell bestimmter Umrechnungsfaktor = 3,7) stimmen diese sehr gut mit den sich aus *stopped-flow*-Messungen ergebenden Beträgen für k_{obs} (k_{obs} Verdünnungsexperiment = 0,03 s⁻¹; $k_{obs \ stopped-flow$ -Experiment \approx 0,04 s⁻¹; siehe auch Abb. 12C¹) und k_{-iso} ($k_{-iso \ Verdünnungsexperiment = 0,07 \ s^{-1}$; $k_{-iso \ stopped-flow$ -Experiment \approx 0,09 s⁻¹; Tab. 5) überein. Eine Abhängigkeit des k_{-iso} -Schrittes von der Substratkonzentration war bei dem hier beschriebenen Versuch im gemessen Konzentrationsbereich (0,1-1,0 mM Pyruvatkonzentration nach der Verdünnung) nicht erkennbar. Dies wurde nach Schema 3 auch so erwartet, da k_{-iso} unabhängig von der Substratkonzentration ist.

Für MAP wurde ein vergleichbares Experiment durchgeführt (Abb. 23). Analog zu den Messungen zur Bestimmung des $S_{0,5}^{a}$ -Wertes wurde die PDC mit hohen Analo-

¹ Gilt für eine Pyruvatkonzentration von 0,67 mM.

gonkonzentrationen (> 100 mM) inkubiert, so dass eine möglichst vollständige Aktivierung erreicht wurde und nur noch SE_a und SE_aS vorlagen. Im Anschluss daran erfolgte wiederum eine drastische Verdünnung des Enzym-Analogon-Komplexes in den Messansatz, der kein Analogon und auch nur wenig Pyruvat (0,6 mM) enthielt. Die aus diesem Experiment resultierende Geschwindigkeitskonstante k_{iso} beträgt 0,018 s⁻¹ für die *KI*PDC und 0,016 s⁻¹ für die rekombinante Wildtyp-*Sc*PDC. Temperaturkorrigiert auf 25 °C ergibt sich ein Betrag von 0,06-0,07 s⁻¹. Erwartungsgemäß ist die Größe dieser Konstante wie beim Pyruvat unabhängig von der eingesetzten MAP-Konzentration. Der Vergleich von k_{-iso} für MAP und Pyruvat ergibt nahezu identische Werte. Folglich wird die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion der Inaktivierung, nicht durch das Analogon Methylacetylphosphonat beeinflusst.



Abb. 23: Progresskurve (durchgezogene Linie), differenzierte Progresskurve (gestrichelte Linie) und zweiphasiger Fit der differenzierten Progresskurve nach Glg. 8 (rote Linie) eines MAP-Ver-dünnungsexperimentes (200 mM auf 0,2 mM) zur Bestimmung der k_{iso}-Konstante. Inkubation: 2 mg *KI*PDC/ml mit 200 mM MAP im Messpuffer für 10 min bei 25 °C inkubiert. Messung: 1:1000 Verdünnung des *KI*PDC-MAP-Komplexes und Messung in 50 mM MES pH 6,0 mit 150 mM Ammoniumsulfat, 2 mM TPP, 2 mM Magnesiumsulfat und 0,6 mM Pyruvat bei 10 °C nach dem gekoppelten optischen Test (Holzer *et al.*, 1956).

Für Pyruvamid ist die Inaktivierung deutlich schneller, so dass k_{-iso} mit einer größeren Ungenauigkeit behaftet ist. Temperaturkorrigiert auf 25 °C ergibt sich für k_{-iso} ein Betrag von 0,6-1,0 s⁻¹. Diese Geschwindigkeitskonstante ist somit deutlich größer als bei Pyruvat und MAP. Die Zunahme um Faktor 15-25 verglichen mit Pyruvat geht der Zunahme des S_{0,5}^a-Wertes konform (siehe Abb. 20 und Tab. 6). Mit dem Ergebnissen zur k_{obs} -Wert-Bestimmung (siehe Abb. 21 und Tab. 6), die annehmen lassen, dass K_a und k_{iso} für Pyruvat und Pyruvamid von vergleichbarer Größenordnung sind, ist daher vor allen von einer Beschleunigung des k-iso-Schrittes, durch das Analogon auszugehen.

Tab. 6 fasst die Ergebnisse dieses Kapitels zusammen. Wie auch schon aus Abb. 12 und Tab. 5 hervorging, sind die kinetischen Unterschiede zwischen der KIPDC und ScPDC vernachlässigbar.

Bei Pyruvat, dem nativen Substrat der PDC, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Aktivierung (k_{iso}) relativ schnell (maximaler k_{obs} -Wert (25 °C) \approx 1,4 s⁻¹),

Tab. 6: Vergleich der Dissoziations- und Geschwindigkeitskonstanten der Substratanaloga Methylacetylphosphonat und Pyruvamid sowie des Substrates Pyruvat bei der Substrataktivierung von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen bei 25 °C

ele-i yluvaluecaibox		_ _	
Parameter	Aktivator	<i>KI</i> PDC	ScPDC, rekombi-
			nanter Wildtyp
v/S-Diagramme,	0 mM MAP ¹	1,7	1,7
Halbsättigungs-	20 mM MAP ¹	2,2	2,0
konzentration in	40 mM MAP ¹	2,8	2,6
mM; Abb. 19	75 mM MAP ¹	3,3	3,2
S _{0,5} ^a ; Abb. 20	Pyruvat	2,4	2,2
,	MAP ¹	37	32
	Pyruvamid ¹	71	65
maximaler Akti-	Pyruvat	100 ³	100 ³
vierungsgrad in	MAP ¹	100	100
%; Abb. 20	Pyruvamid ¹	75	69
k _{obs} bei 100 mM	Pyruvat	0,54	0,68
Substrat oder		0,015	0,022
Analogonkon-	Pyruvamid ^{2a}	0,2-0,7	0,2-0,7
zentration in s ⁻¹ ;	-		
Abb. 21			
maximaler k _{obs} -	Pyruvat	1,3	1,5
Wert (entspricht	MAP ^{2a}	> 0,8, vermutlich	> 0,8, vermutlich
k _{iso}) in s⁻¹; Abb. 21		wie Pyruvat	wie Pyruvat
	Pyruvamid	nicht messbar,	nicht messbar,
		vermutlich wie	vermutlich wie
		Pyruvat	Pyruvat
k _{obs} -Halbsättigung	Pyruvat	130	102
(entspricht K _a) in	MAP ^{2a}	> 2000, vermut-	> 2000, vermut-
mM; Abb. 21		lich ≈ 2600	lich ≈ 2600
	Pyruvamid	nicht messbar,	nicht messbar,
		vermutlich wie	vermutlich wie
		Pyruvat	Pyruvat
K _M in mM; Abb.	Pyruvat ¹	0,15	0,19
22			
K₁ in mM; S. 65-	Pyruvat	1	≤0,38
66	MAP	3,6	4,7
	Pyruvamid ¹	14 ^{4a}	9 ^{4b}
k₋ _{iso} in s ⁻¹ ; Abb. 23	Pyruvat ^{2b}	0,07	0,07
		0,07	0,06
	Pyruvamid ^{2a}	0,6-1,0	0,6-1,0

¹ Bei 10 °C gemessen.

³ Ist Referenz.

⁴ Mit den Daten von ^a Krieger et al. (2002) und ^b Hübner et al. (1978).

 ^{2a} Bei 4 °C gemessen. Angegeben ist der auf 25 °C temperaturkorrigierte Wert (Umrechnungsfaktor = 6,3).
 ^{2b} Bei 10 °C gemessen. Angegeben ist der auf 25 °C temperaturkorrigierte Wert (Umrechnungsfaktor = 3,7).

während die Inaktivierung, bestimmt durch k_{-iso}, vergleichsweise langsam ist (k_{-iso} (25 °C) = 0,07 s⁻¹). Zu ähnlichen Werten für k_{iso} und k_{-iso} kommt man auch für das Substratanalogon Methylacetylphosphonat. Demzufolge ist nicht davon auszugehen, dass dieses einen wesentlichen Einfluss auf die durch K_{iso} bestimmten Reaktionen hat. Andererseits sind jedoch die k_{obs}-Werte in weiten Konzentrationsbereichen um mehr als eine Größenordnung kleiner als beim Pyruvat. Erst bei den höchsten Ligandenkonzentrationen gleichen sie sich an. Hieraus ergibt sich ein um ca. Faktor 20 größerer K_a-Wert für das Analogon. Ein vergleichbarer Unterschied ist in der Halbsättigungskonzentration der aktivierten Spezies (S_{0,5}^a) festzustellen. Daher beeinflusst MAP die Aktivierung verglichen mit Pyruvat in erster Linie durch eine herabgesetzte Bindungsaffinität zum regulatorischen Zentrum. Eine mögliche Ursache hierfür könnte das größere Volumen des Aktivators (Abb. 18) sein.

Für Pyruvamid ist die Geschwindigkeitskonstante der Aktivierung (k_{obs}) von vergleichbarer Größe wie bei Pyruvat. Daher sollte es keine wesentliche Beeinflussung der durch k_{iso} und K_a bestimmten Schritte geben. Folglich lässt sich die Zunahme des $S_{0,5}^{a}$ -Wertes durch den größeren k_{-iso} -Wert erklären, dass heißt, Pyruvamid beschleunigt, verglichen mit Pyruvat, die Rückreaktion der Isomerisierung von der aktiven zur inaktiven Enzymform.

3.6 Kristallstrukturen von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen in Gegenwart aktivierender Liganden

Nachdem im letzten Abschnitt mit enzymkinetischen Methoden gezeigt werden konnte, dass MAP und Pyruvamid Aktivatoren von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen sind, werden in diesem Kapitel Untersuchungen zur Struktur des aktivierten Zustands vorgestellt. Im Zentrum steht hierbei vor allem der regulatorische Bindungsort.

In der Einleitung (Kapitel 1.3) wurden bereits die Kristallstrukturen der Pyruvamid-(Lu *et al.*, 1997, 2000) und der Ketomalonat-aktivierten (Furey *et al.*, 1996, 1998) *Sc*PDC vorgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit ließen sich weitere Strukturen von Hefepyruvatdecarboxylasen im aktivierten Zustand bestimmen. Es handelt sich dabei um die MAP-aktivierte *KI*PDC, die Pyruvamid-aktivierte *KI*PDC, die Pyruvamid-aktivierte *Sc*PDC_{E477Q}, die Pyruvat-aktivierte *Sc*PDC_{E477Q}, die Pyruvat-aktivierte *Sc*PDC_{D28A} sowie zwei Datensätze der mit Acetaldehyd *gesoakten* Pyruvamid-aktivierten ScPDC_{E477Q}.

Die Aminosäureaustausche an Position 28 und 477 liegen im aktiven Zentrum ohne die Substratregulation nennenswert zu beeinflussen (Liu *et al.*, 2001). Die beiden Varianten besitzen eine Restaktivität von < 0,3 % und sind demzufolge gut für die Kokristallisation mit Pyruvat geeignet.

Ein Ziel war es, strukturelle Beeinflussungen durch Puffer, pH-Werte oder Gefrierschutzmittel zu minimieren. Daher wurden Puffer und pH-Werte gewählt, die sich nicht oder nur minimal von denen unterschieden, die bei der Bestimmung der nativen *KI*PDC-Kristallstruktur verwendet wurden (für die detaillierten Bedingungen siehe Kapitel 2.3). Zudem konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass weder die verwendeten Fällungsmittel PEG 2000 und PEG 6000, noch die Gefrierschutzmittel PEG 400 und Glycerin einen signifikanten Einfluss auf die kinetischen Eigenschaften von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen haben.

Im Falle der durch Pyruvat aktivierten Varianten war es jedoch notwendig die Kristallisationsbedingungen geringfügig zu modifizieren. Dies hatte seine Ursache in der Restaktivität (0,3 % verglichen mit dem Wildtyp) der beiden verwendeten *Sc*PDC-Varianten. Daher entstanden im Verlaufe der Kristallisation geringe Mengen an Acetaldehyd, wodurch die Auflösung der sich bereits gebildeten Kristalle aufgrund einer globalen Strukturänderung (Dimer-Dimer-Rotation; siehe auch Kapitel 3.7) induziert wurde. Zur Verringerung der Produktbildungsgeschwindigkeit wurde daher die Kristallisationstemperatur von 8 °C auf 0 °C verringert, dass heißt, die Lagerung der Kristallplatten erfolgte auf Eis. Zum anderen wurde auch eine hohe Pyruvatkonzentration genutzt, um den Anteil von Acetaldehyd im Verhältnis zum Substrat niedrig zu halten. Außerdem wurde den Kristallisationsansätzen NADH+H⁺ und geringe Mengen des Enzyms Alkoholdehydrogenase hinzugesetzt, um zumindest einen Teil des gebildeten Acetaldehydes zu Ethanol umzusetzen.

Zunächst konnte die Kristallstruktur der MAP-aktivierten *KI*PDC bis zu einer Auflösung von 2,3 Å bestimmt werden. Das Substratanalogon bindet dabei sowohl im aktiven als auch im regulatorischen Zentrum. Abb. 24 zeigt die Quartärstruktur des Enzyms. Es ist offensichtlich, dass sich die beiden Dimere der tetrameren PDC in der offenen Form befinden. Damit liegt eine Drehung der *KI*PDC von der halbseitig geschlossenen zur offenen Form im Rahmen der Substrataktivierung vor. Dies ist im Gegensatz zu den bisherigen kristallographischen Befunden zur Aktivierung der
*Sc*PDC, die in der nativen Form offen (Dyda *et al.*, 1993) und der aktivierten Form halbseitig geschlossen (Lu *et al.*, 1997) vorlag. Die Ursache für die unterschiedlichen Drehwinkel bei der *KI*PDC und *Sc*PDC infolge der Aktivierung sollte an Kristallkontakten liegen. Anhand von Röntgenkleinwinkelstreuexperimenten wird in Kapitel 3.7 gezeigt, welche der Dimer-Dimer-Anordnungen in Lösung auftreten.



Abb. 24: Tetramerstruktur der MAP-aktivierten *KI*PDC mit individuell gefärbten Domänen (α , rot; β , blau und γ , gelb), die als Cartoonmodell gezeigt sind.

Wie bereits erwähnt, wird das Substratanalogon MAP an mehreren Positionen in der Kristallstruktur gefunden. Insgesamt sind drei verschiedene Bindungsorte nachweisbar. Zum einen wird das Analogon relativ unspezifisch in drei der vier Untereinheiten zwischen der Seitenkettenhydroxylgruppe von Tyr157, dem Hauptkettensauerstoff von Lys65 und der Seitenkettencarboxylatgruppe von Glu18 (Abb. 25) gebunden. Allerdings ist die Menge an Elektronendichte für diese Position relativ gering, so dass für die Verfeinerung lediglich ein Besetzungsgrad von 40 % angenommen wurde. Interessanterweise ist an der Bindung dieser MAP-Moleküle wie bei Lu *et al.* (2000) Tyr157 beteiligt, hier allerdings mit der Hydroxylgruppe der Seitenkette und nicht mit dem Hauptkettensauerstoffatom. Daher befindet sich MAP in räumlicher Nähe zum Pyruvamid aus dieser Publikation. Der Abstand der Aktivatormoleküle bei der Superposition der beiden Strukturen beträgt knapp 4 Å.

Weitere Analogonmoleküle werden in den aktiven Zentren, gebunden am Kofaktor TPP, gefunden (Abb. 26). Auffallend ist, dass im Gegensatz zur Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC (Lu *et al.*, 2000) hier alle vier aktiven Zentren besetzt sind, auch wenn der



Abb. 25: Locker gebundenes Methylacetylphosphonatmolekül bei der *KI*PDC. Dargestellt ist ein Ausschnitt eines der Dimere der MAP-aktivierten *KI*PDC mit individuell gefärbten Domänen (α , rot; β , blau und γ , gelb) als Cartoonmodell. Die Lage des Ausschnitts ist durch den Pfeil im Insert gekennzeichnet. Die Kofaktoren, MAP inklusive der mit diesem Molekül interagierenden Aminosäuren Glu18, Lys65 und Tyr157 sowie das modellierte Pyruvamidmolekül (nach Lu *et al.*, 2000) sind als Stabmodell mit individuell gefärbten Atomen bzw. in der Farbe ihrer Domäne eingezeichnet. Die Elektronendichte von MAP ist dunkelblau gehalten (σ = 1,1).

Besetzungsgrad für jedes der aktiven Zentren nur bei ca. 60 % liegt. Dies könnte daran liegen, dass die Gefrierschutzlösung kein MAP enthielt. Aufgrund der hohen Abspaltungsgeschwindigkeiten vom aktiven Zentrum (Alvarez & Schowen, 1991) war die Dauer von 5-10 s, die der Kristall in dieser Lösung inkubiert wurde, vermutlich zu lang, um die vollständige Besetzung der aktiven Zentren aufrechtzuerhalten.

Das C₂-Atom von MAP liegt in allen aktiven Zentren sp³-hybridisiert vor, dass heißt, es gibt eine deutliche Verschiebung von einem planar-trigonalen Zustand des Carbonylkohlenstoffes in ungebundenen MAP zu einer tetraedischen Anordnung, auch wenn die Bindungslänge zwischen den C₂-Atomen von MAP und TPP mit \approx 2,22 Å für eine kovalente Bindung relativ groß ist. Eine solche stark gestreckte Bindung erscheint für das Analogon aber durchaus plausibel. Die Bindungsaffinität von Methylacetylphosphonat zum aktiven Zentrum ist im Vergleich zu Pyruvat (Kapitel 3.5) geringer, was mit dem größeren Volumen des Analogons im Zusammenhang stehen könnte.

Abb. 26 zeigt, dass das MAP-Molekül im aktiven Zentrum, verglichen mit dem nur schwach an der Oberfläche gebundenen aus Abb. 25, gestaucht werden musste. Beim MAP-Molekül aus Abb. 26 weist der Methylrest der Methylphosphonatgruppe in

Richtung des Ketocarbonylsauerstoff- und des C₃-Kohlenstoffatoms. In Lösung bzw. am regulatorischen Zentrum (siehe nächste Seite) zeigt der Methylrest in die entgegengesetzte Richtung. Die Konformation im aktiven Zentrum wird durch das Mikromilieu der Substratbindungstasche erzwungen, um sterische Hinderungen zu benachbarten Aminosäureresten, insbesondere zur Seitenkette von Glu477, aber auch zur Hauptkette von Asp28 zu vermeiden. Daher wird deutlich, dass das aktive Zentrum von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen für Pyruvat und nicht für längerkettige Substrate oder gar ein voluminöses Analogon optimiert ist. Die Struktur des aktiven Zentrums kann somit die kinetischen Daten aus Kapitel 3.5 erklären. Dort wurde eine mindestens 11fach verringerte Bindungsaffinität von MAP verglichen mit Pyruvat beschrieben (S. 65-66). Der hohe sterische Stress, dem MAP im aktiven Zentrum unterworfen ist, bietet eine Erklärung für den kinetischen Befund.

Im Gegensatz zu Pyruvamid (Lu *et al.*, 2000) wird MAP aber dennoch sehr dicht am TPP gefunden. Das Ketocarbonylkohlenstoffatom des Pyruvamides ist \approx 2 Å weiter vom Kofaktor entfernt und Pyruvamid befindet sich somit eher in einer *docking*-Position.



Abb. 26: Aktives Zentrum der MAP-aktivierten KIPDC.

Abgebildet ist eines der aktiven Zentren mit individuell gefärbten Domänen (α , rot; β , blau und γ , gelb) als Cartoonmodell. MAP, TPP und Mg²⁺ sind als Stabmodell (dicke Linien) mit individuell gefärbten Atomen inklusive Elektronendichte (MAP, σ = 1,0; Kofaktoren, σ = 1,5) zu sehen. Die beiden Aminosäuren mit sehr geringem Abstand zum MAP (siehe Text) sind als Stabmodell (dünne Linien) in der Farbe ihrer Domänen dargestellt. Ebenfalls als Stabmodell mit dünnen Linien, jedoch mit individuell gefärbten Atomen wurde Pyruvamid in der Position nach Lu *et al.* (2000) überlagert. Das interessanteste Resultat betrifft das regulatorische Zentrum der MAP-aktivierten *KI*PDC. Hier liegt eine 100 %ige Besetzung mit dem Analogon vor. Offensichtlich wirkt sich die Abwesenheit von MAP in der Gefrierschutzlösung am regulatorischen Bindungsort nicht so stark wie im aktiven Zentrum auf den Besetzungsgrad aus. Dies sollte an der deutlich langsameren Dissoziation des Liganden vom regulatorischen Zentrum verglichen mit dem aktiven Zentrum (Alvarez & Schowen, 1991) liegen. Wie Abb. 27A illustriert, befindet sich die regulatorische Bindungsstelle von Methylacetyl-phosphonat am Cys221. Das entspricht den Vorstellungen des Newarkmodells für die Substrataktivierung. Somit ist MAP etwa 10 Å von der Stelle entfernt, an der Lu *et al.* (2000) Pyruvamid fanden.

Zwischen dem Cysteinschwefel- und dem MAP-C₂-Atom des Liganden wird eine kovalente Bindung gebildet, woraus ein Thiohemiketal resultiert (Abb. 27A und B). Die Bindung des Analogons wird durch elektrostatische Wechselwirkungen der negativ geladenen Methylphosphonatgruppe mit drei benachbarten Histidinresten unterstützt. Zudem sind Wechselwirkungen des MAPs und der Hauptkettensauerstoffatome der Aminosäuren Gly286 und Ala287 sowie mit Ser311 möglich. Der Abstand zwischen dem Cysteinschwefel- und dem C₂-Atom des Analogons entspricht mit 1,82 Å der typischen Bindungslänge einer Schwefel-Kohlenstoff-Einfachbindung (theoretischer Wert: 1,81 Å). Die Ausbildung einer kovalenten Bindung wird auch durch das sp³hybridisierte C₂-Atom des gebundenen Liganden belegt.

Infolge der MAP-Bindung werden an der regulatorischen Bindungsstelle die in Abb. 27A und Tab. 7 gezeigten Aminosäurereste um bis zu 3 Å verschoben. Die strukturellen Konsequenzen hierzu sind im Abschnitt zum Aktivierungsmechanismus (ab S. 84) aufgeführt.

Die Regulation von Enzymen durch kovalente Modifikation tritt bei Enzymen des Zuckerstoffwechsels häufig auf. Ein klassisches Beispiel ist die Glykogensynthase, die durch Phosphorylierung inhibiert wird (Friedman & Larner, 1963). Derartige Regulationen haben ihre Ursache meist in einer Veresterung von Serin- oder Threoninseitenketten, bei Wachstumsfaktoren auch von Tyrosinresten, mit anorganischem Phosphat. Diese Reaktionen werden durch Kinasen katalysiert und sind im Allgemeinen irreversibel. Die Abspaltung der Phosphatreste wird enzymatisch durch Phosphatasen kontrolliert.



Abb. 27: A: Regulatorischer Bindungsort der MAP-aktivierten K/PDC. Abgebildet ist eines der regulatorischen Zentren mit individuell gefärbten Domänen (α, rot; β, blau und γ, gelb) als Cartoonmodell. Cys221 und das kovalent gebundene MAP sind als Stabmodell mit dicken Linien gezeigt, die anderen Aminosäuren, mit denen das Analogon nicht-kovalent wechselwirken kann, als Stabmodell mit dünnen Linien. MAP ist mit individuell gefärbten Atomen und der Elektronendichte (σ, 1,5) in dunkelblau, alle Aminosäuren in der Farbe ihrer Domänen (Elektronendichte mit σ, 1,9) eingezeichnet.

B: Bildung eines Thiohemiketals aus einem Thioalkohol (z.B. Cystein) und einem Keton (z.B. MAP, Pyruvat oder Pyruvamid).

Tab. 7: Vergleich der Position aller an der MAP-Bindung im regulatorischen Zentrum beteiligten Aminosäuren bei der *KI*PDC.

C _α -Atom der Aminosäure	Δ (MAP-aktivierte <i>KI</i> PDC -			
	native <i>KI</i> PDC) in Å			
His92	0,1			
Cys221 (S-Atom)	1,8 (2,9)			
His225	1,9			
Gly286	1,9			
Ala287	2,3			
His310	1,6			
Ser311	1,6			

Für die kovalente Regulation der Hefe-PDC-Spezies sind keine weiteren Enzyme nötig. Zudem ist die Thiohemiketalbildung reversibel und benötigt keine weitere Energie in Form von ATP. Damit ist es im Rahmen dieser Arbeit erstmals möglich gewesen, die Bildung eines solchen Thiohemiketals mit regulatorischer Funktion kristallographisch nachzuweisen.

An dieser Stelle ergibt sich die Frage, warum Pyruvamid in der *Sc*PDC-Kristallstruktur von Lu *et al.* (2000) und MAP in der hier vorgestellten *KI*PDC-Kristallstruktur an unterschiedlichen regulatorischen Bindungsorten zu finden sind. Zwar handelt es sich bei den Enzymen, die in Gegenwart von MAP bzw. Pyruvamid kristallisiert wurden, um verschiedene Hefe-PDC-Spezies, doch unterscheiden sie sich in kinetischer Hinsicht nur geringfügig. Um sichere Aussagen über den Bindungsmodus von Pyruvat zu treffen, erfolgten weitere Kristallisationsversuche mit Hefe-Pyruvatdecarboxylasen in Gegenwart des nativen Substrates. So ließen sich die Strukturen der Pyruvat-aktivierten *Sc*PDC_{D28A} und der *Sc*PDC_{E477Q} bis zu einer Auflösung von 1,71 Å bzw. 1,42 Å ermitteln.

Im Weiteren war es möglich die Struktur der $ScPDC_{E477Q}$ in Gegenwart des Analogons Pyruvamid bis zu einer Auflösung von 1,60 Å zu bestimmen. Im Falle der Pyruvamid-aktivierten *KI*PDC sowie der MAP-aktivierten *ScPDC* und der MAP-aktivierten *ScPDC*-Varianten wurden zwar auch Kristalle erhalten, allerdings lag die Auflösung der experimentellen Daten meist bei 5-9 Å. Es wurde daher lediglich ein Datensatz für die Pyruvamid-aktivierte *KI*PDC vermessen (bis 3,65 Å), um Aussagen zur globalen Struktur des Komplexes treffen zu können.

Abb. 28 zeigt die Superposition aller in dieser Arbeit ermittelten PDC-Kristallstrukturen im aktivierten Zustand. Sie liegen grundsätzlich in der offenen Form vor. Besonders gut stimmen dabei die Strukturen der MAP-aktivierten *KI*PDC und der Pyruvataktivierten *Sc*PDC-Varianten überein. Trotz verschiedener Organismen beträgt die mittlere quadratische Abweichung (*r.m.s.d.*) der Position der C_{α}-Atome lediglich 0,6 Å (Tab. 8). Demgegenüber sind die *r.m.s.d.*-Werte zu den beiden Pyruvamid-aktivierten Spezies um den Faktor 2-4 größer.

Abgesehen von der Pyruvamid-aktivierten *KI*PDC (3,65 Å) wurden in allen Kristallstrukturen der Aktivator-PDC-Komplexe gebundene Effektormoleküle gefunden.



- Abb. 28: Superposition der tetrameren Kristallstrukturen der MAP-aktivierten *KI*PDC (blau), der Pyruvamid-aktivierten *KI*PDC¹ (dunkelgrau), der Pyruvat-aktivierten *Sc*PDC_{D28A} (rot), der Pyruvataktivierten *Sc*PDC_{E477Q} (gelb) und der Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC_{E477Q} (weizenfarben). ¹ Liegt als Dimer in der asymmetrischen Einheit vor. Für die tetramere Form wurde das dazugehörige symmetrieverwandte Dimer hinzugezogen.
- Tab. 8: Mittlere quadratische Abweichung der Position aller C_{α} -Atome in den Substrat-aktivierten tetrameren PDC-Kristallstrukturen in Å.

	MAP- <i>KI</i> PDC	Pyruvat-	Pyruvat-	Pyruvamid-
		ScPDC _{E477Q}	ScPDC _{D28A}	ScPDC _{E477Q}
Pyruvamid- <i>KI</i> PDC ¹	2,2	1,1	1,1	1,3
Pyruvamid-ScPDC _{E477Q}	1,3	1,3	1,2	
Pyruvat-ScPDC _{D28A}	0,6	0,5		
Pyruvat-ScPDC _{E477Q}	0,6		-	

Liegt als Dimer in der asymmetrischen Einheit vor. Für die tetramere Form wurde das dazugehörige symmetrieverwandte Dimer hinzugezogen.

An der Stelle der schwach gebundenen MAP-Moleküle (siehe Abb. 25), befand sich zwar auch bei den Strukturen der Pyruvat-aktivierten $ScPDC_{E477Q}$ und $ScPDC_{D28A}$ sowie bei der Pyruvamid-aktivierten $ScPDC_{E477Q}$ immer Elektronendichte, allerdings war die Qualität für eine Modellierung meist nicht ausreichend. Lediglich bei der Pyruvamid-aktivierten $ScPDC_{E477Q}$ war es möglich, in einer Untereinheit ein Pyruvamid-molekül zu positionieren.

Bei der *Sc*PDC_{D28A}-Variante ist Pyruvat kovalent am TPP gebunden (Abb. 29A). Die Bindungslänge liegt mit 1,69 Å über dem für eine kovalente C-C-Einfachbindung zu erwartenden Wert (1,54 Å). Vergleicht man die Position von MAP und Pyruvat im aktiven Zentrum so ist eine Drehung um \approx 36° festzustellen (siehe auch Abb. 31 auf S. 83).

In der Pyruvat-aktivierten $ScPDC_{E477Q}$ fehlt in den aktiven Zentren das C₂-Atom des Kofaktors (Besetzungsgrad ca. 3-9 %). Folglich lässt sich dort auch fast keine Elektronendichte für das Substrat finden (Abb. 29B). Fehlende Atome oder Modifika-

tionen des Kofaktormoleküls wurden bei Kristallstrukturen TPP-abhängiger Enzyme bereits mehrfach beschrieben (z.B. Dobritzsch *et al.*, 1998 und Pang *et al.*, 2004).

Wie in der Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC-Kristallstruktur von Lu *et al.* (2000) sind auch bei der Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC_{E477Q} nur zwei der vier aktiven Zentren vollständig mit dem Analogon besetzt (Abb. 29C und 29D). Interessanterweise sind diese Untereinheiten bei der *Sc*PDC_{E477Q} über Kreuz aktiviert. Dass heißt, entsprechend zu Abb. 15 (S. 50), sind die aktiven Zentren in den Bereichen A und C oder B und D vollständig aktiviert¹. In der Struktur von Lu *et al.* (2000) liegen hingegen die Untereinheiten A und D aktiviert vor. Zudem ist bei der Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC_{E477Q} ein weiteres aktives Zentrum zu ca. 20-30 % mit Pyruvamid besetzt, während im aktiven Zentrum der vierten Untereinheit keine Elektronendichte des Liganden zu finden ist (Abb. 29D). Die Position der Pyruvamidmoleküle im aktiven Zentrum der *Sc*PDC_{E477Q} ist dabei analog zu den Methylacetylphosphonatmolekülen in der MAP-aktivierten *KI*PDC.

Auffallend am aktiven Zentrum der Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC_{E477Q}-Struktur sind jedoch vor allem zwei weitere Punkte. Im Gegensatz zur Pyruvamid-aktivierten Struktur von Lu *et al.* (2000), in der sich das Analogon in einer *Docking*-Position (der Abstand der C₂-Atome des Pyruvamides und des Kofaktors betrug 3,88 Å) befand, ist bei der *Sc*PDC_{E477Q}-Struktur Pyruvamid kovalent am TPP gebunden. Der Abstand zwischen dem sp³-hybridisierten C₂-Atom des Analogons und dem TPP-C₂-Atom ist mit \approx 1,91 Å aber länger als für eine C-C-Einfachbindung zu erwarten ist.

Weiterhin zeigt sich in der Elektronendichtekarte ein sp³-hybridisiertes C₁-Atom des Pyruvamides (Abb. 29C). In der Beilstein-Datenbank wird über keinerlei kovalente Modifikationen dieses Kohlenstoffatoms berichtet. Eine Hydratisierung des C₁-Atoms erscheint am wahrscheinlichsten. Auch wenn zwei Hydroxylgruppen und eine Aminogruppe an demselben Kohlenstoffatom ungewöhnlich sind, lässt sich dies durch das Mikromilieu in der Umgebung des Liganden erklären. Ähnlich wie am regulatorischen Bindungsort befinden sich im aktiven Zentrum basische (His114 und His115), aber auch saure Proteinseitenketten (Asp28) in räumlicher Nähe zum gebundenen Liganden. Diese können als Wechselwirkungspartner agieren.

Die mit Substrat besetzten regulatorischen Zentren der Pyruvat-aktivierten ScPDC-Varianten D28A und E477Q unterscheiden sich kaum vom regulatorischen Zentrum

¹ Unter Berücksichtigung der offenen Form bei der Pyruvamid-aktivierten ScPDC_{E477Q}.

der MAP-aktivierten *KI*PDC. Bei beiden Varianten bindet Pyruvat in allen vier Untereinheiten kovalent an Cys221. Die analogen Atome von MAP und Pyruvat weisen ebenfalls keine Unterschiede in ihrer Position auf. Lediglich die Bindungslänge zwischen dem C₂-Atom des Effektors und dem Cysteinschwefelatom ist mit 2,12 Å für die Pyruvat-aktivierte D28A-Variante und mit 2,04 Å für die Pyruvat-aktivierte E477Q-Variante größer als bei der MAP-aktivierten *KI*PDC und auch etwas größer als für eine C-S-Einfachbindung zu erwarten ist (1,81 Å). Dennoch liegt eine sp³-Hybridisierung am C₂-Atom des Effektormoleküls vor (Abb. 30 links und Abb. 41 S. 123). Hinsichtlich der Wechselwirkungen mit den umgebenden Aminosäuren sind ebenfalls keine Veränderungen gegenüber der MAP-aktivierten *KI*PDC festzustellen.



Abb. 29: Aktives Zentrum der Pyruvat-aktivierten ScPDC_{D28A} (A) und ScPDC_{E477Q} (B) sowie eine der beiden vollständig aktivierten Untereinheiten (C) und die nicht-aktivierte Untereinheit (D) der Pyruvamid-aktivierten ScPDC_{E477Q}. Das obere Insert in C stellt einen vergrößerten Ausschnitt des hydratisierten Pyruvamides dar, das untere Insert illustriert den Vergleich der Strukturformeln von hydratisierten (rechts) und nicht hydratisierten (links) Pyruvamid. Die Proteinkomponente ist als Cartoonmodell mit individuell gefärbten Domänen (α, rot; β, blau und γ, gelb) und die Kofaktoren sowie der Ligand als Stabmodell mit individuell gefärbten Atomen gezeigt. Die Elektronendichte (σ, 1,9) ist für die Aktivatoren und die Kofaktoren eingezeichnet.

Überraschend sind jedoch die Ergebnisse zum regulatorischen Zentrum der Pyruvamid-aktivierten ScPDC_{E477Q}. In der Region zwischen Arg224 und Tyr157 an der Lu et al. (2000) beim Wildtyp Pyruvamid fanden, ist keine Elektronendichte vorhanden, die mit dem Analogon zur Übereinstimmung zu bringen wäre. Stattdessen befindet sich interpretierbare Elektronendichte in der Nähe des Aminosäurerestes Cys221. Der Besetzungsgrad der regulatorischen Bindestelle unterscheidet sich dabei von Untereinheit zu Untereinheit. Dort wo auch die aktiven Zentren zumindest partiell aktiviert vorliegen, ist eine kovalente Bindung von Pyruvamid an Cys221 nachweisbar (Abb. 30, rechts oben). Die Kovalenz der Bindung wird durch die sp³-Hybridisierung des C2-Atoms des Analogons dokumentiert. Die Bindungslänge zwischen Effektor und Aminosäureseitenkette beträgt 1,85 Å und ist damit nur geringfügig größer als der theoretische Wert einer C-S-Einfachbindung (1,81 Å). Wie im aktiven Zentrum liegt auch hier die Säureamidgruppe des Analogons hydratisiert vor. Als Ursache ist wiederum das Mikromilieu anzunehmen. Ansonsten ist die Lage der Atome von Pyruvamid identisch mit denen des Pyruvates und MAPs. Verglichen mit den Pyruvatund MAP-aktivierten Kristallstrukturen sind auch hier keine Unterschiede in den Interaktionen mit den flankierenden Aminosäuren belegbar.



Abb. 30: Regulatorischer Bindungsort der Pyruvat-aktivierten $ScPDC_{D28A}$ (links), der Pyruvamid-aktivierten $ScPDC_{E477Q}$ (vollständig aktivierte Untereinheit; rechts oben) und zum Vergleich der MAP-aktivierten KIPDC (rechts unten). Die Liganden und Cys221 sind als Stabmodell mit dicken Linien und individuell gefärbten Atomen, die Aminosäuren in Wechselwirkungsdistanz zum gebundenen Pyruvatmolekül als Stabmodell mit dünnen Linien und individuell gefärbten Atome ist die Elektronendichte (weizenfarben) mit σ = 1,9 eingezeichnet.

In der Untereinheit, in der das aktive Zentrum nicht-aktiviert vorliegt, ist zwar ebenfalls Elektronendichte am regulatorischen Bindungsort vorhanden, diese ist jedoch viel diffuser und lässt sich nicht eindeutig einzelnen Atomen des Pyruvamides zuordnen. Hier befinden sich auch die den gebunden Liganden flankierenden Aminosäuren in derselben Position (siehe Tab. 7) wie in den nicht-aktivierten PDC-Strukturen. Sowohl in der nicht als auch in der nur partiell aktivierten Untereinheit liegt der Besetzungsgrad des regulatorischen Zentrums mit Pyruvamid bei höchstens 50 %.

Hier stellt sich die Frage, warum sich der regulatorische Bindungsort für Pyruvamid in der Kristallstruktur von Lu *et al.* (2000) an einer anderen Stelle befindet als in der hier vorgestellten Struktur. Dass dies eine Folge des Aminosäureaustausches E477Q ist, kann ausgeschlossen werden. Eine mögliche Ursache ist in der Verwendung einer anderen Gefrierschutzlösung zu sehen. Bei Lu *et al.* (2000) befand sich während des einminütigen *soakings* in dieser kein Substratanalogon. Daher ist es denkbar, dass Pyruvamid in der *soaking-*Zeit bereits abgespalten wurde und sich lediglich noch in einer *docking-site*, 10 Å vom Cys221 entfernt, befand. Dies erscheint plausibel, da in Kapitel 3.5 gezeigt werden konnte, dass die Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstante (k_{-iso}) um eine Größenordnung höher ist als für Pyruvat und MAP. Im Gegensatz zu Lu *et al.* (2000) wurde bei der Pyruvamid-aktivierten ScPDC_{E477Q} nicht nur mit dem Substratanalogon kokristallisiert, sondern Pyruvamid befand sich auch in der Kryolö-sung.

In Abb. 31 ist die Überlagerung der aktiven Zentren der verschiedenen aktivierten und nicht-aktivierten Hefe-PDC-Kristallstrukturen gezeigt. Deutlich zu erkennen ist die 36°-Drehung von Pyruvat verglichen mit den beiden Analoga (Abb. 31A). Inwieweit diese Rotation die Folge unterschiedlicher Eigenschaften des Substrates ist oder an der D28A Mutation liegt, kann hier nicht endgültig geklärt werden.

Infolge der Aktivierung gibt es in jedem Fall eine Neuausrichtung des Aminosäurerestes an Position 28 und zwar unabhängig davon, ob sich dort ein Aspartat oder Alanin befindet (Abb. 31B). Der gesamte Rest wird um ca. 35° gedreht. Dies ist notwendig, um eine Überlagerung der Aminosäureseitenkette mit dem Effektormolekül und dem ebenfalls neu ausgerichteten His115 zu unterbinden. Infolge dieser Bewegungen befindet sich die Carboxylatgruppe von Asp28 in Wasserstoffbrückenbindungsabstand zur His115-Seitenkette sowie zur Carboxylat-, Säureamid- bzw. Methylphosphonatgruppe des gebundenen Liganden.

Neben His115 wird auch His114 neu ausgerichtet und kann mit dem gebundenen Liganden und der Aminogruppe des Aminopyrimidinringes vom TPP interagieren (siehe auch Aktivierungsmechanismus ab S. 84). Für Glu477 scheint es keine bevorzugte Position der Seitenkette zu geben. Es treten mehrere sich geringfügig unterscheidende Konformationen dieser Aminosäureseitenkette auf, die unabhängig vom Aktivierungszustand sind. In den Kristallstrukturen der ScPDC_{E477Q} ist die Gln477-Seitenkette verglichen mit der Glu477-Seitenkette um 107° gedreht (siehe auch Abb. 42 im Anhang II auf S. 123). Alle anderen Aminosäurereste, die mit dem Effektor oder den Kofaktor wechselwirken können, weisen keine nennenswerten Unterschiede zwischen dem aktivierten und dem nicht-aktivierten Zustand auf.

Da die Substrataktivierung das Kernthema dieser Arbeit ist, wird hier nicht weiter auf das aktive Zentrum und die Katalyse eingegangen. Dem Leser, dem die kinetischen Eigenschaften der hier verwendeten Varianten interessieren, seien die Arbeiten von Liu *et al.* (2001), Sergienko & Jordan (2001^{a, b}) und Tittmann *et al.* (2003) sowie der Übersichtsartikel von Jordan (2002) empfohlen.



Abb. 31: Vergleich der aktiven Zentren von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen in Abwesenheit und Gegenwart von Effektoren. Den einzelnen Spezies wurden unterschiedliche Farben zugeordnet: Native KIPDC, blau; MAP-aktivierte KIPDC, rot; native ScPDC (Arjunan *et al.*, 1996), weizenfarben; Pyruvat-aktivierte ScPDC_{D28A}, schwarz; Pyruvat-aktivierte ScPDC_{E477Q}, weiß; Pyruvat-aktivierte ScPDC_{E477Q} (vollständig aktivierte Untereinheit), gelb. Es wurden die C_α-Atome eines Dimers superpositioniert.

A: Drehung von Pyruvat verglichen mit MAP und mit Pyruvamid (gelber Pfeil) um 36°.

B: Rotation von Asp28 bzw. Ala28 infolge der Substrataktivierung (gelber Pfeil) um 35°. Die im Text diskutierten Aminosäuren Asp28, His114, His115 und Glu477 sind für die native und MAP-aktivierte *KI*PDC als Stabmodell (dünne Linien) eingezeichnet. Für dieselben beiden Kristallstrukturen sind die Kofaktoren und der Ligand MAP als Stabmodell (dicke Linien) dargestellt.

Damit lässt sich abschließend feststellen, dass Cys221 den Ausgangspunkt der Aktivierung der Hefe-PDC-Spezies darstellt. Im Folgenden soll der Signaltransfer zwischen Cys221 und dem aktiven Zentrum im Kontext der vorliegenden Kristallstrukturen diskutiert werden.

Jordan *et al.* (1998) postulierten einen Signaltransfer über Cys221, His92, Glu91 und Val410-Gly413 bis zum N₄-Atom des Kofaktors. Der finale Schritt der Aktivierung soll die korrekte Ausrichtung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Hauptkettensauerstoffatom von Gly413 und dem N₄-Atom des Pyrimidinringes sein. Mittlerweile liegen genügend Informationen aus hochaufgelösten PDC-Kristallstrukturen vor, die einen solchen Aktivierungsmechanismus sehr unwahrscheinlich erscheinen lassen. So gibt es beim Proteinrückgrat keine signifikanten Bewegungen der Aminosäuren 91-92 bzw. 410-413 infolge der Substrataktivierung. Bei den Seitenketten sind lediglich Leu411 und His92 leicht gedreht (Abb. 32). Daher beträgt die mittlere quadratische Abweichung der Atome des Newark-Modells weniger als 0,2 Å. Auch die normierten B-Faktoren bleiben fast unverändert. Die Abweichungen betragen im Allgemeinen weniger als 6 Å². Damit ist auch eine Fixierung oder Flexibilisierung im Rahmen des Newark-Modells auszuschließen. Abb. 32 stellt diesen Befund für die verschiedenen *Sc*PDC-Kristallstrukturen dar. Analoge Resultate werden für die *KI*PDC gefunden.



Abb. 32: Superposition der Dimere der nicht-aktivierten *Sc*PDC (Arjunan *et al.*, 1996), der Pyruvamidaktivierten *Sc*PDC_{E477Q} und der Pyruvat-aktivierten *Sc*PDC_{D28A}. Die Aminosäuren des Newark-Modells, die Effektoren und die Kofaktoren sind als Stabmodell dargestellt, das Proteinrückgrat als dünne Linien. Das Insert zeigt die Position der Ausschnittsvergrößerung. Die Farben entsprechen den B-Faktoren von dunkelblau (0 Å²) über gelb bis rot (65 Å²).

einen wichtigen Baustein der Substrataktivierung darstellt. Hierbei zeigte sich, dass die beiden Loops 104-115 und 288-304 in allen Substrat-aktivierten Untereinheiten fixiert und neu geordnet vorliegen. Der Loop 104-115 nimmt in den aktivierten Untereinheiten generell die in Abb. 17A (S. 54) gezeigte Position ein, wodurch die Seitenketten der beiden Histidine 114 und 115 in räumliche Nähe zum Kofaktor TPP gelangen (Abb. 33). Für die Konformation aus Abb. 17B liegt im aktivierten Zustand keine Elektronendichte vor. Dementsprechend sind die B-Faktoren des Loops 104-115 auch deutlich reduziert und nähern sich dem durchschnittlichen B-Faktor der jeweiligen Kristallstruktur. Der Loop 288-304 wird infolge der Aktivierung ebenfalls komplett neu strukturiert und fixiert. In allen aktivierten Untereinheiten, der in der vorliegenden Arbeit bestimmten Kristallstrukturen, befinden sich die beiden Loops immer an derselben Position. Die r.m.s.d.-Werte betragen weniger als 0,6 Å (Tab. 9). Dagegen liegt der r.m.s.d.-Wert für den Loop 288-304 beim Vergleich der nativen und der MAP-aktivierten KIPDC bei \approx 6 Å. Für den Loop 104-115 ergibt sich aus denselben beiden Kristallstrukturen ein r.m.s.d.-Wert von 1,5 Å, sofern sich die KIPDC in der Konformation von Abb. 17A befindet (die Histidine 114 und 115 sind dicht am aktiven Zentrum) und 4,7 Å für die Konformation von Abb. 17B. Folglich kommt die Konformation des Loops 104-115 in Abb. 17A dem aktivierten Zustand sehr nahe.

Dass sich die beiden reorganisierten Loops 104-115 und 288-304 tatsächlich in der Substrat-aktivierten Position befinden, wird beim Vergleich mit den nicht-regulierten Enzymen ZmPDC (Dobritzsch et al., 1998) und EcIPDC (Schütz et al., 2003) deutlich. Es ergeben sich nur marginale Unterschiede. Speziell der Loop 104-115 zeigt eine sehr gute Überstimmung zwischen den aktivierten Hefe-PDCs und der EclPDC (Tab. 9; r.m.s.d. = 0,6 Å). Aber auch die Übereinstimmung des Loops 288-304 mit beiden nicht-regulierten Enzymen wird deutlich. Der r.m.s.d.-Wert beträgt für den für den wichtigen vorderen Bereich des Loops (Aminosäuren 288-298) maximal 1,8 Å. Lediglich bei den stromaufwärts liegenden Aminosäuren des Loops 288-304 gibt es größere Abweichungen. Diese Aminosäuren spielen aber für Aktivierung und Katalyse keine nennenswerte Rolle, wie Mutationsstudien von Joseph et al. (2006) zeigten.

Der Vergleich der Looppositionen der Substrat-aktivierten Strukturen dieser Arbeit mit der Pyruvamid-aktivierten Struktur von Lu et al. (2000) zeigt für beide Loops große r.m.s.d.-Werte von bis zu 5,9 Å. Eine bessere Übereinstimmung ist für die Position des Loop 288-304 zwischen der Struktur von Lu *et al.* (2000) und der nativen *KI*PDC zu finden (2,5 Å). Daher ist nahe liegend, dass in der Kristallstruktur von Lu *et al.* (2000) die Inaktivierung aufgrund des fehlenden Pyruvamides in der Gefrierschutzlösung schon weit fortgeschritten war.



- Abb. 33: Modell des aktiven Zentrums sowie der Loops 104-115 und 288-304 der MAP-aktivierten *KI*PDC. Das Protein-Rückgrat ist als Linienmodell dargestellt; TPP, MAP und die beiden Loops als Stabmodell. Die Farben der Atome entsprechen ihren B-Faktoren (zunehmend von blau über gelb bis rot). Die Elektronendichte des Kofaktors TPP und MAP ist in blau (σ, 1,2), des Loops 104-115 in grün (σ, 1,5) und des Loops 288-304 in grau (σ, 1,5) gehalten.
- Tab. 9: Vergleich der durchschnittlichen *r.m.s.d.*-Werte (in Å) für die C_α-Atome der nativen und aktivierten Hefe-Pyruvatdecarboxylasen sowie der *Zm*PDC und *Ec*IPDC für die Loops 104-115 und 288-304 nach der Superposition der Monomere.

Superpositionierte Enzymspezies	Loop 104-115	Loop 288-304 (288-298 <i>Zm</i> PDC; 288-300 <i>Ec</i> IPDC)
<i>KI</i> PDC (MAP-aktiviert), <i>Sc</i> PDC _{E477Q} (Pyruvat- und Pyruvamid-ak- tiviert) und <i>Sc</i> PDC _{D28A} (Pyruvat-aktiviert)	≤ 0,6	≤ 0,3
<i>KI</i> PDC (nativ; Loopposition wie in Abb. 17A - His114 und His115 dicht am aktiven Zentrum) und <i>KI</i> PDC (MAP-aktiviert)	1,5	6,2
<i>KI</i> PDC (nativ; Loopposition wie in Abb. 17B - His114 und His115 vom aktiven Zentrum weg orientiert) und <i>KI</i> PDC (MAP-aktiviert)	4,7	6,1
<i>Zm</i> PDC (Dobritzsch <i>et al.</i> , 1998) und <i>Sc</i> PDC _{E477Q} (Pyruvat-aktiviert)	1,8	2,9 (1,8)
EcIPDC (Schütz et al., 2003) und ScPDC _{E477Q} (Pyruvat-aktiviert)	0,6	1,7 (1,0)
ScPDC (Pyruvamid-aktiviert von Lu et al. (2000); geschlossene Seite) und ScPDC _{E477Q} (Pyruvat-aktiviert)	3,3	5,9
<i>Sc</i> PDC (Pyruvamid-aktiviert von Lu <i>et al.</i> (2000); geschlossene Seite) und <i>KI</i> PDC (nativ; Loopposition wie in Abb. 17B - His114 und His115 vom aktiven Zentrum weg orientiert)	3,5	2,5

Da es nicht möglich ist, den Aktivierungsmechanismus von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen ausschließlich auf Grundlage des Newark- oder Halle-Stockholm-Modells zu beschreiben, soll hier ein alternativer Mechanismus vorgestellt werden, der die beiden Modelle vereint und erweitert. Der komplette Signalübertragungsweg am Beispiel der *KI*PDC ist in Abb. 34 dargestellt. Für die *Sc*PDC sind die Ergebnisse entsprechend.

Offensichtlich ist der erste Schritt der Substrataktivierung die kovalente Bindung des Effektormoleküls an den regulatorischen Bindungsort, also an Cys221 (Abb. 34A und Abb. 34B). Die korrekte Ausrichtung des Liganden wird dabei durch drei flankierende Histidine (His92, His225 und His310) unterstützt. Diese können nicht-kovalent mit der Carboxylatgruppe des Pyruvates, der hydratisierten Säureamidgruppe des Pyruv-amides bzw. der Methylphosphonatgruppe des MAPs interagieren. Aufgrund der positiven Ladung von mindestens einem der Histidine (His92; Baburina *et al.*, 1996) sind im Fall von Pyruvat und MAP auch ionische Wechselwirkungen möglich. Im Weiteren sind Interaktionen des Liganden mit Gly286, Ala287 und Ser311 möglich.

Infolge der Thiohemiketalbildung, kommt es zu einer Drehung der Cys221-Seitenkette um 33° (nur *Sc*PDC) sowie zu einer Verschiebung von 2,0 Å (Hauptkette) bis 3,7 Å (Seitenkette). Darüber hinaus werden einige weitere Reste (His92, His225, Gly286, Ala287, His310 und Ser311) in der Umgebung des Effektors neu orientiert.

Eine der wichtigsten Konsequenzen der Ligandenbindung ist die Interaktion der β-Domäne mit der α -Domäne. Wie unter 3.4 beschrieben (siehe auch Abb. 16), weist die gesamte β-Domäne des nativen Zustandes eine vergleichsweise hohe Flexibilität auf. Der Grund hierfür ist, dass ein Kontakt zu anderen Domänen fast nur über die Interdomänenloops hergestellt wird. Andere Interaktionsmöglichkeiten sind nur in geringer Anzahl und Stärke vorhanden. Folglich tritt eine ständige Rotationsbewegung der β-Domäne auf, bei der die Interdomänenloops als Scharniere fungieren (siehe S. 51). Die maximale Auslenkung in den nativen Kristallstrukturen beträgt dabei 17° (Abb. 34C). Bedingt durch die nach der Neuorientierung mögliche direkte Interaktion von His92 und His225 sowie die ligandenvermittelte Interaktion von His92 mit Cys221, His225, His310, Gly286, Ala287 und Ser311 spannen die Scharniere und die regulatorische Bindestelle ein Dreieck auf (Abb. 34D), wodurch die β-Domäne fixiert wird. Dabei nimmt sie die dem aktiven Zustand entsprechende Position ein. Die Lage der β-Domänen ist daher in allen aktivierten Kristallstrukturen unabhängig von der Spezies bzw. dem Liganden identisch¹ (Ø-*r.m.s.d.* _{Cα-Atome der β-Domäne}: 0,4 Å; zum Vergleich der Ø-r.m.s.d.-Wert der α - und y-Domänen beträgt 0,3 Å, der Ø-r.m.s.d. Cg-Atome der B-

¹ Es wurden die Monomere der Hefe-PDC-Kristallstrukturen superpositioniert. Angegeben sind die Mittelwerte. Siehe auch Abb. 43I im Anhang III, S. 125.

Domäne ohne Loop 288-304 der nativen *KI*PDC 0,9 Å und der Ø-*r.m.s.d.*-Wert der α- und γ-Domänen der nativen *KI*PDC 0,3 Å). Die Fixierung der β-Domäne im Rahmen der Substrataktivierung wird auch durch den B-Faktor dieser Domäne dokumentiert, der um 24 % gegenüber dem nicht-aktivierten Zustand sinkt¹.

Wie für Abb. 16 erläutert, treten die größten Positionsänderungen bei der Rotation der
ß-Domäne im Loop 288-304 auf. Die Positionen der Aminosäuren Gly286 und Ala287, die mit dem gebundenen Liganden über ihre Hauptkette wechselwirken. werden ebenfalls beeinflusst. Die maximale Auslenkung des Loops beträgt \approx 4 Å. Aufgrund der mit der Substrataktivierung verbundenen Drehung und Fixierung der β-Domäne sowie der Interaktion von Gly286 und Ala287 mit dem am Cys221 kovalent gebundenen Effektor wird der Loop 288-304 neu organisiert und fixiert (Abb. 34E). Der B-Faktor dieses Loops sinkt um die Hälfte. Infolgedessen sind zahlreiche nichtkovalente Interaktionen zwischen den Loops 288-304 und 104-115 möglich, sofern sich Letzterer in der Position befindet, die dem aktivierten Zustand entspricht (Abb. 34F). Diese Loopposition war auch in einer der vier Untereinheiten der nativen KIPDC zu finden, bei der die beiden Histidine 114 und 115 dicht am aktiven Zentrum lagen (Abb. 17A). Dort ist jedoch davon auszugehen, dass dieser Zustand durch Kristall-Kontakte symmetrieverwandter Moleküle induziert wurde. Normalerweise liegt der Anteil der aktivierten Spezies bei Hefe-Pyruvatdecarboxylasen in Abwesenheit von aktivierenden Liganden bei ca. 3 %, wie sich aus der Anfangsgeschwindigkeit von stopped-flow-Progresskurven (Krieger et al., 2002) ergibt. Die Interaktionen der Loops, insbesondere des Bereiches 289-291 mit 112-114 führen letztlich zur Fixierung des Loops 104-115 im Substrat-aktivierten Zustand. Auch hier wird der B-Faktor dieses Loops annährend halbiert. Danach kann sich die C-terminale Helix, die zuvor zum Lösungsmittel hin orientiert war, auf den Loop 104-115 legen und mit diesem einige schwache Wechselwirkungen ausbilden (Abb. 34G). Zudem dreht sich Asp28 um 35°, der Ligand bindet an das C₂-Atom des Kofaktors TPP und im Fall von Pyruvat kann die Katalyse stattfinden (Abb. 34H). Die Bindung des Liganden wird durch Wechselwirkungen mit den beiden Histidinen 114 und 115 sowie mit Asp28 und Glu477 unterstützt. Daneben ist auch eine Interaktion zwischen der Seitenkette von His115 und der 4'-Aminogruppe des Pyrimidinringes möglich.

¹ Um die B-Faktoren der verschieden Kristallstrukturen vergleichen zu können, wurde der B-Faktor der β-Domäne jeweils mit dem durchschnittlichen B-Faktor der Kristallstruktur normiert.



Abb. 34: Signalübertragungsweg der Substrataktivierung von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen am Beispiel der nativen *KI*PDC und der *KI*PDC im Komplex mit dem Substratanalogon MAP.

Die Farben sind wie folgt: α-Domäne, rot; β-Domäne, blau; γ-Domäne, gelb; native *KI*PDC, waldgrün; aktivierte *KI*PDC, weizenfarben; Kofaktoren, schwarz.

A: Regulatorischer Bindungsort der nativen *KI*PDC. Das Insert gibt die Position der Ausschnittsvergrößerung an.

B: Regulatorischer Bindungsort der nativen *KI*PDC mit den superpositionierten Resten nach der Bindung von MAP.

C: Rotation der β -Domäne um $\approx 17^{\circ}$ bei der nativen *KI*PDC (waldgrün und gemischt waldgrün/weizenfarben) und fixierter Zustand nach der Aktivierung (gemischt waldgrün/weizenfarben). Der schwarze Punkt deutet die Rotationsachse im nativen Zustand an, die aus den beiden Scharnieren (Interdomänenloops) resultiert.

D: Fixierung der β -Domäne durch Ausbildung nicht-kovalenter Wechselwirkungen zwischen α - und β -Domäne im Bereich des regulatorischen Bindungsortes. Die für die β -Domäne relevanten Verknüpfungspositionen mit anderen Domänen sind für eine der Untereinheiten durch ein Dreieck markiert.

E: Fixierung des Loops 288-304 der aktivierten *KI*PDC. Zum Vergleich ist die Position des Loops bei der nicht-aktivierten *KI*PDC gezeigt wie er in drei der vier Untereinheiten vorhanden ist (nach Abb. 17B).

F: Fixierung des Loops 104-115 bei der aktivierten *KI*PDC und die möglichen Interaktionen mit dem benachbarten Loop 288-304 im Bereich 112-114 und 289-291 (als gestrichelte gelbe Linien eingezeichnet). Zum Vergleich gezeigt: Die Position der Loops bei der nicht-aktivierten *KI*PDC (in drei der vier Untereinheiten).

G: Verschiebung der C-terminalen Helix infolge der Aktivierung und Loopfixierung.

H: Bindung des Substratanalogons MAP an das C₂-Atom des Kofaktors TPP. Die mit dem Liganden interagierenden Aminosäurereste Asp28, His114, His115 und Glu477 sind als Stabmodell eingezeichnet. Zudem ist die Wechselwirkung von His115 mit der 4'-Aminogruppe des Kofaktors TPP als gestrichelte gelbe Linien hervorgehoben.

Der hier vorgestellte Mechanismus gilt für alle Untereinheiten der durch MAP und Pyruvat aktivierten PDC-Kristallstrukturen. Bei der Pyruvamid-aktivierten ScPDC_{E4770} müssen die einzelnen Untereinheiten separat betrachtet werden, da sich bei diesen der Besetzungsgrad durch den Liganden unterschied (siehe S. 79-82). Die beiden Untereinheiten, die sowohl im regulatorischen als auch im aktiven Zentrum vollständig mit Pyruvamid besetzt waren, weisen keine nennenswerten Differenzen zur MAPaktivierten KIPDC bzw. zur Pyruvat-aktivierten ScPDC_{D28A} und ScPDC_{E477Q} auf. In der Untereinheit, deren regulatorischer Bindungsort einen Besetzungsgrad von 50 % mit dem Analogon aufweist und wo das aktive Zentrum zugleich zu 20-30 % besetzt ist, sind die B-Faktoren der beiden Aktivierungsloops ca. 1,5 mal größer als bei den vollständig aktivierten Untereinheiten. Auch die β-Domäne weist geringfügig höhere B-Faktoren auf, befindet sich jedoch wie die C-terminale Helix in der aktivierten Position. Im Falle der Untereinheit, die kein Pyruvamid im aktiven Zentrum enthält und deren regulatorisches Zentrum einen Besetzungsgrad von ca. 50 % aufweist, wobei die Elektronendichte dort sehr diffus ist, ist der Loopbereich 289-303 so schlecht definiert, dass er aus der PDB-Datei entfernt werden musste. Die Position des anderen Aktivierungsloops liegt hier zwischen der nativen Struktur (siehe auch Abb. 17B) und der aktivierten Position (Abb. 33). Die B-Faktoren dieses Loops sind mehr als

doppelt so groß wie bei den beiden vollständig aktivierten Untereinheiten. Der Drehwinkel der β -Domäne liegt zwischen dem des nativen und dem des aktivierten Zustandes. Allerdings sind die B-Faktoren der gesamten β -Domäne wie bei der nativen PDC deutlich erhöht und auch die Position der C-terminalen Helix entspricht der nicht-aktivierten Struktur. Daher muss diese Untereinheit als nicht-aktiviert betrachtet werden¹.

Die strukturellen Ergebnisse dieses Kapitels geben eine Erklärung für die kinetischen Befunde aus Abschnitt 3.5. Das Molekülvolumen von Pyruvamid unterscheidet sich nur unwesentlich von dem des Pyruvates. Daher sollte das Analogon nach sterischen Kriterien etwa so schnell an den regulatorischen Bindungsort gelangen können wie das Substrat. Auch die Carbonylaktivität des C₂-Atoms sollte ähnlich sein und ist für Pyruvamid eher noch größer. Die primäre Bindung an Cys221 sollte daher nicht beeinflusst sein, was durch die nahezu identischen Werte für K_a (siehe Tab. 6 und den dazugehörigen Text) belegt wird. Andererseits sind aufgrund der fehlenden Ladung der Säureamidgruppe des Pyruvamides die Interaktionen zu den umgebenden Histidinen 92, 225 und 310 schwächer. Dies gilt insbesondere für His92, von dem bekannt ist, dass es geladen vorliegt (Baburina *et al.*, 1996) und welches daher mit der Carboxylatgruppe vom Pyruvat und der Methylphosphonatgruppe vom MAP Ladungswechselwirkungen eingehen kann. Letztlich führen die fehlenden ionischen Wechselwirkungen zu einer Beeinflussung der Loopflexibilität, was einen größeren K_{iso}-Wert zur Folge hat.

Die kinetischen Ergebnisse für Methylacetylphosphonat sind durch das größere Molekülvolumen, verglichen mit Pyruvat und Pyruvamid, erklärbar. Der gegenüber Pyruvat und Pyruvamid deutlich erhöhte K_a-Wert (siehe Tab. 5) reflektiert eine schwächere Bindung von MAP an das regulatorische Zentrum bzw. eine erleichterte Abspaltung von diesem. Sofern die Bindung aber erfolgt ist, gibt es aufgrund der gleichen negativen Ladung der Methylphosphonatgruppe von MAP und der Carboxylatgruppe von Pyruvat, keine Einschränkungen hinsichtlich der den Wechselwirkungen mit den flankierenden Histidinen. Daher sollte sowohl der Isomerisierungsschritt (Loopfixierung) als auch die Rückreaktion der Isomerisierung (Loopflexibilisierung) mit der

¹ Zum Vergleich der Position der β-Domänen und der Aktivierungsloops der Pyruvamid aktivierten *Sc*PDC_{E477Q} siehe auch Abb. 43J im Anhang III, S. 125.

gleichen Geschwindigkeitskonstante wie bei der Pyruvat-aktivierten PDC erfolgen. Dies führt letztlich zu einem identischen K_{iso}-Wert.

Joseph *et al.* (2006) diskutierten, dass die Loopfixierung kein struktureller Effekt der Aktivierung, sondern eine Folge der Substratbindung an das aktive Zentrum ist. Dies kann durch die Kristallstruktur der Pyruvat-aktivierten *Sc*PDC_{E477Q} ausgeschlossen werden. Wie bereits auf S. 78 beschrieben fehlt bei dieser Struktur das C₂-Atom des Kofaktors, so dass keine Bindung von Pyruvat im aktiven Zentrum möglich ist. Dennoch liegen die beiden Aktivierungsloops fixiert vor, die β-Domäne hat sich bei einer allgemeinen Verringerung der B-Faktoren um $\approx 17^{\circ}$ gedreht und die C-terminale Helix liegt eng an den Loops an. Somit liegen alle Untereinheiten trotz fehlenden Substrates im katalytischen Zentrum aktiviert vor.

Das hier vorgestellte Aktivierungsmodell widerspricht einigen Kernpunkten des Newark-Modells. Die Newark-Gruppe versuchte mit Mutationsstudien zu zeigen, dass die Loops 104-115 und 288-304 nicht den Signalübertragungsweg vom regulatorischen zum aktiven Zentrum darstellen, wohl aber die Kaskade His92 \rightarrow Glu91 \rightarrow Val410-Gly413. Die kinetischen Ergebnisse dieser zahlreichen Mutationsstudien bleiben richtig. Allerdings sind die daraus gezogenen Schlussfolgerungen zu hinterfragen. So ergibt sich beispielsweise aus dem Aufbau der reorganisierten Loops 104-115 und 288-304 im aktivierten Zustand und den spezifischen Aktivitäten einzelner Varianten dieser Loops (Joseph et al., 2006) die Konsequenz, dass sich der Einfluss einer Mutation auf die Enzymaktivität mit zunehmenden Abstand vom aktiven Zentrum verringert. Die geringsten k_{kat} -Werte treten bei den Varianten D291A und N293A auf. Asp291 interagiert mit dem Histidinrest 114 des aktiven Zentrums über eine Ionenbeziehung und ist damit wichtig für die Aktivierung. Ähnliches gilt für die Variante W412A (Li & Jordan, 1999). Auch diese weist eine deutlich reduzierte spezifische Aktivität auf. Der Austausch der voluminösen Aminosäure Tryptophan durch das kleine Alanin stellt dem Loop 288-304 aber deutlich mehr Platz zur Verfügung, was dessen Fixierung möglicherweise behindert. Andererseits führt die Substitution von Tryptophan durch Phenylalanin nur zu einem moderaten Aktivitätsverlust. Daher sind die Schlussfolgerungen der Newark-Gruppe zu den kinetischen Ergebnissen kritisch zu werten, solange diese nicht durch Kristallstrukturen, vorzugsweise in Ab- und Anwesenheit von Effektoren, abgesichert sind.

Der Vergleich der hier vorgestellten Kristallstrukturen von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen mit denen der Phenylpyruvatdecarboxylase aus Azospirillum brasilense (Versées et al., 2007^{a, b}; siehe auch Kapitel 1.3 S. 19-20) zeigt, dass in beiden Fällen die Substrataktivierung mit einer Reorganisation des Loops 288-304 (280-294 bei der AbPPDC) und einer Fixierung und Reorganisation des Loops 104-115 (104-120 bei der AbPPDC) verbunden ist. Die Abweichung der Looppositionen im aktivierten Zustand ist mit 2,7 Å (Loop 104-115) bzw. 4,9 Å (Loop 288-304; zum Vergleich 2,7 Å für den Loopbereich 288-297) allerdings größer als zwischen den beiden Hefe-Pyruvatdecarboxylasen aus Kluyveromyces lactis und Saccharomyces cerevisiae sowie zwischen den Hefe-Enzymen und der ZmPDC oder EclPDC (siehe auch Tab. 9 auf S. 86). Die AbPPDC besitzt kein Cys221. Diese Aminosäure kommt nur bei den Hefe-Pyruvatdecarboxylasen vor. Daher basiert die Substrataktivierung der AbPPDC auch nicht auf eine Thiohemiketalbildung. Stattdessen befindet sich die regulatorische Bindestelle rund 13 Å entfernt. Möglicherweise spiegelt der Substrataktivierungsmechanismus der AbPPDC nach Versées et al. (2007^b) auch den Aktivierungsmechanismus der substratregulierten Pyruvatdecarboxylasen wieder, die wie die Erbsen- oder Weizen-PDC ebenfalls kein Cys221 besitzen. Warum die Hefe-Pyruvatdecarboxylasen jedoch eine so außergewöhnliche regulatorische Bindungsstelle besitzen, kann hier nicht geklärt werden und bedarf weiterer Studien.

Im aktiven Zentrum resultiert die Substrataktivierung in einer drastischen Beschleunigung der Umpolungsreaktion zum TPP-Carbanion (Kern *et al.*, 1997; Abb. 5, S. 17). Im nativen Zustand der PDC ist diese Reaktion mit 1 s⁻¹ zu langsam um die vergleichsweise hohen k_{kat} -Werte (60 s⁻¹) von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen erklären zu können. Erst nach Zugabe des Substratanalogons Pyruvamid ermittelten Kern *et al.* (1997) eine hinreichend große Geschwindigkeitskonstante (600 s⁻¹), mit der sich die k_{kat} -Werte der PDC begründen lassen. Aus den hier vorgestellten Kristallstrukturen ergeben sich drei Möglichkeiten wie die Substrataktivierung die Geschwindigkeitskonstante der Umpolungsreaktion beeinflussen kann. Als erstes ist eine Abschottung des aktiven Zentrums durch das Lösungsmittel denkbar. Der Thiazoliumring ist in der deprotonierten Form als Ganzes neutral geladen (Abb. 5). Daher nimmt in zunehmend apolareren Lösungsmitteln die C-H-Acidität des C₂-Atoms des Kofaktors zu (Crosby & Lienhard, 1970). Eine Lösungsmittelabschottung zeigt sich auch bei den aktivierten Kristallstrukturen. Als Folge der Fixierung der beiden Loops 104115 und 288-304 legt sich die C-terminalen Helix über das aktive Zentrum. Hierdurch bleibt nur noch ein enger Kanal zur Moleküloberfläche offen. Zum zweiten gelangt His115 durch die Fixierung und die Reorganisation des Loops 104-115 in räumliche Nähe zum Aminostickstoffatom des Kofaktors (Abb. 35A). Durch diese Interaktion kann sich der Protonenzug auf das C₂-Atom des Kofaktors erhöhen. Liu *et al.* (2001) haben durch Mutationsstudien die Bedeutung von His115 für die Katalyse nachgewiesen. Als drittes ist es ebenfalls möglich, dass auch der Ligand selbst zur Kofaktoraktivierung beiträgt wie schon Ermer (1988) und Tittmann (2000) diskutierten. Befindet sich ein aktivierender Ligand in TPP-Nähe, ist eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Ketocarbonylsauerstoffatom des Liganden und der N₄-Gruppe des Kofaktors möglich (Abb. 35B). Auch dies könnte den Protonenzug am Kofaktor-C₂-Atom erhöhen. Um die strukturellen Änderungen des aktiven Zentrums erklären zu können, ist es dabei notwendig, dass His115 (Abb. 35B) bzw. die oben beschriebene Lösungsmittelabschottung für die korrekte Ausrichtung des Liganden die Vorraussetzung ist.



Abb. 35: Mögliche Beeinflussung der C-H-Acidität des C₂-Atoms des Kofaktors TPP durch das fixierte und neu orientierte His115 (A) bzw. durch den Liganden (hier Pyruvat, B).

Zum Abschluss dieses Kapitels soll die Produktinhibierung der PDC betrachtet werden. Es wurde vermutet, dass möglicherweise weniger die Substrataktivierung als vielmehr die seit langem bekannte Produktinhibierung durch Acetaldehyd (Lohmann & Schuster, 1937) eine physiologische Bedeutung hat. Aufgrund der gesundheitsgefährdenden Eigenschaften dieser reaktiven Verbindung (LD₅₀ = 700-1000 mg pro kg Körpergewicht bei Ratten bzw. Mäusen), könnte es für das Überleben einer Zelle von Bedeutung sein, sehr schnell auf schwankende Acetaldehydkonzentrationen mit einer veränderlichen PDC-Aktivität zu reagieren. Hübner & Schellenberger (1970) ermittelten für Pyruvatkonzentrationen im Bereich der Substratsättigung eine nichtkompetitive Inhibierung. Aufgrund der vorliegenden Kristallstrukturen ist es nahe liegend, dass Acetaldehyd aufgrund der hohen Carbonylaktivität, ebenfalls am Cystein 221 binden kann. Auf der anderen Seite fehlt, verglichen mit Pyruvat, MAP und Pyruvamid, die polare bzw. geladene Gruppe. Folglich sind Wechselwirkungen mit den Histidinen, die die regulatorische Bindungsstelle flankieren, unmöglich. Um die Bindung von Acetaldehyd an Cys221 nachzuweisen, wurde versucht die Kristallstruktur in Gegenwart dieser Substanz zu lösen. Da die Kokristallisation keinen Erfolg brachte, sollten Kristalle der Pyruvamid-aktivierten ScPDC_{E4770} mit Acetaldehyd gesoaked werden. Dieses brachte aber nicht den erhofften Erfolg. Die Kristalle streuten zwar bis 2,1 bzw. 2,5 Å, allerdings entspricht die Elektronendichtekarte nicht dem was für eine solche Auflösung zu erwarten wäre. Der durchschnittliche B-Faktor aller Atome hat mit $\approx 45 \text{ Å}^2$ den doppelten Betrag der anderen hier vorgestellten Kristallstrukturen (außer Pyruvamid-aktivierte KIPDC, siehe auch Tab. 11 im Anhang auf S. 122). Die Ursache für die schlechte Qualität der Elektronendichtekarte sollte an globalen strukturellen Änderungen liegen, die auch rasche Auflösungserscheinungen des Kristalls zur Folge haben. Wie im folgenden Kapitel gezeigt wird, dreht sich die PDC im Rahmen der Substrataktivierung von einer halbseitig geschlossenen Dimer-Dimer-Anordnung in Richtung einer offenen. Bei der Inaktivierung durch Acetaldehyd erfolgt die Rotation umgekehrt von offen zu halbseitig geschlossen.

Dennoch war es möglich, die Kristallstruktur der durch Acetaldehyd inhibierten ScPDC_{E477Q} zu lösen. Dabei weisen in beiden Acetaldehydstrukturen die für die Aktivierung wichtigen Loops 104-115 und 288-304 höhere B-Faktoren als der Durchschnitt der restlichen C_a-Atome auf. Somit nimmt die PDC unter Einfluss von Acetaldehyd erneut die nicht-aktivierte Struktur an. Zwar ist Elektronendichte an dem regulatorischen Bindungsort vorhanden, sie lässt sich aber aufgrund einer sehr diffusen Form nicht eindeutig dem PDC-Reaktionsprodukt zuordnen. Das Volumen der Elektronendichte entspricht jedoch eher dem von Acetaldehyd als dem von Pyruvamid. Insbesondere hydratisiertes Pyruvamid hätte ein signifikant größeres Molekülvolumen. Daher ist es nahe liegend, dass Acetaldehyd am Cys221 bindet, aufgrund fehlender Interaktionsmöglichkeiten mit den Histidinen 92, 225 und 310 die Aktivierungsloops flexibilisiert und die Substrataktivierung so rückgängig macht. Das aktive Zentrum ist unbesetzt. Demnach wurde Pyruvamid infolge des Deaktivierungsprozesses aus dem aktiven Zentrum entfernt, jedoch nicht durch Acetaldehyd ersetzt. Die physiologische Bedeutung der seit langem bekannten Abhängigkeit der S_{0.5}-Werte der Hefe-PDC von der Phosphatkonzentration (Boiteux & Hess, 1970) haben van Urk *et al.* (1988) bereits ausführlich diskutiert. Krieger (2000) zeigte mit *stopped-flow*-Messungen, das Phosphat und Pyruvat um das regulatorische Zentrum der *KI*PDC kompetieren. Allerdings waren zum damaligen Zeitpunkt die molekularen Ursachen hierfür noch unklar. Mit den jetzt vorliegenden Kristallstrukturen ist es nahe liegend, dass das negativ geladene Phosphat mit den drei Histidinen 92, 225 und 310 wechselwirkt. Da eine kovalente Bindung des Phosphates am Cys221 ausgeschlossen werden kann, ist eine Interaktion zwischen α - und β -Domäne nicht möglich. Letztlich führt dies dazu, dass mit steigender Phosphatkonzentration die Substrataktivierung gestört wird, was sich in zunehmenden S_{0,5}-Werten äußert.

Trotz detaillierter Erkenntnisse zur Substrataktivierung kann die Frage nach der globalen Dimer-Dimer-Rotation (siehe Kapitel 1.3, S. 16-18) mit den hier beschriebenen Kristallstrukturen nicht beantwortet werden. Dieses Thema soll im folgenden Kapitel behandelt werden.

3.7 *SAXS*-Studien zur globalen Dimer-Dimer-Rotation von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen während der Aktivierung

Beim Vergleich der nativen *Sc*PDC-Kristallstruktur von Dyda *et al.* (1993) und Arjunan *et al.* (1996) mit der Pyruvamid-aktivierten *Sc*PDC-Struktur stellten Lu *et al.* (1997, 2000) eine globale Drehung der Dimere von einer offenen zu einer halbseitig geschlossenen Form fest. Daneben ermittelten Furey *et al.* (1996) je eine Kristallstruktur der Ketomalonat-aktivierten *Sc*PDC in der offenen und der geschlossenen Form. Zudem gibt es Befunde, dass auch native *Sc*PDC-Kristallstrukturen in der halbseitig geschlossenen Form vorliegen (Jordan *et al.*, 2004). Demgegenüber ist bei den hier vorgestellten neuen Hefe-PDC-Kristallstrukturen ebenso wie bei der *Ab*PPDC (Versées *et al.*, 2007^{a, b}) die Aktivierung mit einem Übergang von einer halbseitig geschlossenen zu einer offenen Form verbunden. Es ist daher die Annahme nahe liegend, dass die Dimer-Dimer-Anordnung in Kristallen von Kontakten mit symmetrieverwandten Molekülen stark beeinflusst wird und somit nicht notwendigerweise dem Arrangement in Lösung entspricht. Eine mögliche Ursache sind die nur schwachen Wechselwirkungen zwischen den beiden Dimeren, wie aus den kleinen Kontaktflächen (Tab. 1) hervorgeht. Aus *SAXS*-Studien ist bekannt, dass es globale Strukturänderungen der PDC nach Zugabe eines aktivierenden Liganden geben muss (Hübner *et al.*, 1990; König *et al.*, 2000^{a, b}, 2004; Svergun *et al.*, 2000). Allerdings konnte auf Grundlage dieser Untersuchungen nicht eindeutig festgestellt werden, unter welchen Bedingungen die offene bzw. die geschlossene Tetramerform vorliegt. Mittlerweile hat sich die Qualität der Datenaufnahme am Messplatz X-33 (EMBL, Hamburg) signifikant verbessert (Rössle *et al.*, 2007). Daher können Aussagen über die Dimer-Dimer-Anordnung von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen in Lösung getroffen werden.

Zunächst wurde anhand der vorliegenden PDC-Kristallstrukturen überprüft, welche Dimer-Dimer-Orientierungen bei Hefe-Pyruvatdecarboxylasen überhaupt möglich sind (Abb. 36). Hierfür wurde eines der beiden Dimere fixiert, während das andere rotiert und verschoben wurde. Anschließend erfolgte ein Vergleich anhand sterischer Kriterien. Es ergab sich, dass lediglich die in den Kristallstrukturen auftretende



Abb. 36: Analyse der Hefe-Pyruvatdecarboxylasen aus *Kluyveromyces lactis* und *Saccharomyces cerevisiae* hinsichtlich möglicher Dimer-Dimer-Orientierungen. Zum Vergleich ist auch das Dimer der PDC aus *Zymomonas mobilis* gezeigt.

In den unteren Bildern deuten die Buchstaben A-F und die entsprechenden Pfeile ausgewählte Positionen des zweiten Dimers an, welches sich oberhalb des abgebildeten Dimers befindet (-x-Achse). Die dazugehörigen Abstände geben die Entfernung an, die vom zweiten Dimer überbrückt werden müsste (entfällt bei offener Form und beim *Zm*PDC-Drehwinkel; hier sind nur Wechselwirkungen über die hervorstehenden β-Domänen der Hefe-PDC möglich). komplett offene und halbseitig geschlossene Form realisierbar sind. Andere Formen sind aus verschiedenen Gründen auszuschließen. Einige Drehwinkel sind aufgrund ungünstig positionierter hydrophiler und hydrophober Seitenketten nicht möglich (z.B. der *Zm*PDC-Drehwinkel). Im Allgemeinen ist aber die Lage der β-Domänen ursächlich. Im Gegensatz zu allen anderen TPP-abhängigen Enzymen mit vergleichbarer Dimerstruktur (siehe Kapitel 1.2), sind aufgrund der weit hervorstehenden β-Domänen zwei Kontaktflächen vorhanden, die an der Dimer-Dimer-Interaktion beteiligt sein können. Der y-Achsen-Abstand zwischen den hervorstehenden β-Domänen eines Dimers beträgt 55 Å und ist damit fast immer zu gering, um das benachbarte Dimer zu überspannen. Lediglich in der halbseitig geschlossenen Form ist dies möglich (Δ = 52 Å). Zusätzlich ist hier aber noch eine y-Achsen Translokation von 4 Å notwendig. Daneben ist auch die offene Form möglich.

Im Folgenden wurden aus den Kristallstrukturen der offenen und halbseitig geschlossenen Form die theoretischen Streukurven und die dazugehörigen Gyrationsradien berechnet (Programm CRYSOL, Svergun *et al.*, 1995; Abb. 37). Dabei ergeben sich deutliche Unterschiede zwischen beiden Kurven. Im Falle der offenen Kristallstruktur ist der Anfangsanstieg der Streukurven deutlich steiler und es ist eine Bandenschulter bei ca. 1 nm⁻¹ zu erkennen. Infolgedessen nimmt der Gyrationsradius wie bei den Berechnungen von Furey *et al.* (1998) um 0,3 nm gegenüber der halbseitig geschlossenen Form zu (von 3,87 auf 4,17 nm). Für die Kurvenform ist es unerheblich, wel-



Abb. 37: Vergleich theoretischer Streukurven der halbseitig geschlossenen (schwarz) und der offenen Form (rot). Die Kurven wurden mit dem Programm CRYSOL (Svergun *et al.*, 1995) anhand der Kristallstrukturen der native *KI*PDC und der MAP-aktivierten *KI*PDC berechnet.

che Hefe-PDC-Spezies (*Saccharomyces* oder *Kluyveromyces*) genutzt wurde, welchen Drehwinkel die β -Domänen aufwiesen, ob die Loops 104-115 und 288-304 sowie die C-terminale Helix in der PDB-Datei vorhanden waren und wenn ja an welcher Position oder ob Effektoren gebunden waren. Für das Aussehen der Streukurve ist es nur wichtig, ob die offene oder geschlossene Form zugrunde gelegt wird.

Zum Vergleich mit den theoretischen Streukurven wurden experimentelle Kurven in An- und Abwesenheit verschiedener Liganden bestimmt. Abb. 38A zeigt zwei ausgewählte Streukurven der *KI*PDC und Abb. 38B die zusammengefassten Ergebnisse für die *KI*PDC, die *Sc*PDC, die *Sc*PDC_{E477Q} und die nicht substratregulierte *Zm*PDC bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen. Die Proteinkonzentration wurde mit 2,5 mg/ml bewusst niedrig gewählt, da die drei verwendeten Pyruvatdecarboxylasen nichtideale Proteinlösungen bilden. Aufgrund von intermolekularen Wechselwirkungen verkleinert sich der Gyrationsradius bei höheren PDC-Konzentrationen zunehmend (König & Koch, 1998; Kutter *et al.*, 2007).



Abb. 38: A: Experimentelle Streukurven der *KI*PDC in Abwesenheit (grau) und Anwesenheit (dunkelrot) von 77 mM Methylacetylphosphonat und Vergleich mit den theoretischen Streukurven der halbseitig geschlossenen (schwarze Punkte) und der offenen Form (rote Punkte). Die blauen Pfeile deuten die durch die Aktivierung hervorgerufene Änderung an.
B: Abhängigkeit des Gyrationsradius von der Ligandenkonzentration. *Zm*PDC, Schwarz; *KI*PDC und MAP, rot; *KI*PDC und Pyruvamid, blau; *Sc*PDC und MAP, dunkelrot; *Sc*PDC und Pyruvamid, magenta; *Sc*PDC_{E477Q} und Pyruvat, dunkelgrau. Linearer Fit für die *Zm*PDC, alle anderen Kurven sind nach Glg. 9 gefittet.

Messbedingungen: 2,5 mg/ml PDC in 100 mM MES pH 6,0 mit 1 mM DTT, 1 mM TPP und 1 mM Magnesiumsulfat.

Der Vergleich der gemessenen mit den theoretischen Streukurven zeigt deutliche Übereinstimmungen (Abb. 38A) zwischen der nativen *KI*PDC und der halbseitig geschlossenen Form bzw. zwischen der mit 77 mM MAP-aktivierten *KI*PDC und der offenen Form. Ohne Effektorzugabe und bei der halbseitig geschlossenen Form ist der Anfangsanstieg signifikant flacher. Zudem ist keine Bandenschulter bei einem Streuvektor von 1 nm⁻¹ zu erkennen. Nach Zugabe des aktivierenden Liganden und bei der offenen Form steigt der Anfangsanstieg an, es wird eine Bandenschulter bei 1 nm⁻¹ sichtbar und der Gyrationsradius nimmt um 0,3 nm von 3,86 nm auf 4,16 nm zu.

Die erhöhte Ionenstärke durch den Effektor kann als Ursache der veränderte Kurvenform ausgeschlossen werden, wie Experimente mit variierender Ammoniumsulfatkonzentration zeigten (ohne Abb.). Zudem treten Gyrationsradienänderungen nur in der tetrameren Form von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen auf. Nach einer durch Erhöhung des pH-Wertes induzierten Dimerisierung sind die Streukurven in An- und Abwesenheit aktivierender Liganden identisch. Die als Negativkontrolle eingesetzte nicht substratregulierte *Zm*PDC zeigte keine Beeinflussung der Gyrationsradien nach Zugabe des Substratanalogons MAP (Abb. 38B, schwarze Punkte und schwarz gestrichelte Linie). Daher legen bereits diese experimentellen Befunde aus *SAXS*-Messungen eine globale Strukturänderung von offen zu halbseitig geschlossen infolge der Substrataktivierung nahe.

Die durch die Gegenwart von Aktivatoren bedingten Veränderungen der Streukurven sind reversibel und lassen sich durch Verdünnen oder Acetaldehydzugabe umkehren. Dabei genügen bereits sehr geringe Konzentrationen des Reaktionsproduktes (< 1 mM bei vorheriger Aktivierung der $ScPDC_{E477Q}$ mit 7 mM Pyruvat; ohne Abb.), um die offene Streukurvenform zu erzwingen.

Abb. 38B illustriert die Abhängigkeit der Gyrationsradien von der Ligandenkonzentration für verschiedene Pyruvatdecarboxylasen. Der zweite Streuparameter, I(0), ist unabhängig von der Konzentration der Effektoren, so dass Änderungen des Oligomerisierungszustandes auszuschließen sind.

Abgesehen von der nicht substratregulierten *Zm*PDC nimmt bei allen Pyruvatdecarboxylasen der Gyrationsradius von annährend demselben Ausgangswert bis zu einem Sättigungswert zu. Dieser Effekt ist unabhängig vom verwendeten Effektor (MAP, Pyruvamid oder Pyruvat) und der Enzymspezies.

Bei kleinen Ligandenkonzentrationen ist ein sigmoider Kurvenverlauf festzustellen. Allerdings ist die Anzahl der Messpunkte für eine Einzelkonstantenbestimmung nach der verwendeten Fitting-Gleichung (Spinka, unveröffentlicht)

$$R_{G} = R_{G_{0}} + \Delta R_{G_{max}} \cdot \frac{[Ligand] \cdot K_{1} + [Ligand]^{2}}{K_{a} \cdot K_{iso} \cdot K_{1} + (1 + K_{iso}) \cdot K_{1} \cdot [Ligand] + [Ligand]^{2}}$$
Glg. 9

 R_G , Gyrationsradius; R_{G_0} , Gyrationsradius bei 0 M Ligandenkonzentration; $\Delta R_{G_{max}}$, maximale Gyrationsradiendifferenz; [Ligand], Ligandenkonzentration. Zur Definition von K_a, K_{iso} und K₁ siehe Schema 2.

zu gering, so dass die in Abb. 38B gezeigten Kurven nur zur besseren Visualisierung dienen.

Wie aus Abb. 38B und Tab. 10 ersichtlich wird, ist $\Delta R_{G_{max}}$ für Pyruvamid um rund ein Drittel kleiner als für MAP und Pyruvat (siehe auch Tab. 10). Nimmt man die Gyrationsradienänderung als Marker für die Substrataktivierung, so lässt sich neben UV/VIS-Experimenten und der Röntgenstrukturanalyse mit der dritten unabhängigen Methode zeigen, dass Pyruvamid die PDC nur zu 60-70 % aktivieren kann.

Die Halbsättigungskonzentration für Abb. 38B, die den Anteil der aktivierten Spezies wiedergibt, ist für MAP mit \approx 25 mM und für Pyruvamid \approx 33 mM etwas kleiner und für Pyruvat mit 5 mM etwas größer als nach den kinetischen Daten aus Kapitel 3.5 erwartet wurde (Tab. 10). Allerdings war die Verteilung der Messpunkte bei den *SAXS*-Experimenten auch nicht ideal gewählt.

Unter der Annahme, dass in Lösung nur die offene oder halbseitig geschlossene PDC-Spezies vorkommt und Zwischenstufen oder andere Oligomere vernachlässigt werden können, sollten die Anteile der beiden Formen in Abhängigkeit von der Effektorkonzentration bestimmt werden. Dies geschah mittels des Programms OLIGOMER (Bestandteil des ATSAS-Programmpaketes von Dr. D. I. Svergun, EMBL-Hamburg). Über die Methode der kleinsten Quadrate wurden hierfür die Streukurven, die Abb. 38B zugrunde liegen, mit den theoretischen Streukurven für die offene und halbseitig geschlossene Form (siehe Abb. 37) verglichen. Die hieraus resultierenden Anteile der offenen Form sind in Abb. 39 dargestellt. Die Kurven wurden nach der Gleichung

$$o_{F}\% = \frac{[Ligand] \cdot K_{1} + [Ligand]^{2}}{K_{a} \cdot K_{iso} \cdot K_{1} + (1 + K_{iso}) \cdot K_{1} \cdot [Ligand] + [Ligand]^{2}} \cdot 100\%$$
 Glg. 10

 $o_F\%$, Anteil offene Form in %; [Ligand], Ligandenkonzentration. Zur Definition von K_a , K_{iso} und K_1 siehe auch Schema 2.

gefittet.

Die Abhängigkeit des Anteils der offenen Form von der Ligandenkonzentration ähnelt der Abhängigkeit der Gyrationsradienerhöhung bzw. des Aktivierungsgrades bestimmt aus UV/VIS-kinetischen Messungen (Abb. 39, exemplarisch gezeigt für die *KI*PDC und das Substratanalogon MAP; für die zusammengefassten Ergebnisse der anderen Liganden sowie für die *Sc*PDC und für die *Sc*PDC_{E477Q} siehe Tab. 10). Wie bei der Hefe-PDC im Komplex mit MAP nimmt auch für *Sc*PDC_{E477Q} und Pyruvat der Anteil der offenen Form von 0 auf 100 % zu (Abb. 39 Insert; Tab. 10). Im Vergleich zu MAP geschieht dies aufgrund der höheren Bindungsaffinität von Pyruvat aber bereits bei kleineren Ligandenkonzentrationen. Für Pyruvamid und beide Hefe-PDC-Spezies ergibt sich eine Steigerung und von 0 auf 70% (Abb. 39 Insert; Tab. 10). Auch hier zeigt sich, dass Pyruvamid die Hefe-Enzyme nicht vollständig aktivieren kann.



 Abb. 39: Vergleichende Darstellung des Anteils der offenen PDC-Form (schwarz), der Gyrationsradienänderung (rot) und des Aktivierungsgrades bestimmt aus UV/VIS-kinetischen Messungen (blau) für die *KI*PDC in Abhängigkeit von der MAP-Konzentration.
 Insert: Anteil der offenen PDC-Form für die *Sc*PDC_{E477Q} in Pyruvatgegenwart (schwarz) sowie für die *KI*PDC in Gegenwart von Pyruvamid (rot) und MAP (blau). Fit nach Glg. 5 (Aktivierungsgrad), Glg. 9 (Gyrationsradienänderung) bzw. Glg. 10 (Abhängigkeit des Anteils der offenen PDC-Form).

Ein weiterer Hinweis, dass die Erhöhung der Gyrationsradien tatsächlich mit der Substrataktivierung im Zusammenhang steht, erbrachten *SAXS*-Kinetiken zur Aktivatorbindung und -abspaltung. Abb. 40A zeigt die Ergebnisse für die Bindung von MAP an die *KI*PDC. Die temperaturkorrigierten Geschwindigkeitskonstanten (Abb. 40B) stimmen gut mit den aus UV/VIS-kinetischen Experimenten abgeleiteten Werten überein

Tab. 10: Parameter der Substrataktivierung von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen bestimmt aus SAXS-Messungen und Vergleich zu UV/VIS-kinetischen Experimenten.

En-11/m	Ligond	AD in Maxima maxima Halbaättigungakanzantratian in mA				tion in mM	
Enzan	сіуапо		iviaxima-	maxima-			
		nm (in %	ler Anteil	ler Akti-	Gyra-	Oligomer	UV/VIS-
		vom	offene	vierungs-	tionsra-	Analyse	Aktivitäts-
		Maxi-	Form in	grad in %;	dienab-		mes-
		mum)	%; Oligo-	UV/VIS-	hängig-		sungen
			MER Ana-	Aktivi-	keit		
			lyse	tätsmes-			
			-	sungen			
<i>KI</i> PDC,	Pyruvat	nicht	nicht	100 ¹	nicht	nicht	2,3
ScPDC	-	messbar	messbar		messbar	messbar	
<i>KI</i> PDC	MAP	0,30	100	100	22	24	37
		(100)					
<i>KI</i> PDC	Pyruv-	0,20	76	75	31	54	71
	amid	(67)					
ScPDC	MAP	0,27	100	100	27	29	32
		(90)					
ScPDC	Pyruv-	0,19	68	69	35	34	65
	amid	(63)					
ScPDC _{E477Q}	Pyruvat	0,28	100	nicht	5	2,5	nicht
	-	(93)		bestimmt			bestimmt

¹ Referenzwert.

(Kapitel 3.5, Abb. 21 und S. 61-62). Dies gilt auch für *SAXS*-Kinetiken der Dissoziation des *KI*PDC-MAP-Komplexes im Rahmen von Verdünnungsexperimenten entsprechend zu Abb. 23 (Abb. 40A, Insert). Die Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung beträgt bei einem Fit 1. Ordnung 0,0058 s⁻¹ (0,04 auf 25 °C temperaturkorrigiert¹) und ist damit von vergleichbarer Größe wie k_{-iso} aus UV/VIS-photometrischen Verdünnungsexperimenten (k_{-iso} (*KIPDC*, MAP) = 0,07 s⁻¹; siehe Tab. 6). Erwartungsgemäß war die Inaktivierungsgeschwindigkeit unabhängig von der eingesetzten Analogonkonzentration (ohne Abb.). Die Geschwindigkeitskonstanten für die Bindung und Abspaltung von Pyruvamid und Pyruvat sind ebenfalls von gleicher Größenordnung wie die aus UV/VIS-photometrischen Experimenten (ohne Abb.).

Die molekularen Ursachen für die Dimer-Dimer-Rotation ergeben sich aus den Kristallstrukturen. Wird die aktivierte Hefe-PDC von der offenen zur halbseitig geschlossenen Form rotiert und verschoben, so treten an mehreren Stellen der Aktivierungsloops 104-115 und 288-304 sowie bei der C-terminalen Helix Überlagerungen von Aminosäureresten auf. Letztlich führen die Bewegungen und Neuorientierungen dieser Reste im Rahmen der Substrataktivierung dazu, dass die offene Form energetisch günstiger ist und in Lösung angereichert wird. Daher ist die Dimer-Dimer-Rotation als Folge der Aktivierung zu bewerten.

¹ Experimentell bestimmter Umrechnungsfaktor: 6,3.



Abb. 40: A: SAXS-Kinetiken der Aktivierung der *KI*PDC durch MAP bei verschiedenen Analogonkonzentrationen bei 4 °C. Fit entsprechend einer Reaktion 1. Ordnung. Geschwindigkeitskonstanten: 55 mM MAP (schwarz), 0,0011 s⁻¹; 138 mM MAP (rot), 0,0032 s⁻¹; 177 mM MAP (blau), 0,011 s⁻¹.

Insert: Verdünnungsexperiment der MAP-aktivierten *KI*PDC (von 66,3 mM auf 9,4 mM) zur Bestimmung der Inaktivierungsgeschwindigkeit bei 4°. Fit entsprechend einer Reaktion 1. Ordnung. Geschwindigkeitskonstante: 0,0058 s⁻¹.

B: Vergleich der auf 25 °C temperaturkorrigierten Geschwindigkeitskonstanten der MAP-Aktivierung aus A (rot; experimentell bestimmter Umrechnungsfaktor = 6,3) mit den k_{obs} -Werten der MAP-Aktivierung aus UV/VIS-photometrischen Experimenten (schwarz; siehe auch Abb. 21B).

4 Ausblick

Um zusätzliche Informationen über den Reaktionsmechanismus von Hefe-Pyruvatdecarboxylasen zu gewinnen, sind weitere Kristallstrukturen notwendig. Ähnlich wie bei der *Ab*PPDC (Versées *et al.*, 2007^b) wäre es beispielsweise wünschenswert die Hefe-PDC in Gegenwart des inaktiven Kofaktoranalogons 3-deaza-TPP sowie von 2-(1-Hydroxyethyl)-3-deaza-TPP zu kristallisieren.

Weitere Daten zur Regulation der *Sc*PDC bzw. der *KI*PDC könnten durch hochaufgelöste Strukturdaten der Enzyme im Komplex mit Acetaldehyd und auch mit Phosphat gewonnen werden. Zusätzlich bietet sich auch die kristallographische Untersuchung von Varianten des regulatorischen Zentrums sowie der Aktivierungsloops an.

Selbst für Pyruvatdecarboxylasen ist die regulatorische Bindestelle Cys221 eine Ausnahme. Diese Aminosäure kommt nur bei den Hefe-Enzymen vor. Daher stellt sich die Frage, warum es bei diesen Spezies ein so ungewöhnliches regulatorisches Zentrum gibt. Zunächst wäre es jedoch erstrebenswert den Aktivierungsmechanismus von nicht Hefe-Pyruvatdecarboxylasen, wie z.B. der PDC aus Erbsen- oder Weizenkeimlingen, aufzuklären. Hierfür würden sich ebenfalls Röntgenkristallographische Untersuchungen in An- und Abwesenheit aktivierender Liganden anbieten.

Bei den kinetischen *SAXS*-Experimenten wäre eine Verkürzung der Messzeit wünschenswert. So könnten die Geschwindigkeitskonstanten des Überganges zwischen offener und halbseitig geschlossener PDC-Struktur besser aufgelöst werden. Möglicherweise sind solche Messungen an der neuen *SAXS-Beamline* des PETRA-3-Speicheringes am DESY-Hamburg möglich.

Da Methylacetylphosphonat die Hefe-PDC im Gegensatz zu Pyruvamid vollständig aktivieren kann, ist es als Substratanalogon besser geeignet die Eigenschaften von Pyruvat zu imitieren. Daher bietet es sich an, zumindest einige der in Vergangenheit in Gegenwart von Pyruvamid durchgeführten Experimente für MAP zu wiederholen. Für die Substrataktivierung wäre es beispielsweise interessant zu erfahren, um welchen Faktor Methylacetylphosphonat den H-D-Austausch am C₂-Atom des Kofaktors TPP beschleunigt.

5 Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wird über die allgemeine Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase aus *Neurospora crassa* berichtet. Als Vorraussetzung für die kinetischen und strukturellen Untersuchungen an diesem Protein wurde ein Reinigungsprotokoll entwickelt.

Für die *Nc*PDC konnte eine Regulation der katalytischen Aktivität durch verschiedene lonen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Hefeenzymen führt Phosphat zu einer Unterdrückung statt Verlängerung von *lag*-Phasen in den Progresskurven bei gleichzeitiger Steigerung der katalytischen Aktivität. Für die *Nc*PDC ergibt sich mit 0,1 mM auch der kleinste aller bisher für Pyruvatdecarboxylasen gemessenen K_M-Werte. Eine weitere Besonderheit dieser PDC-Spezies ist das vergleichsweise niedrige pH-Optimum mit einem Betrag von 5,1. Strukturell ließ sich ein breites Spektrum verschiedener Oligomere bis zum Hexadecamer nachweisen.

Im Weiteren wird die Substrataktivierung der beiden Pyruvatdecarboxylasen aus *Kluyveromyces lactis* und *Saccharomyces cerevisiae* näher beleuchtet.

Zur Charakterisierung der Aktivierung wurden die beiden Substratanaloga Pyruvamid und Methylacetylphosphonat genutzt. Durch den kinetischen Vergleich der beiden Analoga sowie durch Kristallstrukturen der nativen *KI*PDC, der *KI*PDC im Komplex mit MAP, der *Sc*PDC_{E477Q} im Komplex mit Pyruvamid sowie der *Sc*PDC_{D28A} und der *Sc*PDC_{E477Q} im Komplex mit dem Substrat Pyruvat, konnte ein Aktivierungsmechanismus aufgestellt werden, der zwei ältere Modelle miteinander verbindet und erweitert.

Er basiert auf einer kovalenten Bindung eines Effektors an Cys221 in Form eines Thiohemiketals als initialen Aktivierungsschritt. Dieses konnte in den regulatorischen Zentren aller mit Pyruvat, MAP und Pyruvamid kokristallisierten Strukturen gefunden werden. Die Ausbildung eines solchen Thiohemiketals an einer regulatorischen Bindungsstelle eines Enzyms konnte erstmals kristallographisch nachgewiesen werden. Als Folge dieser Interaktion, wird die flexible regulatorische Domäne mit der benachbarten α-Domäne verknüpft und somit fixiert. Dies ist wiederum die Ursache für die Fixierung und Neuanordnung des Loops 288-304 und anschließend des Loops 104-115. Aus den Kristallstrukturen geht hervor, dass die His115-Seitenkette nur im aktivierten Zustand nach der Reorganisation des Loops 104-115 mit dem Liganden und der 4'-Aminogruppe des Thiaminpyrophosphates wechselwirkt, wodurch das Aktivierungssignal letztlich bis zum Kofaktor übertragen werden kann. Infolge der Substrataktivierung sind die beiden Substratanaloga sowie Pyruvat im aktiven Zentrum der Kristallstrukturen kovalent am Kofaktor gebunden.

Mittels *SAXS*-Experimenten ließ sich eine globale Dimer-Dimer-Rotation von halbseitig geschlossen zu offen als unmittelbare Folge der Substrataktivierung nachweisen. Zudem konnten die Ergebnisse UV/VIS-photometrischer Messungen in Gegenwart von Pyruvat, MAP und Pyruvamid durch *SAXS*-Studien bestätigt werden.
6 Literaturverzeichnis

Ævarsson, A., Chuang, J. L., Wynn, R. M., Turley, S., Chuang, D. T. & Hol, W. G. J. (2000) Crystal structure of human branched-chain α-ketoacid dehydrogenase and the molecular basis of multienzyme complex deficiency in maple syrup urine disease architecture. *Structure*. **8**, 277-291.

Ævarsson, A., Seger, K., Turley, S., Sokatch, J. R. & Hol, W. G. (1999) Crystal structure of 2oxoisovalerate and dehydrogenase and the architecture of 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 785-791.

Alvarez, M. E., Rosa, A. L., Temporini, E. D., Wolstenholme, A., Panzetta, G., Patrito, L. & Maccioni H. J. F. (1993) The 59-kDa polypeptide constituent of 8-10-nm cytoplasmic filaments in *Neurospora crassa* is a pyruvate decarboxylase. *Gene* **130**, 253-258.

Alvarez, F. J. & Schowen, R. L. (1991) The kinetic consequences of the interaction of pyruvate decarboxylase with several analogs of the substrate. In *Biochemistry and Physiology of Thiamine diphosphate Enzymes*. Eds: Bisswanger, H. & Ullrich, J., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 59-66.

Arjunan, P., Nemeria, N., Brunskill, A., Chandrasekhar, K., Sax, M., Yan, Y., Jordan, F., Guest, J. R. & Furey, W. (2002) Structure of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex E1 component from *Escherichia coli* at 1.85 Å resolution. *Biochemistry* **41**, 5213-5221.

Arjunan, P., Umland, T., Dyda, F., Swaminathan, S., Furey, W., Sax, M., Farrenkopf, B., Gao, Y., Zhang, D. & Jordan, F. (1996) Crystal structure of the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 256, 590-600.

Arrhenius, S., (1889) Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Z. Phys. Chem.* **4**, 226-248.

Asztalos, P., Parthier, C., Golbik, R., Kleinschmidt, M., Hübner, G., Weiss, M. S., Friedemann, R., Wille, G. & Tittmann, K. (2007) Strain and near attack conformers in enzymic thiamin catalysis: X-ray crystallographic snapshots of bacterial transketolase in covalent complex with donor ketoses xylulose 5-phosphate and fructose 6-phosphate, and in noncovalent complex with acceptor aldose ribose 5-phosphate. *Biochemistry* **46**, 12037-12052.

Avery, O. T., MacLeod, C. M. & McCarty, M. (1944) Studies on the Chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of Transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *Journal of Experimental Medicine* **79**, 137-158.

Baburina, I., Dikdan, G., Guo, F., Tous, G. I., Root, B. & Jordan, F. (1998^a) Reactivity at the substrate activation site of yeast pyruvate decarboxylase: Inhibition by distortion of domain interactions. *Biochemistry* **37**, 10249-10255.

Baburina, I., Gao, Y., Hu, Z., Hohmann, S., Furey, W. & Jordan, F. (1994) Substrate activation of brewer's yeast pyruvate decarboxylase is abolished by mutation of cysteine 221 to serine. *Biochemistry* **33**, 5630-5635.

Baburina, I., Moore, D. J., Volkov, A., Kahyaoglu, A., Jordan, F. & Mendelsohn, R. (1996) Three of four cysteines, including that responsible for substrate activation, are ionized at pH 6.0 in yeast pyruvate decarboxylase: Evidence from Fourier transform infrared and isoelectric focusing studies. *Biochemistry* **35**, 5630-5635.

Baburina, I., Li, H., Bennion, B., Furey, W. & Jordan, F. (1998^b) Interdomain information transfer during substrate activation of yeast pyruvate decarboxylase: The interaction between cysteine 221 and histidine 92. *Biochemistry* **37**, 1235-1244.

Berthold, C. L., Moussatche, P., Richards, N. G. & Lindqvist, Y. (2005) Structural basis for activation of the thiamin diphosphate-dependent enzyme oxalyl-CoA decarboxylase by adenosine diphosphate. *J. Biol. Chem.* **280,** 41645-41654.

Bahar, M., Ballard, C., Cohen, S. X., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Esnouf, R. M.,
Keegan, R., Lamzin, V., Langer, G., Ledikov, V., Long, F., Meier, C., Muller, A., Morshodov, G. N.,
Perrakis, A., Siebold, C., Stein, N., Turkenburg, M. G. W., Vagin, A. A., Winn, M., Winter, G. & Wilson,
K. S. (2006) SPINE workshop on automated X-ray analysis: a progress report. *Acta Crystallogr. D* 62, 1170-1183.

Berthold, C. L., Gocke, D., Wood, M. D., Leeper, F. J., Pohl, M. & Schneider, G. (2007) Structure of the branched-chain keto acid decarboxylase (KdcA) from *Lactococcus lactis* provides insights into the structural basis for the chemoselective and enantioselective carboligation reaction. *Acta crystallogr. D* **63**, 1217-1224.

Boiteux, A. & Hess, B. (1970) Allosteric properties of yeast pyruvate decarboxylase. *FEBS Lett.* 9, 293-296.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

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.

Bringer-Meyer, S., Schimz, K. L. & Sahm, H. (1986) Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterisation. *Arch. Microbiol.* **146**, 105-110.

Caines, M. E., Elkins, J. M., Hewitson, K. S. & Schofield, C. J. (2004) Crystal structure and mechanistic implications of N2-(2-carboxyethyl) arginine synthase, the first enzyme in the clavulanic acid biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 5685-5692.

Chabriere, E., Charon, M. H., Volbeda, A., Pieulle, L., Hatchikian, E. C. & Fontecilla-Camps, J. C. (1999) Crystal structures of the key anaerobic enzyme pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, free and in complex with pyruvate. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 182-190.

Chipman, D., Barak, Z. & Schloss, J. V. (1998) Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**, 401-419.

Ciszak, E. M., Korotchkina, L. G., Dominiak, P. M., Sidhu, S. & 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.

Collaborative Computational Project Number 4 (1994) *CCP4* suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* **50**, 760-763.

Crosby, J. & Lienhard, G. E. (1970) Mechanism of thiamine-catalyzed reactions. A kinetic analysis of the decarboxylation of pyruvate by 3,4-dimethylthiazolium ion in water and ethanol. *J. Amer. Chem. Soc.* **92,** 5707-5716.

Davies, D. D. (1967) Glyoxylate as a substrate for PDC. Biochem. J. 104, 50.

Diefenbach, R. J. & Duggleby, R. G. (1991) Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Structure and re-activation of apoenzyme by the cofactors thiamin diphosphate and magnesium ion. *Biochem. J.* **276**, 439-445.

Dietrich, A. (2001) Native und rekombinante Pyruvatdecarboxylase aus *Pisum sativum* -Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Struktur und Funktion. Dissertation, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*

Dietrich, A. & König, S. (1997) Substrate activation behaviour of pyruvate decarboxylase from *Pisum sativum* cv. Miko. *FEBS Lett.* **400**, 42-44.

Dobritzsch, **D.** (1998) Untersuchungen zur Struktur und Funktion von Pyruvatdecarboxylasen aus einem Brauhefereinzuchtstamm und aus dem Bakterium *Zymomonas mobilis*. Dissertation, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.

Dobritzsch, D., König, S., Schneider, G. & Lu, G. (1998) High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Implications for substrate activation in pyruvate decarboxylases. *J. Biol. Chem.* **273**, 20196-20204.

Dyda, F., Furey, W., Swaminathan, S., Sax, M., Farrenkopf, B. & Jordan, F. (1993) Catalytic centers in the thiamin diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4-Å resolution. *Biochemistry* **32,** 6165-6170.

Eberhardt, I., Cederberg, H., Li, H., König, S., Jordan, F. & Hohmann, S. (1999) Autoregulation of yeast pyruvate decarboxylase gene expression requires the enzyme but not its catalytic activity. *Eur. J. Biochem.* **262,** 191-201.

Eijkman, C. (1896) Eine Beri Beri-ähnliche Krankheit der Hühner. Virchows Archiv 148, 523-532.

Eijkman, C. (1897) Ein Versuch zur Bekämpfung der Beri-Beri. Virchows Archiv 149, 187-194.

Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) COOT: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D* 60, 2126-2132.

Erixon, K. M., Dabalos, C. L. & Leeper, F. J. (2007) Inhibition of pyruvate decarboxylase from *Z. mobilis* by novel analogues of thiamine pyrophosphate: investigating pyrophosphate mimics. *Chem. Commun.* **2007**, 960-962.

Ermer, J. (1988) Beiträge zur Untersuchung von Transition-State-Strukturen enzymkatalysierter Reaktionen am Beispiel der Pyruvatdecarboxylase. Lösungsmittel-Isotopieeffekte und pL-Abhängigkeit der kinetischen Parameter der Enzym-Aktivierung und -Katalyse. Dissertation, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*

Fiebig, J. (2008) Strukturelle und funktionelle Studien an der filamentbildenden Pyruvatdecarboxylase aus *Neurospora crassa*. Diplomarbeit, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.

Folco, H. D., Freitag, M., Ramón, A., Temporini, E. D., Alvarez, M. E., García, I., Scazzocchio, C., Selker, E. U. & Rosa, A. L. (2003) Histone H1 is required for proper regulation of pyruvate decarboxylase gene expression in *Neurospora crassa. Eukaryotic Cell* **2**, 341-350.

Frank, R. A. W., Titman, C. M., Pratap, V., Luisi, B. F. & Perham, R. N. (2004) A molecular switch and proton wire synchronize the active sites in thiamine enzymes. *Science* **306**, 872-876.

French, S. & Wilson, K. (1978) Treatment of negative intensity observations. *Acta Crystallogr. A* 34, 517-525.

Friedman, D. L. & Larner, J. (1963) Studies on UDPG- $_{\alpha}$ -glucan transglucosylase. III. Interconversion of two forms of muscle on UDPG- $_{\alpha}$ -glucan transglucosylase by a phosphorylation - dephosphorylation reaction sequence. *Biochemistry* **2**, 669-675.

Funk, C. (1911) On the chemical nature of the substance which cures polyneuritis in birds induced by a diet of polished rice. *J. Physiol.* **43**, 395-400.

Funk, C. (1912) The preparation from yeast and certain foodstuffs of the substance the deficiency of which in diet occasions polyneuritis in birds. *J. Physiol.* **45**, 75-81.

Furey, W., Arjunan, P., Chen, L., Dyda, F., Umland, T., Swaminathan, S., Sax, M., Jordan, F., Farrenkopf, B., Gao, Y. & Zhang, D. (1996) Multiple modes of tetramer assembly and insight into allosteric activation revealed by X-ray crystal structures of pyruvate decarboxylase. In *Biochemistry and Physiology of Thiamine diphosphate Enzymes.* Eds: Bisswanger, H. & Schellenberger, A., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, pp. 103-124.

Furey, W., Arjunan, P., Chen, L., Sax, M., Gou, F. & Jordan, F. (1998) Structure-function relationships and flexible tetramer assembly in pyruvate decarboxylase revealed by analysis of crystal structures. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**, 253-270.

Gerhardt, S., Echt, S., Busch, M., Freigang, J., Auerbach, G., Bader, G., Martin, W. F., Bacher, A., Huber, R. & Fischer, M. (2003) Structure and properties of an engineered transketolase from maize. *Plant Phys.* **132**, 1941-1949.

Gocke, D., Nguyen, C. L., Pohl, M., Stillger, T., Walter, L. & Müller, M. (2007) Branched-chain keto acid decarboxylase from *Lactococcus lactis* (KdcA), a valuable thiamine diphosphate-dependent enzyme for asymmetric C-C bond formation. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1425-1435.

Guo, F., Zhang, D., Kahyaoglu, A., Farid, R. & Jordan, F. (1998) Is a hydrophobic amino acid required to maintain the reactive v conformation of thiamin at the active center of thiamin diphosphate-requiring enzymes? Experimental and computational studies of isoleucine 415 of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* **37**, 13379-13391.

Haedo, S. D., Temporini, E. D., Alvarez, M. E., Maccioni, H. J. F. & Rosa, A. L. (1992) Molecular cloning of a gene (cfp) encoding the cytoplasmic filament protein p59Nc and its genetic relationship to the *snowflake* locus of *Neurospora crassa*. Genetics **131**, 575-580.

Hasson, M. S., Muscate, A., Henehan, G. T. M., Guidinger, P. T., Petsko, G. A., Ringe, D. & Kenyon, G. L. (1995) Purification and crystallization of benzoylformate decarboxylase. *Protein Science* **4**, 955-959.

Hasson, M. S., Muscate, A., McLeish, M. J., Polovnikova, L. S., Gerlt, J. A., Kenyon, G. L., Petsko, G. A. & 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.

Hawkins, C. F., Borges, A. & Perham, R. N. (1989) A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett.* **255**, 77-82.

Hershey, A. D. & Chase, M. (1952) Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *Journal of General Physiology* **36**, 39-56.

Holloway, P. & Subden, R. E. (1993) The isolation and nucleotide sequence of the pyruvate decarboxylase gene from *Kluyveromyces marxianus*. *Curr. Genet.* **24**, 274-277.

Holzer, H. & Goedde, H. W. (1957) Oxydation von α-Ketosäuren und einigen Aldehyden mit Pyruvatdecarboxylase aus Hefe. *Biochem. Z.* **329**, 192-208.

Holzer, H., Schultz, G., Villar-Palasi, C. & Jüntgen-Sell, J. (1956) Isolierung der Hefecarboxylase und Untersuchungen über die Aktivität des Enzyms in lebenden Zellen. *Biochem. Z.* **327**, 331-344.

Hübner, G. (1966) Beiträge zum Rekombinations- und Funktionsmechanismus der Hefe-Pyruvatdecarboxylase. Dissertation, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*

Hübner, G., Fischer, G. & Schellenberger, A. (1970) Zur Theorie der Thiaminpyrophosphatwirkung, XI. Über den Einfluß von Carbonylverbindungen auf die Geschwindigkeit der Hefe-PDC-Reaktion. *Z. Chem.* **10**, 436-437.

Hübner, G., König, S. & Schellenberger, A. (1988) The functional role of thiol groups of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biomed. Biochim. Acta* **47**, 9-18.

Hübner, G., König, S., Schellenberger, A. & Koch M. H. J. (1990) An X-ray solution scattering study of the cofactor and activator induced structural changes in yeast pyruvate decarboxylase (PDC). *FEBS Lett.* **266**, 17-20.

Hübner, G. & Schellenberger, A. (1970) Zur Theorie der Thiaminpyrophosphat-Wirkung. X. Untersuchungen zum Mechanismus der Produkthemmung bei der Pyruvat-Decarboxylase-Reaktion. *Hoppe-S. Z. Physiol. Chem.* **351**, 1435-1440.

Hübner, G., Weidhase, R. & Schellenberger, A. (1978) The mechanism of substrate activation of pyruvate decarboxylase: a first approach. *Eur. J. Biochem.* **92**, 175-181.

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

Jelsch, C., Teeter, M. M., Lamzin, V., Pichon-Pesme, V., Blessing, R. H. & Lecomte, C. (2000) Accurate protein crystallography at ultra-high resolution: Valence electron distribution in crambin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3171-3176.

Jordan, F., Liu, M., Sergienko, E., Zhang, Z., Brunskill, A., Arjunan, P. & Furey, W. (2004) Yeast pyruvate decarboxylases: New features of the structure and mechanism. In *thiamine - catalytic mechanisms in normal and disease state*. Eds: Jordan, F. & Patel, M. S., Marcel Dekker Inc., New York, 173-215.

Jordan, F., Nemeria, N., Guo, F., Baburina, I., Gao, Y., Kahyaoglu, A., Li, H., Wang, J., Yi, J., Guest, J. R. & Furey, W. (1998) Regulation of thiamin diphosphate-dependent 2-oxo acid decarboxylases by substrate and thiamin diphosphate. Mg(II) - evidence for tertiary and quaternary interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**, 287-306.

Joseph, E., Wei, W., Tittmann, K. & Jordan F. (2006) Function of a conserved loop of the β -domain, not involved in thiamin diphosphate binding, in catalysis and substrate activation in yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* **45**, 13517-13527.

Kellermann, E., Seeboth, P. G. & Hollenberg C. P. (1986) Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (*PDC1*) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* **14**, 8963-8977.

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

Killenberg-Jabs, M. (1997) Untersuchungen zum Katalysemechanismus, zu Stabilität und Faltung rekombinanter Hefe-Pyruvatdecarboxylase. Dissertation, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*

Killenberg-Jabs, M., Jabs, A., Lilie, H., Golbik, R. & Hübner, G. (2001) Active oligomeric states of pyruvate decarboxylase and their functional characterization. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1698-1704.

Koga, J., Adachi, T. & Hidaka, H. (1992) Purification and characterisation of indolepyruvate decarboxylase. A novel enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.* **267**, 15823-15828.

König, S. & Koch, M. H. J. (1998) The effect of high protein concentrations on the pH-dependent scattering behaviour of the enzyme pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Hasylab Ann. Rep.* pp. 909-910.

König, S., Krieger, F., Svergun, D. I. & Koch, M. H. J. (2000^a) First preliminary SAXS studies on pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis*. *Hasylab Ann. Rep.* pp. 2736-2737.

König, S., Spinka, M., Seliger, B., Golbik, R., Hübner, G. & Koch, M. H. J. (2004) Conformational changes of pyruvate decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae* after binding an inactive cofactor analogue and substrate. *Hasylab Ann. Rep.* pp. 12072-12073.

König, S., Spinka, M., Seliger, B., Svergun, D. I. & Koch, M. H. J. (2000^b) SAXS studies on the subunit association behaviour of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast in its apo and holo-form. *Hasylab Ann. Rep.* pp. 2630-2631.

König, S., Svergun, D. I., Koch, M. H. J., Hübner, G. & Schellenberger, A. (1992) Synchrotron radiation solution X-ray scattering study of the pH dependence of the quaternary structure of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* **31**, 8726-8731.

König, S., Svergun, D. I., Koch, M. H. J., Hübner, G. & Schellenberger, A. (1993) The influence of effectors of yeast pyruvate decarboxylase (PDC) on the conformation of the dimers and tetramers and their pH-dependent equilibrium. *Eur. Biophys. J.* **22**, 185-194.

König, S., Svergun, D. I., Volkov, V. V., Feigin, L. A. & Koch, M. H. J. (1998) Small-angle X-ray solution scattering studies on ligand-induced subunit interactions of the thiamine diphosphate enzyme pyruvate decarboxylase from different organisms. *Biochemistry* **37**, 5329-5334.

König, S., Weidner, A., Tittmann, K., Hübner, G. & Koch, M. H. J. (2004) Effects of ligand binding on the non-activated and chymotrypsin-activated form of pyruvate oxidase from *Escherichia coli*. *Hasylab Ann. Rep.* pp. 12062-12063.

Krieger, F. (2000) Isolierung und Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase aus *Kluyceromyces lactis*. Diplomarbeit, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.

Krieger, F., Spinka, M., Golbik, R., Hübner, G. & König, S. (2002) Pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis*. An enzyme with an extraordinary substrate activation behaviour. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3256-3263.

Kutter, S. (2004). Funktionelle und strukturelle Untersuchungen zum Einfluss der Enzymkonzentration auf die Pyruvatdecarboxylasen aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces lactis*. Diplomarbeit, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.

Kutter, S., Spinka, M., Koch M. H. J. & König, S. (2007) The influence of protein concentration on oligomer structure and catalytic function of two pyruvate decarboxylases. *Protein J.* **26**, 585-591.

Kutter, S., Wille, G., Relle, S., Weiss, M. S., Hübner, G. & König, S. (2006) The crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis*. Implications for the substrate activation mechanism of this enzyme. *FEBS J.* **273**, 4199-4209.

Lämmli, U. K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Langenbeck, W. (1932) Fermentproblem und organische Katalyse. Angewandte Chemie 45, 97-99.

Lehmann, H., Fischer, G., Hübner, G., Kohnert, K.-D. & Schellenberger, A. (1973) The influence of steric and electronic parameters on the substrate behaviour of α -oxo acids to yeast pyruvate decarboxylase. *Eur. J. Biochem.* **32**, 83-87.

Li, H., Furey, W. & Jordan, F. (1999) Role of glutamate 91 in information transfer during substrate activation of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* **38**, 9992-10003.

Li, H. & Jordan, F. (1999) Effects of substitution of tryptophan 412 in the substrate activation pathway of yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* **38**, 10004-10012.

Lindqvist, Y., Schneider, G., Ermler, U. & Sundström, M. (1992) Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* **11**, 2373-2379.

Lineweaver, H. & Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* **56**, 658-666.

Liu, M., Sergienko, E. A., Guo, F., Wang, J., Tittmann, K., Hübner, G., Furey, W. & Jordan, F. (2001) Catalytic acid-base groups in yeast pyruvate decarboxylase. 1. Site-directed mutagenesis and steadystate kinetic studies on the enzyme with the D28A, H114F, H115F, and E477Q substitutions. *Biochemistry* **40**, 7355-7368.

Lohkamp, B., Emsley, P. & Cowtan, K. (2005) Coot News. CCP4 Newsletter 42, Contribution 7.

Lohmann, K. & Schuster, P. (1937) Untersuchungen über die Cocarboxylase. *Biochem. Z.* 294, 188-214.

Lu, G., Dobritzsch, D., Baumann, S., Schneider, G. & König, S. (2000) The structural basis of substrate activation in yeast pyruvate decarboxylase. A crystallographic and kinetic study. *Eur. J. Biochem.* **267**, 861-868.

Lu, G., Dobritzsch, D., König, S. & Schneider, G. (1997) Novel tetramer assembly of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast observed in a new crystal form. *FEBS Lett.* **403**, 249-253.

Magat Juan, E. C., Hoque, M. M., Hossain, M. T., Yamamoto, T., Imamura, S., Suzuki, K., Sekiguchi, T. & Takénaka, A. (2007) The structures of pyruvate oxidase from *Aerococcus viridans* with cofactors and reaction intermediate reveal the flexibility of the active-site tunnel for catalysis. *Acta Crystallogr. F* 63, 900-907.

McCourt, J. A., Pang, S. S., King-Scott, J., Guddat, L. W. & Duggleby, R. G. (2006) Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *Proc. Nat.Acad. Sci. USA* **103**, 569-573.

Michaelis, L. & Menten, M. L. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z. 49, 333-369.

Minton, A. P. (2000) Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 34-39.

Mosbacher, **T. G.**, Mueller, M. & Schulz, G. E. (2005) Structure and mechanism of the ThDPdependent benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*. *FEBS J.* **272**, 6067-6076.

Mücke, **U.**, König, S. & Hübner, G. (1995) Purification and characterisation of pyruvate decarboxylase from pea sees (*Pisum sativum* cv. miko). *Biol. Chem. Hoppe-S.* **376**, 111-117.

Muller Y. A., Lindqvist, Y., Furey, W., Schulz, G. E., Jordan, F. & 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.

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

Müller-Dieckmann, J. (2006) The open-access high-throughput crystallization facility at EMBL Hamburg, *Acta Crystallogr. D* 62, 1446-1452.

Nakai, T., Nakagawa, N., Maoka, N., Masui, R., Kuramitsu, S. & Kamiya N. (2004) Ligand-induced conformational changes and a reaction intermediate in branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase (E1) from *Thermus thermophilus* HB8, as revealed by X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* **337**, 1011-1033.

Neale, A. D., Scopes, R. K., Wettenhall, R. E. H. & Hoogenraad, N. J. (1987) Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: Isolation, properties, and genetic expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 169, 1024-1028.

Neuberg, C. & Karczag, L. (1911) Über zuckerfreie Hefegärung, IV. Carboxylase ein neues Enzym der Hefe. *Biochem Z.* **36**, 68-75.

O'Brien, T. A., Kluger, R., Pike, D. C. & Gennis, R. B. (1980) Phosphonate analogues of pyruvate. Probes of substrate binding and other thiamin pyrophosphate-dependent decarboxylases *Biochim. Biophys. Acta* **613**, 10-17.

Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth. Enzymol.* **276**, 307-326.

Pang, S. S., Duggleby, R. G. & Guddat, L. W. (2002) Crystal structures of Yeast acetohydroxyacid synthase: A target for herbicidal inhibitors. *J. Biol. Chem.* **317,** 249-262.

Pang, S. S., Duggleby, R. G., Schowen, R. L. & Guddat, L. W. (2004) The crystal structures of *Klebsiella pneumoniae* acetolactate synthase with enzyme-bound cofactor and with an unusual intermediate. *J. Biol. Chem.* **279**, 2242-2253.

Patzlaff, A. (1996) Untersuchungen zur Untereinheitstruktur der Pyruvatdecarboxylase aus Brauhefe. Diplomarbeit, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*

Pletcher, J. & Sax, M. (1972) Crystal and molecular structure of thiamine pyrophosphate hydrochloride. *J. Amer. Chem. Soc.* **94**, 3998-4005.

Pohl, M., Grötzinger, 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., Mesch, K., Rodenbrock, A. & Kula, M.-R. (1995) Stability investigations on the pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **22**, 95-105.

Risse, B., Stempfer, G., Rudolph, R., Mollering, H. & Jaenicke, R. (1992) Stability and reconstitution of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*: Dissection of the stabilizing effects of coenzyme binding and subunit interaction. *Protein Sci.* **1**, 1699-1709.

Rosa, A. L., Alvarez, M. E., Lawson, D. & Maccioni, H. J. F. (1990^a) A polypeptide of 59 kDa is associated with bundles of cytoplasmic filaments in *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* **268**, 649-655.

Rosa, A. L., Peralta-Soler, A. & Maccioni, H. J. F. (1990^b) Purification of P59Nc and immunocytochemical studies of the 8- to 10-nm cytoplasmic filaments from *Neurospora crassa*. *Experimental mycology* **14**, 360-371.

Rössle, M. W., Klaering, R., Ristau, U., Robrahn, B., Jahn, D., Gehrmann, T., Konarev, P., Round, A., Fiedler, S., Hermes, C. & Svergun, D. (2007) Upgrade of the small-angle X-ray scattering beamline X33 at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg. *J. Appl. Cryst.* **40**, s190-s194.

Schellenberger, A. (1967¹) Struktur und Wirkungsweise des aktiven Zentrums der Hefe-Pyruvatdecarboxylase. *Angew. Chem.* **23**, 1050-1061.

Schellenberger, A. (1967²) Structure and mechanism of action of the active center of yeast pyruvate decarboxylase. *Angew. Chem. Internat. Edit.* **6**, 1024-1035.

Schellenberger, A. (1998) Sixty years of thiamin diphosphate biochemistry. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**, 177-186.

Schmitt, H. D., Ciriacy, M. & Zimmermann, F. K. (1983) The synthesis of yeast pyruvate decarboxylase is regulated by large variations in the messenger RNA level. *Mol. Gen. Genet.* **192**, 247-252.

Schütz, A., Sandalova, T., Ricagno, S., Hübner, G., König, S. & Schneider, G. (2003) Crystal structure of thiamindiphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2312-2321.

Sergienko, E. A. & Jordan, F. (2001^a) Catalytic acid-base groups in yeast pyruvate decarboxylase. 2. Insights into the specific roles of D28 and E477 from the rates and stereospecificity of formation of carboligase side products. *Biochemistry* **40**, 7369-7381.

Sergienko, E. A. & Jordan, F. (2001^b) Catalytic acid-base groups in yeast pyruvate decarboxylase. 3. A steady-state kinetic model consistent with the behavior of both wild-type and variant enzymes at all relevant pH values. *Biochemistry* **40**, 7382-7403.

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

Spaepen, S., Versées, W., Gocke, D., Pohl, M., Steyaert, J. & Vanderleyden, J. (2007) Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **189**, 7626-7633. Stoppani, A. O. M., Actis, A. S., Deferrari, J. O. & Gonzalez, E. L. (1952) Essential role of thiol groups in carboxylase. *Nature* **170**, 842-843.

Svergun, D. I., Barberato, C. & Koch, M. H. J. (1995) *CRYSOL* - a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Cryst.* **28**, 768-773.

Svergun, D. I., Petoukhov, M. V., Koch, M. H. J. & König, S. (2000) Crystal *versus* solution structures in thiamine diphosphate-dependent enzymes. *J. Biol. Chem.* **275**, 297-302.

Thompson-Coffe, C., Borioli, G., Zickler, D. & Rosa, A. L. (1999) Pyruvate decarboxylase filaments are associated with the cortical cytoskeleton of asci and spores over the sexual cycle of filamentous ascomycetes. *Fungal Genet. Biol.* **26**, 71-80.

Tittmann, K. (2000) Untersuchungen zu Katalysemechanismen von Flavin- und Thiamindiphosphatabhängigen Enzymen. Aktivierung von Thiamindiphosphat in Enzymen. Katalysemechanismus der Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum*. Dissertation, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.

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

Uhlemann, K. (2001) Die Rolle des Aspartat 28 von rekombinanter Pyruvatdecarboxylase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.

Ullrich, J. & Donner, I. (1970) Kinetic evidence for two active sites in cytoplasmic yeast pyruvate decarboxylase. *Hoppe-S. Z. Physiol. Chem.* **351**, 1026-1029.

unbekannte Autoren, Die Bibel, das alte Testament, 1. Buch Moses, 9. Noahs Fluch und Segen über seine Söhne, Vers 18-29.

van Urk, H., Schipper, D., Breedveld, G. J., Mak, P. R., Scheffers, W. A. & van Dijken, J. P. (1988) Localization and kinetics of pyruvate metabolizing enzymes in relation to aerobic alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621. *Biochim. Biophys. Acta* 992, 78-86.

Veitch, N. J., Maugeri, D. A., Cazzulo, J. J., Lindqvist, Y. & Barrett, M. P. (2004) Transketolase from *Leishmania mexicana* has a dual subcellular localization. *Biochem. J.* **382**, 759-767.

Versées, W., Speapen, S., Vanderleyden, J. & Steyaert, J. (2007^a) The crystal structure of phenylpyruvate decarboxylase from *Azospirillum brasilense* at 1.5 Å resolution. Implications for its catalytic and regulatory mechanism. *FEBS J.* **274,** 2363-2375.

Versées, W., Speapen, S., Wood, M. D. H., Leeper, F. J., Vanderleyden, J. & Steyaert, J. (2007^b) Molecular mechanism of allosteric substrate activation in a thiamine diphosphate-dependent decarboxylase. *J. Biol. Chem.* **282**, 35269-35278.

Wang, J., Golbik, R., Seliger, B., Spinka, M., Tittmann, K., Hübner, G. & Jordan, F. (2001) Consequences of a modified putative substrate-activation site on catalysis by yeast pyruvate decarboxylase. *Biochemistry* **40**, 1755-1763.

Wei, W., Liu, M. & Jordan, F. (2002) Solvent kinetic isotope effects monitor changes in hydrogen bonding at the active center of yeast pyruvate decarboxylase concomitant with substrate activation: The substitution at position 221 can control the state of activation. *Biochemistry* **41**, 451-461.

Weidner, A., Neumann, P., Wille, G., Stubbs, M. T. & Tittmann, K. (2008) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of full-length and proteolytically activated pyruvate oxidase from *Escherichia coli. Acta Crystallogr. F* **64**, 179-181.

Werther, T., Spinka, M., Tittmann, K., Schütz, A., Golbik, R., Mrestani-Klaus, C., Hübner, G. & König, S. (2008) Amino acids allosterically regulate the thiamine diphosphate-dependent α-keto acid decarboxylase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **283**, 5344-5354.

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

Wu, Y.-G., Chang, A. K., Nixon, P. F., Li, W. & Duggleby, R. G. (2000) Mutagenesis at Asp27 of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Effect on its ability to form acetoin and acetolactate. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6493-6500.

Xiang, S., Usunow, G., Lange, G., Busch, M. & Tong, L. (2007) Crystal structure of 1-deoxy-Dxylulose 5-phosphate synthase, a crucial Enzyme for isoprenoids biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 282, 2676-2682.

Zimmer, A. (2007) Strukturelle und kinetische Untersuchungen an Oxalyl-CoA Decarboxylase aus zwei Organismen. Diplomarbeit, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*

Tab. 11: Statistische Daten der gemessenen K	ristallstrukturen.											
Enzym	<i>KI</i> PDC	<i>KI</i> PDC	<i>KI</i> PDC	K/PDC1	ScPDC _{E477Q}	ScPDC _{D28A}	ScPDC _{E477Q}	ScPDC _{E477Q} ²	K/PDC ¹	ScPDC _{E477Q}	ScPDC _{D28A} ¹	ScPDC _{E477Q} ²
*			•	•	Datensammlu	ng			•			
Ligand (kokristallisiert)	1	1	MAP	Pyruvamid	Pyruvat	Pyruvat	Pyruvamid	Pyruvamid	1	Pyruvat	Pyruvat	Pyruvamid
Ligand (in Krvolösung)	1	/	/	Pvruvamid	Pvruvat	Pvruvat	Pvruvamid	Acetaldehyd	1	Pvruvat	Pvruvat	Acetaldehyd
Verweildauer in der Kryolösung in s	20-30	20-30	5-10	45	60	60	20	30	20-30	60	60	60
ndh ID	20-00	20-00 2\/KA	2\/ IV		2//K8	2\/K1	noch nicht	1	/	1	/	1
pablib	2011	2 114	2001	'	2 110	2 1 1	eingereicht	'	'	'	'	1
Beamline	X11. EMBL Ha	amburg	X12. EMBL	ID14-2.	ID14-2.	ID14-2.	X12, EMBL	X12, EMBL	X31. EMBL	ID14-2.	ID14-2.	X12. EMBL
	,		Hamburg	ESRF	ESRF	ESRF	Hamburg	Hamburg	Hamburg	ESRF	ESRF	Hamburg
				Grenoble	Grenoble	Grenoble				Grenoble	Grenoble	
Detektor	MARCCD		MARCCD	ADSC Q4R	ADSC Q4R	ADSC Q4R	MARCCD	MARCCD	MAR345	ADSC Q4R	ADSC Q4R	MARCCD
				CCD	CCD	CCD				CCD	CCD	
Wellenlänge in Å	0,8125		0,93001	0,933	0,933	0,933	1,0	1,0	1,0	0,933	0,933	1,0
Temperatur in K	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Kristall-Detektor-Abstand in mm	180		220	203	101	125	130	185	400	108	150	228
Rotation pro Bild in °	0,5		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Gesamtzahl der Bilder	531		437	360	360	360	367	382	221	360	360	362
Auflösung (max.) in Å	99,0-2,26	48,45-1,95	104,3-2,30	99,0-3,65	95,4-1,42	99,0-1,71	99,0-1,60	99,0-2,13	37,2-2,70	99,0-1,67	99,0-2,05	99,0-2,50
	(2,32-2,26)	(2,06-1,95)	(2,34-2,30)	(3,71-3,65)	(1,44-1,42)	(1,74-1,71)	(1,63-1,60)	(2,17-2,13)	(2,85-2,70)	(1,70-1,67)	(2,09-2,05)	(2,54-2,50)
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P3 ₂ 12	P2 ₁	P2 ₁	P1	P1	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P1
Einheitszellparameter in Å bzw. °	a=78,72	a=78,71	a=81,76	a=83,97	a=78,98	a=80,88	a=73,05	a=75,03	a=78,62	a=78,54	a=81,75	a=74,44
	b=203,09	b=203,18	b=135,77	b=83,97	b=190,51	b=141,31	b=79,22	b=79,50	b=203,38	b=190,27	b=140,91	b=78,15
	c=79,78	c=79,81	c=103,88	c=307,52	c=84,14	c=114,41	c=109,09	c=111,71	c=79,94	c=83,87	c=114,52	c=106,03
	α=90,00	α=90,00	α=90,00	α=90,00	α=90,00	α=90,00	α=89,23	α=89,25	α=90,00	α=90,00	α=90,00	α=84,36
	β=91,82	β=91,81	β=103,88	β=90,00	β=113,01	β=107,19	β=73,32	β=71,98	β=91,75	β=112,94	β=107,21	β=72,75
• • • • •	γ=90,00	γ=90,00	γ= 90,00	γ=120,00	γ=90,00	γ=90,00	γ=62,43	γ=61,85	γ=90,00	γ=90,00	γ=90,00	γ=60,92
Mosaizität	0,40	0,57	0,79	0,60	0,40	0,38	0,55	0,90	0,54	0,30	0,88	0,90
Gesamtzahl an Reflexionen	549432	665697	438157	137703	1523231	937903	498004	216940	148845	815953	546987	113581
einzigartige Reflexionen	114899	155315	100426	14203	427276	262151	260585	113617	51866	253500	154410	65403
Redundanz	4,8	4,3	4,4	9,7	4,4	3,6	1,9	1,9	2,9	3,2	3,5	1,7
I/σ (max. Auflösung)	20,2 (6,4)	11,5 (2,5)	9,6 (2,3)	13,2 (1,9)	22,5 (1,9)	17,5 (2,1)	19,0 (2,0)	13,7 (2,0)	6,6 (1,7)	16,8 (2,0)	14,2 (2,0)	9,3 (1,7)
Vollständigkeit des Datensatzes in % (max.	98,5 (95,5)	86,3 (80,6)	99,7 (99,9)	99,7 (100,0)	99,7 (99,8)	99,3 (99,2)	96,0 (91,6)	95,0 (84,8)	75,4 (74,3)	97,0 (93,1)	99,7 (99,7)	95,0 (92,7)
Autiosung)	74 (04 5)	10.0 (51.0)	110(015)	10.1 (00.0)	5.0 (00.0)	0.0 (57.4)	0.0 (00.0)	1 7 (01 0)	10 5 (50.0)	0.5 (10.0)	07(54.4)	7 5 (40 7)
R _{merge} in % (max. Autiosung)	7,1 (21,5)	10,2 (51,3)	14,8 (61,5)	16,1 (98,8)	5,3 (62,9)	6,8 (57,4)	3,9 (39,3)	4,7 (31,2)	18,5 (56,9)	6,5 (43,9)	8,7 (54,1)	7,5 (40,7)
R _{r.i.m.} in % (max. Auflosung)	8,0 (24,7)	11,6 (59,2)	16,8 (70,6)	17,0 (104,7)	hicht bestimmt	8,0 (68,0)	5,5 (55,2)	6,5 (43,4)	22,4 (71,1)	7,7 (52,3)	10,3 (64,1)	10,6 (57,6)
R _{p.i.m.} in % (max. Auflösung)	2,5 (11,8)	5,4 (29,0)	8,0 (34,3)	5,5 (34,3)	nicht bestimmt	4,2 (36,1)	3,8 (38,7)	4,5 (30,1)	12,5 (41,7)	4,1 (28,1)	5,4 (34,1)	7,5 (40,7)
B-Faktor aus Wilson-Plot in Å ²	28,3	19,9	29,7	75,5	17,6	20,8	20,3	38,3	38,6	19,9	29,1	46,2
Anzahl der PDC Oligomere in der	4	4	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4
asymmetrischen Einheit												
					Verfeinerung	1						
Auflösung (max.)	23,58-2,26	48,45-1,95	20,2-2,30	30,0-3,65	95,4-1,42	109,1-1,71	103,7-1,60	104,83-2,13	37,2-2,70	39,75-1,67	109,1-2,05	29,01-2,50
	(2,32-2,26)	(2,00-1,95)	(2,36-2,30)	(3,74-3,65)	(1,46-1,42)	(1,75-1,71)	(1,64-1,60)	(2,19-2,13)	(2,77-2,70)	(1,71-1,67)	(2,10-2,05)	(2,57-2,50)
genutzte Reflexionen	113636	147446	99345	13145	425935	260330	259466	112186	50634	252325	145604	52122
Gesamtzahl von nicht Wasserstoffatomen	18466	18656	18588	8672	19242	18994	18689	17936	17413	17430	16876	17599
Anzahl von Proteinatomen	16776	17227	17344	8672	17292	17280	17113	17292	17305	17292	16768	17296
Anzahl von Wassermolekülen	1582	1321	1048	0	1818	1558	1413	294	0	933	0	195
R _{cryst} in % (max. Auflösung)	15,8 (16,3)	18,0 (23,0)	15,4 (19,2)	37,3 (50,6)	18,1 (25,4)	19,1 (24,8)	18,1 (25,0)	22,3 (34,8)	17,2 (20,7)	20,0 (24,7)	20,1 (23,0)	17,0 (28,8)
R _{free} in % (max. Auflösung)	21,4 (27,0)	24,2 (29,0)	22,5 (30,5)	57,8 (56,8)	18,6 (26,7)	22,0 (27,6)	21,3 (29,3)	27,1 (43,2)	28,8 (35,9)	20,6 (25,7)	37,5 (48,1)	21,4 (50,4)
Gesamtzahl der Reflexionen für R _{free}	1161	7784	1006	1016	1068	1313	1070	1151	1030	1032	1004	1012
mittlere Fehlerquadratabweichung von der	0,015	0,019	0,025	0,057	0,013	0,018	0,015	0,045	0,033	0,013	0,055	0,026
idealen Bindungslänge in A												
mittlere Fehlerquadratabweichung vom	1,48	1,85	1,95	3,71	1,25	1,45	1,35	3,44	2,91	1,47	4,53	2,48
Iueaien Bindungswinkel In *	02.5	00.7	90 F	47.0	01.2	00.0	01.0	92.6	95.0	01.2	60.1	01.0
Ramachandran Plot (am meisten favourisier- ter Bereich) in %	92,5	90,7	89,5	47,2	91,3	90,9	91,0	82,6	85,3	91,3	09,1	81,8
Ramachandran Plot (erlaubter Bereich) in %	99,9	99,6	99,8	97,7	100	100	99,9	99,8	99,6	99,9	98,0	99,6
durchschnittlicher B-Eaktor	24.5	22.1	26.3	104.8	18.9	20.9	24.0	50.9	19.3	18.8	25.9	37.1

¹ Nur regil body refinement und ein refinement-Zyklus. ² Vorläufiges Modell, Verfeinerung und Modellbildung noch nicht abgeschlossen.



- Abb. 41: Differenzelektronendichte der gebundenen Liganden im regulatorischen Zentrum.
 - A: Pyruvat-aktivierte ScPDC_{D28A}; σ, 4,5.
 - B: Pyruvamid-aktivierte ScPDC_{E477Q}; σ , 4,0.
 - C: Methylacetylphosphonat-aktivierte K/PDC; σ , 4,5.



- Abb. 42: Differenzelektronendichte der gebundenen Liganden im aktiven Zentrum.
 - A: Pyruvat-aktivierte *Sc*PDC_{D28A}; σ, 4,5.
 - B: Pyruvamid-aktivierte ScPDC_{E477Q}; σ , 4,0.
 - C: Methylacetylphosphonat-aktivierte *KI*PDC; σ , 3,5.





Abb. 43: Vergleich des Abstandes der C_{α}-Atome nach der Superposition verschiedener Monomere (A, C, E, G, I, J) bzw. von β -Domänen (B, D, F, H) aus unterschiedlichen Hefe-PDC-Kristallstrukturen.

Abkürzungen: L1, Loop 104-115; L2, Loop 288-304; IL2, β - γ -Interdomänenloop; CT, C-terminaler Bereich

A, B: Vergleich der Untereinheiten A und D (schwarz), B und D (rot) sowie C und D (blau) der nativen *KI*PDC. Bezeichnung der Untereinheiten wie in Abb. 15B (S. 50). Zu beachten ist, dass sich der Loop 104-115 von Monomer B und die β -Domäne von Monomer A in der aktivierten Position befindet. Daher wird Monomer D in den weiteren Abbildungen als Referenz für den nativen Zustand genutzt.

C, D: Vergleich der beiden Untereinheiten der nativen ScPDC (Arjunan et al., 1996).

E, F: Vergleich von Monomer D der nativen *KI*PDC mit den beiden Untereinheiten der nativen *Sc*PDC (Arjunan *et al.*, 1996).

G, H: Vergleich von Monomer D der nativen *KI*PDC mit jeweils einem Monomer der MAPaktivierten *KI*PDC (schwarz), der Pyruvat-aktivierten *Sc*PDC_{D28A} (rot) bzw. der Pyruvataktivierten *Sc*PDC_{E477Q} (blau).

I: Vergleich von jeweils einem Monomer der Pyruvat-aktivierten $ScPDC_{D28A}$ mit der MAPaktivierten *KI*PDC (schwarz), der Pyruvat-aktivierten $ScPDC_{D28A}$ mit der Pyruvat-aktivierten $ScPDC_{E477Q}$ (rot) bzw. der MAP-aktivierten *KI*PDC mit der Pyruvat-aktivierten $ScPDC_{E477Q}$ (blau).

J: Vergleich eines Monomers der Pyruvat-aktivierten $ScPDC_{E477Q}$ mit Untereinheit A (schwarz), Untereinheit B (rot), Untereinheit C (blau) bzw. Untereinheit D (grau) der Pyruvamid-aktivierten $ScPDC_{E477Q}$. Zu beachten ist, dass bei der Pyruvamid-aktivierten $ScPDC_{E477Q}$ die β -Domäne von Monomer A nicht und von Monomer C partiell aktiviert ist sowie dass der Loop 104-115 von Monomer B nicht und von Monomer D partiell aktiviert vorliegt.

Ableitung der Glg. 4, 5, 9 und 10:

Für die Bindung des aktivierenden Liganden L an das Enzym E gilt:

$$E_{i} \stackrel{K_{a}}{\underset{k_{a}}{\leftarrow}} LE_{i} \stackrel{K_{a0}}{\underset{k_{a0}}{\leftarrow}} LE_{a} \stackrel{K_{1}}{\underset{k_{a1}}{\leftarrow}} LE_{a}L$$
Schema 4

Im Weiteren wird angenommen: Anteil der aktivierten Spezies $\left(\frac{LE_a + LE_aL}{E_0}\right)$ ist proportional zur Enzymaktivität bei Präinkubationsexperimenten (Glg. 5), zum Gyrationsradius (Glg. 9) und zum Anteil der offenen Form (Glg. 10).

Die aktivierten Enzymformen LE_a und LE_aL geben dabei abweichende Signale zu den inaktiven Spezies E_i und SE_i (hinsichtlich der (Anfangs)-Aktivität, des Gyrationsradius und des Anteils der offenen Form).

Im Folgenden werden die Gleichgewichtskonzentrationen der einzelnen Enzymspezies berechnet.

aus Schema 4 ergibt sich:

$$\frac{E_{i}}{E_{0}} = \frac{k_{-a} \cdot k_{-iso} \cdot k_{-1}}{\sum D}$$

$$\frac{LE_{i}}{E_{0}} = \frac{k_{a} \cdot k_{-iso} \cdot k_{-1} \cdot L}{\sum D}$$

$$\frac{LE_{a}}{E_{0}} = \frac{k_{a} \cdot k_{iso} \cdot k_{-1} \cdot L}{\sum D}$$

$$\frac{LE_{a}L}{E_{0}} = \frac{k_{a} \cdot k_{iso} \cdot k_{1} \cdot L^{2}}{\sum D}$$

 $\sum D = k_{-a} \cdot k_{-iso} \cdot k_{-1} + k_a \cdot k_{-iso} \cdot k_{-1} \cdot L + k_a \cdot k_{iso} \cdot k_{-1} \cdot L + k_a \cdot k_{iso} \cdot k_1 \cdot L^2$

Anhang IV

hieraus folgt:

$$\frac{\mathsf{LE}_{\mathsf{a}}}{\mathsf{E}_{\mathsf{0}}} = \frac{\mathsf{k}_{\mathsf{a}} \cdot \mathsf{k}_{\mathsf{iso}} \cdot \mathsf{k}_{-1} \cdot \mathsf{L}}{\mathsf{k}_{\mathsf{-a}} \cdot \mathsf{k}_{\mathsf{-iso}} \cdot \mathsf{k}_{-1} + \mathsf{k}_{\mathsf{a}} \cdot \mathsf{k}_{\mathsf{-iso}} \cdot \mathsf{k}_{-1} \cdot \mathsf{L} + \mathsf{k}_{\mathsf{a}} \cdot \mathsf{k}_{\mathsf{iso}} \cdot \mathsf{k}_{-1} \cdot \mathsf{L} + \mathsf{k}_{\mathsf{a}} \cdot \mathsf{k}_{\mathsf{iso}} \cdot \mathsf{k}_{1} \cdot \mathsf{L}^{2}}$$

$$LE_{a} = \frac{K_{1} \cdot E_{0} \cdot L}{K_{a} \cdot K_{iso} \cdot K_{1} + (1 + K_{iso}) \cdot K_{1} \cdot L + L^{2}}$$

sowie

$$\frac{\mathsf{LE}_{\mathsf{a}}\mathsf{L}}{\mathsf{E}_{\mathsf{0}}} = \frac{\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{1}}\cdot\mathsf{L}^{2}}{\mathsf{k}_{\mathsf{-a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{L}+\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{a}}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{a}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{iso}}\cdot\mathsf{k}_{\mathsf{-1}}\cdot\mathsf{k}}$$

$$LE_{a}L = \frac{E_{0} \cdot L^{2}}{K_{a} \cdot K_{iso} \cdot K_{1} + (1 + K_{iso}) \cdot K_{1} \cdot L + L^{2}}$$

so dass:

$$LE_{a} + LE_{a}L = \frac{E_{0} \cdot L^{2}}{K_{a} \cdot K_{iso} \cdot K_{1} + (1 + K_{iso}) \cdot K_{1} \cdot L + L^{2}} + \frac{K_{1} \cdot E_{0} \cdot L}{K_{a} \cdot K_{iso} \cdot K_{1} + (1 + K_{iso}) \cdot K_{1} \cdot L + L^{2}}$$
$$LE_{a} + LE_{a}L = \frac{K_{1} \cdot E_{0} \cdot L + E_{0} \cdot L^{2}}{K_{a} \cdot K_{iso} \cdot K_{1} + (1 + K_{iso}) \cdot K_{1} \cdot L + L^{2}}$$

und:

Anteil aktivierte Spezies =
$$\frac{LE_a + LE_aL}{E_0} = \frac{K_1 \cdot L + L^2}{K_a \cdot K_{iso} \cdot K_1 + (1 + K_{iso}) \cdot K_1 \cdot L + L^2}$$

zur Bestimmung der Halbsättigungskonzentration gilt:

Anteil aktivierte Spezies (L $\rightarrow \infty$) = 1

hieraus folgt:

$$L(S_{0,5}^{a}) = \frac{1}{2}$$

$$\frac{1}{2} = \frac{K_{1} \cdot S_{0,5}^{a} + S_{0,5}^{a^{2}}}{K_{a} \cdot K_{iso} \cdot K_{1} + (1 + K_{iso}) \cdot K_{1} \cdot S_{0,5}^{a} + S_{0,5}^{a^{2}}}$$

$$S_{0,5}^{a^{2}} + (1 - K_{iso}) \cdot K_{1} \cdot S_{0,5}^{a} - K_{a} \cdot K_{iso} \cdot K_{1} = 0$$

$$S_{0,5}^{a} = \frac{(1 - K_{iso}) \cdot K_{1}}{2} \pm \sqrt{\frac{((1 - K_{iso}) \cdot K_{1})^{2}}{4}} + K_{a} \cdot K_{iso} \cdot K_{1}$$

da K_a, K_{iso} und K₁ > 0 entfällt die negative Wurzel

hieraus folgt:

$$S_{0,5}^{\ a} = \frac{(1 - K_{iso}) \cdot K_{1}}{2} + \sqrt{\frac{((1 - K_{iso}) \cdot K_{1})^{2}}{4}} + K_{a} \cdot K_{iso} \cdot K_{1}$$

Temperaturabhängigkeit der Aktivierungsparameter:



- Abb. 44: Abhängigkeit des k_{obs}-Wertes von der Substratkonzentration bei verschiedenen Temperaturen (6 °C, Schwarz; 15 °C, rot; 25 °C, blau; 35 °C, grau). *Stopped-flow*-Messungen nach dem gekoppelten optischen Test (Holzer *et al.*, 1956) mit 15 μg *KI*PDC/ml. Fit nach Glg. 3. Messungen in 50 mM MES pH 6,0 mit 150 mM Ammoniumsulfat.
- Tab. 12: Temperaturabhängigkeit der spezifischen Aktivität und der Aktivierungskonstanten der Pyruvatdecarboxylase aus *Kluyveromyces lactis*.

Temperatur in	K _a in mM	k _{iso} in s ⁻¹	k₋ _{iso} in s⁻¹	K _m in mM	spezifische
°C					Aktivität in
					U/mg
6	76	0,24	0,013	0,54	7,7
15	118	0,49	0,026	0,56	11,4
25	139	1,2	0,073	0,81	38
35	104	1,6	0,19	0,79	52

Danke

Ich danke Prof. Dr. G. Hübner für die Möglichkeit, diese Arbeit in der AG Enzymologie verfassen zu können.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. S. König für das Überlassen des überaus interessanten Themas sowie der Unterstützung bei den SAXS-Messungen.

Bei Dipl.-Biochem. M. Spinka möchte ich mich für die Unterstützung bei den zahlreichen kinetischen Fragestellungen bedanken.

Dr. M. S. Weiss danke ich für die Synchrotronmesszeit am EMBL Hamburg sowie der der Hilfe bei der Auswertung der kristallographischen Daten. Auch bei Dr. G. Wille möchte ich für die Unterstützung bei der Auswertung der Kristallstrukturen bedanken.

Bei Dr. D. I. Svergun bedanke ich mich für die SAXS-Messzeit sowie der Möglichkeit 2006 am EMBO practical course on solution scattering from biological macromolecules teilzunehmen.

PD Dr. R. Golbik danke ich für die Synthese der beiden Substratanaloga Methylacetylphosphonat und Pyruvamid.

Biol.-Ing. (FH) B. Seliger, J. Brauer und den zahlreichen Praktikanten danke ich die für die technische Unterstützung.

Zudem möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Enzymologie und molekulare Enzymologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Steffen Kutter Anschrift: Lindenbreite 20 39326 Wolmirstedt Geburtsdatum: 26.9.1979 Geburtsort: Wolmirstedt Familienstand: ledig

<u>Bildungsweg</u>

1986-1990	Diesterweg-Schule Wolmirstedt
1990-1998	Kurfürst-Joachim-Friedrich-Gymnasium Wolmirstedt
1998-1999	Grundwehrdienst, Sanitätssoldat im 1 SPi Bataillon 801 Havelberg
1999-2004	Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2003-2004	Diplomarbeit
seit 2004	Promotionsstudent an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am In-
	stitut für Biochemie & Biotechnologie, Abteilung Enzymologie

weitere Tätigkeiten

6/2002-12/2002	Studentische Hilfskraft an der Max-Planck-Forschungsstelle Enzymologie der
	Proteinfaltung
5/2003-6/2003	Auslandsaufenthalt an der Umeå Universitet (Schweden), Kemiska Institutio-
	nen (Biokemi)
10/2004-11/2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Witten-
	berg am Institut für Biochemie & Biotechnologie, Abteilung Enzymologie

Fortbildungskurse

10/2006	EMBO practical course on solution scattering from biological macromole-
	cules
11/2006	3rd TID Workshop: Structural biology with synchrotron radiation

Vorträge auf internationalen Konferenzen

Kutter, S., Relle, S., Spinka, M., Wille, G., Weiss, M. S., Hübner, G. & König, S. (2005) The crystal structure of the pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis* - new implications for the substrate activation mechanism. 8th heart of Europe bio-crystallography meeting, Karlovy Vary (Tschechische Republik), 28.9.2005-1.10.2005.

Kutter, S., Weiss, M. S., Wille, G., Hübner, G. & König, S. (2008) Substrate activation of yeast pyruvate decarboxylases. 7th international conference on mechanism and physiology of thiamine, Wittenberg, 29.5.2008-1.6.2008.

Kutter, S., Wille, G., Weiss, M. S., Hübner, G. & König, S. (2007) Enzymes in motion. Substrate activation of yeast pyruvate decarboxylases. 10th heart of Europe bio-crystallography meeting, Bedlewo (Polen), 27.9.2007-29.9.2007.

Posterpräsentationen

Fiebig, **J.**, Kutter, S., Hause, G. & König, S. (2008) Catalytically active filaments - studies on pyruvate decarboxylase from *Neurospora crassa*. 7th international conference on mechanism and physiology of thiamine, Wittenberg, 29.5.2008-1.6.2008.

Kutter, S., Relle, S., Wille, G., Weiss, M. S., Spinka, M., Hübner, G. & König, S. (2006) The crystal structure of the pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis*. Implications for the substrate activation mechanism. 14. Jahrestagung. Deutsche Gesellschaft für Kristallographie, Freiburg (Breisgau), 3.4.2006-6.4.2006.

Kutter, S., Weiss, M. S., Wille, G., Hübner, G. & König, S. (2008) Enzymes in motion - substrate activation of yeast pyruvate decarboxylases. I. Crystal structures. 7th international conference on mechanism and physiology of thiamine, Wittenberg, 29.5.2008-1.6.2008; *Poster Award*.

Kutter, S., Weiss, M. S., Wille, G., Hübner, G. & König, S. (2008) Enzymes in motion - substrate activation of yeast pyruvate decarboxylases. II. Small angle X-ray solution scattering studies. 7th international conference on mechanism and physiology of thiamine, Wittenberg, 29.5.2008-1.6.2008.

Publikationsliste

1) begutachtete Veröffentlichungen

Kutter, S., Spinka, M., Koch, M. H. J. & König, S. (2007) The influence of protein concentration on oligomer structure and catalytic function of two pyruvate decarboxylases. *Protein J.* **26**, 585-591.

Kutter, S., Wille, G., Relle, S., Weiss, M. S., Hübner, G. & König, S. (2006) The crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis*. Implications for the substrate activation mechanism of this enzyme. *FEBS J.* **273**, 4199-4209.

2) nicht begutachtete Veröffentlichungen

König, S., Kutter, S., Hübner, G. & Koch, M. H. J. (2004) Structural studies on pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis*. *Hasylab Ann. Rep.* pp. 427-428.

Kutter, S., Golbik, R., Konarev, P., Svergun, D. I. & König, S. (2006) Determination of binding constants for activating ligands of pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis* using SAXS parameters. *Hasylab Ann. Rep.* pp. 319-320.

Kutter, S., Relle, S., Spinka, M., Wille, G., Weiss, M. S., Hübner, G. & König, S. (2005) The crystal structure of the pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis* - new implications for the substrate activation mechanism. *Materials Structure in Chemistry, Biology, Physics and Technology* **12**, 182-183.

Kutter, S., Relle, S., Wille, G., Weiss, M. S., Hübner, G. & König, S. (2005) The crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis*. *Hasylab Ann. Rep.* pp. 307-308.

Kutter, S., Round, A., Golbik, R. & König, S. (2007) Enzymes in motion. Substrate activation of pyruvate decarboxylases. *Hasylab Ann. Rep.* pp. 367-368.

Kutter, S., Wille, G., Golbik, R., Weiss, M. S. & König, S. (2007) Crystal structure of methyl acetylphosphonate activated pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis* - new aspects on the substrate activation of this enzyme. *Hasylab Ann. Rep.* pp. 97-98.

Kutter, S., Wille, G., Weiss, M. S. & König, S. (2006) The crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis*. Implications for the substrate activation mechanism of this enzyme. *Hasylab Ann. Rep.* pp. 229-230.

3) eingereicht

Kutter, S., Weiss, M. S., Wille, G., Golbik, R., Spinka, M. & König, S. Covalently bound substrate at the regulatory site triggers allosteric enzyme activation.

König, S., Spinka, M. & Kutter, S. Allosteric activation of pyruvate decarboxylases. A never-ending story?

Erklärung

Ich erkläre, dass ich diese Arbeit bisher weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel herangezogen habe. Die den genutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), den 12.12.2008